

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 13-252732-00000-0000

Fecha: 2013-10-24 15:00:23
Tra. 11 PATENTEIYII
Act. 411 PRESENTACION

Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Eve: 378 FASENACIONALI
Folios: 4

Industria y Comercio

SUPERINTENDENCIA

DELEGATURA DE PROPIEDAD INDUSTRIAL
DIRECCION DE NUEVAS CREACIONES

SOLICITUD DE PATENTE DE
INVENCION

TITULO: ANTICUERPOS TIPO RECEPTOR DE CÉLULAS T ESPECÍFICOS
PARA UN PÉPTIDO WT1 PRESENTADO POR HLA-A2

SOLICITANTE: MEMORIAL SLOAN-KETTERING CANCER CENTER

DIRECCIÓN: 1275 York Avenue, New York, New York 10065 Estados Unidos
de América

APODERADO: CARLOS R. OLARTE

BOGOTÁ 24 de octubre de 2013

P2013/000176

OLARTEM

OLARTE MOURE & ASO

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 13-252732-00000-0000

Fecha: 2013-10-24 15:00:23 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 4



PETITORIO - FORMULARIO UNICO DE SOLICITUD

PATENTE PCT

ENTRADA EN FASE NACIONAL

P2013/000176

SOLICITUD DE:

1

☒

Patente de Invención.

☐

Patente de Modelo de Utilidad.

☒

Capítulo I.

☐

Capítulo II.

2

SOLICITANTE
(71)

Nombre: MEMORIAL SLOAN-KETTERING
CANCER CENTER

Dirección: 1275 York Avenue, New York, New
York 10065 Estados Unidos de América.

Nacionalidad o Domicilio: Estadounidense

Lugar de Constitución: Estados Unidos

Teléfono: _____

Fax: _____

E-mail: _____

IDENTIFICACIÓN

C.C. ☐ NIT ☐

C.E. ☐ Otro ☐

Cual _____

Número _____

REPRESENTANTE
O APODERADO

Nombre: CARLOS R. OLARTE

Dirección: Carrera 5 No. 34-03, Bogotá

Teléfono: 601-7700 Fax: 601-7799

E-mail: office@olartemoure.com

IDENTIFICACIÓN

C.C. ☒ NIT ☐

C.E. ☐ Otro ☐

Cual _____

Número 79782747Bta
TP 74.295

INVENTOR (ES)
(72)

Nombre: VER PAGINA ADJUNTA

Dirección: VER PAGINA ADJUNTA

Nacionalidad o Domicilio: VER PAGINA ADJUNTA

5

PCT (86)

Solicitud Internacional No. PCT/US2012/031892 Fecha Abril 02, 2012

Publicación Internacional No. WO 2012/135854 A2 Fecha Octubre 04, 2012

6

Título (54) ANTICUERPOS TIPO RECEPTOR DE CÉLULAS T ESPECÍFICOS PARA
UN PÉPTIDO WT1 PRESENTADO POR HLA-A2

Clasificación Internacional (51) A61K 39/00

Prioridad

SI ☒ NO ☐

(33) País de Origen

US

US

(32) Fecha

Abril 01, 2011

Mayo 31, 2011

(31) Número de Solicitud

61/470,635

61/491,392

9

Comprobante de pago No. 13- Fecha _____



ANEXOS



Comprobante de pago de la tasa de presentación de la solicitud.



Documento que acredita la existencia y representación legal cuando el solicitante sea persona jurídica.



Poderes, si fuere el caso. Adjunto copia simple.



Documento de cesión del inventor al solicitante o a su causante.



Declaraciones. Declaración bajo la regla 4.17 (ii) del PCT.



Copia de la solicitud internacional. (Resumen, descripción, reivindicaciones, dibujos).



Traducción de la solicitud internacional al castellano. (Resumen, descripción, reivindicaciones, dibujos).



Copia del examen preliminar internacional efectuado por la Autoridad Internacional de Examen Preliminar (IPEA).



Traducción del examen preliminar internacional efectuado por la IPEA.



De ser el caso, copia del contrato de acceso.



De ser el caso, documento que acredite la licencia o autorización de uso de conocimientos tradicionales de las comunidades indígenas.



De ser el caso, certificado de depósito del material biológico.



Arte final 12 x 12.



De ser el caso, información sobre otras solicitudes de patente o títulos obtenidos en el extranjero por el mismo titular o su causante, relacionadas parcial o totalmente con la invención de esta solicitud.



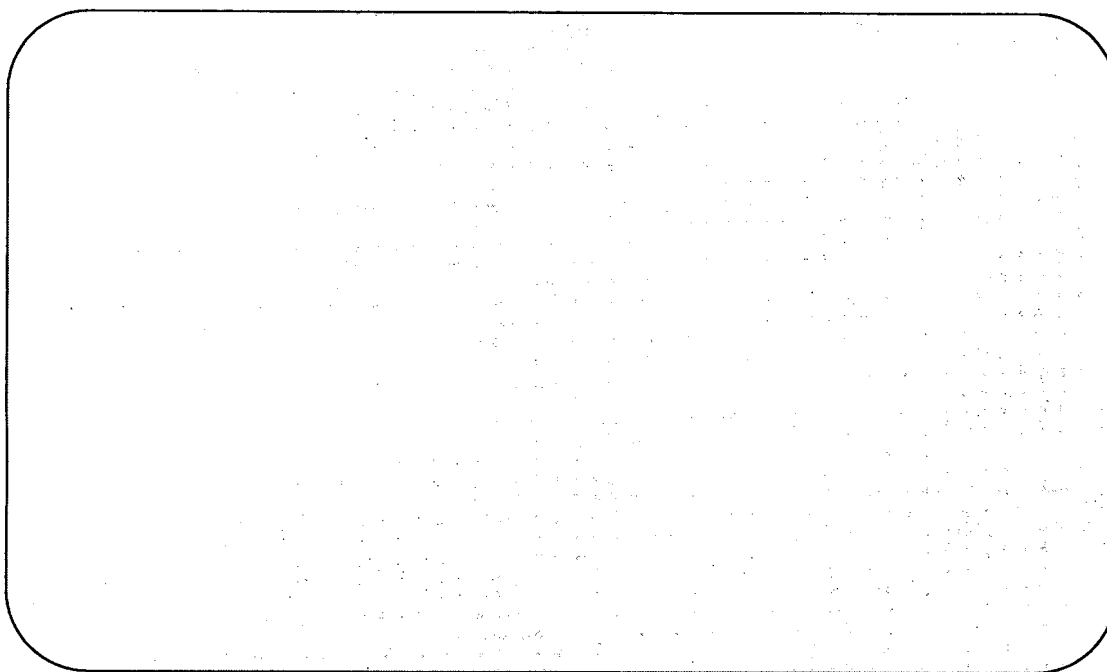
De ser el caso, modificaciones efectuadas a la solicitud internacional.



Otros. Búsqueda Internacional



FIGURA CARACTERÍSTICA:



Solicito la concesión de la patente,

NOMBRE: CARLOS R. OLARTE

FIRMA:

C.C. 79.782.747 Btá T.P. 74.295

LISTA DE INVENTORES

PCT/US2012/031892

David A. SCHEINBERG
325 Central Park West,
New York, New York 10025
Estados Unidos de América
Nacionalidad: Estadounidense

Tao DAO
245 East 87 Street,
Apt. 14F, New York,
New York 10128
Estados Unidos de América
Nacionalidad: Estadounidense

Cheng LIU
24 N. Hill Court, Oakland,
California 94618
Estados Unidos de América
Nacionalidad: Estadounidense

Su YAN
731 Partidge Lane, State College,
Pennsylvania 16803
Estados Unidos de América
Nacionalidad: China

4

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
NIT : 800.176.089-2
- / -



RECIBO DE CAJA

No. 13 - 107413

Bogotá D.C., Octubre 23 de 2013 - 16:31:55

RECIBIDO DE : OLARTE MOURE & ASOCIADOS NI 830.122.870

*** Soporte del Pago ***

TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PAGO	VR. PAGO
CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	522591171	23/10/2013	8.388.000.00

*** Conceptos Pagados ***

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	Vr.UNDITARIO	Vr.CONCEPTO
1	50005-01-01 SOLICITUDES	1 TRAMITES DE SOL. DE PATENTE DE INVENCIÓN	500.000.00	500.000.00
				\$500.000.00

SON: **QUINIENTOS MIL PESOS MONEDA CORRIENTE***

Responsable: 

Recibo de Caja Aplicado al Expediente No. _____

 Industria y Comercio SUPERINTENDENCIA		PLANILLA DE RADICACIÓN - DIGITALIZACIÓN DIARIA RELACIÓN DE ANEXOS	
Dependencia: 2020		Fecha: 13 / 10 / 24 AAAA MM DD	Recorrido: 3
Tipo de Radicación: Entrada: ☒ Salida: ☐ Traslado: ☐ Convenio: ☐			
Radicador:			Planilla:

ID	No. Radicación	Consecutivo	Item
1	13-252732	0	2
2			
3			
4			
5			
6			
7			
8			
9			
10			
11			
12			
13			
14			
15			
16			
17			

Item	Unidad de Conservación
1	Bolsa
2	Caja
3	Libro
4	Sobre
5	Tomo
6	Otro
Item	Soporte Documental
7	CD
8	Disquete
9	DVD
10	Folleto
11	Foto
12	Periódico
13	Plano
14	Publicación Periódica
15	USB
16	Otro

Observaciones:

El CD Anexo contiene un total de 8 Archivos
8 en formato pdf, las cuales fueron
procesados.

griselda

PATENTE DE INVENCION ☐

MODELO DE UTILIDAD ☐

Art 33 Decisión 486/00

☐

Indicación que se solicita una patente.

☐

Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud

☐

Descripción de la invención

☐

Dibujos de ser estos pertinentes

☐

Comprobante de pago de las tasas establecidas (De ser el caso formato de descuento)

Completa ☐

Incompleta ☐

PATENTE DE INVENCION PCT ☒

MODELO DE UTILIDAD PCT ☐

Art.33 Decisión 486/00, Circular Única

☒

Indicación que se solicita una PCT

☒

Copia de la solicitud en español, tal como fue presentada inicialmente (capítulo descriptivo, reivindicatorio, resumen)

☐

Dibujos de ser estos pertinentes

☒

Comprobante de pago de las tasas establecidas (de ser el caso formato de descuento)

Completa ☒

Incompleta ☐

DISEÑO INDUSTRIAL ☐

(Art. 119 Decisión 486/00)

☐

Indicación que se solicita Diseño industrial

☐

Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud

☐

Representación gráfica y fotográfica del Diseño industrial o muestra del material que incorpora el diseño

☐

Comprobante de pago de las tasas establecidas

Completa ☐

Incompleta ☐

ESQUEMA DE TRAZADO ☐

(Art. 92 Decisión 486/00)

☐

Indicación que se solicita un esquema de trazado

☐

Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud

☐

Representación gráfica de un esquema de trazado

☐

Comprobante de pago de las tasas establecidas

Completa ☐

Incompleta ☐

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 13-252732-00000-0000

Fecha: 2013-10-24 15:00:23 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 4

FIG2-F03 (2009-11-18)



OLARTEMOURE

OLARTE MOURE & ASOCIADOS LTDA.

Espacio reservado para el adhesivo de radicación.

PETITORIO - FORMULARIO ÚNICO DE SOLICITUD
PATENTE PCT

ENTRADA EN FASE NACIONAL

P2013/000176

SOLICITUD DE:

1

☒

Patente de Invención.

☐

Patente de Modelo de Utilidad.

☒

Capítulo I.

☐

Capítulo II.

2

SOLICITANTE
(71)

Nombre: MEMORIAL SLOAN-KETTERING
CANCER CENTER

Dirección: 1275 York Avenue, New York, New
York 10065 Estados Unidos de América.

Nacionalidad o Domicilio: Estadounidense

Lugar de Constitución: Estados Unidos

Teléfono: _____

Fax: _____

E-mail: _____

IDENTIFICACIÓN

C.C.

☐

NIT

☐

C.E.

☐

Otro

☐

Cual _____

Número _____

REPRESENTANTE
O APODERADO

Nombre: CARLOS R. OLARTE

Dirección: Carrera 5 No. 34-03, Bogotá

Teléfono: 601-7700 Fax: 601-7799

E-mail: office@olartemoure.com

IDENTIFICACIÓN

C.C.

☒

NIT

☐

C.E.

☐

Otro

☐

Cual _____

Número 79782747Bta

TP 74.295

INVENTOR (ES)
(72)

Nombre: VER PAGINA ADJUNTA

Dirección: VER PAGINA ADJUNTA

Nacionalidad o Domicilio: VER PAGINA ADJUNTA

5

PCT (86)

Solicitud Internacional No. PCT/US2012/031892

Fecha

Abril 02, 2012

Publicación Internacional No. WO 2012/135854 A2

Fecha

Octubre 04, 2012

6

Título (54) ANTICUERPOS TIPO RECEPTOR DE CÉLULAS T ESPECÍFICOS PARA
UN PÉPTIDO WT1 PRESENTADO POR HLA-A2

Clasificación Internacional (51) A61K 39/00

Prioridad

SI

☒

NO

☐

(33) País de Origen

US

US

(32) Fecha

Abril 01, 2011

Mayo 31, 2011

(31) Número de Solicitud

61/470,635

61/491,392

9

Comprobante de pago No. 13-

Fecha

10

ANEXOS

☒

Comprobante de pago de la tasa de presentación de la solicitud.

☐

Documento que acredita la existencia y representación legal cuando el solicitante sea persona jurídica.

☐

Poderes, si fuere el caso.

☐

Documento de cesión del inventor al solicitante o a su causante.

☐

Declaraciones.

☒

Copia de la solicitud internacional. (Resumen, descripción, reivindicaciones, dibujos).

☒

Traducción de la solicitud internacional al castellano. (Resumen, descripción, reivindicaciones, dibujos).

☒

Copia del examen preliminar internacional efectuado por la Autoridad Internacional de Examen Preliminar (IPEA).

☐

Traducción del examen preliminar internacional efectuado por la IPEA.

☐

De ser el caso, copia del contrato de acceso.

☐

De ser el caso, documento que acredite la licencia o autorización de uso de conocimientos tradicionales de las comunidades indígenas.

☐

De ser el caso, certificado de depósito del material biológico.

☐

Arte final 12 x 12.

☐

De ser el caso, información sobre otras solicitudes de patente o títulos obtenidos en el extranjero por el mismo titular o su causante, relacionadas parcial o totalmente con la invención de esta solicitud.

☐

De ser el caso, modificaciones efectuadas a la solicitud internacional.

☒

Otros. Búsqueda Internacional

11

FIGURA CARACTERÍSTICA:

12

Solicito la concesión de la patente,

NOMBRE: CARLOS R. OLARTE

FIRMA: _____

C.C. 79.782.747 Btá T.P. 74.295

LISTA DE INVENTORES

PCT/US2012/031892

David A. SCHEINBERG

325 Central Park West,
New York, New York 10025
Estados Unidos de América
Nacionalidad: Estadounidense

Tao DAO

245 East 87 Street,
Apt. 14F, New York,
New York 10128
Estados Unidos de América
Nacionalidad: Estadounidense

Cheng LIU

24 N. Hill Court, Oakland,
California 94618
Estados Unidos de América
Nacionalidad: Estadounidense

Su YAN

731 Partidge Lane, State College,
Pennsylvania 16803
Estados Unidos de América
Nacionalidad: China

(51) International Patent Classification:
A61K 39/00 (2006.01)(21) International Application Number:
PCT/US2012/031892(22) International Filing Date:
2 April 2012 (02.04.2012)

(25) Filing Language: English

(26) Publication Language: English

(30) Priority Data:
61/470,635 1 April 2011 (01.04.2011) US
61/491,392 31 May 2011 (31.05.2011) US(71) Applicant (for all designated States except US): **MEMORIAL SLOAN-KETTERING CANCER CENTER** [US/US]; 1275 York Avenue, New York, New York 10065 (US).

(72) Inventors; and

(75) Inventors/Applicants (for US only): **SCHEINBERG, David A.** [US/US]; 325 Central Park West, New York, New York 10025 (US). **DAO, Tao** [US/US]; 245 East 87 Street, Apt. 14F, New York, New York 10128 (US). **LIU, Cheng** [US/US]; 24 N. Hill Court, Oakland, California94618 (US). **YAN, Su** [CN/US]; 731 Partidge Lane, State College, Pennsylvania 16803 (US).(74) Agent: **DIAS, Kathy Smith**; Heslin Rothenberg Farley & Mesiti P.C., 5 Columbia Circle, Albany, New York 12203 (US).

(81) Designated States (unless otherwise indicated, for every kind of national protection available): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(84) Designated States (unless otherwise indicated, for every kind of regional protection available): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Eurasian (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK,

[Continued on next page]

(54) Title: ANTIBODIES TO CYTOSOLIC PEPTIDES

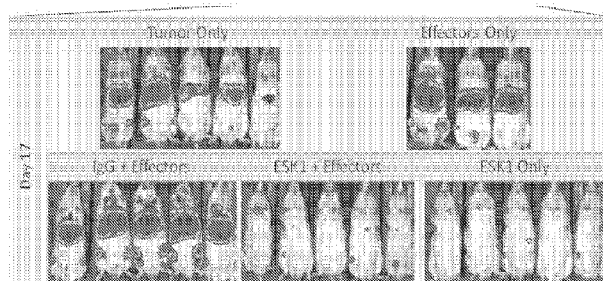
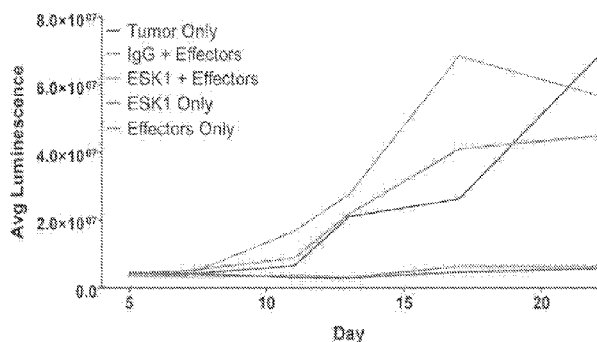


Figure 31

(57) Abstract: The present invention provides antigen binding proteins that specifically bind to Wilms' tumor protein (WT1), including humanized, chimeric and fully human antibodies against WT1, antibody fragments, chimeric antigen receptors (CARs), fusion proteins, and conjugates thereof. The antigen binding proteins and antibodies bind to HLA-A0201-restricted WT1 peptide. Such antibodies, fragments, fusion proteins and conjugates thereof are useful for the treatment of WT1 associated cancers, including for example, breast cancer, ovarian cancer, prostate cancer, chronic myelocytic leukemia, multiple myeloma, acute lymphoblastic leukemia (ALL), acute myeloid/myelogenous leukemia (AML) and myelodysplastic syndrome (MDS). In more particular embodiments, the anti-WT1/A antibodies may comprise one or more framework region amino acid substitutions designed to improve protein stability, antibody binding and/or expression levels.



SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, — *with sequence listing part of description (Rule 5.2(a))*
GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Published:

— *without international search report and to be republished
upon receipt of that report (Rule 48.2(g))*

ANTIBODIES TO CYTOSOLIC PEPTIDES

Cross-Reference to Related Applications

[0001] This application claims priority from U.S. Provisional Application No. 61/470,635, filed April 1, 2011, and U.S. Provisional Application No. 61/491,392 filed May 31, 2011. These Provisional Applications are hereby incorporated by reference in their entirety into the present disclosure.

Statement of Rights Under Federally-Sponsored Research

[0002] This invention was made with government support under grants P01CA23766 and R01CA55349 awarded by the U.S. National Institutes of Health. The government has certain rights in the invention.

Sequence Listing

[0003] This application contains a Sequence Listing, created on March 29, 2012; the file, in ASCII format, is designated 3314013AWO_Sequence Listing_ST25.txt . The file is hereby incorporated by reference in its entirety into the application

Technical Field

[0004] The present invention relates generally to antibodies against cytosolic proteins. More particularly, the invention relates to antibodies against Wilm's tumor oncogene protein (WT1), specifically antibodies that recognize a WT1 peptide in conjunction with a major histocompatibility antigen.

Background of the Invention

[0005] The Wilms' tumor oncogene protein (WT1) is an attractive target for immunotherapy for most leukemias and a wide range of cancers. WT1 is a zinc finger transcription factor that is normally expressed in mesodermal tissues during embryogenesis. In normal adult tissue, WT1 expression is limited to low levels in CD34⁺ hematopoietic stem cells but is over-expressed in leukemias of multiple lineages and a wide range of solid tumors (1-2). More recently, WT1 expression has been reported to be a marker of minimal residual disease. Increasing transcript

levels in patients with acute myeloid leukemia (AML) in morphologic remission have been predictive of overt clinical relapse (3, 4). Furthermore, antibodies to WT1 are detected in patients with hematopoietic malignancies and solid tumors, indicating that WT1 is a highly immunogenic antigen (7).

[0006] For the most part, clinically approved therapeutic monoclonal antibodies (mAbs) recognize structures of cell surface proteins. WT1, however, is a nuclear protein and, therefore, is inaccessible to classical antibody therapy. Up until now, immunotherapy targeting WT1 has been limited to cellular approaches, exclusively aimed at generating WT1-specific cytotoxic CD8 T cell (CTL) responses that recognize peptides presented on the cell surface by MHC class I molecules.

[0007] For induction of CTL responses, intracellular proteins are usually degraded by the proteasome or endo/lysosomes, and the resulting peptide fragments bind to MHC class I or II molecules. These peptide-MHC complexes are displayed at the cell surface where they provide targets for T cell recognition via a peptide-MHC (pMHC)-T cell receptor (TCR) interaction (8, 9). Vaccinations with peptides derived from the WT1 protein induce HLA-restricted cytotoxic CD8 T cells, which are capable of killing tumor cells.

[0008] To improve efficacy, cancer antigens can be targeted with monoclonal antibody therapy. Monoclonal antibody (mAb) therapy has been shown to exert powerful antitumor effects by multiple mechanisms, including complement-dependent cytotoxicity (CDC), antibody-dependent cellular cytotoxicity (ADCC) and direct cell inhibition or apoptosis-inducing effects on tumor cells that over-express the target molecules. Furthermore, mAb can be used as carriers to specifically deliver a cytotoxic moiety such as a radionuclide, cytotoxic drug or toxin to the tumor cells (18).

[0009] A tremendous benefit would exist if, in addition to a cellular immunotherapy approach, a humoral immunotherapy approach was available to target non-cell surface tumor antigens. Therefore, a monoclonal antibody (mAb) that mimics a T cell receptor in that it is specific for a target comprising a fragment of an intracellular protein in conjunction with an MHC molecule, for example, a WT1 peptide/HLA-A2 complex, would be a novel and effective therapeutic agent alone or as a vehicle

capable of delivering potent anti-cancer reagents, such as drugs, toxins and radioactive elements. Such mAbs would also be useful as diagnostic or prognostic tools.

Summary of the Invention

[0010] The present disclosure identifies and characterizes antigen-binding proteins, such as antibodies, that are able to target cytosolic/intracellular proteins, for example, the WT1 oncoprotein. The disclosed antibodies target a peptide/MHC complex as it would typically appear on the surface of a cell following antigen processing of WT1 protein and presentation by the cell. In that regard, the antibodies mimic T-cell receptors in that the antibodies have the ability to specifically recognize and bind to a peptide in an MHC-restricted fashion, that is, when the peptide is bound to an MHC antigen. The peptide/MHC complex recapitulates the antigen as it would typically appear on the surface of a cell following antigen processing and presentation of the WT1 protein to a T-cell.

[0011] The antibodies disclosed specifically recognize and bind to epitopes of a peptide/HLA-A2 complex, particularly a WT1/HLA-A0201 complex. Examples of peptides that are recognized by the antigen-binding proteins of the invention as part of an HLA-peptide complex include, but are not limited to, those shown in Table 7, for example, a peptide with the amino acid sequence RMFPNAPYL (SEQ ID NO: 1.)

[0012] In one aspect, therefore, the invention relates to an isolated antibody, or antigen-binding fragment thereof, that binds to a peptide with the amino acid sequence, RMFPNAPYL, when said peptide is bound to an MHC antigen, such as HLA-A2.

[0013] In another aspect, the invention relates to an isolated antigen-binding protein, antibody, or antigen-binding fragment thereof, comprising (A) (i) a heavy chain (HC) variable region comprising HC-CDR1, HC-CDR2 and HC-CDR3 respectively, comprising amino acid sequences SEQ ID NOS: 2, 3, and 4; and a light chain (LC) variable region comprising LC-CDR1, LC-CDR2 and LC-CDR3 respectively, comprising amino acid sequences SEQ ID NOS: 8, 9 and 10; (ii) a heavy chain (HC) variable region comprising HC-CDR1, HC-CDR2 and HC-CDR3 respectively, comprising amino acid sequences SEQ ID NOS: 20, 21 and 22; and a

light chain (LC) variable region comprising LC-CDR1, LC-CDR2 and LC-CDR3 respectively, comprising amino acid sequences SEQ ID NOS: 26, 27 and 28; (iii) a heavy chain (HC) variable region comprising HC-CDR1, HC-CDR2 and HC-CDR3 respectively, comprising amino acid sequences SEQ ID NOS: 38, 39 and 40; and a light chain (LC) variable region comprising LC-CDR1, LC-CDR2 and LC-CDR3 respectively, comprising amino acid sequences selected from SEQ ID NOS: 44, 45 and 46; (iv) a heavy chain (HC) variable region comprising HC-CDR1, HC-CDR2 and HC-CDR3 respectively, comprising amino acid sequences SEQ ID NOS: 56, 57 and 58; and a light chain (LC) variable region comprising LC-CDR1, LC-CDR2 and LC-CDR3 respectively, comprising amino acid sequences SEQ ID NOS: 62, 63 and 64; (v) a heavy chain (HC) variable region comprising HC-CDR1, HC-CDR2 and HC-CDR3 respectively, comprising amino acid sequences SEQ ID NOS: 74, 75 and 76; and a light chain (LC) variable region comprising LC-CDR1, LC-CDR2 and LC-CDR3 respectively, comprising amino acid sequences SEQ ID NOS: 80, 81 and 82; or (vi) a heavy chain (HC) variable region comprising HC-CDR1, HC-CDR2 and HC-CDR3 respectively, comprising amino acid sequences SEQ ID NOS: 92, 93 and 94; and a light chain (LC) variable region comprising LC-CDR1, LC-CDR2 and LC-CDR3 respectively, comprising amino acid sequences SEQ ID NOS: 98, 99 and 100.

[0014] In another aspect, the invention relates to an isolated antigen-binding protein, antibody, or antigen-binding fragment thereof, comprising a V_H and V_L comprising first and second amino acid sequences, respectively, selected from SEQ ID NOS: 14 and 16; 32 and 34; 50 and 52; 68 and 70; 86 and 88; and 104 and 106.

[0015] In yet another aspect, the invention relates to an isolated antigen-binding protein, antibody, or antigen-binding fragment thereof, comprising an amino acid sequence selected from SEQ ID NOS: 18, 36, 54, 72, 90, and 108.

[0016] In a related aspect, the isolated antigen-binding protein comprises an antigen-binding region as disclosed in any of Tables 1-8. The antigen-binding protein may be a fusion protein.

[0017] In another aspect, the invention relates to an immunoconjugate comprising a first component which is an antigen-binding protein, antibody or antigen-binding fragment thereof as disclosed herein. The immunoconjugate comprises a second

component that is a cytotoxin, a detectable label, a radioisotope, a therapeutic agent, a binding protein or a molecule having a second amino acid sequence. Where the second component is a binding protein or second antibody, the binding protein or second antibody has binding specificity for a target that is different from the HLA-peptide complex for which the first is specific.

[0018] In a related aspect, therefore, the present invention relates to bispecific antibody comprising an antigen-binding protein or functional fragment thereof as described herein.

[0019] In yet another aspect, the invention relates to nucleic acids that encode antigen binding proteins, including antibodies and chimeric antigen receptors specific for a WT1 peptide/HLA complex, in particular the complex of WT1 peptide RMFPNAPYL/HLA-A0201.

[0020] In another related aspect, the invention relates to cells comprising the nucleic acids or antigen binding proteins disclosed herein, including recombinant immune effector cells, such as, T-cells genetically modified to express a chimeric antigen receptor comprising an antigen binding region in accordance with the present disclosure. Cells which have been engineered to produce antibodies in accordance with the disclosure are also encompassed by the invention.

[0021] In a related aspect, the invention relates to vectors comprising the nucleic acids to encode the antigen binding proteins disclosed herein, including vectors to facilitate expression and/or secretion of an antigen binding protein such as an antibody or chimeric antigen receptor in accordance with the present disclosure.

[0022] In a related aspect, the invention relates to pharmaceutical compositions comprising the antigen binding proteins, antibodies, nucleic acids, vectors or cells comprising the nucleic acids or antigen binding proteins disclosed herein, together with a pharmaceutically acceptable carrier.

[0023] In another aspect, the invention relates to a method for detecting WT1 on the surface of cells or tissues using WT1 antibodies of the invention.

[0024] In yet another aspect, the invention relates to methods for treatment of a subject having a WT1-positive disease, comprising administering to the subject a therapeutically effective amount of an antigen binding protein, antibody or antigen binding fragment thereof, nucleic acid encoding the antigen binding protein or antibody or a cell comprising the nucleic acids or proteins as disclosed herein. The WT1-positive disease is a chronic leukemia, acute leukemia or WT1⁺ cancer selected from the group consisting of chronic myelocytic leukemia, multiple myeloma (MM), acute lymphoblastic leukemia (ALL), acute myeloid/myelogenous leukemia (AML), myelodysplastic syndrome (MDS), mesothelioma, ovarian cancer, gastrointestinal cancers, breast cancer, prostate cancer and glioblastoma. In some embodiments, the antigen binding protein or antibody is a conjugate thereof having a cytotoxic moiety linked thereto.

Brief Description of the Drawings

[0025] Figure 1 shows the amino acid sequence of Wilms tumor protein, (GenBank Accession No. P19544) with some HLA-restricted peptides bolded. The 121-140 peptide further encompasses a 9-mer (underlined), RMFPNAPYL (SEQ ID NO: 1), which, in addition to analogs thereof, has been shown to induce WT1-specific cytotoxic T-cell activity.

[0026] Figure 2 is a graph showing that vaccination with WT1 peptides induces cytotoxic T cells against WT1⁺ leukemia cells.

[0027] Figure 3 shows the results of a phage ELISA for specific binding of WT1/A2 (WA) versus PBS control or R3/HLAA0201 (R3).

[0028] Figure 4 shows specific binding of only WT1 phage antibodies that bind to T2 cells pulsed with WT1A peptide were selected.

[0029] Figure 5 shows the binding affinity of a full-length IgG1 of a WT1 antibody to RMF/A0201 complex tested by titration of the antibody at various concentrations. Results are shown for T2 cells pulsed with 50ug/ml RMF (upper panel). Control antibody is shown in the lower panel.

[0030] Figure 6 shows the dependence on density of RMF/HLA-A0201 complex recognized by WT1 antibody on T2 cells pulsed with RMF (upper panel) or control, RHAMM-R3 (lower panel).

[0031] Figure 7 shows an expression vector for expression of human antibodies.

[0032] Figure 8 shows the results of SDS-PAGE analysis of WT1/A2 antibodies under reducing and non-reducing conditions.

[0033] Figure 9 shows the results of kinetic binding analysis of an WT1/A2 antibody demonstrating affinity of the antibody toward WT1/A2.

[0034] Figure 10 shows the affinity (K_D) of antibody binding to WT1/A2 complex.

[0035] Figure 11 shows the mean fluorescence intensity (MFI) by flow cytometry of peptide titration on binding of some embodiments, mAb clone 5 (upper panel), clone 15 (middle panel) and control (lower panel) to live T2 cells pulsed with varying concentrations of peptide, WT1-A, WT1-A1 or control.

[0036] Figure 12 shows the results of peptide titration on binding of a WT1 antibody, mAb 5 (upper panel), mAb 15 (lower panel) to live T2 cells pulsed with varying concentrations of WT1A peptide.

[0037] Figure 13 shows the binding specificity of one embodiment, mAb 5, at different concentrations (50 $\mu\text{g/ml}$ upper; 25 $\mu\text{g/ml}$ middle; and 12.5 $\mu\text{g/ml}$ lower) of peptide (R3, WT1-A1, WT1-A or no peptide.)

[0038] Figure 14 shows the binding specificity of one embodiment, mAb 15, at different concentrations (50 $\mu\text{g/ml}$ upper; 25 $\mu\text{g/ml}$ lower) of peptide (R3, WT1-A1, WT1-A or no peptide).

[0039] Figure 15 shows dose-dependent binding of mAbs 5 (upper panel) and 15 (lower panel) to T2 cells pulsed with WT1-A, WT1-A1, or RHAMM-R3 peptide.

[0040] Figure 16 shows binding of mAbs 5 and 15 to U266, a myeloma cell line.

[0041] Figure 17 shows binding of mAb 15 to BV173, a cell line derived from an individual with (Ph1)-positive acute leukemia.

[0042] Figure 18 shows the specific binding of ESK1 (#13) to WT1/A2 complex on the surface of T2 cells pulsed with WT1 peptide.

[0043] Figure 19 and 20 show that WT1 antibody is able to recognize RMF peptide in which substitution of different positions of the RMF peptide with alanine is made (see also Table 10) and that the loss of binding seen with substitution of position 1 by either alanine (WT1-A1-B) or tyrosine (WT1-A1), was not due to the reduction of peptide binding affinity to the HLA-A2 molecule, as both peptides showed the strongest binding in T2 stabilization assay using the mAb specific for the HLA-A2 molecule, clone BB7.

[0044] Figure 21 shows recognition by WT1 antibody of naturally presented RMF/HLA-A0201 complex on the cell surface of human mesothelioma cell lines, JMN (WT1⁺/A0201⁺) but not MSTO (WT1⁺/HLA-A0201⁻).

[0045] Figure 22 shows binding of WT1 antibodies to human CML-derived cell line BV173.

[0046] Figure 23 is a Scatchard analysis based on binding of WT1 antibody to JMN cells and shows an avidity constant of about 0.2nM.

[0047] Figure 24 shows WT1 antibody binding to a panel of mesothelioma and leukemia cells.

[0048] Figure 25 shows the results of flow cytometric analyses gated on CD33 and CD34 double positive AML blast cells from an HLA-A2 positive patient. ESK1 binds to the leukemia blasts.

[0049] Figure 26 shows the results of flow cytometric analyses gated on CD33 and CD34 double positive AML blast cells from an HLA-A2 negative patient. WT1mAb ESK1 did not bind to the blasts.

[0050] Figure 27 shows WT1mAb ESK1 mediated ADCC against T2 cells pulsed with RMF peptide.

[0051] Figure 28 shows the ability of WT1 antibody to mediate ADCC with human effectors in JMN and leukemia cell line BV173 (lower panel) but not MSTO cells.

[0052] Figure 29 shows that WT1 mAbs are effective against human leukemia cell line BV173 but not HL60 cells, which are not HLA-A2⁺.

[0053] Figure 30 shows that WT1 antibody induces ADCC against primary AML blasts from an HLA-A2 positive patient.

[0054] Figure 31 shows the results of treatment of human BV173 in NSG mice using antibodies of the invention.

[0055] Figure 32 shows that at later time points, mice treated with WT1 antibody only began to relapse, while antibody with effectors cured 2 of 5 mice.

[0056] Figure 33 shows that WT1 antibody significantly reduces tumor burden in a dose-dependent manner.

[0057] Figure 34 shows that antibody with altered carbohydrate in Fc (MAGE) is more active in ADCC than original antibody.

Detailed Description of the Invention

[0058] All publications, patents and other references cited herein are incorporated by reference in their entirety into the present disclosure.

[0059] In practicing the present invention, many conventional techniques in molecular biology, microbiology, cell biology, biochemistry, and immunology are used, which are within the skill of the art. These techniques are described in greater detail in, for example, Molecular Cloning: a Laboratory Manual 3rd edition, J.F. Sambrook and D.W. Russell, ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press 2001; Recombinant Antibodies for Immunotherapy, Melvyn Little, ed. Cambridge University Press 2009; "Oligonucleotide Synthesis" (M. J. Gait, ed., 1984); "Animal Cell Culture" (R. I. Freshney, ed., 1987); "Methods in Enzymology" (Academic Press, Inc.); "Current Protocols in Molecular Biology" (F. M. Ausubel et al., eds., 1987, and periodic updates); "PCR: The Polymerase Chain Reaction", (Mullis et al., ed., 1994); "A Practical Guide to Molecular Cloning" (Perbal Bernard V., 1988); "Phage Display: A Laboratory Manual" (Barbas et al., 2001). The contents of these references and other references containing standard protocols, widely known to and relied upon by those of skill in the art, including manufacturers' instructions are hereby incorporated

by reference as part of the present disclosure. The following abbreviations are used throughout the application:

- [0060] **Ab:** Antibody
- [0061] **ADCC:** Antibody-dependent cellular cytotoxicity
- [0062] **ALL:** Acute lymphocytic leukemia
- [0063] **AML:** Acute myeloid leukemia
- [0064] **APC:** Antigen presenting cell
- [0065] **β 2M:** Beta-2-microglobulin
- [0066] **BiTE:** Bi-specific T cell engaging antibody
- [0067] **CAR:** Chimeric antigen receptor
- [0068] **CDC:** Complement dependent cytotoxicity
- [0069] **CMC:** Complement mediated cytotoxicity
- [0070] **CDR:** Complementarity determining region (see also HVR below)
- [0071] **C_L:** Constant domain of the light chain
- [0072] **CH₁:** 1st constant domain of the heavy chain
- [0073] **CH_{1,2,3}:** 1st, 2nd and 3rd constant domains of the heavy chain
- [0074] **CH_{2,3}:** 2nd and 3rd constant domains of the heavy chain
- [0075] **CHO:** Chinese hamster ovary
- [0076] **CTL:** Cytotoxic T cell
- [0077] **E:T Ratio:** Effector:Target ratio
- [0078] **Fab:** Antibody binding fragment
- [0079] **FACS:** Flow assisted cytometric cell sorting

- [0080] **FBS:** Fetal bovine serum
- [0081] **FR:** Framework region
- [0082] **HC:** Heavy chain
- [0083] **HLA:** Human leukocyte antigen
- [0084] **HVR-H:** Hypervariable region-heavy chain (see also CDR)
- [0085] **HVR-L:** Hypervariable region-light chain (see also CDR)
- [0086] **Ig:** Immunoglobulin
- [0087] **IRES:** Internal ribosome entry site
- [0088] **K_D:** Dissociation constant
- [0089] **k_{off}:** Dissociation rate
- [0090] **k_{on}:** Association rate
- [0091] **MHC:** Major histocompatibility complex
- [0092] **MM:** Multiple myeloma
- [0093] **scFv:** Single-chain variable fragment
- [0094] **TCR:** T cell receptor
- [0095] **V_H:** Variable heavy chain includes heavy chain hypervariable region and heavy chain variable framework region
- [0096] **V_L:** Variable light chain includes light chain hypervariable region and light chain variable framework region
- [0097] **WT1:** Wilms tumor protein 1
- [0098] In the description that follows, certain conventions will be followed as regards the usage of terminology. Generally, terms used herein are intended to be

interpreted consistently with the meaning of those terms as they are known to those of skill in the art.

[0099] An "antigen-binding protein" is a protein or polypeptide that comprises an antigen-binding region or antigen-binding portion, that is, has a strong affinity to another molecule to which it binds. Antigen-binding proteins encompass antibodies, chimeric antigen receptors (CARs) and fusion proteins.

[00100] "Antibody" and "antibodies" as those terms are known in the art refer to antigen binding proteins of the immune system. The term "antibody" as referred to herein includes whole, full length antibodies having an antigen-binding region, and any fragment thereof in which the "antigen-binding portion" or "antigen-binding region" is retained, or single chains, for example, single chain variable fragment (scFv), thereof. A naturally occurring "antibody" is a glycoprotein comprising at least two heavy (H) chains and two light (L) chains inter-connected by disulfide bonds. Each heavy chain is comprised of a heavy chain variable region (abbreviated herein as V_H) and a heavy chain constant (CH) region. The heavy chain constant region is comprised of three domains, CH1, CH2 and CH3. Each light chain is comprised of a light chain variable region (abbreviated herein as V_L) and a light chain constant C_L region. The light chain constant region is comprised of one domain, C_L . The V_H and V_L regions can be further subdivided into regions of hypervariability, termed complementarity determining regions (CDR), interspersed with regions that are more conserved, termed framework regions (FR). Each V_H and V_L is composed of three CDRs and four FRs arranged from amino-terminus to carboxy-terminus in the following order: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4. The variable regions of the heavy and light chains contain a binding domain that interacts with an antigen. The constant regions of the antibodies may mediate the binding of the immunoglobulin to host tissues or factors, including various cells of the immune system (e.g., effector cells) and the first component (C1q) of the classical complement system.

[00101] The term "antigen-binding portion" or "antigen-binding region" of an antibody, as used herein, refers to that region or portion of the antibody that binds to the antigen and which confers antigen specificity to the antibody; fragments of antigen-binding proteins, for example, antibodies includes one or more fragments of

an antibody that retain the ability to specifically bind to an antigen (e.g., an peptide/HLA complex). It has been shown that the antigen-binding function of an antibody can be performed by fragments of a full-length antibody. Examples of antigen-binding fragments encompassed within the term "antibody fragments" of an antibody include a Fab fragment, a monovalent fragment consisting of the V_L , V_H , C_L and $CH1$ domains; a $F(ab)_2$ fragment, a bivalent fragment comprising two Fab fragments linked by a disulfide bridge at the hinge region; a Fd fragment consisting of the V_H and $CH1$ domains; a Fv fragment consisting of the V_L and V_H domains of a single arm of an antibody; a dAb fragment (Ward et al., 1989 Nature 341:544-546), which consists of a V_H domain; and an isolated complementarity determining region (CDR).

[00102] Furthermore, although the two domains of the Fv fragment, V_L and V_H , are coded for by separate genes, they can be joined, using recombinant methods, by a synthetic linker that enables them to be made as a single protein chain in which the V_L and V_H regions pair to form monovalent molecules. These are known as single chain Fv (scFv); see e.g., Bird et al., 1988 Science 242:423-426; and Huston et al., 1988 Proc. Natl. Acad. Sci. 85:5879-5883. These antibody fragments are obtained using conventional techniques known to those of skill in the art, and the fragments are screened for utility in the same manner as are intact antibodies.

[00103] An "isolated antibody" or "isolated antigen-binding protein" is one which has been identified and separated and/or recovered from a component of its natural environment. "Synthetic antibodies" or "recombinant antibodies" are generally generated using recombinant technology or using peptide synthetic techniques known to those of skill in the art.

[00104] Traditionally, the MHC-peptide complex could only be recognized by a T-cell receptor (TCR), limiting our ability to detect an epitope of interest using T cell-based readout assays. In the present disclosure, antigen binding proteins, including antibodies, having an antigen-binding region based on scFvs that are selected from human scFv phage display libraries using recombinant HLA-peptide complexes are described. These molecules demonstrated exquisite specificity, for example as shown with anti-WT1 antibodies that recognize only HLA-A2-RMFPNAPYL complexes. In addition, along with their inability to bind to HLA-complexes

containing other peptides, the molecules were also unable to bind to the peptides themselves, further demonstrating their TCR-like specificity.

[00105] The scFvs of the disclosure selected by phage display were initially tested for their ability to bind to peptide presented on the surface of HLA-positive cells. After T2 cells were incubated in the presence of peptide, fluorescently labeled antibodies could be used to selectively recognize the antigen pulsed cells using flow cytometry.

[00106] In some embodiments, the invention includes antibodies that have the scFv sequence fused to one or more constant domains of the heavy to form an antibody with an Fc region of a human immunoglobulin to yield a bivalent protein, increasing the overall avidity and stability of the antibody. In addition, the Fc portion allows the direct conjugation of other molecules, including but not limited to fluorescent dyes, cytotoxins, radioisotopes etc. to the antibody for example, for use in antigen quantitation studies, to immobilize the antibody for affinity measurements, for targeted delivery of a therapeutic agent, to test for Fc-mediated cytotoxicity using immune effector cells and many other applications.

[00107] The results presented here highlight the specificity, sensitivity and utility of the antibodies of the invention in targeting MHC-peptide complexes.

[00108] The molecules of the invention are based on the identification and selection of single chain variable fragments (scFv) using phage display, the amino acid sequence of which confers the molecules' specificity for the MHC restricted peptide of interest and forms the basis of all antigen binding proteins of the disclosure. The scFv, therefore, can be used to design a diverse array of "antibody" molecules, including, for example, full length antibodies, fragments thereof, such as Fab and F(ab')₂, minibodies, fusion proteins, including scFv-Fc fusions, multivalent antibodies, that is, antibodies that have more than one specificity for the same antigen or different antigens, for example, bispecific T-cell engaging antibodies (BiTe), tribodies, etc. (see Cuesta et al., Multivalent antibodies: when design surpasses evolution, *Trends in Biotechnology* 28:355-362 2010).

[00109] In an embodiment in which the antigen-binding protein is a full length antibody, the heavy and light chains of an antibody of the invention may be full-

length (e.g., an antibody can include at least one, and preferably two, complete heavy chains, and at least one, and preferably two, complete light chains) or may include an antigen-binding portion (a Fab, F(ab')₂, Fv or a single chain Fv fragment ("scFv")). In other embodiments, the antibody heavy chain constant region is chosen from, e.g., IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgM, IgA1, IgA2, IgD, and IgE. In some embodiments, the immunoglobulin isotype is selected from IgG1, IgG2, IgG3, and IgG4, more particularly, IgG1 (e.g., human IgG1). The choice of antibody type will depend on the immune effector function that the antibody is designed to elicit.

[00110] In constructing a recombinant immunoglobulin, appropriate amino acid sequences for constant regions of various immunoglobulin isotypes and methods for the production of a wide array of antibodies are known to those of skill in the art.

[00111] In one embodiment, the antibody or other antigen binding protein is an anti-WT1/HLA-A2 scFv or or antigen-binding fragment thereof having an antigen binding region that comprises the amino acid sequence of SEQ ID NO: 18 and specifically binds to a peptide with the amino acid sequence RMFPNAPYL (SEQ ID NO: 1) in conjunction with HLA-A0201. In some embodiments, the anti-WT1 antibody is a scFv-Fc fusion protein or full length human IgG with VH and VL regions or CDRs selected from Table 1.

Table 1

Antigen	WT1 (Ext002 #3)		
Peptide	RMFPNAPYL (SEQ ID NO: 1)		
CDRs:	1	2	3
VH	GGTFSSYAIS (SEQ ID NO: 2)	GIIPFGTANYAQKFQG (SEQ ID NO: 3)	RIPPPYGMDV (SEQ ID NO: 4)
DNA	ggaggcaccttcagcag ctatgctatcagc (SEQ ID NO: 5)	gggatcatccctatcttggtag agcaaactacgcacagaagtt ccagggc (SEQ ID NO: 6)	cggattccccgtactacggtat ggacgtc (SEQ ID NO: 7)
VL	SGSSSNIGSNYVY (SEQ ID NO: 8)	RSNQRPS (SEQ ID NO: 9)	AAWDDSLNGVV (SEQ ID NO: 10)
DNA	tctggaagcagctccaac atcggaagtaattatgtat ac (SEQ ID NO: 11)	aggagtaatcagcggccctca (SEQ ID NO: 12)	gcagcatgggatgacagcctg aatggtgtggta (SEQ ID NO: 13)

Antigen	WT1 (Ext002 #3)
Peptide	RMFPNAPYL (SEQ ID NO: 1)
Full VH	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSKASGGTFSSYAISWVRQAPGQGLE WMGGIIPFGTANYAQKFQGRVTITADESTSTAYMELSSLRSEDTAVYY CARRIPPYYGMDVWGQGTTVTVSS (SEQ ID NO: 14)
DNA	cagggtgcagctgggtgcagctctggggctgaggtgaagaagcctgggtcctcggtgaaggtctcctgc aaggcttctggaggcaccttcagcagctatgctatcagctgggtgcgacaggccctggacaagg gcttgagtggatgggagggatcatccctatctttggtacagcaaactacgcacagaagttccaggg cagagtcacgattaccgcggaacgaatccacgagcacagcctacatggagctgagcagcctgag atctgaggacacggccgtgtattactgtgcgagacggattccccgtactacggtatggacgtctgg ggccaagggaaccacgggtcaccgtctcctca (SEQ ID NO: 15)
Full VL	QTVVTQPPSASGTPGQRVTISCSGSSSNIGSNYVYQQLPGTAPKL LIYRSNQRPSGVPDRFSGSKSGTSASLAISGPRSVDEADYYCAAWDD SLNGVVFGGGTKLTVLG (SEQ ID NO: 16)
DNA	cagactgtggtgactcagccaccctcagcgtctgggacccccgggcagagggtcaccatctctgtt ctggaagcagctccaacatcggaagtaattatgtatactggtaccaacagctcccaggaacggcc cccaaactcctcatctataggagtaatcagcggccctcaggggtccctgaccgattctctggctcca agtctggcacctcagcctccctggccatcagtgggccccgggtccgtggatgaggctgattactgt gcagcatgggatgacagcctgaatggtgtggtattcggcggagggaaccaagctgaccgtcctagg t (SEQ ID NO: 17)
scFv	QTVVTQPPSASGTPGQRVTISCSGSSSNIGSNYVYQQLPGTAPKL LIYRSNQRPSGVPDRFSGSKSGTSASLAISGPRSVDEADYYCAAWDD SLNGVVFGGGTKLTVLG SRGGGGSGGGGSGGGG SLEMAQVQLVQSG AEVKKPGSSVKVSKASGGTFSSYAISWVRQAPGQGLEWMGGIIPFG TANYAQKFQGRVTITADESTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARRIPPYY GMDVWGQGTTVTVSS (SEQ ID NO: 18)
DNA	cagactgtggtgactcagccaccctcagcgtctgggacccccgggcagagggtcaccatctctgtt ctggaagcagctccaacatcggaagtaattatgtatactggtaccaacagctcccaggaacggcc cccaaactcctcatctataggagtaatcagcggccctcaggggtccctgaccgattctctggctcca agtctggcacctcagcctccctggccatcagtgggccccgggtccgtggatgaggctgattactgt gcagcatgggatgacagcctgaatggtgtggtattcggcggagggaaccaagctgaccgtcctagg ttctagaggtggtggtggtgtagcgggcgggcggtctggtggtggatccctcgagatggc ccaggtgcagctggtgcagctctggggctgaggtgaagaagcctgggtcctcggtgaaggtctcctg caaggcttctggaggcaccttcagcagctatgctatcagctgggtgcgacaggccctggacaag ggcttgagtggatgggagggatcatccctatctttggtacagcaaactacgcacagaagttccagg gcagagtcacgattaccgcggaacgaatccacgagcacagcctacatggagctgagcagcctga gatctgaggacacggccgtgtattactgtgcgagacggattccccgtactacggtatggacgtctg gggccaagggaaccacgggtcaccgtctcctca (SEQ ID NO: 19)

[00112] In another embodiment, the antibody or antigen binding protein is an anti-WT1 scFv or antigen-binding fragment thereof that has an antigen binding region that comprises the amino acid sequence of SEQ ID NO: 36 and specifically binds to a peptide with the amino acid sequence RMFPNAPYL (SEQ ID NO: 1) in conjunction with HLA-A0201. In other embodiments, the anti-WT-1 antibody is a scFv-Fc fusion

protein or full length human IgG with VH and VL regions or CDRs selected from Table 2.

Table 2

Antigen	WT1 (Ext002 #5)		
Peptide	RMFPNAPYL (SEQ ID NO: 1)		
CDRs :	1	2	3
VH	GDSVSSNSAAWN (SEQ ID NO: 20)	RTYYGSKWYNDYAVS VKS (SEQ ID NO: 21)	GRLGDAFDI (SEQ ID NO: 22)
DNA	ggggacagtgtctctagc aacagtgtgtgcttgaac (SEQ ID NO: 23)	aggacatactacgggtccaag tggtataatgattatgcagtatct gtgaaaagt (SEQ ID NO: 24)	ggtcgcttaggggatgctttga tatac (SEQ ID NO: 25)
VL	RASQSISSYLN (SEQ ID NO: 26)	AASSLQS (SEQ ID NO: 27)	QQSYSTPLT (SEQ ID NO: 28)
DNA	cgggcaagtcagagcatt agcagctatttaaata (SEQ ID NO: 29)	gctgcatccagttgcaaagt (SEQ ID NO: 30)	caacagagttacagtaccct ctcact (SEQ ID NO: 31)
Full VH	QVQLQQSGPGLVKPSQTLSTCAISGDSVSSNSAAWNWIRQSPSRGL EWLGRTYYGSKWYNDYAVSVKSRITINPDTSKNQFSLQLNSVTPEDTA VYYCARGRLGDAFDIWGQGTMTVSS (SEQ ID NO: 32)		
DNA	caggtacagctgcagcagtcagggtccaggactgggtgaagccctcgagaccctctcactcacctgt gccatctccggggacagtgtctctagcaacagtgtgtggaactggatcaggcagtcacctcg agaggccttgagtggctgggaaggacatactacgggtccaagtgggtataatgattatgcagtatctg tgaaaagtgaataaccatcaaccagacacatccaagaaccagttctccctgcagctgaactct gtgactcccaggacacggctgtgtattactgtgcaagaggtcgcttaggggatgctttgatatactgg ggccaagggacaatggtcaccgtctctca (SEQ ID NO: 33)		
Full VL	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIY AASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQSYSTPLT FGGGTKVDIKR (SEQ ID NO: 34)		
DNA	gacatccagatgaccagctctccatcctccctgtctgcatctgtaggagacagagtcaccatcacttg ccgggcaagtcagagcattagcagctatttaaattggatcagcagaaccagggaagccccta agctcctgatctatgctgcatccagttgcaaagtgggtcccatcaagggtcagtggcagtgatct gggacagatttactctcaccatcagcagctctgcaacctgaagattttgcaacttactactgtcaaca gagttacagtaccctctcacttctggcggaggggaccaaagtggatatcaaacgt (SEQ ID NO: 35)		

Antigen	WT1 (Ext002 #13)		
Peptide	RMFPNAPYL (SEQ ID NO: 1)		
DNA	tctggaagcagctccaac atcggaagtaataactgtaa ac (SEQ ID NO: 47)	agtaataatcagcgccctca (SEQ ID NO: 48)	gcagcatgggatgacagcct gaatggttgggtg (SEQ ID NO: 49)
Full VH	QMQLVQSGAEVKEPGESLRISCKGSGYSFTNFWISWVRQMPGKGLE WMGRVDPGYSYSTYSPSFQGHVTISADKSTSTAYLQWNSLKASDTA MYYCARVQYSGYYDWFDWPWGQGLTVTVSS (SEQ ID NO: 50)		
DNA	cagatgcagctggtgcagtcaggagcagaggtgaaagagccccgggagctctgaggatctcct gtaaggttctggatacagcttcaccaactctggatcagctgggtgcgccagatgcccgga ggcctggagtggtggggaggggtgatcctggctactcttatagcacctacagccgcctccaag gccacgtcaccatctcagctgacaagtctaccagcactgcctacctgcagtgaacagcctgaag gcctcggacaccgccatgtattactgtgcgagagtacaatatagtggtactatgactggttcgacc cctggggccagggaaccctggtcaccgtctcctca (SEQ ID NO: 51)		
Full VL	QAVVTQPPSASGTPGQRVTISCSGSSSNIGSNTVNWYQQVPGTAPK LLIYSNNQRPSGVPDRFSGSKSGTSASLAISGLQSEDEADYYCAAWD DSLNGWVFGGGTKLTVLG (SEQ ID NO: 52)		
DNA	caggctgtggtgactcagccaccctcagcgtctgggacccccgggcagagggtcaccatctctgt tctggaagcagctccaacatcggaagtaataactgtaaactgtaccagcaggtcccaggaacgg ccccaaactcctcatctatagtaataatcagcgccctcaggggtccctgaccgattctctggctc caagtctggcacctcagcctccctggccatcagtggtccagctctgaggatgaggctgattattac tgtgcagcatgggatgacagcctgaatggttgggtgttcggcgagggaaccaagctgaccgtcct aggt (SEQ ID NO: 53)		
scFv	QAVVTQPPSASGTPGQRVTISCSGSSSNIGSNTVNWYQQVPGTAPK LLIYSNNQRPSGVPDRFSGSKSGTSASLAISGLQSEDEADYYCAAWD DSLNGWVFGGGTKLTVLG SRGGGGSGGGGSGGGGSLEMA QMQLV QSGAEVKEPGESLRISCKGSGYSFTNFWISWVRQMPGKGLEWMGR VDPGYSYSTYSPSFQGHVTISADKSTSTAYLQWNSLKASDTAMYYCA RVQYSGYYDWFDWPWGQGLTVTVSS (SEQ ID NO: 54)		
DNA	caggctgtggtgactcagccaccctcagcgtctgggacccccgggcagagggtcaccatctctgt tctggaagcagctccaacatcggaagtaataactgtaaactgtaccagcaggtcccaggaacgg ccccaaactcctcatctatagtaataatcagcgccctcaggggtccctgaccgattctctggctc caagtctggcacctcagcctccctggccatcagtggtccagctctgaggatgaggctgattattac tgtgcagcatgggatgacagcctgaatggttgggtgttcggcgagggaaccaagctgaccgtcct aggttctagaggtggtggttagcgggcggcgggctctggtggtggtgatccctcgagatgg cccagatgcagctggtgcagtcaggagcagaggtgaaagagccccgggagctctgaggatct cctgtaaggttctggatacagcttcaccaactctggatcagctgggtgcgccagatgcccgga aaggcctggagtggtggggaggggtgatcctggctactcttatagcacctacagccgcctcca aggccacgtcaccatctcagctgacaagtctaccagcactgcctacctgcagtgaacagcctga aggcctcggacaccgccatgtattactgtgcgagagtacaatatagtggtactatgactggttcga cccctggggccagggaaccctggtcaccgtctcctca (SEQ ID NO: 55)		

[00114] In another embodiment, the antibody or antigen binding protein is an anti-WT1 scFv or antigen binding fragment thereof that has an antigen binding region that comprises the amino acid sequence of SEQ ID NO: 72 and specifically binds to

a peptide with the amino acid sequence RMFPNAPYL (SEQ ID NO:1) in conjunction with HLA-A0201. In other embodiments, the anti-WT-1 antibody is a scFv-Fc fusion protein or full length human IgG with VH and VL regions or CDRs selected from Table 4.

Table 4

Antigen	WT1 (Ext002 #15)		
Peptide	RMFPNAPYL (SEQ ID NO: 1)		
CDRs :	1	2	3
VH	GYNFSNKWIG (SEQ ID NO: 56)	IIYPGYSDITYSPSFQG (SEQ ID NO: 57)	HTALAGFDY (SEQ ID NO: 58)
DNA	ggctacaacttagcaaca agtggatcggc (SEQ ID NO: 59)	atcatctatcccggttactcgga catcacctacagcccgctctc caaggc (SEQ ID NO: 60)	cacacagcttggccggcttg actac (SEQ ID NO: 61)
VL	RASQNINKWLA (SEQ ID NO: 62)	KASSLES (SEQ ID NO: 63)	QQYNSYAT (SEQ ID NO: 64)
DNA	Cgggccagtcagaatc aataagtggtggcc (SEQ ID NO: 65)	aaggcgtctagttagaagc (SEQ ID NO: 66)	caacaatataatggtatgcga cg (SEQ ID NO: 67)
Full VH	QVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGSGYNFSNKWIGWVRQLPGRGLE WIAIIYPGYSDITYSPSFQGRVTISADTSINTAYLHWHSLKASDTAMYYC VRHTALAGFDYWGLGTLTVSS (SEQ ID NO: 68)		
DNA	cagggtgcagctggtgcagctctggagcagaggtgaaaaagcccgagagctctgaagatctcctg taaggttctggctacaacttagcaacaagtggatcggctgggtgcgccaattgccgggagagg cctggagtgtagcaatcatctatcccggttactcggaacacacacagcccgctctccaaggc cgcgccaccatctccgacacgtccattaacaccgctacctgcactggcacagcctgaaggc ctcggacaccgcatgtattattgtgtgcgacacacagcttggccggcttgactactggggcctgg gcaccctggtcaccgtctctca (SEQ ID NO: 69)		
Full VL	DIQMTQSPSTLSASVGDRVTITCRASQNINKWLAWYQQRPGKAPQLLI YKASSLESGVPSRFSGSGSGTEYTLTISSLQPDDFATYYCQQYNSYAT FGQGTKVEIKR (SEQ ID NO: 70)		
DNA	gacatccagatgaccagctctctccaccctgtctgcatctgtaggagacagagtcacaatcacttg ccgggccagtcagaatatcaataagtggtggcctggtatcagcagagaccagggaagccct cagctctgatctataaggcgtctagttagaagtggtgccatctaggttcagcggcagtgatc tggaacagaatacactctaccatcagcagcctgcagcctgatgatttgcaactattactgccaac aatataatggtatgcgacgttcggccaagggaaggtggaaatcaaactg (SEQ ID NO: 71)		
scFv	DIQMTQSPSTLSASVGDRVTITCRASQNINKWLAWYQQRPGKAPQLLI YKASSLESGVPSRFSGSGSGTEYTLTISSLQPDDFATYYCQQYNSYAT FGQGTKVEIKR SRGGGGSGGGGSGGGGSLEMA QVQLVQSGAEVKK PGESLKISCKGSGYNFSNKWIGWVRQLPGRGLEWIAIIYPGYSDITYSP SFQGRVTISADTSINTAYLHWHSLKASDTAMYYCVRHTALAGFDYWGL GTLTVSS (SEQ ID NO: 72)		

Antigen	WT1 (Ext002 #15)
Peptide	RMFPNAPYL (SEQ ID NO: 1)
DNA	gacatccagatgacccagtcctccaccctgtctgcatctgtaggagacagagtcacaatcacttg ccgggccagtcagaatatcaataagtggtggcctggatcagcagagaccagggaaagcccct cagctcctgatctataaggcgtctagtttagaaagtggggtcccatctaggttcagcggcagtggtatc tgggacagaatacactctcaccatcagcagcctgcagcctgatgatttgcacttattactgccaac aatataatagttatgcgacgttcggccaagggaaggtggaaatcaaacgtt ctagagggtggt ggtggttagcggcggcggcggctctggtggtggtggatccctcgagatggccc agggtgcag ctggtgcagtcctggagcagaggtgaaaaagcccggagagtcctctgaagatctcctgtaagggttct ggctacaacttagcaacaagtggatcggctgggtgcgccaattgccgggagaggcctggagtg gatagcaatcatctatcccgttactcggacatcacctacagcccgtcctccaaggccgcgtcacc atctccgccgacacgtccattaacaccgcctacctgcactggcacagcctgaaggcctcggacac cgccatgtattattgtgtgcgacacacagcttggccggcttgactactggggcctgggcaccctggt caccgtctctca (SEQ ID NO: 73)

[00115] In another embodiment, the antibody or antigen binding protein is an anti-WT1 scFv or antigen binding fragment thereof that has an antigen binding region that comprises the amino acid sequence of SEQ ID NO: 90 and specifically binds to a peptide with the amino acid sequence RMFPNAPYL (SEQ ID NO: 1) in conjunction with HLA-A0201. In other embodiments, the anti-WT-1 antibody is a scFv-Fc fusion protein or full length human IgG with VH and VL regions or CDRs selected from Table 5.

Table 5

Antigen	WT1 (Ext002 #18)		
Peptide	RMFPNAPYL (SEQ ID NO: 1)		
CDRs:	1	2	3
VH	GFTFDDYGMS (SEQ ID NO: 74)	GINWNGGSTGYADS VRG (SEQ ID NO: 75)	ERGYGYHDPHDY (SEQ ID NO: 76)
DNA	gggttcaccttgatgattat ggcatgagc (SEQ ID NO: 77)	ggtattaattggaatggtggt agcacaggttatgcagactc tgtgaggggc (SEQ ID NO: 78)	gagcgtggctacgggtacca tgatcccatgactac (SEQ ID NO: 79)
VL	GRNNIGSKSVH (SEQ ID NO: 80)	DDSDRPS (SEQ ID NO: 81)	QVWDSSSDHVV (SEQ ID NO: 82)
DNA	gggagaaacaacattgg aagtaaaagtgtgcac (SEQ ID NO: 83)	gatgatagcgaccggccctc a (SEQ ID NO: 84)	cagggtgggatagtagtagt gatcatgtggtgta (SEQ ID NO: 85)
Full VH	EVQLVQSGGGVVRPGGSLRLSCAASGFTFDDYGMSWVRQAPGKG LEWVSGINWNGGSTGYADSVRGRFTISRDNKNSLYLQMNSLRAE DTALYYCARERGYGYHDPHDYWGQGTLVTVSS (SEQ ID NO: 86)		

Antigen	WT1 (Ext002 #18)
Peptide	RMFPNAPYL (SEQ ID NO: 1)
DNA	gaagtcagctggtgcagctctggggagggtgtggtacggcctgggggtccctgagactctcctgtgcagcctctgggtcacctttagtgattatggcatgagctgggtccgccaagctccaggggaagggctggagtggtctctggtattaattggaatggtgtagcacaggttatgcagactctgtgagggccgattcaccatctccagagacaacgccagaactccctgtatctgcaaataaacagctctgagagccgaggacacggcctgtattactgtgcgagagagcgtggctacgggtaccatgatcccatgactactggggccaaggcaccctggtgaccgtctcctca (SEQ ID NO: 87)
Full VL	QSVVTQPPSVSVAPGKTARITCGRNNIGSKSVHWYQQKPGQAPVLVYDDSDRPSGIPERFSGSNSGNTATLTISRVEAGDEADYYCQVWDSSSDHVVFGGGTKLTVLG (SEQ ID NO: 88)
DNA	cagctctgctgacgcagccgccctcggtgtcagtggtggccaggaaagacggccaggattactgtgggagaaacaacattggaagtaaaagtgtgcactggtaccagcagaagccaggccaggccccctgtgctggtcgtctatgatgatagcgaccggccctcagggatccctgagcgattctctggctccaactctgggaacacggccaccctgaccatcagcagggctgaagccggggatgaggccgactattactgtcaggtgtgggtagtagtagtcatgtggtattcggcggagggaaccaagctgaccgtcctaggt (SEQ ID NO: 89)
scFv	QSVVTQPPSVSVAPGKTARITCGRNNIGSKSVHWYQQKPGQAPVLVYDDSDRPSGIPERFSGSNSGNTATLTISRVEAGDEADYYCQVWDSSSDHVVFGGGTKLTVLG SRGGGGSGGGGSGGSLEMA EVQLVQSGGGVVRPGGSLRLSCAASGFTFDDYGMWVRQAPGKGLEWVSGINWNGGSTGYADSVRGRFTISRDNKNSLYLQMNSLRAEDTALYYCARERGYGYHDPHDYWGGQTLTVSS (SEQ ID NO: 90)
DNA	cagctctgctgacgcagccgccctcggtgtcagtggtggccaggaaagacggccaggattactgtgggagaaacaacattggaagtaaaagtgtgcactggtaccagcagaagccaggccaggccccctgtgctggtcgtctatgatgatagcgaccggccctcagggatccctgagcgattctctggctccaactctgggaacacggccaccctgaccatcagcagggctgaagccggggatgaggccgactattactgtcaggtgtgggtagtagtagtcatgtggtattcggcggagggaaccaagctgaccgtcctaggt tctagaggtggtggtgtagcgggcgggcggtctgtggtggatccc tcgagatggcc gaagtcagctggtgcagctctggggagggtgtggtacggcctgggggtcctgagactctcctgtgcagcctctgggtcacctttagtgattatggcatgagctgggtccgccaagctccaggaaggggctggagtgggtctctggtattaattggaatggtgtagcacaggttatgcagactctgaggggcccattcaccatctccagagacaacgccagaactccctgtatctgcaaatgaacagctctgagagccgaggacacggcctgtattactgtgcgagagagcgtggctacgggtaccatgatcccatgactactggggccaaggcaccctggtgaccgtctcctca (SEQ ID NO: 91)

[00116] In another embodiment, the antibody or antigen binding protein is an anti-WT1 scFv or antigen binding fragment thereof that has an antigen binding region that comprises the amino acid sequence of SEQ ID NO: 108 and specifically binds to a peptide with the amino acid sequence RMFPNAPYL (SEQ ID NO: 1) in conjunction with HLA-A0201. In other embodiments, the anti-WT-1 antibody is a scFv-Fc fusion protein or full length human IgG with VH and VL regions or CDRs selected from Table 6.

Table 6

Antigen	WT1 (Ext002 #23)		
Peptide	RMFPNAPYL (SEQ ID NO. 1)		
CDRs :	1	2	3
VH	GFSVSGTYMG (SEQ ID NO. 92)	LLYSGGGTYHPASLQ G (SEQ ID NO. 93)	GGAGGGHFDS (SEQ ID NO. 94)
DNA	gggttctccgtcagtggcac ctacatgggc(SEQ ID NO. 95)	cttctttatagtgtggcgccac ataccaccagcgtccctgca gggc (SEQ ID NO. 96)	gaggggcaggaggtggcc actttgactcc (SEQ ID NO. 97)
VL	TGSSSNIGAGYDVH (SEQ ID NO. 98)	GNSNRPS (SEQ ID NO. 99)	AAWDDSLNGYV (SEQ ID NO. 100)
DNA	actgggagcagctccaac atcggggcaggttatgatgt acac (SEQ ID NO. 101)	ggtaacagcaatcgccctca (SEQ ID NO. 102)	gcagcatgggatgacagcct gaatggttatgtc (SEQ ID NO. 103)
Full VH	EVQLVETGGGLLQPGGSLRLSCAASGFSVSGTYMGWVRQAPGKGLE WVALLYSGGGTYHPASLQGRFIVSRDSSKNMVYLQMNSLKAEDTAVY YCAKGGAGGGHFDSWGQGTLLTVSS (SEQ ID NO. 104)		
DNA	gaggtgcagctggtggagaccggaggaggcttctccagccgggggggtccctcagactctcctg tgagcctctgggtctccgtcagtggcacctacatgggctgggtccgccaggctccagggaagg actggagtgggtcgactctttatagtgtggcgccacataccaccagcgtccctgcagggccg attcatcgtctccagagacagctccaagaatatggtctatcttcaaatgaatagcctgaaagccgag gacacggccgtctattactgtgcgaaaggaggggcaggaggtggccactttgactcctggggcca aggcaccctggtgaccgtctcctca (SEQ ID NO. 105)		
Full VL	QSVLTQPPSVSGAPGQRVTISCTGSSSNIGAGYDVHWYQQLPGTAPK LLIYGNSNRPSGVPDRFSGSKSGTSASLAISGLQSEDEADYYCAAWD DSLNGYVFGTGKTLTVLG (SEQ ID NO. 106)		
DNA	cagtctgtgtgacgcagccgccctcagtgtctggggccccagggcagaggggtcaccatctcctgc actgggagcagctccaacatcggggcaggttatgatgtacactggtaccagcagcttcagggaac agccccaaactcctcatctatggtaacagcaatcgccctcaggggtccctgaccgattctctggc tccaagtctggcacctcagcctccctggccatcagtgggtccagctctgaggatgaggctgattatta ctgtgcagcatgggatgacagcctgaatggttatgtcttcggaactgggaccaagctgaccgtccta ggt (SEQ ID NO. 107)		
scFv	QSVLTQPPSVSGAPGQRVTISCTGSSSNIGAGYDVHWYQQLPGTAPK LLIYGNSNRPSGVPDRFSGSKSGTSASLAISGLQSEDEADYYCAAWD DSLNGYVFG TGKTLTVLGS SRGGGSGGGGSGGGGSLE MAEVQLVETGGGLLQPG GSLRLSCAASGFSVSGTYMGWVRQAPGKGLEWVALLYSGGGTYHPA SLQGRFIVSRDSSKNMVYLQMNSLKAEDTAVYYCAKGGAGGGHFDS WGQGTLLTVSS (SEQ ID NO. 108)		

Antigen	WT1 (Ext002 #23)
Peptide	RMFPNAPYL (SEQ ID NO. 1)
DNA	cagtctgtgtgacgcagccgccctcagtgtctggggccccagggcagagggtcaccatctctgc actgggagcagctccaacatcggggcaggttatgatgtacactgggtaccagcagcttcaggaac agccccaaactcctcatctatggtaacagcaatcgggccctcaggggtccctgaccgattctctggc tccaagtctggcacctcagcctccctggccatcagtgggctccagtctgaggatgaggctgattatta ctgtgcagcatgggatgacagcctgaatgggtatgtcttcggaactgggaccaagctgaccgtccta ggttctagaggtgggtgggtgtagcggcggcggcggcgtctgggtgggtggatccctcgag atggccg aggtgcagctgggtggagaccggaggaggctgtccagccgggggggtccctcaga ctctctgtgcagcctctgggtctccgtcagtggcacctacatgggtgggtccgccagggtccagg gaagggactggagtgggtcgcacttctttatagtggtggcgccacataccaccagcgccctgca gggccgattcatcgtctccagagacagctccaagaatatggtctatctcaaataatagcctgaaa gccgaggacacggccgtctattactgtgcgaaaggaggggcaggaggtggccacttgactcctg gggccaaggcaccctggtgaccgtctctca (SEQ ID NO. 109)

[00117] Other embodiments of the disclosed antibodies and antigen binding proteins encompass those comprising light and heavy hypervariable regions and constant regions, for example as shown in Tables 7 (heavy chain), 8 (light chain) and 9 (constant regions).

Table 7

Group I	CDR-H1	CDR-H2	CDR-H3	SEQ ID NO.
EXT002-12(166)	SNAVAWN	RTYRGSTYY---ALSV	G-SNSAFDF	119-121
EXT002-5(184)	SNSAAWN	RTYYGSKWYNDYAVSV	GRLGDAFDI	122-124
EXT002-8(184)	SDGAAWN	RTYYRSKWYNDYAVSV	GDYYYGMDV	125-127
Consensus(191)	SNAAAWN	RTYYGSKWYNDYAVSV	G AFDI	128-130
Group II				
EXT002-14(163)	SYWIS	RIDPSDSYTNYSFSFQG	GD-----YDFYLDP--	131-133

EXT002-25(163)	SYGIS	WISAYNGNTNYAQKLQG	DLYSSGWYESYYYGMDV	134-136
EXT002-3(186)	SYAIS	GIIPIFGTANYAQKFQG	RIP-P-----YYGMDV	137-139
EXT002-30(163)	SYGIS	WISAHNGNTNYAQKLQG	DR-----VWFGDLSD	134, 140, 141
EXT002-33(163)	SYAIS	GIIPIFGTANYAQKEQG	NYDFWSG-----DAFDI	137, 142, 143
Consensus(188)	SYAIS	I P G TNYAQKFQG	FY GMDV	137, 144, 145
Group III				
EXT002-34(161)	DYGMS	GINWNGGSTGYADSV	ERGY-GYHDPHDY	146-148
EXT002-40(157)	NYTMN	SISLSGAYIYYADSL	EGYSSSVYDAFDL	149-151
EXT002-45(165)	SYGMH	GILSDGGKDYYVDSV	CSSN-YGNDAFDI	152-154
EXT002-48(165)	TYSMN	SISSGAYSIFYADSV	DQYYGDKWDAFDI	155-157
Consensus (170)	SYGMN	SISS GGSIIYYADSV	E YY WDAFDI	158-160

Table 8

	CDR-L1	CDR-L2	CDR-L3	SEQ ID NOS.
Group I				
EXT002-1 (46)	CSGSSSNIGS-NTVN	SNNQRPSG	AAWDDSLNG--WVFG	161-163
EXT002-10 (46)	CSGSSSNIGS-NTVN	SNNQRPSG	EAWDDSLKG--PVFG	161,

				162, 164
EXT002-12 (22)	CTGSSSNIGAGYDVH	GNSNRPSG	QSYDSSLADNYVFG	165-167
EXT002-13 (46)	CSGSSSNIGS-NTVN	SNNQRPSG	AAWDDSLNG--WVFG	161-163
EXT002-2 (46)	CSGSSSNIGR-NIVN	SNIERPSG	ASWDDSLNG--VLFG	168-170
EXT002-20 (46)	CSGSRSNIAS-NGVG	KNDQRPSG	SAWDDSLDGH-VVFG	171-173
EXT002-23 (46)	CTGSSSNIGAGYDVH	GNSNRPSG	AAWDDSLNG--YVFG	165, 166, 174
EXT002-25 (22)	CSGSSSNIGS-STVN	SNSQRPSG	AAWDDSLNG--VVFG	175-177
EXT002-3 (46)	CSGSSSNIGS-NYVY	RSNQRPSG	AAWDDSLNG--VVFG	178, 179, 177
EXT002-30 (22)	CSGSSSNIGR-NTVN	SNNQRPSG	AAWDDSLNG--YVFG	180, 162, 174
EXT002-33 (22)	CSGSSSNIGN-DYVS	DNNKRPSG	GTWDNSLSA--WVFG	181-183
EXT002-36 (22)	CSGSSSNIGS-NSVY	NNNQRPSG	ATWDDSLSG--WVFG	184-186
EXT002-40 (22)	CSGSSSNIGS-NYVY	RNNQRPSG	AAWDDSLSA--WVFG	178, 187, 188
EXT002-42 (46)	CSGSTSNIGS-YYVS	DNNNRPSG	GTWDSSLSA--WVFG	189-191
EXT002-45 (22)	CSGSSSNIGN-NYVS	DNNKRPSG	GTWDSSLSA--WVFG	192, 182, 191
EXT002-48 (22)	CSGSNSNIGT-NTVT	SNFERPSG	SAWDDSFNG--PVFG	193-195
EXT002-6 (46)	CSGSSSNIGS-NYVS	RNNQRPSG	AAWDDGLRG--YVFG	196, 187, 197
EXT002-9 (22)	CSGSSSNIGS-NTVN	SNNQRPSG	EAWDDSLKG--PVFG	161, 162, 164
Consensus (46)	CSGSSSNIGS N V	NNQRPSG	AAWDDSL G WVFG	161-163
Group II				
EXT002-24 (24)	RASQSISSYLN	AASSLQS	QQSYSTP--T	198-200
EXT002-31 (24)	RASQGISNYLA	AASTLQS	QKYNAPGVT	201-203
EXT002-35 (24)	RASQSINGWLA	RASTLQS	QQSSSLP-FT	204-206

EXT002-5 (48)	RASQSISSYLN	AASSLQS	QQSYSTP-LT	198-200
EXT002-7 (48)	RASQGISYYLA	AASTLKS	QQLNSYP-LT	207-209
EXT002-B (48)	RASQSISSYLN	AASSLQS	QQSYSTP-WT	198-200
Consensus (48)	RASQSISSYLN	AASSLQS	QQSYSTP LT	198-200
Group III				
EXT002-16 (23)	GGNNIGSKSVH	DDSDRPS	QVWDSSSDHPV	210-212
EXT002-17 (47)	GGNNIGSKSVH	DDSDRPS	QVWDSSGDHPV	210, 211, 213
EXT002-19 (47)	GGNNIGSKSVH	YDSDRPS	QVWDSSSDHPV	210, 214, 212
EXT002-21 (19)	GGTNIGSRFVH	DDSDRPS	QVWDSSGDHPV	215, 211, 213
EXT002-22 (47)	GGNNVESKSVH	YDRDRPS	EVWDSSGDHPV	216-218
EXT002-32 (23)	GGKNIGSKSVH	YDSDRPS	QVWDSSGDHYV	219, 214, 220
EXT002-34 (23)	GGNNIGSKSVH	DDSDRPS	QVWISSGDRVI	210, 211, 221
EXT002-43 (23)	GGDNIGSQGVH	YDTRDRPS	QVWGASSDHPV	222-224
Consensus (47)	GGNNIGSKSVH	YDSDRPS	QVWDSSSDHPV	210, 214, 212
Group IV				
EXT002-11 (47)	TGTSSDVGGYNYVS	DVSKRPS	GIYTYSDSW--V	225-227
EXT002-14 (23)	TGTSSDVGGYNYVS	DVGNRPS	SSYTSSSTR--V	225, 228, 229
EXT002-26 (23)	TGTRSDVGLYNYVA	DVIYRPG	SSYTNTGTV--L	230-232
EXT002-4 (47)	TGTSSDFGDYDYVS	DVSDRPS	QSYDSSLGSGV	233-235
Consensus (47)	TGTSSDVGGYNYVS	DVS RPS	SSYTSS S V	225, 234, 229

Table 9

Constant Regions				
Human heavy chain constant region and IgG1 Fc domain sequence	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO. 236)			
Human light chain (kappa)	TVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYLSLSSTLTLSKADYEEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO. 237)			
Human light chain (lambda)	QPKANPTVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADGSPVKAGVETTKPSKQSNNKYAASSYLSLTPEQWKSHRSYSCQVTHEGSTVEKTVAPTECS (SEQ ID NO. 238)			

[00118] The invention relates to recombinant antigen-binding proteins, antibodies and antigen binding fragments thereof that specifically recognize epitopes of a complex of a peptide/protein fragment derived from an intracellular protein, and an MHC class I molecule, for example, as the complex might be displayed at the cell surface during antigen presentation. The heavy and light chains of an antibody of the invention may be full-length (e.g., an antibody can include at least one, and preferably two, complete heavy chains, and at least one, and preferably two, complete light chains) or may include an antigen-binding portion (a Fab, F(ab')₂, Fv or a single chain Fv fragment ("scFv")). In other embodiments, the antibody heavy chain constant region is chosen from, e.g., IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgM, IgA1, IgA2, IgD, and IgE, particularly chosen from, e.g., IgG1, IgG2, IgG3, and IgG4, more particularly, IgG1 (e.g., human IgG1). In another embodiment, the antibody light chain constant region is chosen from, e.g., kappa or lambda, particularly kappa.

[00119] The antibodies and antigen binding proteins of the present invention are intended to encompass bispecific antibodies, including bispecific T-cell engaging antibodies, that is, antibodies comprising two antibody variable domains on a single polypeptide chain that are able to bind two separate antigens. Where a first portion of a bispecific antibody binds an antigen on a tumor cell for example and a second portion of a bispecific antibody recognizes an antigen on the surface of a human immune effector cell, the antibody is capable of recruiting the activity of that effector cell by specifically binding to the effector antigen on the human immune effector cell. In some instances, bispecific antibodies, therefore, are able to form a link between effector cells, for example, T cells and tumor cells, thereby enhancing effector function.

[00120] In one embodiment, the constant region/framework region is altered, for example, by amino acid substitution, to modify the properties of the antibody (e.g., to increase or decrease one or more of: antigen binding affinity, Fc receptor binding, antibody carbohydrate, for example, glycosylation, fucosylation etc, the number of cysteine residues, effector cell function, effector cell function, complement function or introduction of a conjugation site). Furthermore, conjugation of the antibody to a

drug, toxin, radioisotope, cytokine, inflammatory peptide or cytotoxic agent is also contemplated.

[00121] In one embodiment, the antibody is an anti -WT1/A2 antibody and comprises the human IgG1 constant region and Fc domain shown in Table 9. In one embodiment, the anti-WT1/A2 antibody comprises a human kappa sequence, or a human lambda sequence having the sequence set forth in Table 9. The amino acid sequences for some complementarity determining regions (CDRs) of antibodies of the invention are shown in Tables 1-8.

[00122] The present invention is based on the identification of antigen-specific binding sequences from which a variety of antigen-binding proteins can be produced. In addition to antibodies specific for an antigen that represents a protein fragment (peptide)/HLA complex similar to that typically recognized by a T-cell receptor following antigen processing and presentation of the protein to the T-cell, identification of amino acid and nucleic sequences as disclosed herein for the preparation of antibodies can also be used to generate other antigen-binding molecules including chimeric antigen receptors (CARs), with specificity for the protein fragment (peptide)/HLA complex. These can be incorporated into cells to make them specifically cytotoxic to the antigen expressing cell.

[00123] The present invention employs a novel approach to obtaining therapeutic antibodies to any protein, including those proteins that are inaccessible because they are not expressed on the cell surface. Nearly any intracytoplasmic or intranuclear protein (in addition to cell surface proteins) is a potential target for the approach described herein. This includes, but is not limited to, oncogenic proteins, transcription factors, enzymes, etc.

[00124] In order to target tumor antigens derived from intracellular or nuclear proteins, development of a therapeutic antibody an uncommon approach was required. This approach is to generate recombinant mAbs that recognize the peptide/MHC complex expressed on the cell surface, with the same specificity as a T-cell receptor (TCR). Such mAbs share functional homology with TCRs regarding target recognition, but confer higher affinity and capabilities of arming with potent cytotoxic agents that antibodies feature. Technically, TCR-like mAbs may be

generated by conventional hybridoma techniques known to those of skill in the art, to produce human, humanized or chimeric antibodies.

[00125] Furthermore, fully-human mAbs are preferred for therapeutic use in humans because murine antibodies cause an immunogenicity reaction, known as the HAMA (human anti-mouse antibodies) response (24, 25), when administered to humans, causing serious side effects, including anaphylaxis and hypersensitivity reactions. This immunogenicity reaction is triggered by the human immune system recognizing the murine antibodies as foreign because of slightly different amino acid sequences from natural human antibodies. Humanization methods known in the art (26, 27) can be employed to reduce the immunogenicity of murine-derived antibodies (28).

[00126] Recently, the use of phage display libraries has made it possible to select large numbers of Ab repertoires for unique and rare Abs against very defined epitopes (for more details on phage display see McCafferty et al., Phage antibodies: filamentous phage displaying antibody variable domains. *Nature*, 348: 552-554.) The rapid identification of human Fab or single chain Fv (ScFV) fragments highly specific for tumor antigen-derived peptide-MHC complex molecules has thus become possible (19-22). More recently, immuno-toxins, generated by fusing TCR-like Fab specific for melanoma Ag MART-1 26-35/A2 or gp100 280-288/A2 to a truncated form of Pseudomonas endotoxin, have been shown to inhibit human melanoma growth both *in vitro* and *in vivo* (23). In addition, by engineering full-length mAb using the Fab fragments, it is possible to directly generate a therapeutic human mAb, by-passing months of time-consuming work, normally needed for developing therapeutic mAbs. The present invention involves the development of a TCR-like, fully human mAb that recognizes, for example, the WT1 peptide/HLA-A2 complex (RMFPNAPYL, SEQ ID NO: 1) for cancer therapy.

[00127] Recombinant antibodies with TCR-like specificity represent a new and valuable tool for research and therapeutic applications in tumor immunology and immunotherapy. WT1 is a well-established and validated tumor antigen that has been investigated throughout the world as a marker, prognostic factor and therapeutic target. It was recently prioritized as the top priority tumor antigen by an NCI task force (29).

Identification of peptides with high predictive binding to HLA molecules

[00128] In one embodiment, the present invention relates to a method for the generation of antibodies that specifically bind to HLA-restricted peptides, which, when presented as part of a peptide/MHC complex are able to elicit a specific cytotoxic T-cell response. HLA class I molecules present endogenous derived peptides of about 8-12 amino acids in length to CD8⁺ cytotoxic T lymphocytes. Peptides to be used in the method of the present invention are generally about 6-22 amino acids in length, and in some embodiments, between about 9 and 20 amino acids and comprise an amino acid sequence derived from a protein of interest, for example, human WT1 protein (Genbank accession no. P19544) or an analog thereof.

[00129] Peptides suitable for use in generating antibodies in accordance with the method of the present invention can be determined based on the presence of HLA-A0201-binding motifs and the cleavage sites for proteasomes and immune-proteasomes using computer prediction models known to those of skill in the art. For predicting MHC class I binding sites, such models include, but are not limited to, ProPred1 (described in more detail in Singh and Raghava, *ProPred: prediction of HLA-DR binding sites. BIOINFORMATICS* 17(12):1236-1237 2001), and SYFPEITHI (see Schuler et al. *SYFPEITHI, Database for Searching and T-Cell Epitope Prediction. in Immunoinformatics Methods in Molecular Biology, vol 409(1): 75-93 2007*)

[00130] HLA-A*0201 is expressed in 39-46% of all caucasians and therefore, represents a suitable choice of MHC antigen for use in the present method. For preparation of one embodiment of a WT1 peptide antigen, amino acid sequences and predicted binding of putative CD84⁺ epitopes to HLA-A0201 molecules were identified using the predictive algorithm of the SYFPEITHI database (see Schuler et al. *SYFPEITHI, Database for Searching and T-Cell Epitope Prediction. in Immunoinformatics Methods in Molecular Biology, vol 409(1): 75-93 2007*).

[00131] Once appropriate peptides have been identified, peptide synthesis may be done in accordance with protocols well known to those of skill in the art. Because of their relatively small size, the peptides of the invention may be directly synthesized in solution or on a solid support in accordance with conventional peptide synthesis

techniques. Various automatic synthesizers are commercially available and can be used in accordance with known protocols. The synthesis of peptides in solution phase has become a well-established procedure for large-scale production of synthetic peptides and as such is a suitable alternative method for preparing the peptides of the invention. (See for example, *Solid Phase Peptide Synthesis* by John Morrow Stewart and Martin et al. *Application of Almez-mediated Amidation Reactions to Solution Phase Peptide Synthesis*, Tetrahedron Letters Vol. 39, pages 1517-1520 1998.)

[00132] Each of the peptides used in the protocols described herein was purchased and synthesized by Genemed Synthesis, Inc. (San Antonio, TX) using fluorenylmethoxycarbonyl chemistry and solid-phase synthesis and purified by high-pressure liquid chromatography. The quality of the peptides was assessed by high-performance liquid chromatography analysis, and the expected molecular weight was observed using matrix-assisted laser desorption mass spectrometry. Peptides were sterile and 70% to 90% pure. The peptides were dissolved in DMSO and diluted in PBS (pH 7.4) or saline at 5 mg/mL and stored at -80°C.

[00133] Subsequent to peptide selection, binding activity of selected peptides is tested using the antigen-processing-deficient T2 cell line, which increases expression of HLA-A when stabilized by a peptide in the antigen-presenting groove. Briefly, T2 cells are pulsed with peptide for a time sufficient to induce HLA-A expression. HLA-A expression of T2 cells is then measured by immunostaining with a fluorescently labeled monoclonal antibody specific for HLA-A (for example, BB7.2) and flow cytometry. Fluorescence index (FI) is calculated as the mean fluorescence intensity (MFI) of HLA-A0201 on T2 cells as determined by fluorescence-activated cell-sorting analysis, using the formula $FI = (MFI[T2 \text{ cells with peptide}]/MFI [T2 \text{ cells without peptide}]) - 1$.

[00134] Fully human T-cell receptor (TCR)-like antibodies to Wilm's tumor oncogene protein (WT1) were produced using the method disclosed herein. TCR-like anti-WT1 antibodies generated by phage display technology are specific for a WT1 peptide/HLA complex similar to that which induces HLA-restricted cytotoxic CD8 T-cells.

[00135] The WT1 protein sequence was screened using the SYFPEITHI algorithm and WT1 peptides (for example, peptides designated 428, 328, and 122) were identified that had predicted high-affinity binding to multiple HLA molecules that are highly expressed in the Caucasian population. Peptide 428 spans WT1 amino acids 428-459, peptide 328 spans WT1 amino acids 328-349, and peptide 122 spans WT1 amino acids 122-140 (see Figure 1)

[00136] Heteroclitic peptides can also be designed by conservative amino acid substitutions of MHC-binding residues expected to enhance the affinity toward the MHC class 1 allele, as predicted by the prediction algorithm. WT1 peptide 122 comprises within it a known CD8⁺ epitope (126-134). In one embodiment, therefore, a modified peptide of the peptide that spans the WT1 amino acid residues 126-134 and contains a modified amino acid at positions may be used. Peptides used for alanine mutagenesis of WT1A (otherwise designated RFM) were named based on the position where the substitution was made. Examples of WT1 peptides which may be used are shown in Table 10 along with irrelevant peptides, RHAMM-R3 and EW.

Table 10

WT1A (RMF)	RMFPNAPYL	SEQ ID NO.: 1
WT1A1-B	AMFPNAPYL	SEQ ID NO.: 110
WT1A-3	RMAPNAPYL	SEQ ID NO.: 111
WT1A-4	RMFANAPYL	SEQ ID NO.: 112
WT1A-5	RMFPAAPYL	SEQ ID NO.: 113
WT1A-7	RMFPNAAYL	SEQ ID NO.: 114
WT1A-8	RMFPNAPAL	SEQ ID NO.: 115
RHAMM-R3	ILSLELMKL	SEQ ID NO.: 116
EW	QLQNPSYDK	SEQ ID NO.: 117
RSDELVRHHNMHQRNMTKL		SEQ ID NO.: 118
PGCNKRYFKLSHLQMHSRKHTG		SEQ ID NO.: 119
SGQARMFPNAPYLPSCLES		SEQ ID NO.: 120
SGQAYMFPNAPYLPSCLES		SEQ ID NO.: 121

[00137] Once a suitable peptide has been identified, the target antigen to be used for phage display library screening, that is, a peptide/HLA complex (for example, WT1 peptide/HLA-A0201) is prepared by bringing the peptide and the histocompatibility antigen together in solution to form the complex.

Selecting a high affinity ScFV against a WT1 peptide

[00138] The next step is the selection of phage that bind to the target antigen of interest with high affinity, from phage in a human phage display library that either do not bind or that bind with lower affinity. This is accomplished by iterative binding of phage to the antigen, which is bound to a solid support, for example, beads or mammalian cells followed by removal of non-bound phage and by elution of specifically bound phage. In one embodiment, antigens are first biotinylated for immobilization to, for example, streptavidin-conjugated Dynabeads M-280. The phage library is incubated with the cells, beads or other solid support and non binding phage is removed by washing. Clones that bind are selected and tested.

[00139] Once selected, positive scFv clones are tested for their binding to HLA-A2/peptide complexes on live T2 cell surfaces by indirect flow cytometry. Briefly, phage clones are incubated with T2 cells that have been pulsed with Wt1-A peptide, or an irrelevant peptide (control). The cells are washed and then with a mouse anti-M13 coat protein mAb. Cells are washed again and labeled with a FITC-goat (Fab)₂ anti-mouse Ig prior to flow cytometry.

[00140] In other embodiments, the anti-WT1/A antibodies may comprise one or more framework region amino acid substitutions designed to improve protein stability, antibody binding, expression levels or to introduce a site for conjugation of therapeutic agents. These scFv are then used to produce recombinant human monoclonal Igs in accordance with methods known to those of skill in the art.

[00141] Methods for reducing the proliferation of leukemia cells is also included, comprising contacting leukemia cells with a WT1 antibody of the invention. In a related aspect, the antibodies of the invention can be used for the prevention or treatment of leukemia. Administration of therapeutic antibodies is known in the art.

Antibody Conjugates with Anti-Cancer Agents

[00142] Monoclonal antibodies represent the preferred vehicle for the targeted delivery of bioactive agents to cancer sites, including antibody-based delivery of cytotoxics, radionuclides or immunomodulatory cytokines. Conjugates of the antibodies of the invention with therapeutic agents, including without limitation, drugs (such as calecheamicin, aureastatin, doxorubicin), or toxins (such as ricin, diphtheria, gelonin) or radioisotopes emitting alpha or beta particles (such as, ^{90}Y , ^{131}I , ^{225}Ac , ^{213}Bi , ^{223}Ra and ^{227}Th), inflammatory peptides (such as IL2, TNF, IFN- γ) are encompassed by the invention.

[00143] Pharmaceutical Compositions and Methods of Treatment

[00144] WT1 antibodies of the present invention can be administered for therapeutic treatments to a patient suffering from a tumor or WT1-associated pathologic condition in an amount sufficient to prevent, inhibit, or reduce the progression of the tumor or pathologic condition. Progression includes, e.g, the growth, invasiveness, metastases and/or recurrence of the tumor or pathologic condition. Amounts effective for this use will depend upon the severity of the disease and the general state of the patient's own immune system. Dosing schedules will also vary with the disease state and status of the patient, and will typically range from a single bolus dosage or continuous infusion to multiple administrations per day (e.g., every 4-6 hours), or as indicated by the treating physician and the patient's condition.

[00145] The identification of medical conditions treatable by WT1 antibodies of the present invention is well within the ability and knowledge of one skilled in the art. For example, human individuals who are either suffering from a clinically significant leukemic disease or who are at risk of developing clinically significant symptoms are suitable for administration of the present WT1 antibodies. A clinician skilled in the art can readily determine, for example, by the use of clinical tests, physical examination and medical/family history, if an individual is a candidate for such treatment.

[00146] Non-limiting examples of pathological conditions characterized by WT1 expression include chronic myelocytic leukemia, acute lymphoblastic leukemia (ALL), acute myeloid/myelogenous leukemia (AML) and myelodysplastic syndrome (MDS). Additionally, solid tumors, in general and in particular, tumors associated

with mesothelioma, ovarian cancer, gastrointestinal cancers, breast cancer, prostate cancer and glioblastoma are amenable to treatment using WT1 antibodies.

[00147] In another embodiment, therefore, the present invention provides a method of treating a medical condition by administering a WT1 antibody of the present invention in combination with one or more other agents. For example, an embodiment of the present invention provides a method of treating a medical condition by administering a WT1 antibody of the present invention with an antineoplastic or antiangiogenic agent. The WT1 antibody can be chemically or biosynthetically linked to one or more of the antineoplastic or antiangiogenic agents.

[00148] Any suitable method or route can be used to administer a WT1 antibody of the present invention, and optionally, to coadminister antineoplastic agents and/or antagonists of other receptors. Routes of administration include, for example, oral, intravenous, intraperitoneal, subcutaneous, or intramuscular administration. It should be emphasized, however, that the present invention is not limited to any particular method or route of administration.

[00149] It is noted that a WT1 antibody of the present invention can be administered as a conjugate, which binds specifically to the receptor and delivers a toxic, lethal payload following ligand-toxin internalization.

[00150] It is understood that WT1 antibodies of the invention will be administered in the form of a composition additionally comprising a pharmaceutically acceptable carrier. Suitable pharmaceutically acceptable carriers include, for example, one or more of water, saline, phosphate buffered saline, dextrose, glycerol, ethanol and the like, as well as combinations thereof. Pharmaceutically acceptable carriers may further comprise minor amounts of auxiliary substances such as wetting or emulsifying agents, preservatives or buffers, which enhance the shelf life or effectiveness of the binding proteins. The compositions of the injection may, as is well known in the art, be formulated so as to provide quick, sustained or delayed release of the active ingredient after administration to the mammal.

[00151] Other aspects of the invention include without limitation, the use of antibodies and nucleic acids that encode them for treatment of WT1 associated disease, for diagnostic and prognostic applications as well as use as research tools

for the detection of WT1 in cells and tissues. Pharmaceutical compositions comprising the disclosed antibodies and nucleic acids are encompassed by the invention. Vectors comprising the nucleic acids of the invention for antibody-based treatment by vectored immunotherapy are also contemplated by the present invention. Vectors include expression vectors which enable the expression and secretion of antibodies, as well as vectors which are directed to cell surface expression of the antigen binding proteins, such as chimeric antigen receptors.

[00152] Cells comprising the nucleic acids, for example cells that have been transfected with the vectors of the invention are also encompassed by the disclosure.

[00153] For use in diagnostic and research applications, kits are also provided that contain a WT1 antibody or nucleic acids of the invention, assay reagents, buffers, and the like.

[00154] The method of the present invention will now be described in more detail with respect to representative embodiments.

Materials

[00155] *Cell samples, cell lines and antibodies.* After informed consent on Memorial Sloan-Kettering Cancer Center Institutional Review Board approved protocols, peripheral blood mononuclear cells (PBMC) from HLA-typed healthy donors and patients were obtained by Ficoll density centrifugation. The sources for obtaining human mesothelioma cell lines are described previously (29). The cell lines include: H-Meso1A, JMN, VAMT, H2452, H2373, H28, MSTO, Meso 11, Meso 34, Meso 37, Meso 47, and Meso 56. All cells were HLA typed by the Department of Cellular Immunology at Memorial Sloan-Kettering Cancer Center. Leukemia cell lines LAMA81, BV173, and 697, (WT1+, A0201+) were kindly provided by Dr. H. J. Stauss (University College London, London, United Kingdom). Melanoma cell line MeWo (WT1-, A201+), SKLY16 (B-cell lymphoma; WT1-, A0201+); K562, RwLeu4, and HL60, all WT1+ leukemias, and a TAP-deficient T2 cell line were obtained from the American Type Culture Collection. The cell lines were cultured in RPMI 1640 supplemented with 5% FCS, penicillin, streptomycin, 2 mmol/L glutamine, and 2-mercaptoethanol at 37 C/5% CO₂.

[00156] Monoclonal Ab against human HLA-A2 (clone BB7.2) conjugated to FITC or APC, and its isotype control mouse IgG2b/FITC or APC, to human or mouse CD3, CD19, CD56, CD33, CD34 (BD Biosciences, San Diego), goat F(ab)₂ anti-human IgG conjugated with PE or FITC and goat F(ab)₂ anti-mouse Ig's conjugated to fluorescent (In Vitrogen, City) were purchased. Mouse mAb to HLA-class I (W6/32) was obtained from the MSKCC Monoclonal antibody Core Facility.

[00157] *Peptides*. All peptides were purchased and synthesized by Genemed Synthesis, Inc. (San Antonio, TX). Peptides were > 90% pure. (Table 1.) The peptides were dissolved in DMSO and diluted in saline at 5 mg/mL and frozen at -180C. Biotinylated single chain WT1peptide/HLA-A0201 and RHAMM-3/HLA-A0201 complexes were synthesized by refolding the peptides with recombinant HLA-A2 and beta2 microglobulen (β 2M) at the Tetramer facility at MSKCC.

[00158] *Animals*. Eight to 10 week-old NOD.Cg-Prkdc scid IL2rgtm1Wjl/SzJ mice, known as NOD scid gamma (NSG), were purchased from the Jackson Laboratory (Bar Harbor, ME) or obtained from MSKCC animal breeding facility.

Methods

[00159] *Flow cytometry analysis*. For cell surface staining, cells were incubated with appropriate mAbs for 30 minutes on ice, washed, and incubated with secondary antibody reagents when necessary. Flow cytometry data were collected on a FACS Calibur (Becton Dickinson) and analyzed with FlowJo V8.7.1 and 9.4.8 software.

[00160] *Selection and characterization of scFv specific for WT1 peptide/HLA-A0201 complexes*. A human scFv antibody phage display library was used for the selection of mAb clones. In order to reduce the conformational change of MHC1 complex introduces by immobilizing onto plastic surfaces, a solution panning method was used in place of conventional plate panning. In brief, biotinylated antigens were first mixed with the human scFv phage library, then the antigen-scFv antibody complexes were ppulled down by streptavidin-conjugated Dynabeads M-280 through a magnetic rack. Bound clones were then eluted and were used to infect *E.Coli* XL1-Blue. The scFv phage clones expressed in the bacteria were purified (35, 36). Panning was performed for 3-4 cycles to enrich scFv phage clones binding to HLA-A0201/WT1 complex specifically. Positive clones were determined by standard ELISA method

against biotinylated single chain HLA-A0201/WT1 peptide complexes. Positive clones were further tested for their binding to HLA-A2/peptide complexes on live cell surfaces by flow cytometry, using a TAP-deficient, HLA-A0201+ cell line, T2. T2 cells were pulsed with peptides (50ug/ml) in the serum-free RPMI1640 medium, in the presence of 20 µg/ml β 2 M ON. The cells were washed, and the staining was performed in following steps.

[00161] The cells were first stained with purified scFv phage clones, and followed by staining with a mouse anti-M13 mAb, and finally the goat F(ab)₂ anti-mouse Ig's conjugate to FITC. Each step of the staining was done between 30 -60 minutes on ice and the cells were washed twice between each step of the staining.

[00162] *Engineering full length mAb using the selected ScFv fragments.* Full-length human IgG1 of the selected phage clones were produced in HEK293 and Chinese hamster ovary (CHO) cell lines, as described (37). In brief, antibody variable regions were subcloned into mammalian expression vectors, with matching human lambda or kappa light chain constant region and human IgG1 constant region sequences. Molecular weight of the purified full length IgG antibodies were measured under both reducing and non-reducing conditions by electrophoresis.

[00163] *Engineering chimeric antigen receptors and immune effector cells.* Nucleic acids that encode antibodies and antigen binding proteins identified herein can be used engineer recombinant immune effector cells. Methods and vectors to generate genetically modified T-cells, for example, are known in the art (See Brentjens et al., *Safety and persistence of adoptively transferred autologous CD19-targeted T cells in patients with relapsed or chemotherapy refractory B-cell leukemias* in Blood 118(18):4817-4828, November 2011).

[00164] *Characterization of the full-length human IgG1 for the WT1p/A2 complex.* Initially, specificities of the fully human IgG1 mAbs for the WT1peptide/A2 complex were determined by staining T2 cells pulsed with or without RMF or RHAMM-R3 control peptides, followed by secondary goat F(ab)₂ anti-human IgG mAb conjugate to PE or FITC. The fluorescence intensity was measured by flow cytometry. The same method was used to determine the binding of the mAbs to fresh tumor cells and cell lines.

[00165] *Radioimmunoassays.* WT1 ab1 was labeled with ^{125}I (PerkinElmer) using the chloramine-T method (38). 100 μg antibody was reacted with 1mCi ^{125}I and 20 μg chloramine-T, quenched with 200 μg Na metabisulfite, then separated from free ^{125}I using a 10DG column (company) equilibrated with 2% bovine serum albumin in PBS. Specific activities of products were in the range of 7-8 mCi/mg.

[00166] Hematopoietic cell lines, adherent cell lines (harvested with a non-enzymatic cell stripper (name)), PBMCs from normal donors and AML patients were obtained as described. Cells were washed once with PBS and re-suspended in 2% human serum in PBS at 10^7 cells/mL at 0° . Cells (10^6 tube in duplicate) were incubated with ^{125}I -labeled WT1 AB1 (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$) for 45 minutes on ice, then washed extensively with 1% bovine serum albumin in PBS at 0° . To determine specific binding, a duplicate set of cells was assayed after pre-incubation in the presence of 50-fold excess unlabeled WT1 AB1 for 20 minutes on ice. Bound radioactivity was measured by a gamma counter, specific binding was determined, and the number of bound antibodies per cell was calculated from specific activity.

[00167] *Antibody-dependent cellular cytotoxicity (ADCC).* Target cells used for ADCC were T2 cells pulsed with or without WT1 or RHAAM-3 peptides, and tumor cell lines without peptide pulsing. WT1 ab1 or its isotype control human IgG1 at various concentrations were incubated with target cells and fresh PBMCs at different effector: target (E:T) ratio for 16 hrs. The supernatant were harvested and the cytotoxicity was measured by LDH release assay using Cytotox 96 non-radioreactive kit from Promega following their instruction. Cytotoxicity is also measured by standard 4 hours ^{51}Cr -release assay.

[00168] *Transduction and selection of luciferase/GFP positive cells.* BV173 and JMN cells were engineered to express high level of GFP-luciferase fusion protein, using lentiviral vectors containing a plasmid encoding the luc/GFP (39). Using single cell cloning, only the cells showing high level GFP expression were selected by flow cytometry analysis and were maintained and used for the animal study.

[00169] *Therapeutic trials of the WT1 ab1 in a human leukemia xenograft NSG model.* Two million BV173 human leukemia cells were injected IV into NSG mice. On day 5, tumor engraftment was confirmed by firefly luciferase imaging in all mice

that were to be treated; mice were then randomly divided into different treatment groups. On day 6 and day 10, mAb WT1 ab1 or the isotype control mAb were injected IV. In animals that also received human effector cells with or without mAb, cells (CD34 and CD3-depleted healthy donor human PBMCs) were injected IV into mice (10^7 cells/mouse) 4 hr before the mAb injections. Tumor growth was assessed by luminescence imaging once to twice a week, and clinical activity was assessed daily.

[00170] *Selection and characterization of scFv specific for WT1 peptide/HLA-A0201 complexes.* Selection of an WT1-specific scFV is achieved using a 9-mer WT1-derived peptide comprising amino acids 126-134 (RMFPNAPYL, SEQ ID NO: 1) of WT1. This peptide has been shown to be processed and presented by HLA-A0201 to induce cytotoxic CD8⁺ T cells that are capable of killing WT1-positive tumor cells.

[00171] Representative data from a patient with AML after 6 vaccinations with a WT1 RMF peptide are shown in Figure 2 as evidence that the WT1 peptides are immunogenic in humans. CD3 T cells were stimulated with WT1-A peptide (amino acids 126-134) and cytotoxicity was measured using a standard ⁵¹Cr release assay against 697 (A0201⁺ WT1⁺) or SKLY-16 (A0201⁺ WT1⁻) cell lines. The SKLY-16 cells pulsed with WT1-A or irrelevant peptide EW were used as positive and negative controls for the specificity of the killing. Effector: Target (E:T) ratios are indicated on the X-axis. Data demonstrates that T cells killed WT1⁺ tumor cells in a HLA- A0201-restricted manner.

[00172] Well established phage display libraries and screening methods known to those of skill in the art were used to select scFv fragments highly specific for an WT1-A peptide/HLA-A2 complex. In one embodiment, a human scFv antibody phage display library (7×10^{10} clones) was used for the selection of mAb clones. In order to reduce the conformational change of MHC1 complex introduced by immobilizing onto plastic surfaces, a solution panning method was used in place of conventional plate panning. In brief, biotinylated antigens were first mixed with the human scFv phage library, then the antigen-scFv phage antibody complexes were pulled down by streptavidin-conjugated Dynabeads M-280 through a magnetic rack.

[00173] Bound clones were then eluted and were used to infect *E. Coli* XL1-Blue. The scFv phage clones expressed in the bacteria were purified (35, 36). Panning was performed for 3-4 cycles to enrich scFv phage clones binding to HLA-A0201/WT1 complex specifically. Positive clones were determined by standard ELISA method against biotinylated single chain HLA-A0201/WT1 peptide complexes (Figure 3). Positive clones were further tested for their binding to HLA-A2/peptide complexes on live cell surfaces by flow cytometry, using a TAP-deficient, HLA-A0201⁺ cell line, T2. T2 cells were pulsed with peptides (50µg/ml) in serum-free RPMI1640 medium, in the presence of 20 µg/ml β 2 M overnight. The cells were washed, and staining was performed as follows.

[00174] The cells were first stained with purified scFv phage clones, followed by staining with a mouse anti-M13 mAb, and finally, a goat F(ab)₂ anti-mouse Ig conjugated to FITC. Each step of the staining was done for 30-60 minutes on ice. The cells were washed twice between each staining step. Results are shown in Figure 4. The phage clone of WT1 ab1 was shown to bind to T2 cells pulsed with only WT1-A peptide (RMFPNAPYL: abbreviated hereinafter as RMF), but not to T2 cells alone, T2 cells pulsed with control EW peptide, or heteroclitic peptide WT1-A.

[00175] Binding affinity of the full-length IgG1 of WT1 ab1 to the peptide/A0201 complex was tested by titration of WT1 ab1 at indicated concentrations. T2 cells were pulsed with 50 µg/ml or 10µg/ml, followed by secondary goat F(ab) anti-human IgG/PE. Results are shown in Figure 5.

[00176] Figure 6 shows the density of peptide/HLA-A0201 complex recognized by WT1 ab. T2 cells were pulsed overnight (ON) with RMF (upper panel) or RHAMM-R3 (lower panel) peptides at indicated concentrations, and binding of WT1 ab1, WT1 ab3 and WT1 ab5 at a concentration of 1 µg/ml was analyzed by flow cytometry.

Table 11: Summary of phage panning for WT1/A2

<i>Phage libraries</i>	<i>Rounds of panning</i>	<i>Number of single clone screened</i>	<i>Solution ELISA positive Rate</i>	<i>Number of Unique Clones</i>
<i>scFv-spleen A</i>	4	72	41/96	13
<i>scFv-spleen B</i>	4	47	3/47	2
<i>scFv-spleen C</i>	3	58	0/58	0
<i>scFv-PBMC A</i>	4	68	34/68	10
<i>scFv-PBMC B</i>	3	90	19/90	7
<i>Fab-spleen A</i>	4	12	2/12	0
<i>Fab-spleen B</i>	4	36	0/36	0
<i>Fab-spleen C</i>	4	24	2/24	1
<i>Fab-spleen C</i>	3	72	38/72	5
<i>Fab-spleen D</i>	4	72	4/72	1
<i>Fab-spleen D</i>	4	72	4/72	3

[00177] The positive scFv clones were tested for their binding to HLA-A2/peptide complexes on live cell surfaces by indirect flow cytometry on: (i) a TAP deficient HLA-A0201⁺ T2 cells pulsed with WT1 peptide or irrelevant peptide; (ii) a WT1⁺ HLA-A0201⁺ cell lines such as BV173, U266 and control WT1⁻ HLA-A0201⁺ cell line SKLY-16, or WT1⁺ HLA-A0201⁻ cell line, K562, without pulsing with the peptide. The latter

determine the recognition and binding affinity of the scFv to the naturally processed WT1p/A2 complex on tumor cells.

[00178] A total of 28 phage clones were screened for their ability to produce mAb specific for the WT1-A peptide/A2 complex. The recognition of the WT1p/A2 complex on live cells was measured by the binding of the phage scFv to T2 cells pulsed with the WT1-A peptide and the other HLA-A2-binding peptides (50 µg/ml). These include: T2 cells alone; T2 cells pulsed with WT1-A peptide; T2 cells pulsed with heteroclitic peptide WT1-A1; T2 cells pulsed with irrelevant EW peptide (HLA-A0201- binding 9-mer peptide, derived from Ewing sarcoma) or RHAMM-R3 (Figure 4).

Table 12

Clone #	Positive for binding toT2 pulsed with WT1A	Selected for Construction of full-length IgG1
1	+	
2	+	
3	+	+
4	+	
5	+	+
6	+	
7		
8	+	
9		
10		
11		
12		
13	+	+
14		
15	+	+

16		
17	+	
18	+	+
19	+	
20	+	
21		
22	+	
23	+	+
24-28		

Engineering full length mAb using the selected ScFv fragments.

[00179] Phage display technology allows for the rapid selection and production of antigen-specific scFv and Fab fragments, which are useful in and of themselves, or which can be further developed to provide complete antibodies, antigen binding proteins or antigen binding fragments thereof. Complete mAbs with Fc domains have a number of advantages over the scFv and Fab antibodies. First, only full length Abs exert immunological function such as CDC and ADCC mediated via Fc domain. Second, bivalent mAbs offer stronger antigen-binding affinity than monomeric Fab Abs. Third, plasma half- life and renal clearance will be different with the Fab and bivalent mAb. The particular features and advantages of each can be matched to the planned effector strategy. Fourth, bivalent mAb may be internalized at different rates than scFv and Fab, altering immune function or carrier function. Alpha emitters, for example, do not need to be internalized to kill the targets, but many drugs and toxins will benefit from internalization of the immune complex. In one embodiment, therefore, once scFv clones specific for WT1p/A2 were obtained from phage display libraries, a full length IgG mAb using the scFv fragments was produced.

[00180] To produce recombinant human monoclonal IgG in Chinese hamster ovary (CHO) cells, a full length IgG mAb was engineered based on a method known to

those of skill in the art (Tomomatsu et al., Production of human monoclonal antibodies against FcεR1α by a method combining *in vitro* immunization with phage display. Biosci Biotechnol Biochem 73(7): 1465-1469 2009). Briefly, antibody variable regions were subcloned into mammalian expression vectors (Figure 7), with matching Lambda or Kappa light chain constant sequences and IgG1 subclass Fc (for example, see Table 9) (33,34). Purified full length IgG antibodies showed expected molecular weight under both reducing and non-reducing conditions (Figure 8). Kinetic binding analysis (35) confirmed specific binding of full length IgG to WT1/A2, with a KD in nanomolar range (Figures 9 and 10.)

EXAMPLE 1

Selection of ScFv specific for WT1p/A2 complex using a fully human phage display library.

[00181] Phage display against HLA-A0201/WT1 peptide complex was performed for 3-4 panning rounds to enrich the scFv phage clones binding to HLA-A0201/WT1 peptide complex specifically. Individual scFv phage clones positive for the WT1 peptide/A2 complex were determined by ELISA and the clones that possessed unique DNA coding sequences were subjected to further characterization. To test if the ScFv bound to the WT1p/A2 complex on live cells, the positive phage clones were tested for binding to a TAP deficient, HLA-A0201-positive cell line, T2. T2 cells can only present the exogenous peptides and therefore have been widely used for detection of specific epitopes presented by HLA-A2 molecules. A total 35 phage clones were screened on T2 cells and 15 clones showed specific binding to T2 cells pulsed with only WT1 RMF peptide, but not to T2 cells alone or pulsed with control RHAMM-3 peptide (Figure 4). The scFv phage clones were unable to bind to several tumor cell lines that are WT1- and HLA-A2 positive suggesting the affinity of the ScFv was weak, compared to full-length bivalent mAb.

EXAMPLE 2

Generation of full-length human IgG1.

[00182] Immunological function such as CDC and ADCC depend on the Fc domain of bivalent IgG. In addition, bivalent mAbs offer stronger antigen-binding avidity than

monomeric scFv Abs. Therefore, 6 ScFv phage clones among 15 positive phage clones were selected to produce the full-length human monoclonal IgG1 in HEK293 and Chinese hamster ovary (CHO) cells. In brief, variable regions of the mAbs were sub-cloned into mammalian expression vectors with matching human lambda or kappa light chain constant region and human IgG1 constant region sequences. Purified full length IgG antibodies showed expected molecular weight under both reducing and non-reducing conditions (Figure 8). Five clones were successfully engineered into human IgG1.

EXAMPLE 3

Specificity and binding avidity of the IgG1 mAb

Binding to human cell lines.

T2 cells, pulsed with or without RMF or RHAMM-3 peptides initially were used to determine the binding specificity of the mAb. Three out of five human IgG1, including WT1 ab1, showed specific binding to the T2 cells that were pulsed only with WT1 peptide, but not to T2 alone or T2 pulsed with control peptide RHAMM-R3. The binding avidity of the mAb were substantially enhanced (50 to 100 fold), compared to their parental scFv phage clones. Two mAbs among the five showed binding to T2 cells alone or pulsed with the control peptide RHAMM-R3, although the binding was greatly enhanced by pulsing the cells with RMF peptide. This suggested that these two mAb also had high avidity for epitopes on the HLA-A2 molecule alone and therefore were excluded from further investigation. This was not unexpected, as it has been a common problem for producing such mAb against peptide/MHC complexes, given the predominance of the MHC class I molecule epitopes within the complexes. It also suggests that the precise specificity of the mAb for the complexes might not be determined easily at the scFv stage, due to the lower affinity compared to the bivalent IgG1 mAb.

[00183] The binding affinity of the three remaining mAb specific for the WT1p/A2 complex first was investigated on T2 cells pulsed with or without RMF and control RHAMM-R3 peptides (50 ug/ml) by titration of the mAbs. Mab WT1 ab1 showed the strongest binding, down to a concentration of 0.01ug/ml. Isotype control human

IgG1 showed no binding at any concentrations tested (Figure 5). In addition to WT1 ab1, the two other mAb, WT1 ab3 and WT1 ab5, showed specific binding at a range of <1 ug/ml of the mAb concentrations used. The specific recognition of the mAb also depended on the antigenic density on the cell surface. T2 cells were pulsed with RMF or R3 peptides at 50, 25, 12.5, 6.25, 3.13 and 1.6 ug/ml; the test mAb were used at 1ug/ml for the T2 binding assay. WT1 ab1 could detect the RMF peptide/A2 complex on T2 cells in a concentration-dependent manner at concentrations as low as 1.6 ug/ml, with significantly higher fluorescence intensity than the other 2 mAb (Figure 6). These results further confirmed that the WT1 ab1 possessed the highest avidity for the RMFp/A0201 complex.

EXAMPLE 4

Epitope mapping.

[00184] To investigate with more precision the epitope for WT1 ab1 recognition, RMF peptides were substituted at positions 1, 3, 4, 5, 6, 7 and 8 with alanine and pulsed onto T2 cells and were tested for binding of WT1 ab1. Positions 2 and 9 of the RMF were left intact, as these are the anchor residues for peptide binding to the HLA-A0201 molecule. Except for position 1, alanine substitutions at other positions did not greatly affect the binding of the WT1 ab1, as compared to the native RMF peptide (Figure 19). However, substitution of position 1 by either alanine (WT1-A1-B) or tyrosine (WT1-A1), completely abrogated the binding of WT1 ab1. The loss of binding was not due to the reduction of peptide binding affinity to the HLA-A2 molecule, as both peptides showed the strongest binding in T2 stabilization assay using the mAb specific for the HLA-A2 molecule, clone BB7 (Figure 20). These results show that the arginine at position 1 of the RMF peptide is one of the most crucial for the WT1 ab1 recognition. The role of the residues at positions #2 and 9, could not be assessed.

[00185] The next important question was whether WT1 ab1 was able to recognize naturally processed WT1 epitope RMF presented by HLA-A0201 molecules on the cell surface. A panel of cell lines was selected based on the expression of WT1 mRNA and HLA genotyping (Table 12).

Table 12

Mesothelioma/solid tumor	HLA-A2 genotype	WT1 mRNA	WT1 AB binding	Ratio of BB7.2: Isotype
JMN	+	+	+	248
Meso 37	+	+	+	68
Meso 47	+ (02xx)	+	+	17
H2452	+	+	+	20
Meso34	+	+	+	37.3
Meso-56	+ (02xx)	+	+	23
H2373	+	+	-	1.6
MSTO	-	+	-	1.4
VAMT	-	3+	-	NT
Mewo	+	-	-	3
Leukemias and other hematopoietic cell lines				
BV173	+	++	+	196
BA25	+	?	+	117.5
ALL-3	+	+	+	60
U266	+	+	-	1.8
697	+	5+	-	4.1
LAMA	+	2+	-	6
SKLY-16	+	-	-	1.9
HL-60	-	3+	-	0.4
K562	-	2+	-	1.5
T2	+	NT	-	>20

[00186] WT1 mRNA expression level was estimated according to a previous study (Rena), by quantitative RT-PCR.

[00187] Among 7 human mesothelioma cell lines that are positive for both HLA-A0201 and WT1 mRNA, WT1 ab1 bound to 6 out of 7 cell lines, but not to the cells that were either HLA-A0201 negative (MSTO and VAMT) or WT1 mRNA negative, such as melanoma cell line, Mewo (Figure 21).

[00188] Similarly, among 9 leukemia cell lines tested, WT1 ab1 bound to 3 cell lines BV173 (Figure 22), BA25 and ALL-3, that are positive for both WT1 mRNA and HLA-A0201, but not to HLA-A2-negative cell lines HL60 and K562, that have been demonstrated to express a high level of WT1 transcripts in numerous studies.

[00189] As expected, intensity of binding of the WT1 AB1 also appeared to be directly associated with the expression level of HLA-A0201 molecule, as shown in mesothelioma cells H2373, leukemia cell lines 697 and LAMA, and myeloma cell line U266. Although these cell lines were positive for both WT1 transcripts and HLA-A2, the expression level of the HLA-A2 was low (Table 12) and the mAb did not show binding. On the other hand, the results obtained with T2 cells argue against the possibility of WT1 ab1 binding to HLA-A0201 alone as T2 cells expressed a high level of HLA-A2 molecule. Notably, WT1 ab1 did not bind to T2 cells alone or pulsed with R3 and other HLA-A0201-binding peptides such as Ewing sarcoma-derived (EW) or the heteroclitic peptide for the RMF peptide, WT1-A1; these two peptides have been shown to have higher affinity for the HLA-A0201 molecule in T2 stabilization assay (28). These results provided strong evidences that WT1 ab1 recognition was specific for epitopes jointly composed of the RMF peptide and the A0201 molecule in a complex. The binding of the other two mAb, WT1 ab3 and WT1 ab5, to the BV173 and JMN cells was also weaker than WT1 ab1.

EXAMPLE 5

Quantitation of WT1 ab1 Binding Sites on Cells.

[00190] A radioimmunoassay using ¹²⁵I-labeled WT1 ab1 was used to confirm the specificity of the antibody for WT1⁺ HLA-A0201⁺ cell lines, to determine an affinity constant and to assess the number of antibody binding sites per cell on a panel of

cell lines. Scatchard analysis based on binding to JMN cells showed an avidity constant of about 0.2nM (Figure 23). This number was confirmed by interferometry using a Forte Bio device. ¹²⁵I-labeled WT1 ab1 was used to confirm the specificity of the antibody for WT1⁺ HLA-A0201⁺ cell lines, and to assess the number of antibody binding sites on a panel of cell lines (Figure 24). Because we cannot determine whether the bivalent mAb is binding to 1 or 2 complexes on the surface, total epitopes per cell could be as high as twice the number of mAb binding sites. Again, WT1 ab1 bound to JMN, ALL-3, BA25, BV173, which are positive for both HLA-A0201 and WT1 mRNA, but not HLA-A0201 negative (HL60) or WT1 mRNA negative (SKLY-16) cells. WT1 ab1 did not bind to 697 cells, which are both HLA-A0201 and WT1 positive, but contain low levels of HLA-A0201 (Table 12), confirming that a certain level of total MHC complex is needed to present sufficient WT1 peptide for WT1 ab1 binding. T2 pulsed with RMF bound the highest number of mAb (50,000 per cell), followed by JMN cells which bound $\sim 6 \times 10^3$ WT1 ab1 molecules per cell, translating to between 6×10^3 and 1.2×10^4 RMFpeptide/A2 complexes per cell assuming monovalent or bivalent antibody binding, respectively. The three positive leukemia cell lines bound between 1×10^3 and 2×10^3 WT1 ab1 molecules, or 2×10^3 - 4×10^3 binding sites (Figure 24). These results were confirmed by quantitative flow cytometry.

EXAMPLE 6

WT1 ab1 Binding to leukemic patient samples.

[00191] We next investigated if WT1 ab1 is able to detect the RMF epitope on primary AML cells. Radioimmunoassay showed significant binding of the WT1 AB1 to AML blasts of patient 1, who is HLA-A2 positive and WT1 mRNA⁺. WT1 ab1 bound to CD33⁺ and CD34⁺ double positive cells that account for more than 83% of the whole cell populations (Figure 25). WT1 ab1 did not bind to the cells of 3 other patients who are either HLA-A2 positive but mRNA negative or HLA-A2 negative. WT1 ab1 did not bind to PBMCs from either HLA-A2 positive or negative healthy donors. The results were confirmed by flow cytometry analysis. WT1 AB1 did not show significant binding to the blasts from the patients who were A0201 negative (Figure 26). The results were consistent with the results obtained with mRNA expression of the cells. These data confirm that the level of RMFp/HLA-A0201 on

the surface of leukemia cells is adequate to allow reactivity with the WT1 ab1 and the levels on WT1 negative healthy cells is not significant.

EXAMPLE 7

WT1 AB1 mediates ADCC against tumor cells

[00192] ADCC is considered to be one of the major effector mechanisms of therapeutic mAb in humans. In the presence of human PBMC, WT1 ab1 mediated dose-dependent PBMC ADCC against the T2 cells loaded with RMF peptide, but not T2 cells alone or T2 cells pulsed with control R3 peptide (Figure 27). Importantly, WT1 ab1 was able to mediate ADCC against naturally presented RMF epitope by HLA-A0201 molecule on tumor cells, such as the mesothelioma cell line, JMN (Figure 33), and the leukemia cell line BV173 (Figure 34), but not the HLA-A2 negative cells MSTO (Figure 28) or HL-60 (Figure 29). The killing was consistently observed at 1 µg/ml or below of WT1 ab1 using PBMCs as effector cells from multiple healthy donors. Importantly, WT1 ab1 also killed primary A0201-positive AML blasts that were positive for the WT1 ab1 binding, but not the blasts that were HLA-A0201 negative (Figure 30). These results demonstrated that WT1 ab1 mediates specific ADCC against cells that naturally express RMF and HLA-A0201 complex at physiologic levels as well as on cell lines.

EXAMPLE 8

WT1 AB1 eliminates human leukemia cells in NSG mice

[00193] The efficacy of WT1 ab1 in vivo was tested in NOD SCID gamma (NSG) mice xenografted intravenously 6 days previously with BV173 bcr/abl positive acute lymphoblastic leukemia. At the time of treatment, mice had leukemia in their liver, spleen, and BM visible by luciferase imaging. NSG mice lack mature B-, T- and NK-cells, and we hypothesized that introducing human effector cells (CD3⁺, CD34⁺, PBMCs) along with WT1 ab1 treatment would recapitulate *in vivo* the ADCC-mediated anti-tumor effects observed in vitro. Injection of effectors along with two 100 µg doses of WT1 ab1 nearly ablated tumor growth compared to controls (Figure 31). This effect was durable over the course of the experiment (Figure 32). Interestingly, early on in the trials, effector cells alone or combined with control IgG

appeared to promote more rapid growth of leukemia relative to mice injected with leukemia alone, demonstrating that the anti-tumor effect was unrelated to the effectors by themselves. Several of the mice given effectors (with or without control mAb) died early in the experiment with massive infiltration of the BV173.

[00194] Surprisingly, WT1 ab1 treatment without human effectors also dramatically reduced tumor burden as well as the WT1 ab1 combined with effectors for approximately 30 days (Figure 32), though tumors eventually relapsed far more quickly in the WT1 ab1 alone group, when compared to WT1 ab1 combined with effectors group (Figure 32). We confirmed the effect of WT1 ab1 alone and titrated the dosage to evaluate potency. WT1 ab1 alone produced a marked reduction in tumor burden at early time points at all doses tested (25-100 µg times 2 doses). Tumors in all treatment groups relapsed slowly after antibody therapy was stopped; and by day 23 (13 days after the last antibody injection), significantly more tumor relapse could be observed in the 25 µg group compared to the 100 µg dose group, indicating a dose-response to WT1 ab1 therapy (Figure 33). Before treatment, mice displayed the largest tumor burden in the liver, which was quickly cleared by WT1 ab1. Upon relapse, tumor in the highest dose group appeared to develop mainly in bone marrow, while tumor returned more quickly to the liver in mice treated with the lowest dose.

EXAMPLE 9

Engineering antibodies to enhance their cytotoxic abilities.

[00195] Bispecific antibodies are constructed that recognize both WT1/A2 complex and CD3 on immune T cells as described (43,44) with a human IgG1 Fc. Bispecific antibodies are expected to recruit and target cytotoxic T cells to WT1/A2 positive cancer cells, while maintaining Fc effector functions and long half life *in vivo*. Three mechanisms are involved in the specific killing of cancer cells mediated by bispecific antibodies: i) killing by activated T cells; ii) ADCC activity; iii) CDC activity. Other formats of bispecific antibodies can be constructed, such tandem scFv molecules (taFv), diabodies (Db), or single chain diabodies (scDb), and fusion protein with human serum albumin (45, 46, 47, 48), but are devoid of Fc effector functions with distinct pharmacokinetic profiles.

[00196] WT1/A2 target specific-ADCC activity is enhanced by expressing antibodies recombinantly in glycol-engineered CHO cells as described in U.S. patents 8,025,879; 8,080,415; and 8,084,022. The modified oligosaccharide N-glycan on Asn297 alters effector functions as follows: 1) higher affinity binding to CD16/FcRIIIa for improved ADCC activity mediated by human Natural Killer cells; 2) reduced binding affinity to CD32b/FcRIIb, an inhibitory receptor expressed in multiple types of immune cells (except NK cells), for improved ADCC activity mediated by effector cells such as neutrophils and antigen presentation by macrophage and DC cells (50, 51, 52). Enhanced antibodies are expected to achieve better efficacy for cancer treatment *in vivo*.

[00197] Glycosylation (specifically fucosylation) variants of IgG Fc can be produced using host expression cells and methods described in U.S. patents 8,025,879; 8,080,415; and 8,084,022, the contents of which are incorporated by reference. Briefly, messenger RNA (mRNA) coding for heavy or light chain of the antibodies disclosed herein, is obtained by employing standard techniques of RNA isolation purification and optionally size based isolation. cDNAs corresponding to mRNAs coding for heavy or light chain are then produced and isolated using techniques known in the art, such as cDNA library construction, phage library construction and screening or RT-PCR using specific relevant primers. In some embodiments, the cDNA sequence may be one that is wholly or partially manufactured using known *in vitro* DNA manipulation techniques to produce a specific desired cDNA. The cDNA sequence can then be positioned in a vector which contains a promoter in reading frame with the gene and compatible with the low fucose-modified host cell.

[00198] Numerous plasmids that contain appropriate promoters, control sequences, ribosome binding sites, and transcription termination sites, and optionally convenient markers are known in the art, these include but are not limited to, vectors described in U.S. Pat. Nos. 4,663,283 and 4,456,748. In one embodiment, the cDNA coding for the light chain and that coding for the heavy chain may be inserted into separate expression plasmids. In an alternative embodiment, the cDNA coding for the light chain and that coding for the heavy chain may be inserted together in the same plasmid, so long as each is under suitable promoter and translation control. Results are shown in Figure 34.

References

1. Mundlos S, et al. Nuclear localization of the protein encoded by the Wilms' tumor gene WT1 in embryonic and adult tissues. *Development* 1993;119: 1329-41.
2. Keilholz U, et al. Wilms' tumor gene 1 (WT1) in human neoplasia. *Leukemia* 2005; 19: 1318-1323.
3. Inoue K, et al. WT1 as a new prognostic factor and a new marker for the detection of minimal residual disease in acute leukemia. *Blood* 1994; 84 (9): 3071-3079.
4. Ogawa H, et al. The usefulness of monitoring WT1 gene transcripts for the prediction and management of relapse following allogeneic stem cell transplantation in acute type leukemia. *Blood* 2003; 101 (5): 1698- 1704.
5. Yarnagarni T, et al. Growth Inhibition of Human Leukemic Cells by WT1(Wilms Tumor Gene) Antisense Oligodeoxynucleotides: Implications for the Involvement of WT1 in Leukemogenesis. *Blood* 1996; 87: 2878- 2884.
6. Bellantuono I, et al. Two distinct HLA-A0201-presented epitopes of th Wilms tumor antigen 1 can function as targets for leukemia-reactive CTL. *Blood* 2002; 100 (10): 3835-3837.
7. Gaiger A, et al. WT1- specific serum antibodies in patients with leukemia. *Clin. Cancer Res.* 2001; 7 (suppl 3): 761-765.
8. Oka Y, et al. WT1 peptide cancer vaccine for patients with hematopoietic malignancies and solid cancers. *The Scientific World Journal* 2007; 7: 649-665.
9. Kobayashi H, et al. Defining MHC class II T helper epitopes from WT1 antigen. *Cancer Immunol.Immunother.* 2006; 55 (7): 850-860.
10. Pinilla-Ibarz J, et al. Improved human T-cell responses against synthetic HLA-A0201 analog peptides derived from the WT1 oncoprotein. *Leukemia* 2006; 20 (11): 2025-2033.
11. May RJ, et al. Peptide epitopes from the Wilms tumor 1 oncoprotein stimulate CD4+ and CD8+ T cells that recognize and kill human malignant mesothelioma tumor cells. *Clin Cancer Res.* 2007; 13:4547-4555.
12. Keilholz U, et al. A clinical and immunologic phase 2 trial of Wils tumor gene product (WT1) peptide vaccination in patients with AML and MDS. *Blood* 2009; 113: 6541-6548.
13. Rezwani K, et al. Leukemia-associated antigen-specific T-cell responses following combined PR1 and WT1 peptide vaccination in patients with myeloid malignancies. *Blood* 2008; 111 (1): 236-242.

14. Maslak P, et al.. Vaccination with synthetic analog peptides derived from WT1 oncoprotein induces T cell responses in patients with complete remission from acute myeloid leukemia. *Blood* 2010; Acpt Minor rev.
15. Krug LM, et al. WT1 peptide vaccinations induce CD4 and CD8 T cell immune responses in patients with mesothelioma and non-small cell lung cancer. *Cancer Immunol Immunother* 2010; in revision.
16. Morris E, et al. Generation of tumor-specific T-cell therapies. *Blood Reviews* 2006; 20: 61-69.
17. Houghton AN et al. Monoclonal antibody therapies- a “constant” threat to cancer. *Nat Med* 2000; 6:373- 374.
18. Miederer M, et al. Realizing the potential of the Actinium-225 radionuclide generator in targeted alpha particle therapy applications. *Adv Drug Deliv Rev* 2008; 60 (12): 1371-1382.
19. Noy R, T-cell-receptor-like antibodies: novel reagents for clinical cancer immunology and immunotherapy. *Expert Rev Anticancer Ther* 2005; 5 (3): 523-536.
20. Chames P, et al. Direct selection of a human antibody fragment directed against the tumor T-cell epitope HLA-A1-MAGE-A1 from a nonimmunized phage-Fab library. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000; 97: 7969-7974.
21. Held G, et al. Dissecting cytotoxic T cell responses towards the NY-ESO-1 protein by peptide/MHC- specific antibody fragments. *Eur J Immunol.* 2004: 34:2919-2929.
22. Lev A, et al. Isolation and characterization of human recombinant antibodies endowed with the antigen- specific, major histocompatibility complex-restricted specificity of T cells directed toward the widely expressed tumor T cell-epitopes of the telomerase catalytic subunit. *Cancer Res* 2002; 62: 3184-3194.
23. Klechevsky E, et al. Antitumor activity of immunotoxins with T-cell receptor-like specificity against human melanoma xenografts. *Cancer Res* 2008; 68 (15): 6360-6367.
24. Azinovic I, et al. Survival benefit associated with human anti-mouse antibody (HAMA) in patients with B-cell malignancies. *Cancer Immunol Immunother* 2006; 55(12):1451-8.
25. Tjandra JJ, et al. Development of human anti-murine antibody (HAMA) response in patients. *Immunol Cell Biol* 1990; 68(6):367-76.
26. Riechmann L, et al. Reshaping human antibodies for therapy. *Nature* 1988; 332 (6162): 332:323.
27. Queen C, et al. A humanized antibody that binds to the interleukin 2 receptor. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989; 86 (24): 10029–33.

28. Gerd R, et al. Serological Analysis of Human Anti-Human Antibody Responses in Colon Cancer Patients Treated with Repeated Doses of Humanized Monoclonal Antibody A33. *Cancer Res* 2001; 61, 6851– 6859.
29. Cheever MA, et al. The prioritization of cancer antigens: A national Cancer Institute pilot project for the acceleration of translational research. *Clin Cancer Res* 2009; 15 (17): 5323-5337.
30. Drakos E, et al. Differential expression of WT1 gene product in non-Hodgkin lymphomas. *Appl Immunohistochem Mol Morphol* 2005; 13 (2): 132-137.
31. Asemissen AM, et al. Identification of a highly immunogenic HLA-A*01-binding T cell epitope of WT1. *Clin Cancer Res* 2006; 12 (24):7476-7482.
32. Tomimatsu K, et al. Production of human monoclonal antibodies against FceRIa by a method combining in vitro immunization with phage display. *Biosci Biotechnol Biochem* 2009; 73 (7): 1465-1469.
33. Lidija P, et al. An integrated vector system for the eukaryotic expression of antibodies or their fragments after selection from phage display libraries. *Gene* 1997; 187(1): 9-18.
34. Lisa JH, et al. Crystallographic structure of an intact IgG1 monoclonal antibody. *Journal of Molecular Biology* 1998; 275 (5): 861-872.
35. Yasmina NA, et al. Probing the binding mechanism and affinity of tanezumab, a recombinant humanized anti-NGF monoclonal antibody, using a repertoire of biosensors. *Protein Science* 2008; 17(8): 1326–1335.
36. Roberts WK, et al. Vaccination with CD20 peptides induces a biologically active, specific immune response in mice. *Blood* 2002; 99 (10): 3748-3755.
37. Caron PC, Class K, Laird W, Co MS, Queen C, Scheinberg DA. Engineered humanized dimeric forms of IgG are more effective antibodies. *J Exp Med* 176:1191-1195. 1992.
38. McDevitt M, et al. Tumor targeting with antibody-functionalized, radiolabeled carbon nanotubes. *J. Nuclear Med* 2207; 48 (7))1180-1189.
39. Xue SA, et al. Development of a Wilms' tumor-specific T-cell receptor for clinical trials: engineered patient's T cells can eliminate autologous leukemia blasts in NOD/SCID mice. *Haematologica* 2010; 95 (1): 126-134.
40. McDevitt MR, et al. Tumor therapy with targeted atomic nanogenerators. *Science* 2001; 294 (5546): 1537-1540.
41. Borchardt PE, et al. Targeted Actinium-225 in vivo generators for therapy of ovarian cancer. *Cancer Res* 2003; 63: 5084-5090.
42. Singh Jaggi J, et al. Selective alpha-particle mediated depletion of tumor vasculature with vascular normalization. *Plos One* 2007; 2 (3): e267.

43. Yan W, et al. Enhancing antibody Fc heterodimer formation through electrostatic steering effects. *J. Biol. Chem.* 2010; 285: 19637-19646.
44. Rossi EA, et al. Stably tethered multi-functional structures of defined composition made by the dock and lock method for use in cancer targeting. *Proc Natl Aca Sci USA* 2006; 103:6841-6.
45. Ryutaro A, et al. Cytotoxic enhancement of a bispecific diabody by format conversion to tandem single-chain variable fragment (taFv). *J Biol Chem* 2011; 286: 1812-1818.
46. Anja L, et al. A recombinant bispecific single-chain antibody, CD19 × CD3, induces rapid and high lymphoma-directed cytotoxicity by unstimulated T lymphocytes. *Blood* 2000; 95(6): 2098-2103.
47. Weiner GJ, et al. The role of T cell activation in anti-CD3 x antitumor bispecific antibody therapy. *J. Immunology* 1994; 152(5): 2385-2392.
48. Dafne M, et al. Improved pharmacokinetics of recombinant bispecific antibody molecules by fusion to human serum albumin. *J Biol Chem* 2007; 282: 12650-12660.
49. Liu C, et al. Modified host cells and uses thereof, PCT/US2010/0081195.
50. Francisco J, et al. Neutrophils Contribute to the Biological Antitumor Activity of Rituximab in a Non-Hodgkin's Lymphoma Severe Combined Immunodeficiency Mouse Model. *Clin Cancer Res* 2003; 9: 5866.
51. Kavita M, et al. Selective blockade of inhibitory Fc receptor enables human dendritic cell maturation with IL-12p70 production and immunity to antibody-coated tumor cells. *Proc natl Aca Sci USA* 2005; 102(8): 2910–2915.
52. Raphael A, et al. Inhibitory Fc receptors modulate in vivo cytotoxicity against tumor targets. *Nature Medicine* 2000; 6:443-446.
53. Milenic ED. Monoclonal antibody-based therapy strategies: providing options for the cancer patient. *Curr Pharm Des.* 2002; 8: 1794-1764.
54. Grillo-Lopez AJ. Anti-CD20 mAbs: modifying therapeutic strategies and outcomes in the treatment of lymphoma patients. *Expert Rev Anticancer Ther.* 2002; 2 (3): 323-329.
55. Jones KL & Buzdar AU. Evolving novel anti-Her2 strategies. *Lancet Oncol.* 2009; 10 (12): 1179-1187.
56. Reddy MM, Deshpande A & Sattler M. targeting JAK2 in the therapy of myeloproliferative neoplasms. *Exper Opin Ther targets* 2012; 3: 313-324.
57. Takeuchi K & Ito F. Receptor tyrosine kinases and targeted cancer therapeutics. *Biol Pharm Bull.* 2011; 34 (12) 1774-1780.
58. Roychowdhury S & Talpaz M. Managing resistance in chronic myeloid leukemia. *Blood Rev.* 2011; (6): 279- 290.

59. Konnig R. Interactions between MHC molecules and co-receptors of the TCR. *Curr Opin Immunol* 2002; 14 (1) 75-83.
60. Sergeeva A, Alatrash G, He H, Ruusaard K, Lu S, Wygant J, McIntyre BW, Ma Q, Li D, St John L, Clise-Dwyer K & Molldrem JJ. An anti-PR1/HLA-A2 T-cell receptor-like antibody mediated complement-dependent cytotoxicity against acute myeloid leukemia progenitor cells. *Blood* 2011; 117 (16): 4262-4272).
61. Takigawa N, Kiura K & Kishimoto T. Medical Treatment of Mesothelioma: Anything New? *Curr Oncol Rep* 2011; DOI 10.1007/s11912-011-0172-1.
62. Raja S, Murthy SC & Mason DP. Malignant Pleural Mesothelioma. *Curr Oncol Rep* 2011; DOI 10. 1007/s11912-0177-9.
63. Gerber JM, Qin L, Kowalski J, Smith D, Griffin CA, Vala MS, Collector MI, Perkins B, Zahurak M, Matsui W, Gocke CD, Sharkis S, Levitsky H & Jones RJ. Characterization of chronic myeloid leukemia stem cells. 2011; *Am J Hematol*. 86: 31-37.
64. Rezwani K, Yong AS, Savani BN, Mielke S, Keyvanfar K, Gostick E, Price DA, Douek DC & Barrett AJ. Graft-versus-leukemia effects associated with detectable Wilms tumor-1 specific T lymphocytes after allogeneic stem-cell transplantation for acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 2007; 110 (6): 1924-1932.
65. Persic L, Roberts A, Wilton J et al. An integrated vector system for the eukaryotic expression of antibodies or their fragments after selection from phage display libraries. *Gene* 1997; 187(1): 9-18.
66. Cheng L, Xiang JY, Yan S et al. Modified host cells and uses thereof. *PCT/US2010/0081195*.
67. Lindmo T, Boven E, Cuttitta F, Fedorko J & Bunn PA Jr. Determination of the immunoreactive fraction of radiolabeled monoclonal antibodies by linear extrapolation to binding at infinite antigen excess. *J Immunol Methods*. 1984; 72 (1): 77-89.
68. Feng M, Zhang JL, Anver M, Hassan R & Ho M. *In vivo* imaging of human malignant mesothelioma growth orthotopically in the peritoneal cavity of nude mice. *J Cancer* 2011; 2: 123-131.

CLAIMS

What is claimed is:

1. An isolated antibody, or antigen-binding fragment thereof, comprising one of:
 - (A) (i) a heavy chain (HC) variable region comprising HC-CDR1, HC-CDR2 and HC-CDR3 respectively, comprising amino acid sequences SEQ ID NOS: 2, 3, and 4; and a light chain (LC) variable region comprising LC-CDR1, LC-CDR2 and LC-CDR3 respectively, comprising amino acid sequences SEQ ID NOS: 8, 9 and 10;
 - (ii) a heavy chain (HC) variable region comprising HC-CDR1, HC-CDR2 and HC-CDR3 respectively, comprising amino acid sequences SEQ ID NOS: 20, 21 and 22; and a light chain (LC) variable region comprising LC-CDR1, LC-CDR2 and LC-CDR3 respectively, comprising amino acid sequences SEQ ID NOS: 26, 27 and 28;
 - (iii) a heavy chain (HC) variable region comprising HC-CDR1, HC-CDR2 and HC-CDR3 respectively, comprising amino acid sequences SEQ ID NOS: 38, 39 and 40; and a light chain (LC) variable region comprising LC-CDR1, LC-CDR2 and LC-CDR3 respectively, comprising amino acid sequences selected from SEQ ID NOS: 44, 45 and 46;
 - (iv) a heavy chain (HC) variable region comprising HC-CDR1, HC-CDR2 and HC-CDR3 respectively, comprising amino acid sequences SEQ ID NOS: 56, 57 and 58; and a light chain (LC) variable region comprising LC-CDR1, LC-CDR2 and LC-CDR3 respectively, comprising amino acid sequences SEQ ID NOS: 62, 63 and 64;
 - (v) a heavy chain (HC) variable region comprising HC-CDR1, HC-CDR2 and HC-CDR3 respectively, comprising amino acid sequences SEQ ID NOS: 74, 75 and 76; and a light chain (LC) variable region comprising LC-CDR1, LC-CDR2 and LC-CDR3 respectively, comprising amino acid sequences SEQ ID NOS: 80, 81 and 82; or
 - (vi) a heavy chain (HC) variable region comprising HC-CDR1, HC-CDR2 and HC-CDR3 respectively, comprising amino acid sequences SEQ ID NOS:

92, 93 and 94; and a light chain (LC) variable region comprising LC-CDR1, LC-CDR2 and LC-CDR3 respectively, comprising amino acid sequences SEQ ID NOS: 98, 99 and 100; or

(B) a V_H and V_L comprising first and second amino acid sequences, respectively, selected from SEQ ID NOS: 14 and 16; 32 and 34; 50 and 52; 68 and 70; 86 and 88; and 104 and 106; or

(C) an amino acid sequence selected from SEQ ID NOS: 18, 36, 54, 72, 90, and 108.

2. An isolated antibody, or antigen-binding fragment thereof, comprising:

(A) a heavy chain (HC) variable region comprising HC-CDR1, HC-CDR2 and HC-CDR3 respectively, comprising amino acid sequences selected from SEQ ID NOS: (i) 2, 3, and 4; (ii) 20, 21 and 22; (iii) 38, 39 and 40; (iv) 56, 57 and 58; (v) 74, 75 and 76 ; and (vi) 92, 93 and 94; and

(B) a light chain (LC) variable region comprising LC-CDR1, LC-CDR2 and LC-CDR3 respectively, comprising amino acid sequences selected from SEQ ID NOS: (i) 8, 9 and 10; (ii) 26, 27 and 28; (iii) 44, 45 and 46; (iv) 62, 63 and 64; (v) 80, 81 and 82; and (vi) 98, 99 and 100.

3. An isolated antibody, or antigen-binding fragment thereof, comprising:

a V_H and V_L comprising first and second amino acid sequences, respectively, selected from SEQ ID NOS: (i) 14 and 16; (ii) 32 and 34; (iii) 50 and 52; (iv) 68 and 70; (v) 86 and 88; and (vi) 104 and 106.

4. An isolated antibody, or antigen-binding fragment thereof, comprising an amino acid sequence selected from SEQ ID NOS: 18, 36, 54, 72, 90, and 108.

5. The antibody of any of claims 1 to 4, wherein the antibody comprises a human variable region framework region.

6. The antibody of any of claims 1 to 4, wherein the antibody is fully human.

7. The antibody of any of claims 1 to 4, wherein said antibody specifically binds to an WT1 peptide bound to HLA-A2.

8. The antibody of claim 7, wherein said WT1 peptide has the amino acid sequence RMFPNAPYL.
9. The antibody of claim 7, wherein said HLA-A2 is HLA-A0201.
10. The antibody of any of claims 1 to 9, wherein the antigen-binding fragment of said antibody is an Fab, Fab', F(ab')₂, Fv or single chain Fv (scFv).
11. The antibody of any of claims 1 to 9 conjugated to a therapeutic agent.
12. The antibody of claim 11, wherein said therapeutic agent is a drug, toxin, radioisotope, protein, or peptide.
13. An isolated nucleic acid that encodes an antibody of any of claims 1 to 4.
14. An isolated nucleic acid comprising:
 - (A) (i) first, second and third nucleotide sequences selected from the group consisting of SEQ ID NOS: 5, 6 and 7; 23, 24 and 25; 41, 42 and 43; 58, 59 and 60; 77, 78 and 79; and 95, 96 and 97; and
 - (ii) fourth, fifth and sixth nucleotide sequences selected from the group consisting of SEQ ID NOS: 11, 12 and 13; 29, 30 and 31; 47, 48 and 49; 65, 66 and 67; 83, 84 and 85; and 101, 102 and 103; or
 - (B) first and second nucleotide sequences selected from the group consisting of SEQ ID NOS: 15 and 17; 33 and 35; 51 and 53; 69 and 71; 87 and 89 and 105 and 107; or
 - (C) a nucleotide sequence selected from the group consisting of SEQ ID NOS: 19, 37, 55, 73, 91 and 109.
15. An isolated nucleic acid comprising:
 - (A) first, second and third nucleotide sequences selected from the group consisting of SEQ ID NOS: (i) 5, 6 and 7; (ii) 23, 24 and 25; (iii) 41, 42 and 43; (iv) 58, 59 and 60; (v) 77, 78 and 79; and (vi) 95, 96 and 97; and

(B) fourth, fifth and sixth nucleotide sequences selected from the group consisting of SEQ ID NOS: (vii) 11, 12 and 13; (viii) 29, 30 and 31; (ix) 47, 48 and 49; (x) 65, 66 and 67; (xi) 83, 84 and 85; and (xii) 101, 102 and 103.

16. The nucleic acid of claim 15, wherein said first, second and third nucleotide sequences encode HC-CDR1, HC-CDR2 and HC-CDR3, respectively of an antibody and said fourth, fifth and sixth nucleotide sequences encodes LC-CDR1, LC-CDR2 and LC-CDR3, respectively of said antibody.

17. An isolated nucleic acid comprising first and second nucleotide sequences respectively, selected from the group consisting of SEQ ID NOS: (i) 15 and 17; (ii) 33 and 35; (iii) 51 and 53; (iv) 69 and 71; (v) 87 and 89 and (vi) 105 and 107.

18. The nucleic acid of claim 17, wherein said first nucleotide sequence encodes a V_H , and said second nucleotide sequence encodes a V_L of an antibody.

19. An isolated nucleic acid, comprising a nucleotide sequence selected from the group consisting of SEQ ID NOS: 19, 37, 55, 73, 91 and 109.

20. The nucleic acid of claim 19, wherein said nucleic acid encodes an scFv.

21. A vector comprising a nucleic acid of any one of claims 13 to 20.

22. A cell comprising a nucleic acid of any one of claims 13 to 20.

23. The cell of claim 22, wherein said cell expresses on its surface an antibody of claims 1 to 4.

24. A method for detecting WT1 in a whole cell or tissue, said method comprising:

(A) contacting a cell or tissue with an antibody or antigen-binding fragment thereof that specifically binds to a WT1 peptide that is bound to HLA-A2, wherein said antibody comprises a detectable label;

(B) determining the amount of antibody bound to said cell or tissue by measuring the amount of detectable label associated with said cell or tissue, wherein the amount of bound antibody indicates the amount of WT1 in said cell or tissue.

25. The method of claim 24, wherein the antibody specifically binds to a WT1 peptide with the amino acid sequence RMFPNAPYL (SEQ ID NO: 1), bound to HLA-A2.
26. The method of claim 25, wherein the WT1 peptide is bound to HLA-A0201.
27. The method of claim 24, wherein the antibody is an isolated antibody or antigen-binding fragment thereof comprising one of:
- (A) (i) a heavy chain (HC) variable region comprising HC-CDR1, HC-CDR2 and HC-CDR3 respectively, comprising amino acid sequences SEQ ID NOS: 2, 3, and 4; and a light chain (LC) variable region comprising LC-CDR1, LC-CDR2 and LC-CDR3 respectively, comprising amino acid sequences SEQ ID NOS: 8, 9 and 10;
 - (ii) a heavy chain (HC) variable region comprising HC-CDR1, HC-CDR2 and HC-CDR3 respectively, comprising amino acid sequences SEQ ID NOS: 20, 21 and 22; and a light chain (LC) variable region comprising LC-CDR1, LC-CDR2 and LC-CDR3 respectively, comprising amino acid sequences SEQ ID NOS: 26, 27 and 28;
 - (iii) a heavy chain (HC) variable region comprising HC-CDR1, HC-CDR2 and HC-CDR3 respectively, comprising amino acid sequences SEQ ID NOS: 38, 39 and 40; and a light chain (LC) variable region comprising LC-CDR1, LC-CDR2 and LC-CDR3 respectively, comprising amino acid sequences selected from SEQ ID NOS: 44, 45 and 46;
 - (iv) a heavy chain (HC) variable region comprising HC-CDR1, HC-CDR2 and HC-CDR3 respectively, comprising amino acid sequences SEQ ID NOS: 56, 57 and 58; and a light chain (LC) variable region comprising LC-CDR1, LC-CDR2 and LC-CDR3 respectively, comprising amino acid sequences SEQ ID NOS: 62, 63 and 64;
 - (v) a heavy chain (HC) variable region comprising HC-CDR1, HC-CDR2 and HC-CDR3 respectively, comprising amino acid sequences SEQ ID NOS: 74, 75 and 76; and a light chain (LC) variable region comprising LC-CDR1,

LC-CDR2 and LC-CDR3 respectively, comprising amino acid sequences SEQ ID NOS: 80, 81 and 82; or

(vi) a heavy chain (HC) variable region comprising HC-CDR1, HC-CDR2 and HC-CDR3 respectively, comprising amino acid sequences SEQ ID NOS: 92, 93 and 94; and a light chain (LC) variable region comprising LC-CDR1, LC-CDR2 and LC-CDR3 respectively, comprising amino acid sequences SEQ ID NOS: 98, 99 and 100; or

(B) a V_H and V_L comprising first and second amino acid sequences, respectively, selected from SEQ ID NOS: 14 and 16; 32 and 34; 50 and 52; 68 and 70; 86 and 88; and 104 and 106; or

(C) an amino acid sequence selected from SEQ ID NOS: 18, 36, 54, 72, 90, and 108.

28. A kit comprising an antibody of any of claims 1 to 4.
29. Use of an antibody of any of claims 1 to 4 for the treatment of a WT1 positive disease.
30. A pharmaceutical composition comprising an antibody of any of claims 1 to 4 and a pharmaceutically acceptable carrier.
31. A method for treatment of a subject having a WT1-positive disease, comprising administering to the subject a therapeutically effective amount of an antibody or antigen binding fragment thereof of any of claims 1 to 4.
32. The method of claim 31, wherein the WT1-positive disease is a chronic leukemia or acute leukemia or WT1⁺ cancer.
33. The method of claim 31, wherein the WT1-positive disease is selected from the group consisting of chronic myelocytic leukemia, multiple myeloma (MM), acute lymphoblastic leukemia (ALL), acute myeloid/myelogenous leukemia (AML), myelodysplastic syndrome (MDS), mesothelioma, ovarian cancer, gastrointestinal cancers, breast cancer, prostate cancer and glioblastoma.

34. The method of claim 34, wherein said antibody is a conjugate having a cytotoxic moiety linked thereto.
35. A method for treatment of a subject having a WT1-positive disease, comprising administering to the subject a therapeutically effective amount of a nucleic acid of any of claims 13 to 20.
36. The method of claim 35, wherein the WT1-positive disease is a chronic leukemia, acute leukemia or WT⁺ cancer.
37. The method of claim 35, wherein the WT1-positive disease is selected from the group consisting of chronic myelocytic leukemia, multiple myeloma, acute lymphoblastic leukemia (ALL), acute myeloid/myelogenous leukemia (AML), myelodysplastic syndrome (MDS), mesothelioma, ovarian cancer, gastrointestinal cancers, breast cancer, prostate cancer and glioblastoma.
38. Use of a nucleic acid of any of claims 13 to 20 for the treatment of a WT1 positive disease.
39. A pharmaceutical composition comprising a nucleic acid of any of claims 13 to 20.
40. A method for killing a WT1⁺ cell, said method comprising:
contacting the cell with an antibody or antigen-binding fragment thereof that specifically binds to a WT1peptide that is bound to HLA-A2.
41. The method of claim 40, wherein said antibody or antigen-binding fragment thereof has a cytotoxic moiety linked thereto.

1 mgsdvrdlna llpavpslgg gggcalpvsg aaqwapvldf appgasaygs lgppapppap
61 pppppppphs fikqepswgg aepheeqcls aftvhfsggf tgtagacryg pfgpppppsqa
121 **ssgqarmfpn** **apylpscles** qpainqgys tvtfdgtpsy ghtpshhaaq fpnhsfkhed
181 pmgqqqslge qqysvpppy gchtptdsct gsgalllrtp yssdnlyqmt sqlecmtwnq
241 mnlgatlkqv aagsssvkw tegqsnhstg yesdnhttpi lcgayriht hgvfrgiqdv
301 rrvpgvaptl vrsasetsek rpfmcaypgc **nkryfklshl** **qmhsrkhtge** kpyqcdfkdc
361 errfsrsdql krhqrhtgv kpfqcktcqr kfsrsdhlkt htrthtgkts ekpfscrwps
421 cqkkfarsde **lvrrhnmhqr** **nmtklqlal** (SEQ ID NO: 118)

Figure 1

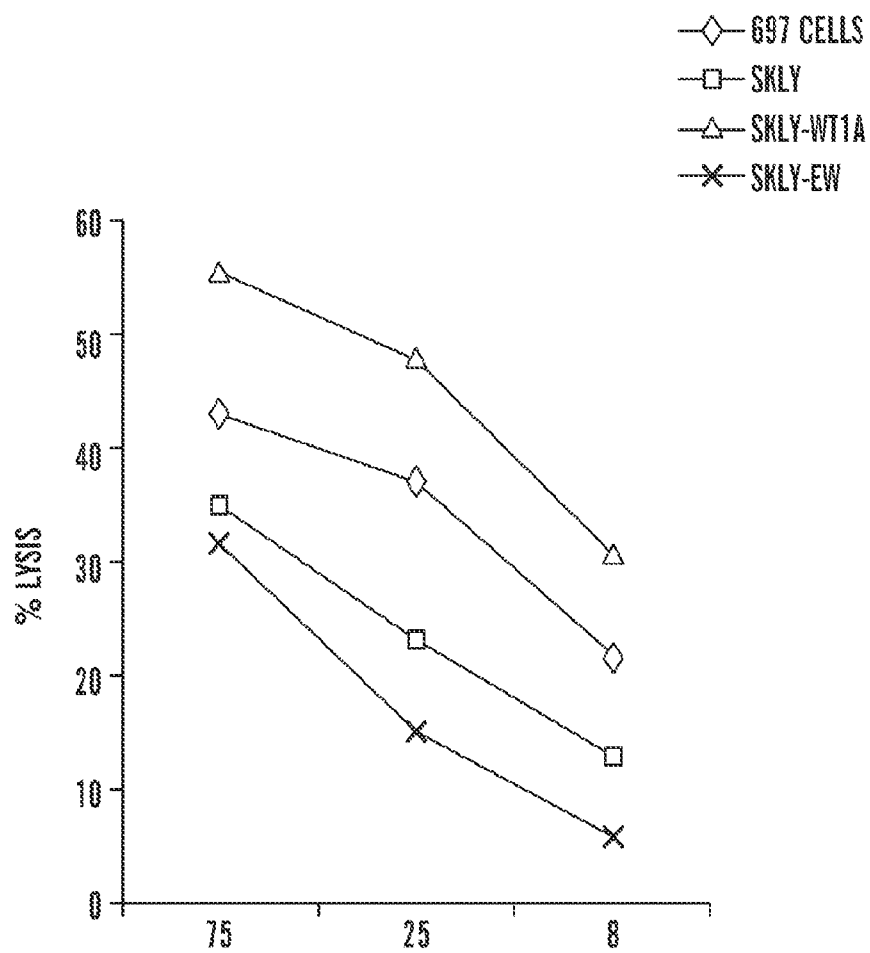


Figure 2

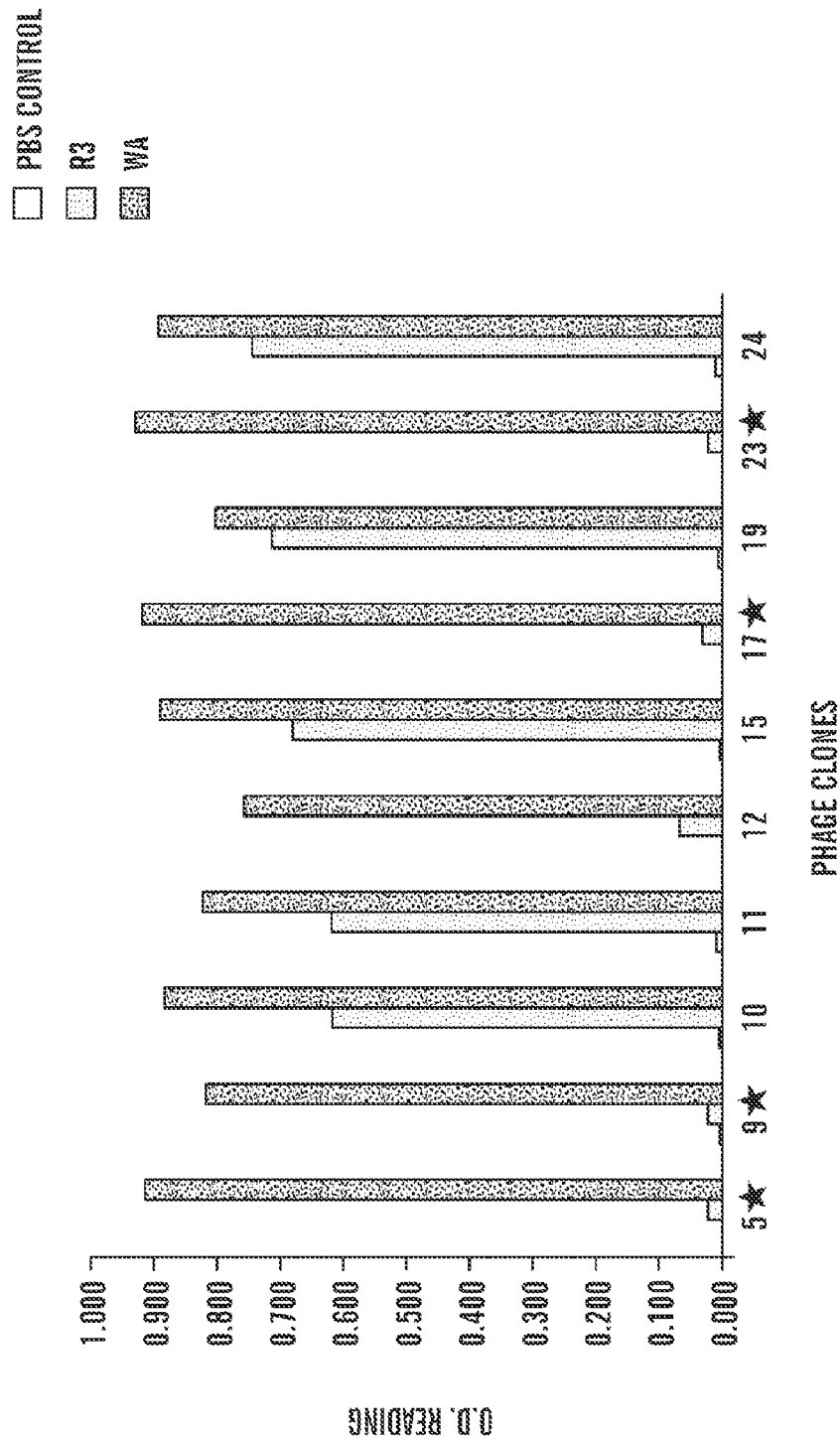


Figure 3

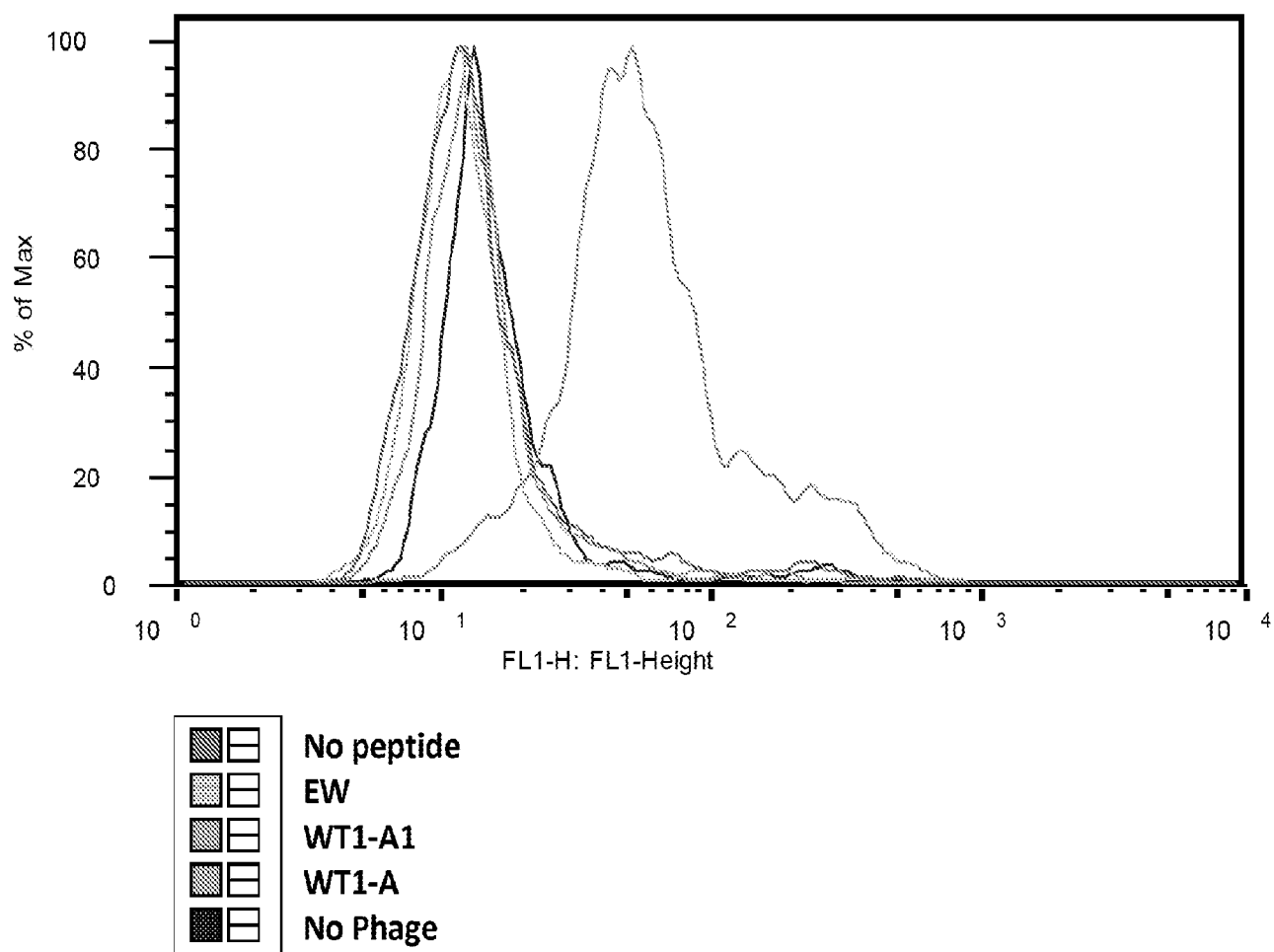
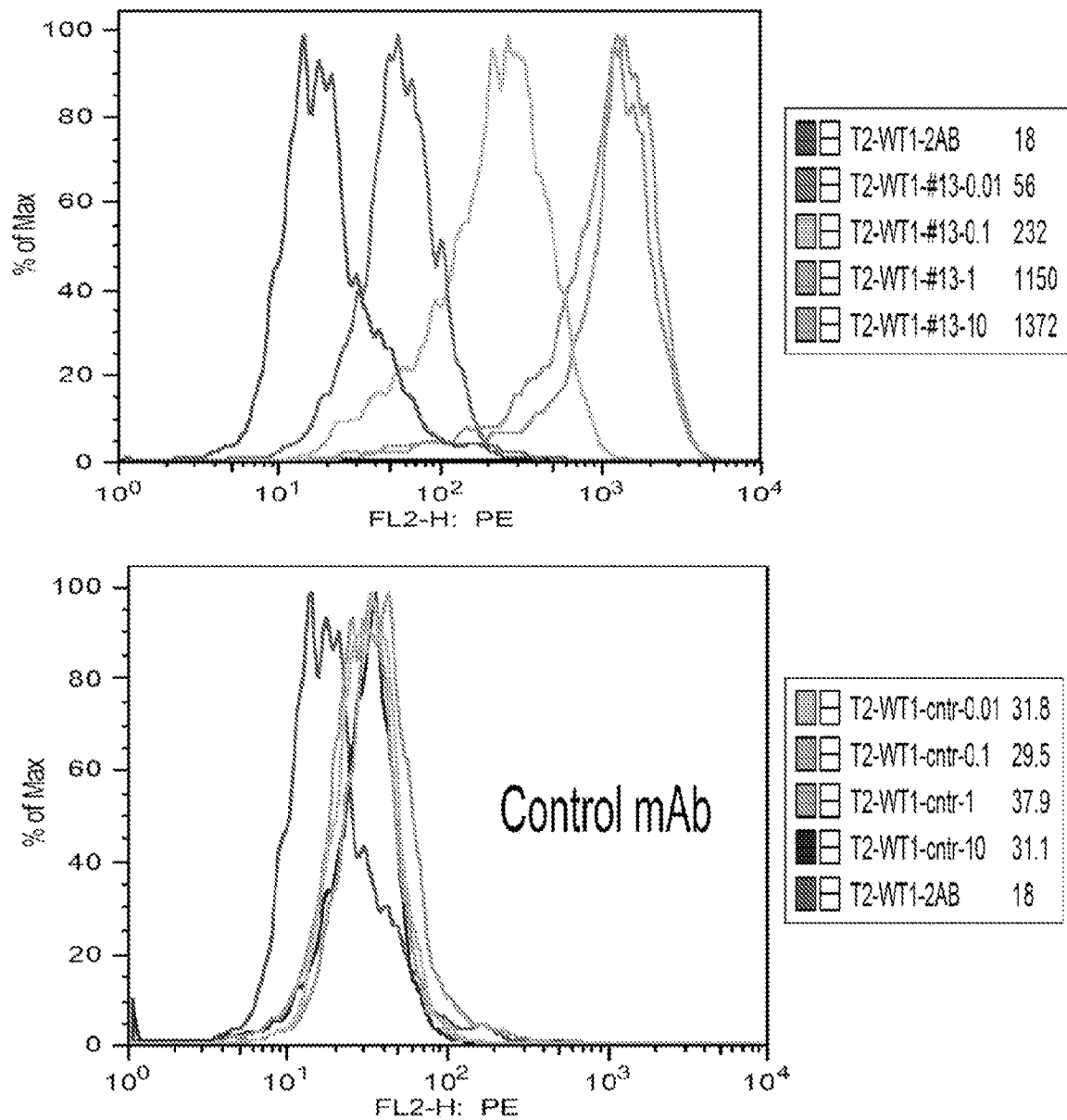


Figure 4



Flow cytometric titration of mAb #13 on T2 cells pulsed w/ WT1 peptide

Figure 5

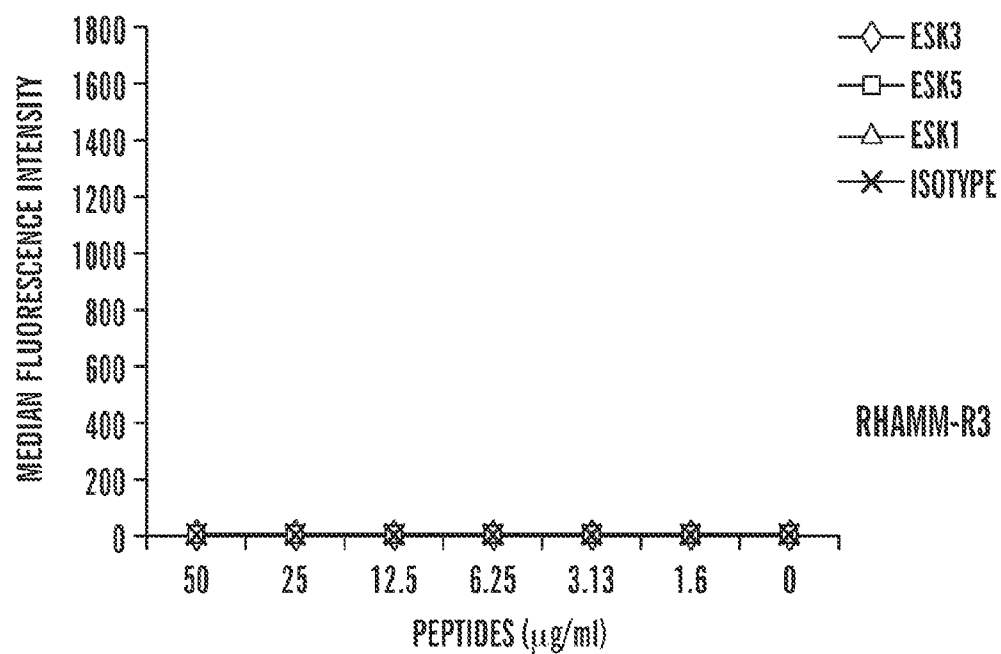
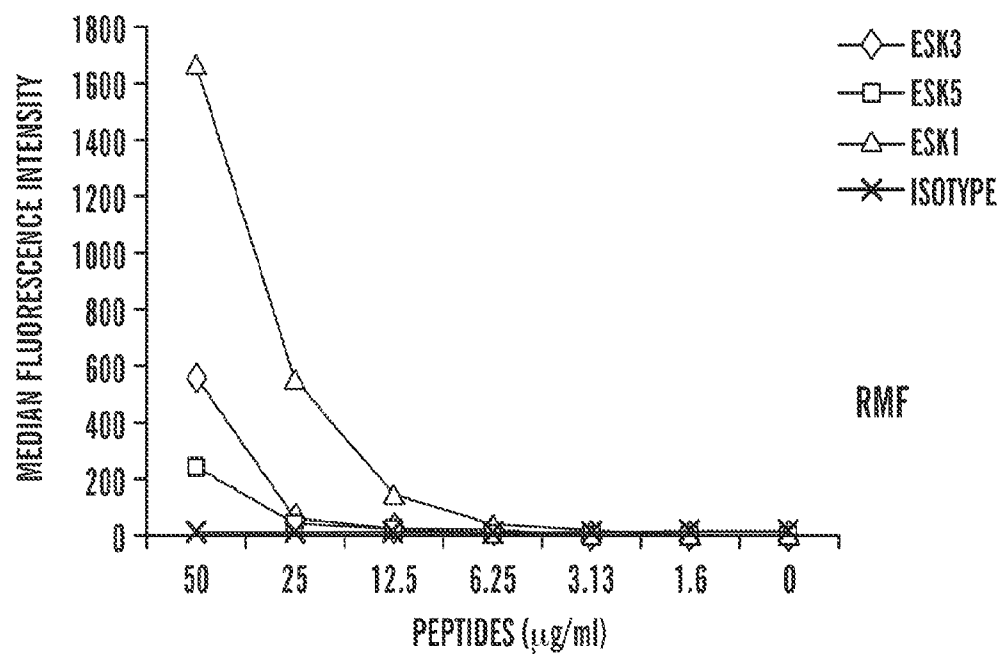
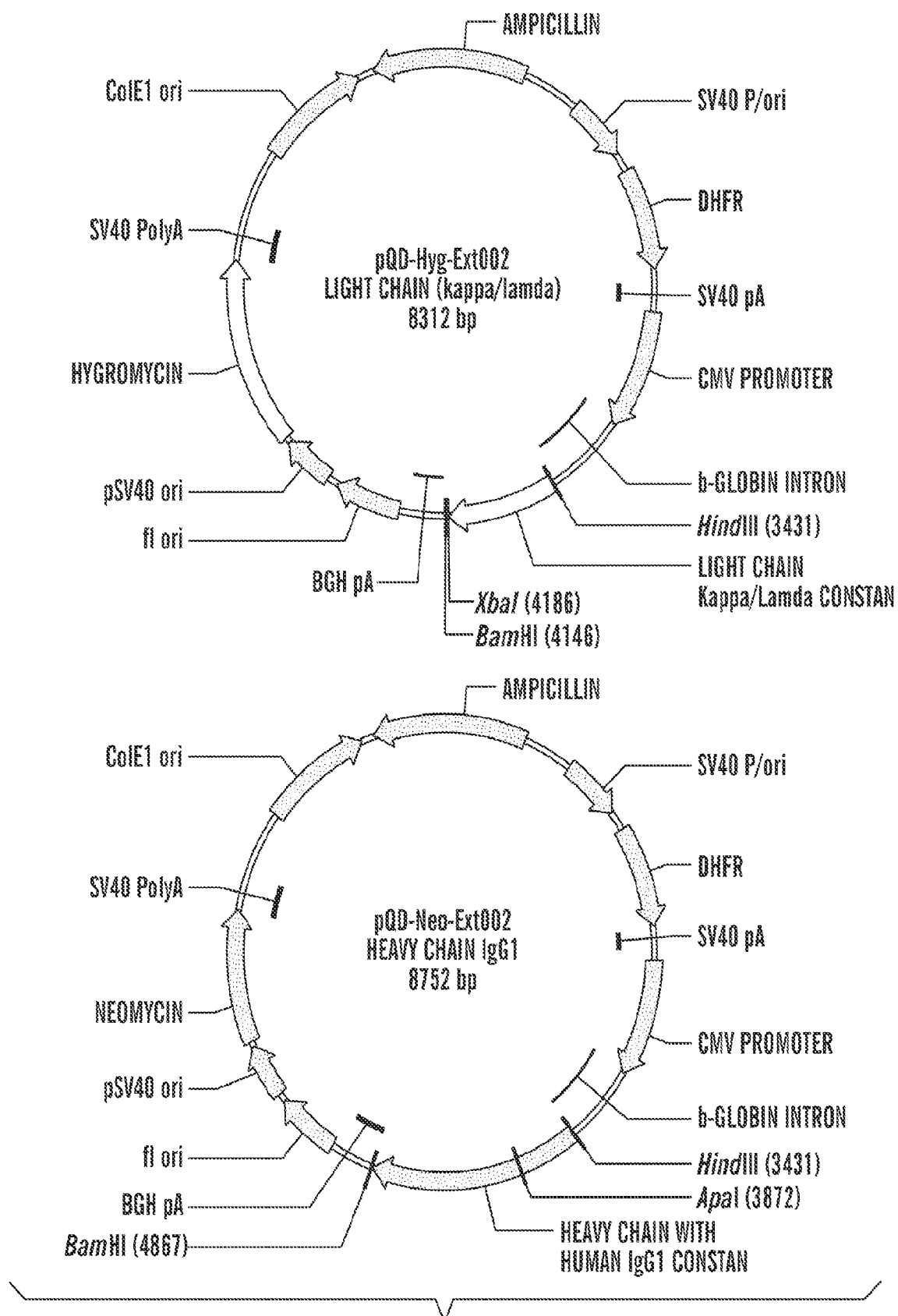


Figure 6

**Figure 7**

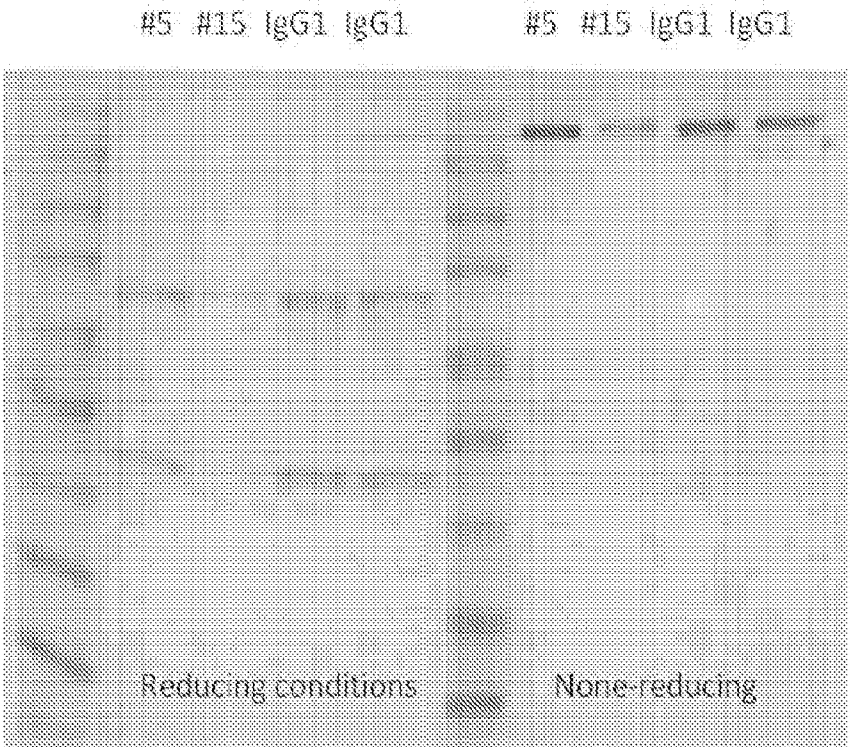


Figure 8

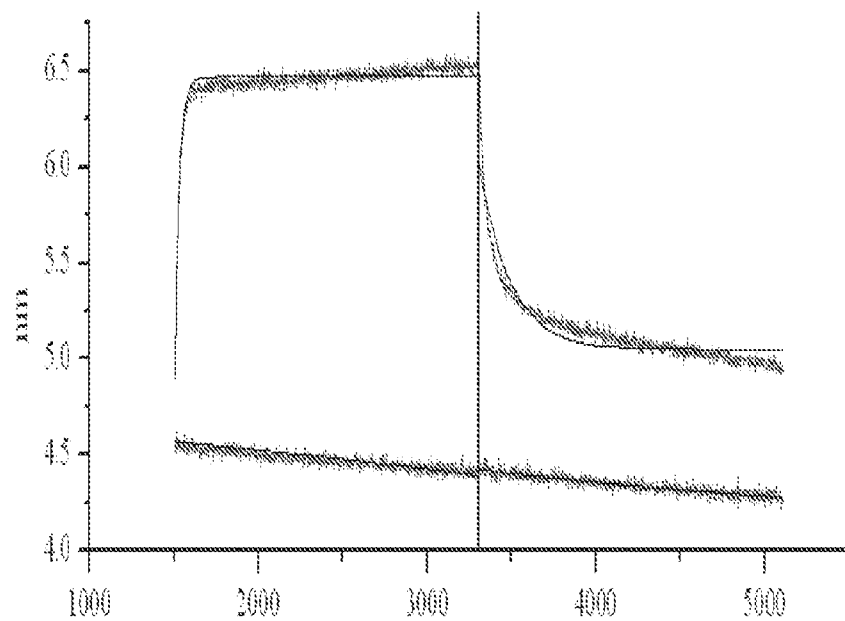
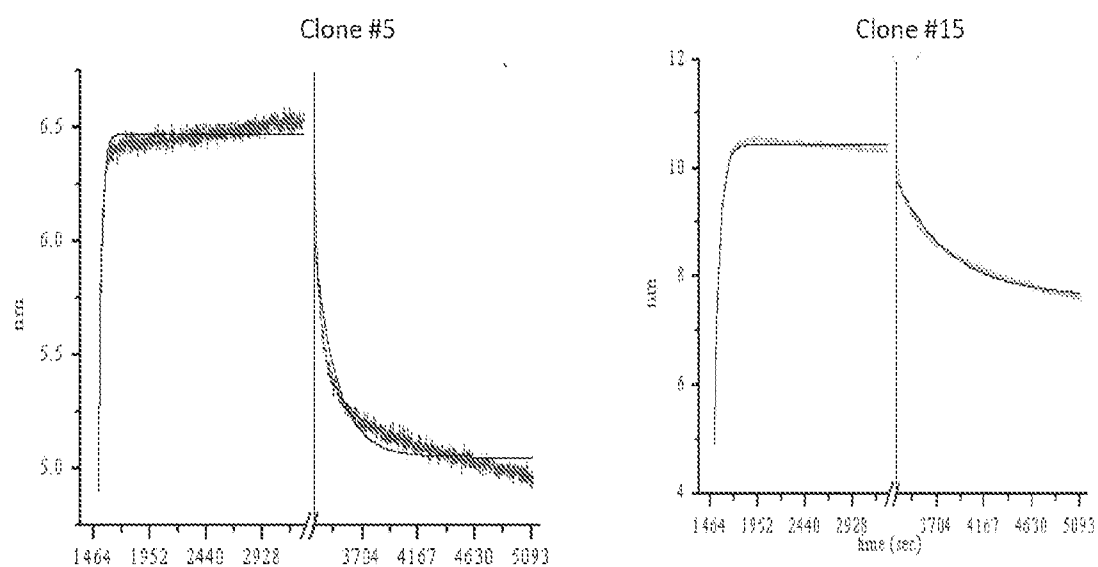
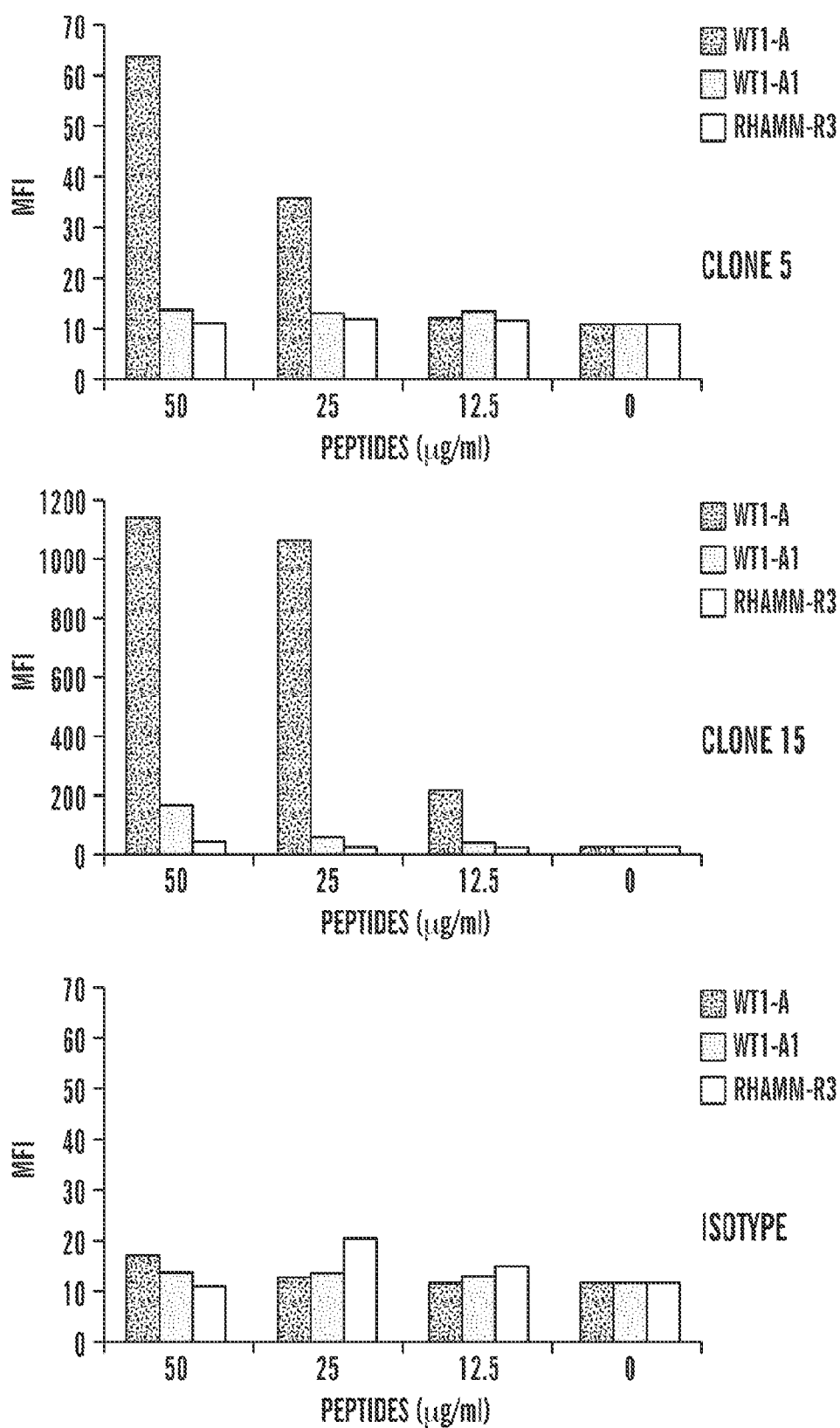


Figure 9



Samples	k_d [1/s]	Error in k_d	k_a [1/Ms]	K_D [M]
EXT002- Clone #5 IgG1	5.48E-3	1.12E-4	4.68E5	1.17E-8
EXT002- Clone #15 IgG1	1.88E-3	2.25E-5	2.45E5	7.68E-9

Figure 10

*Figure 11*

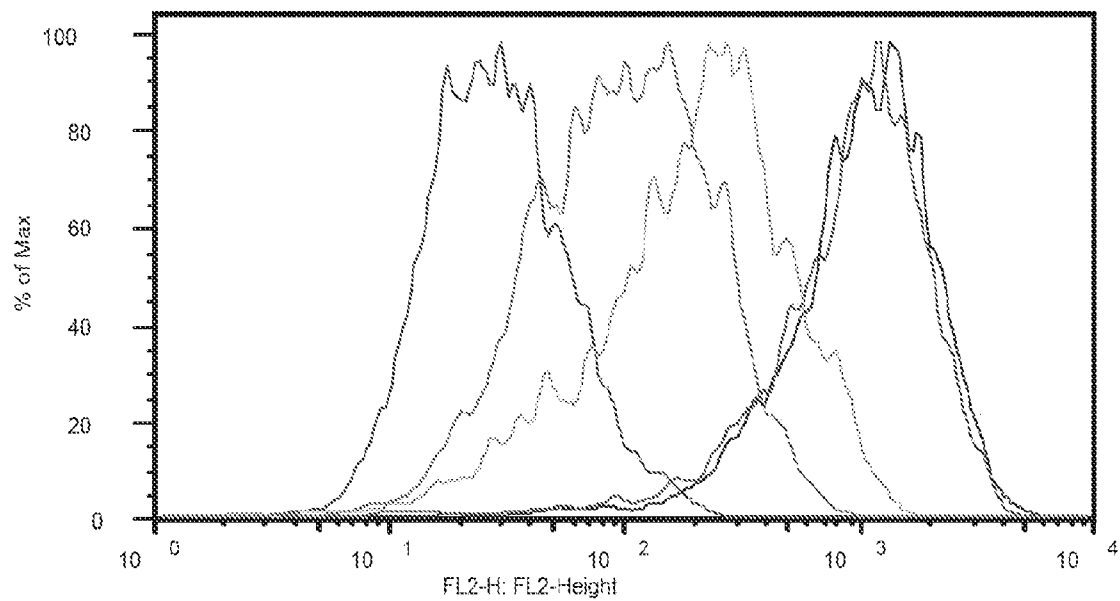
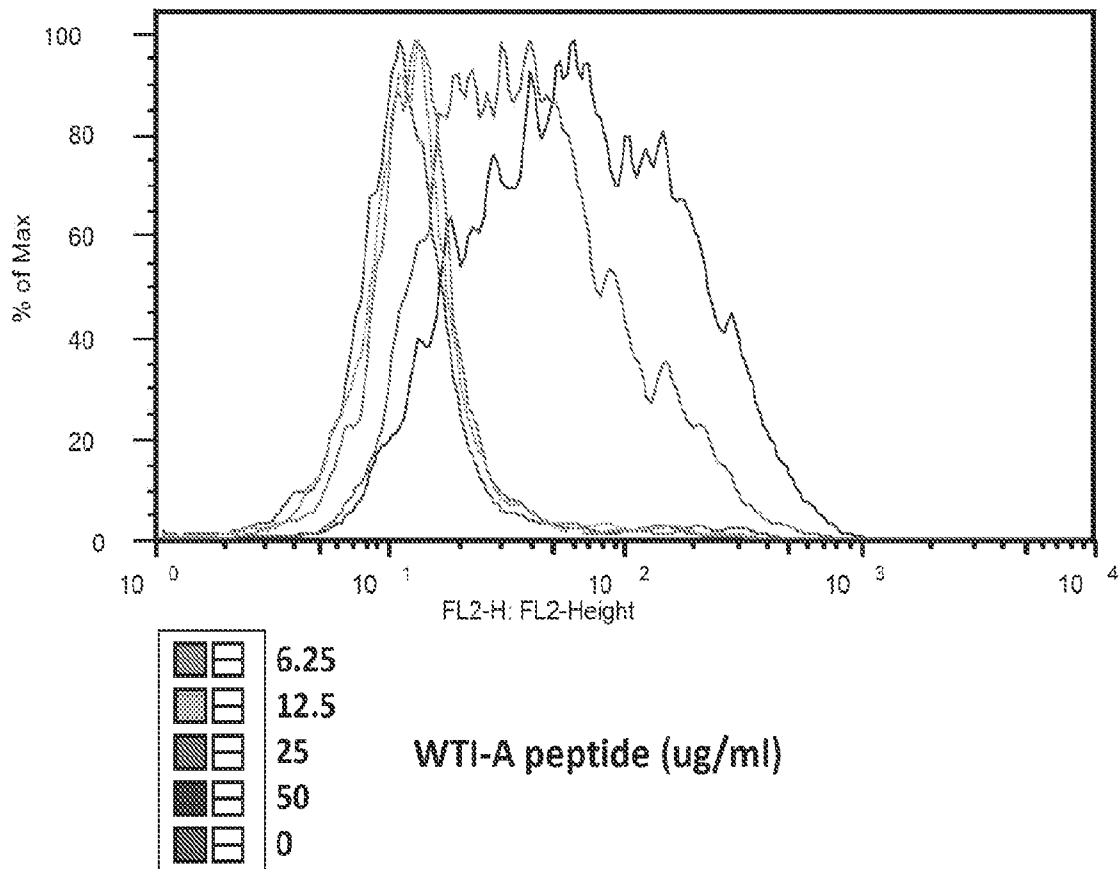


Figure 12

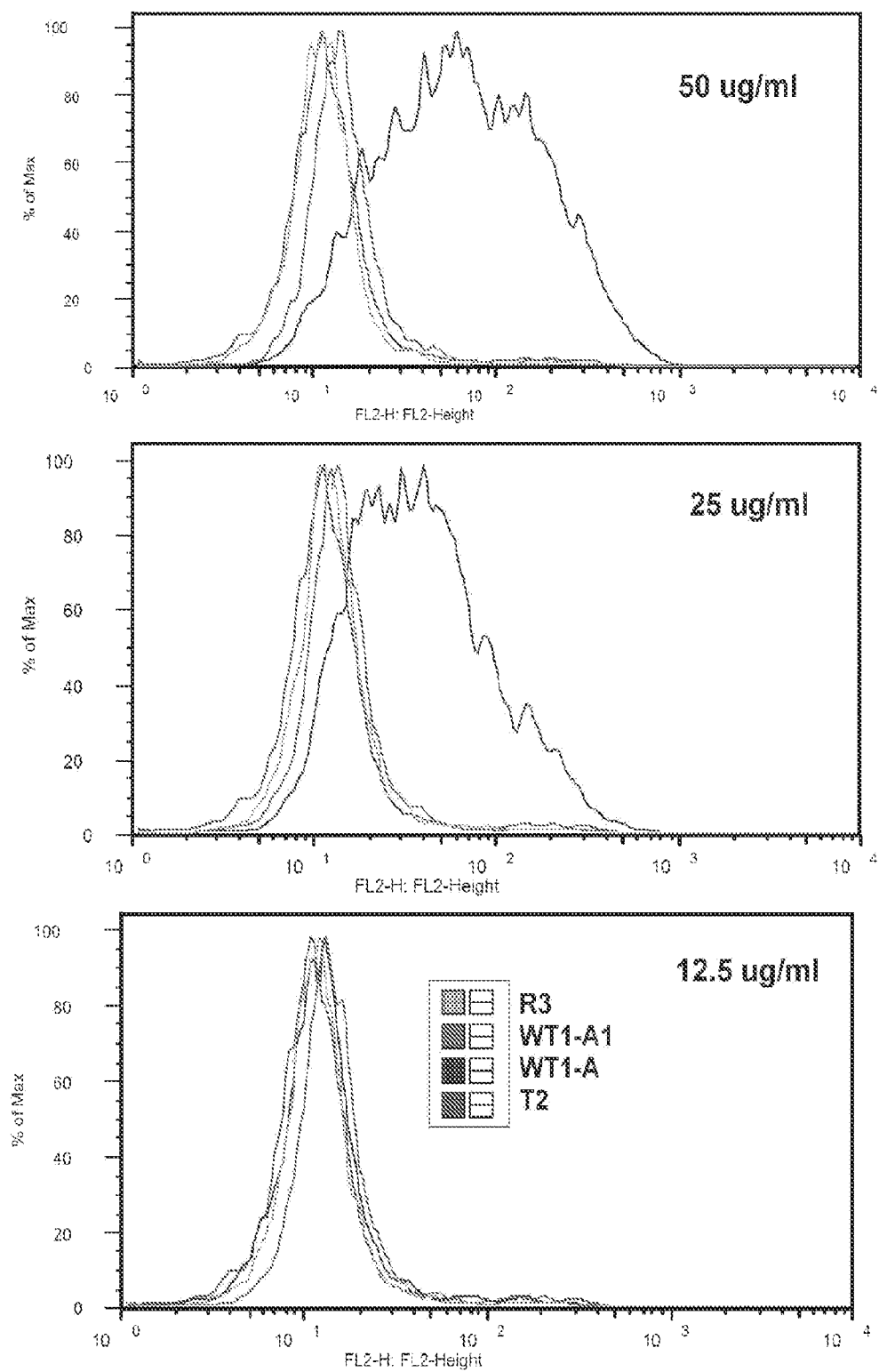
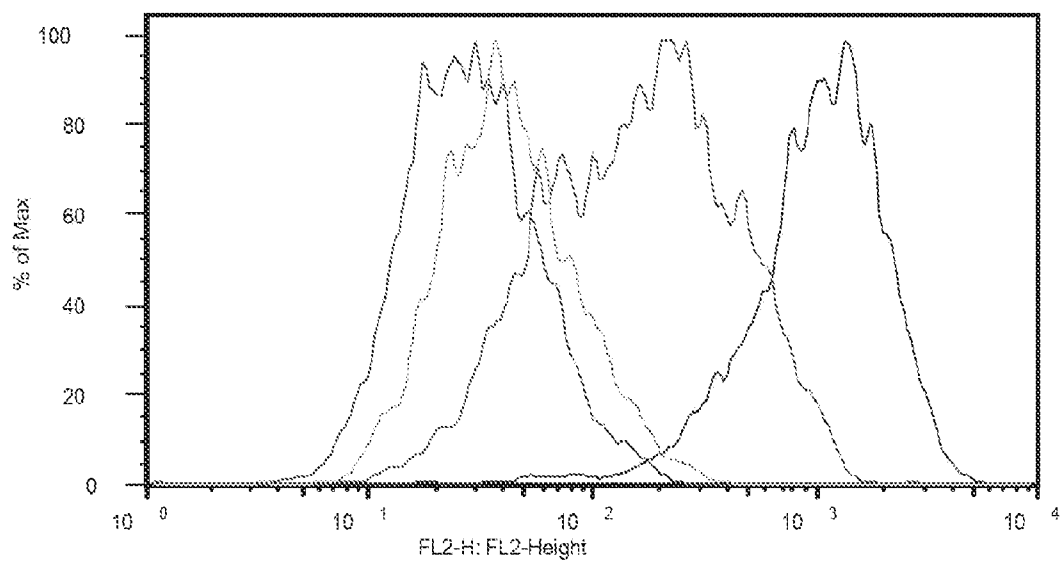
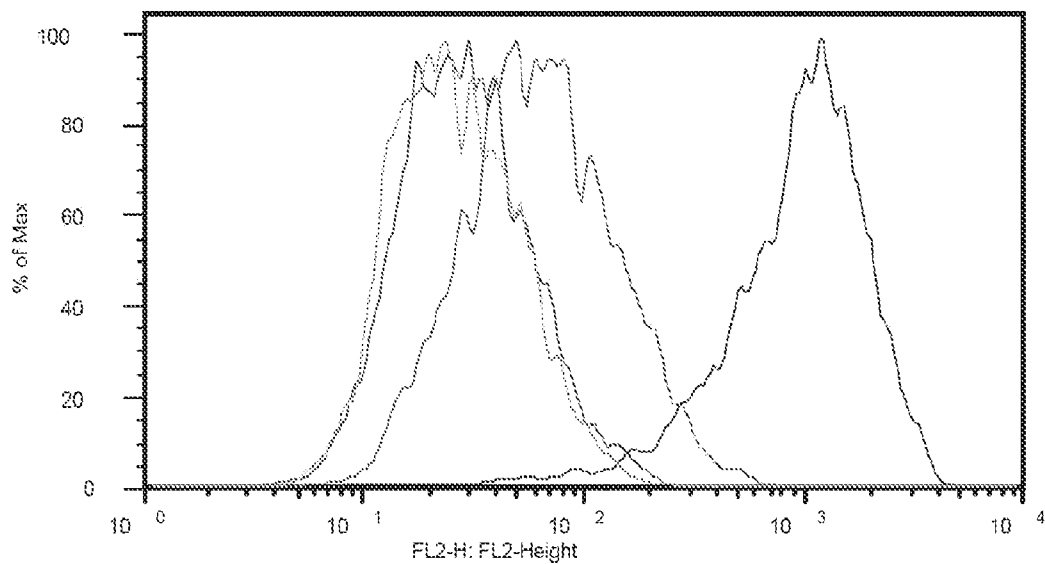


Figure 13



50 ug/ml



25 ug/ml

Figure 14

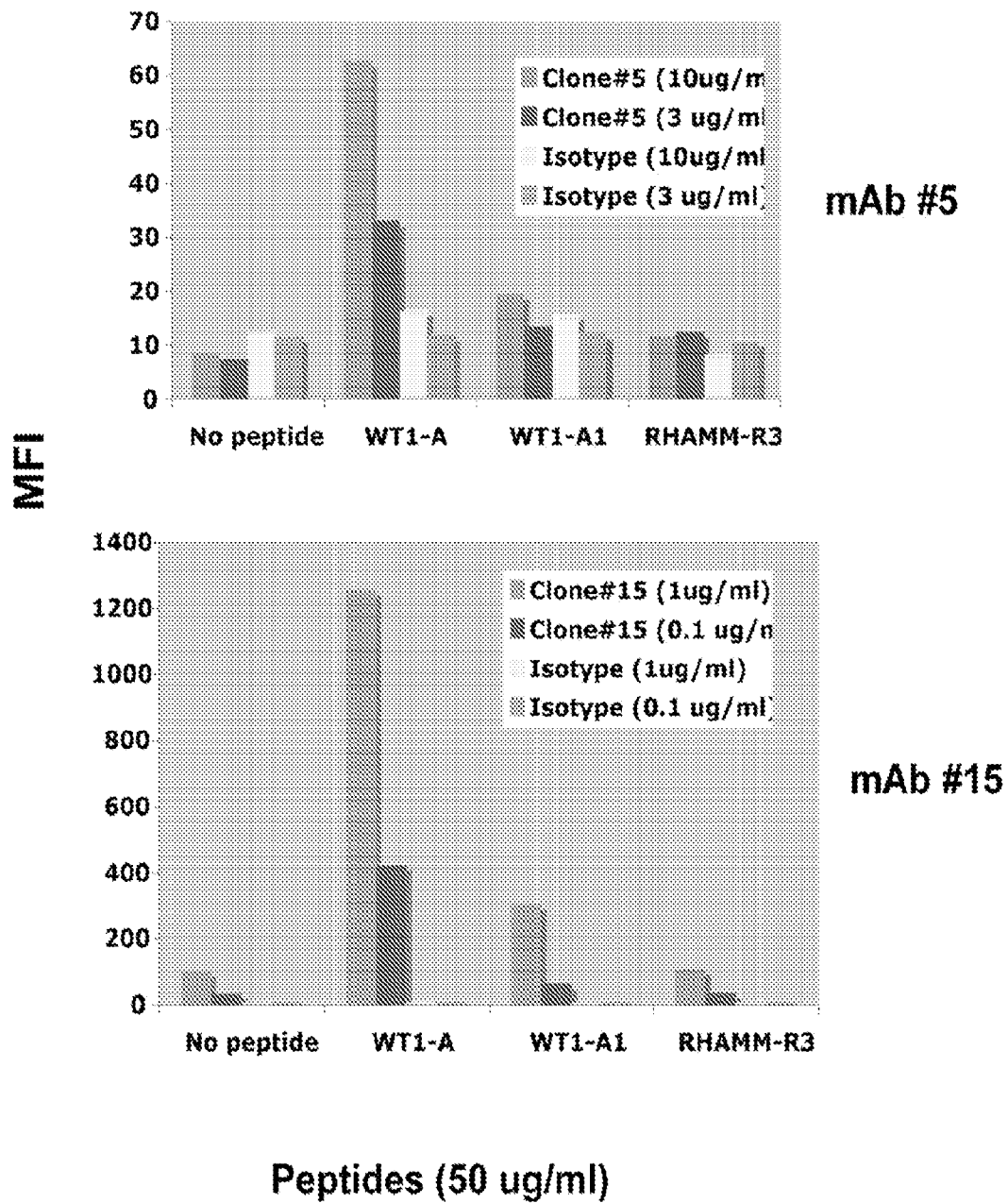


Figure 15

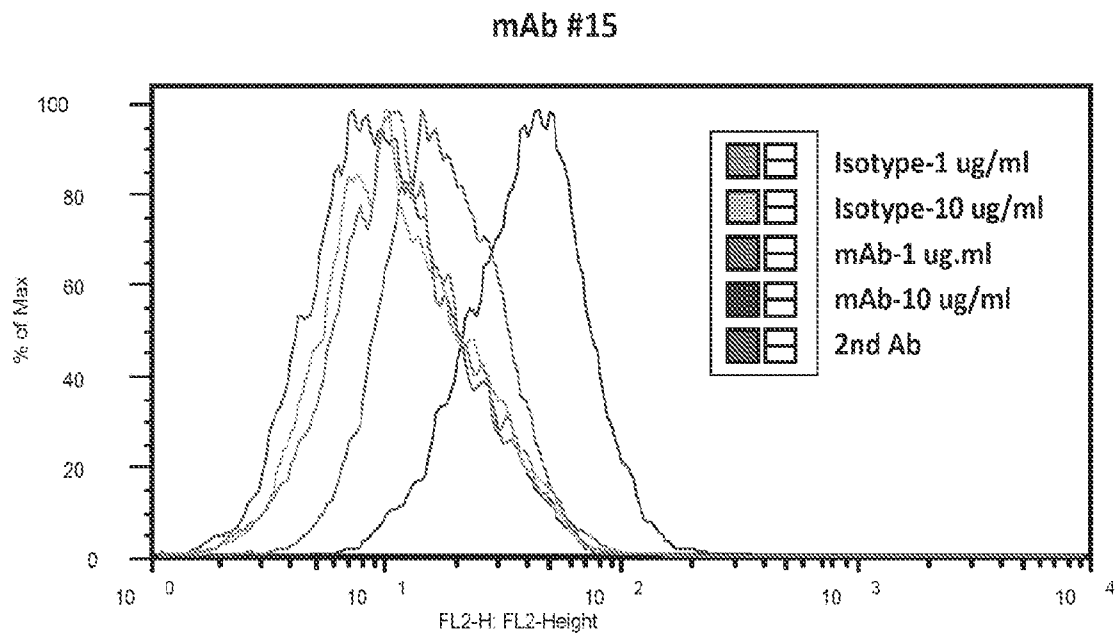
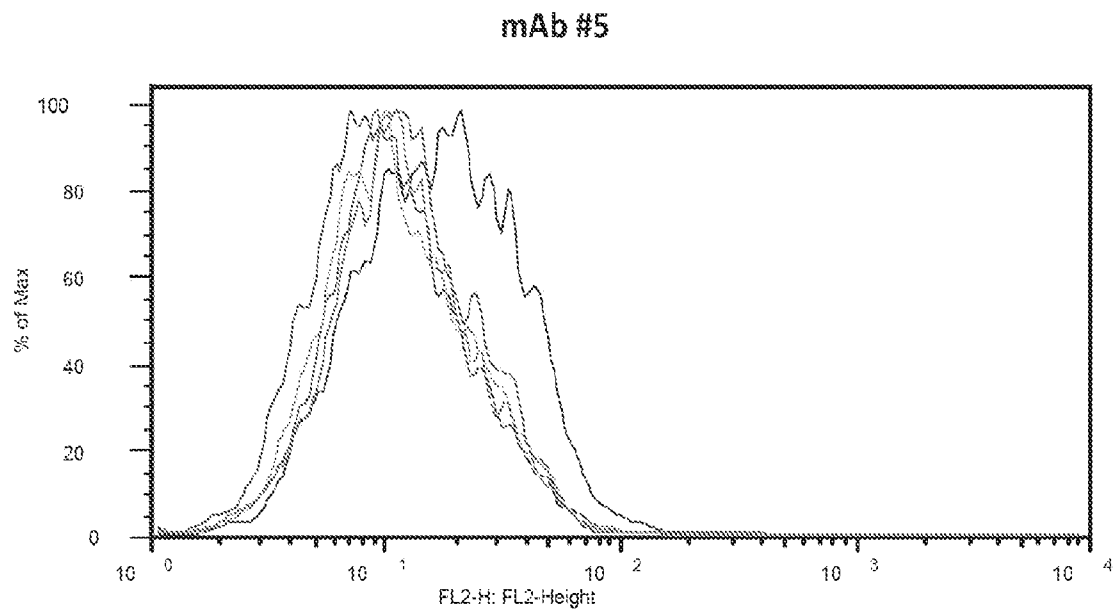


Figure 16

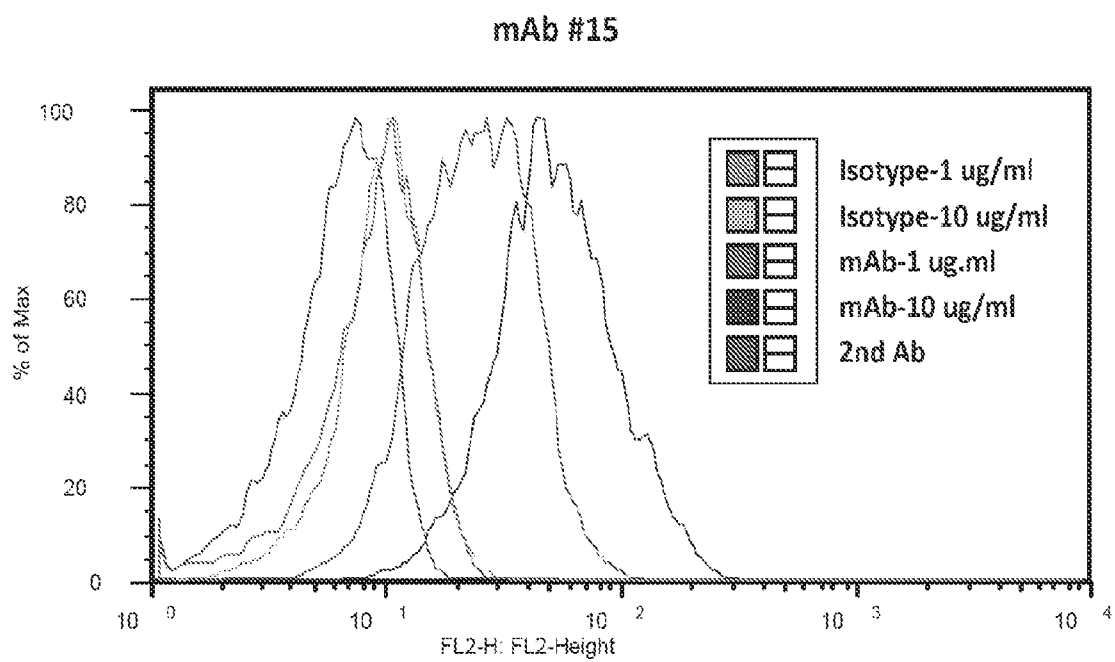


Figure 17

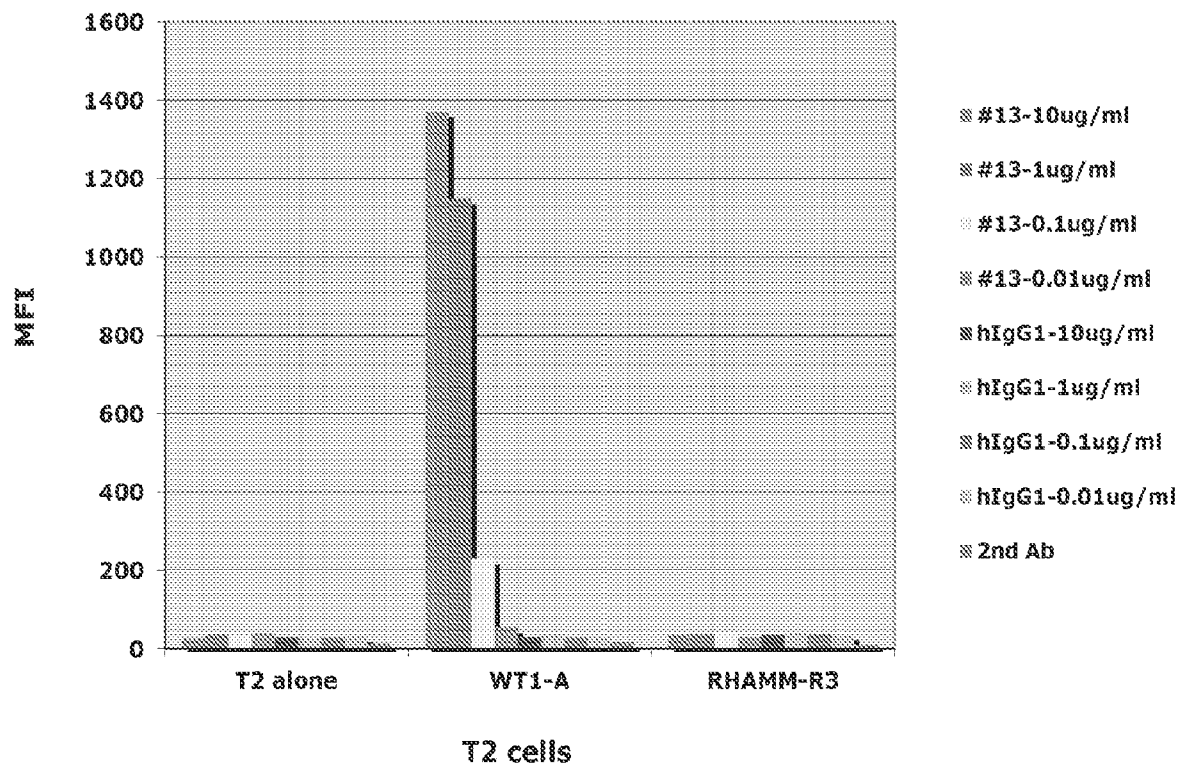


Figure 18

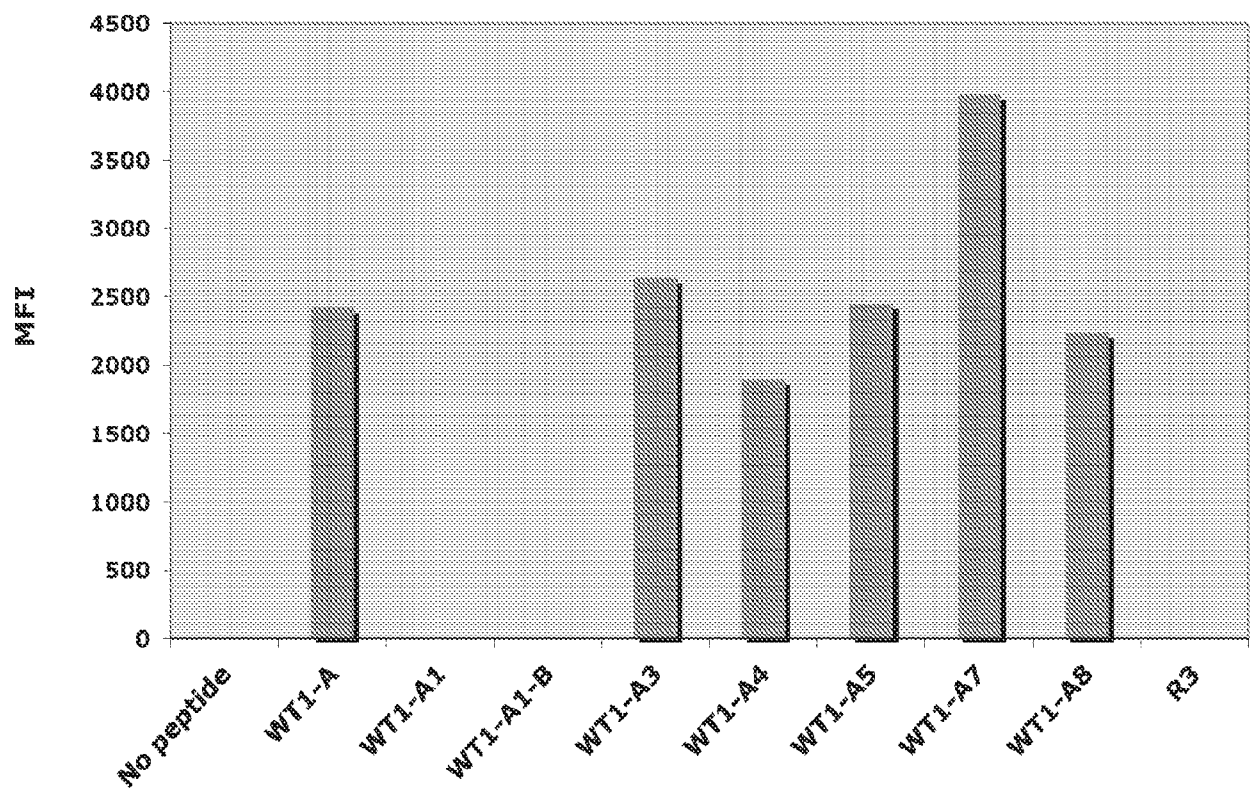


Figure 19

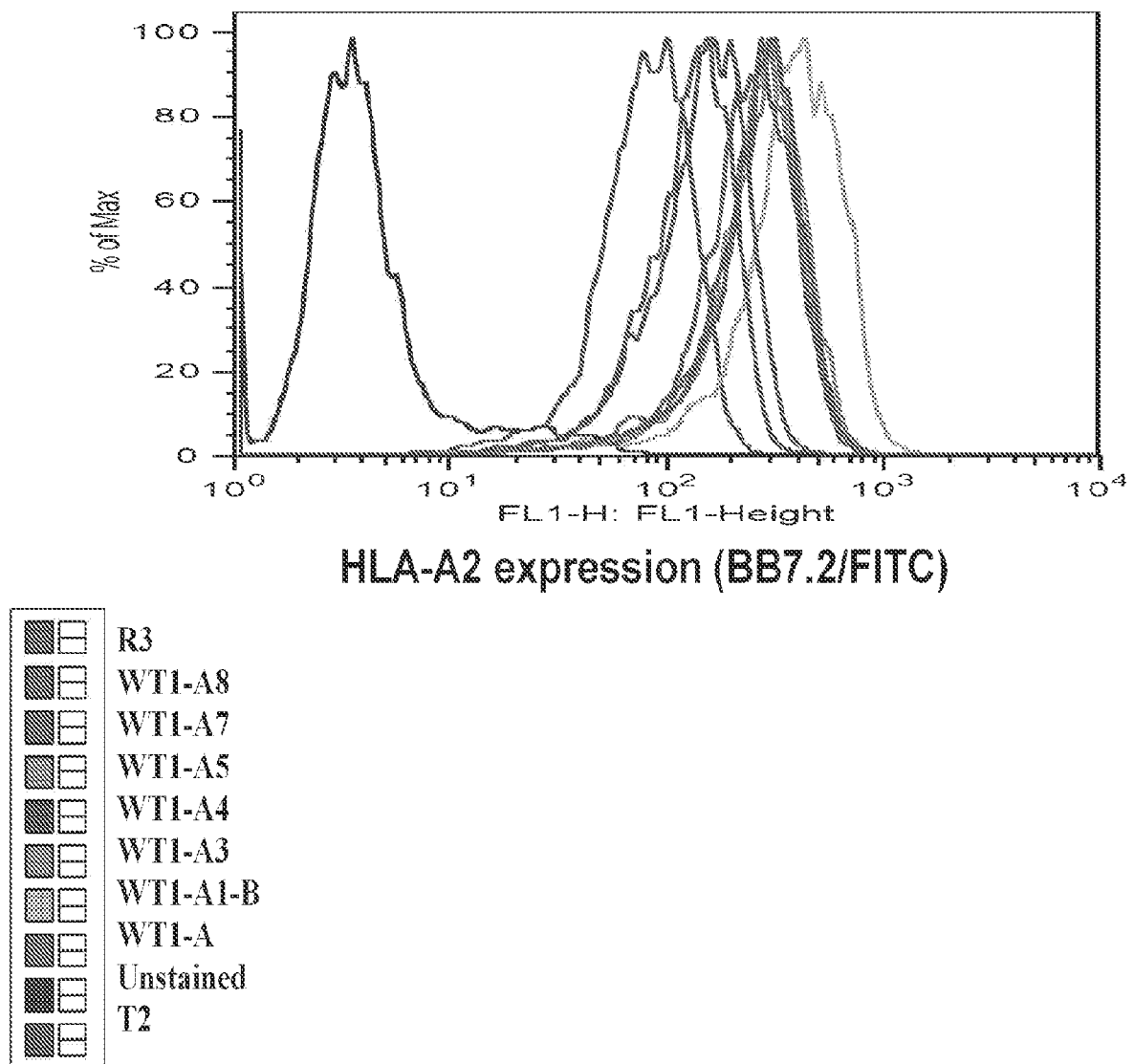


Figure 20

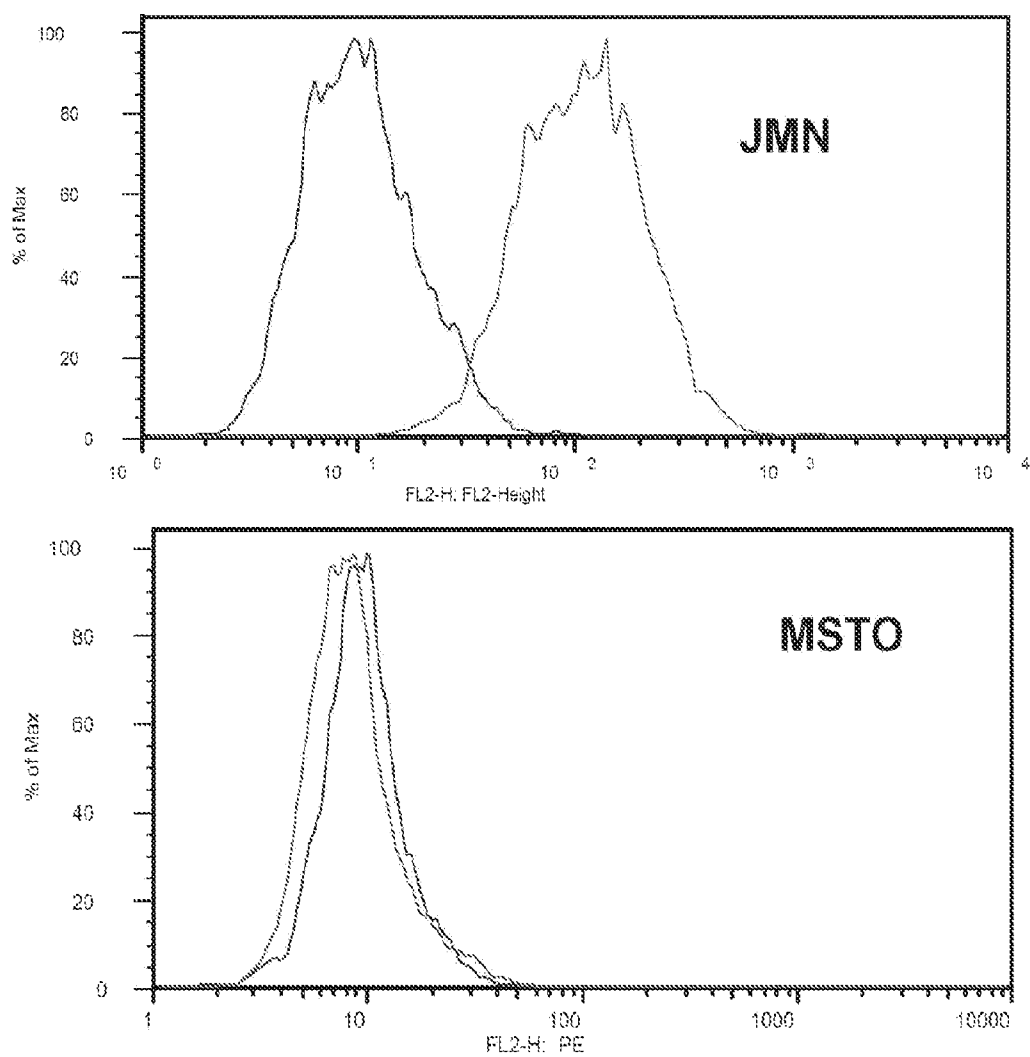


Figure 21

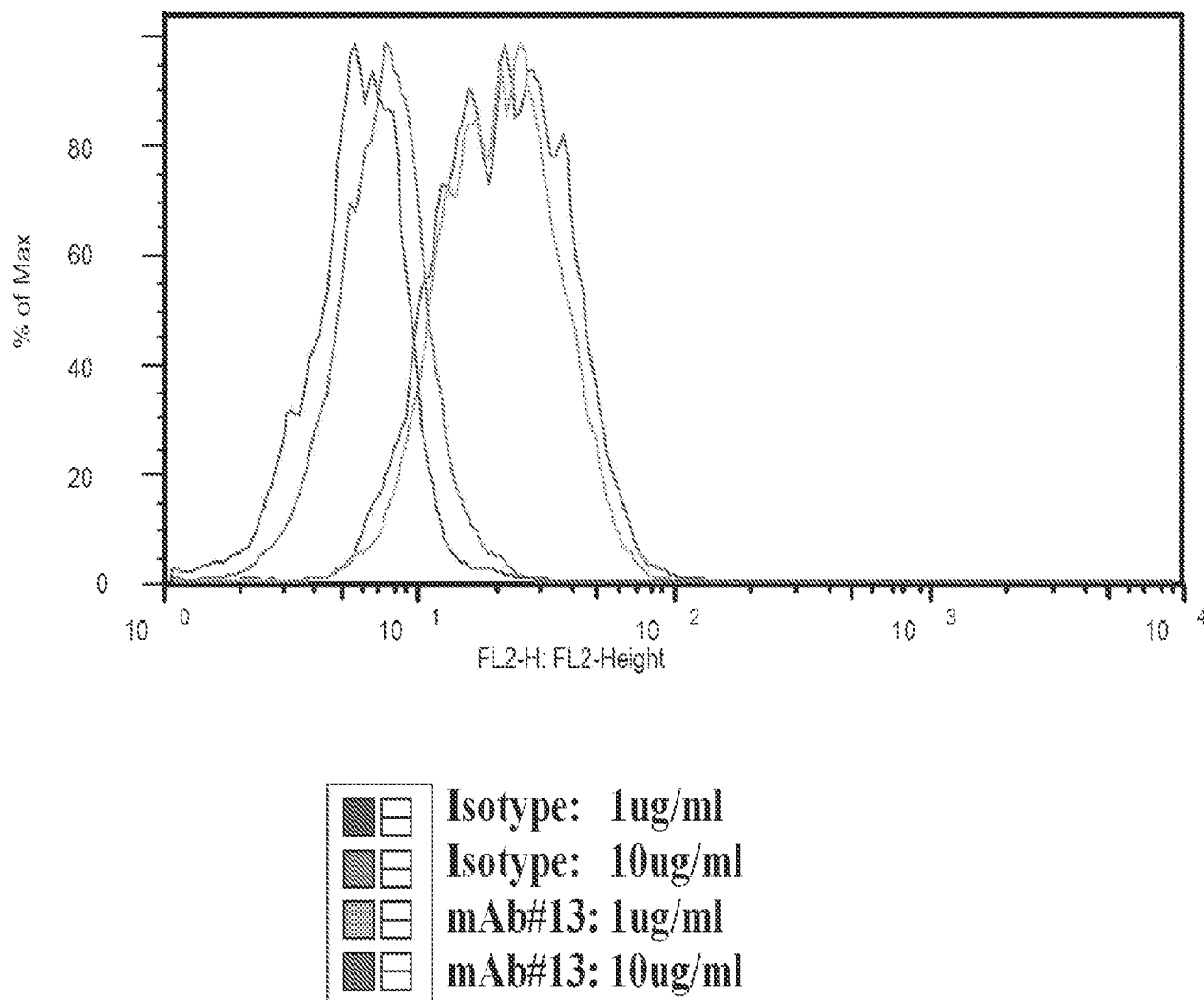


Figure 22

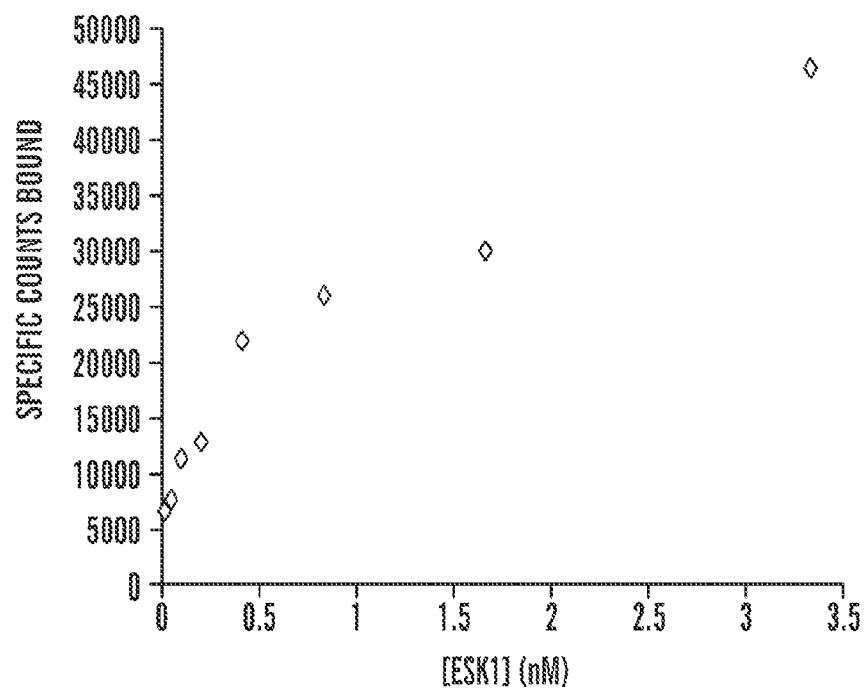


Figure 23

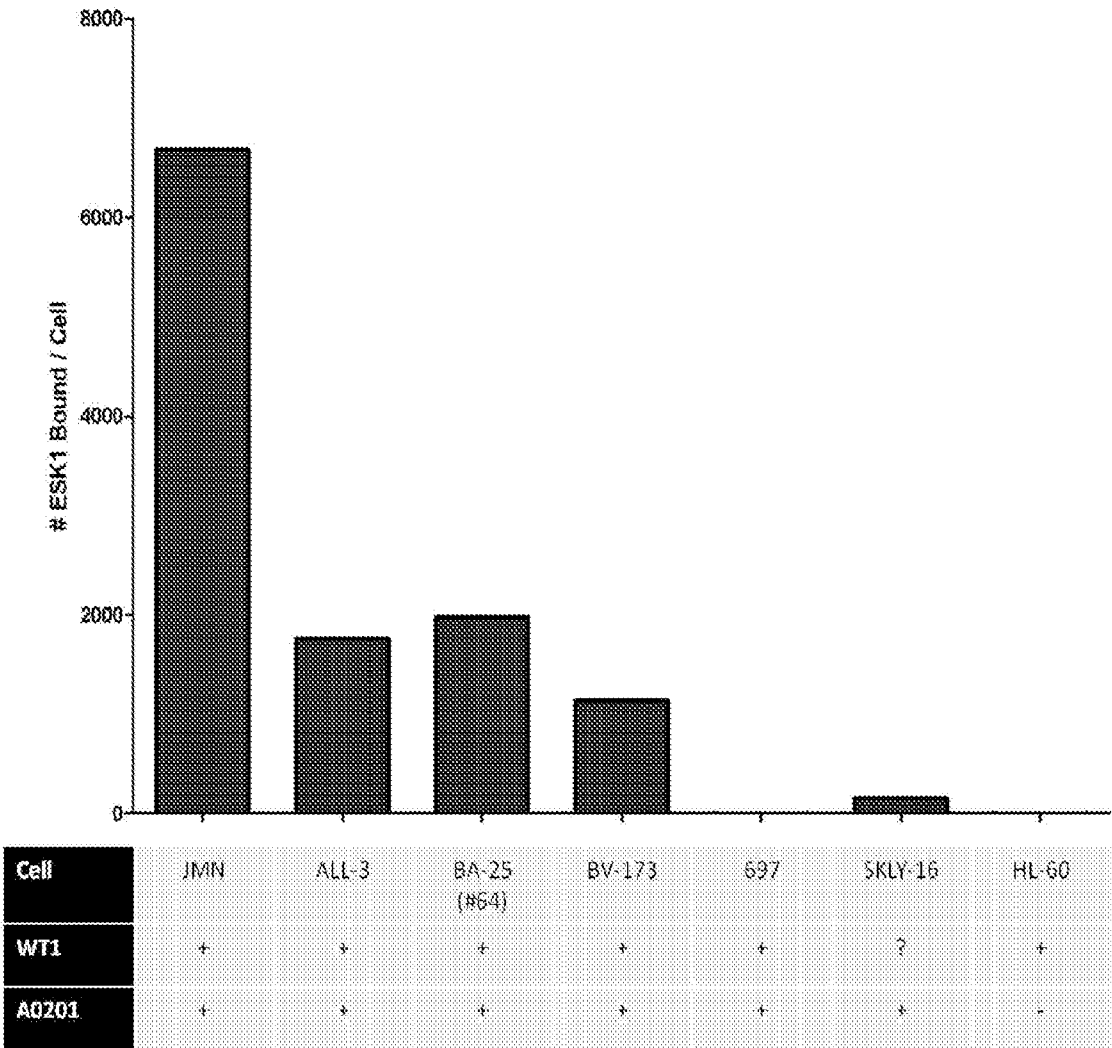


Figure 24

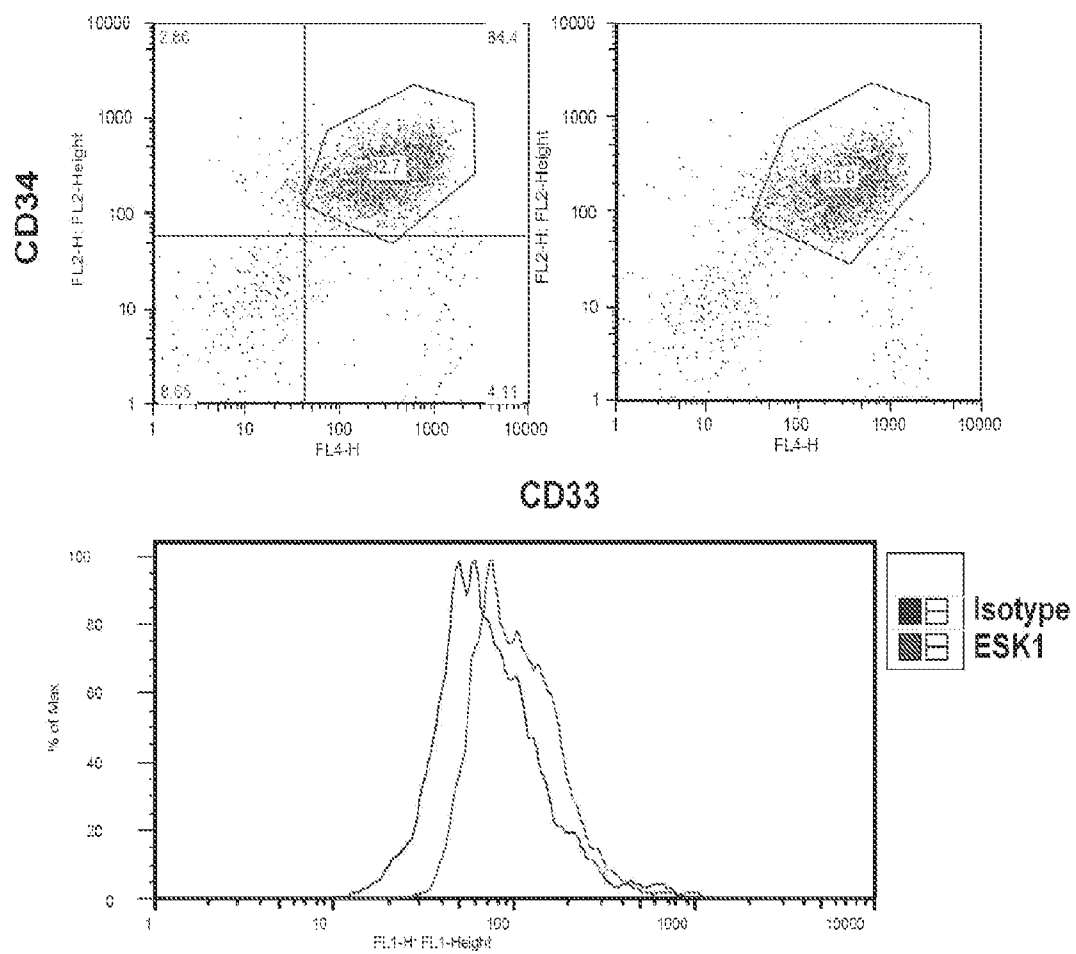


Figure 25

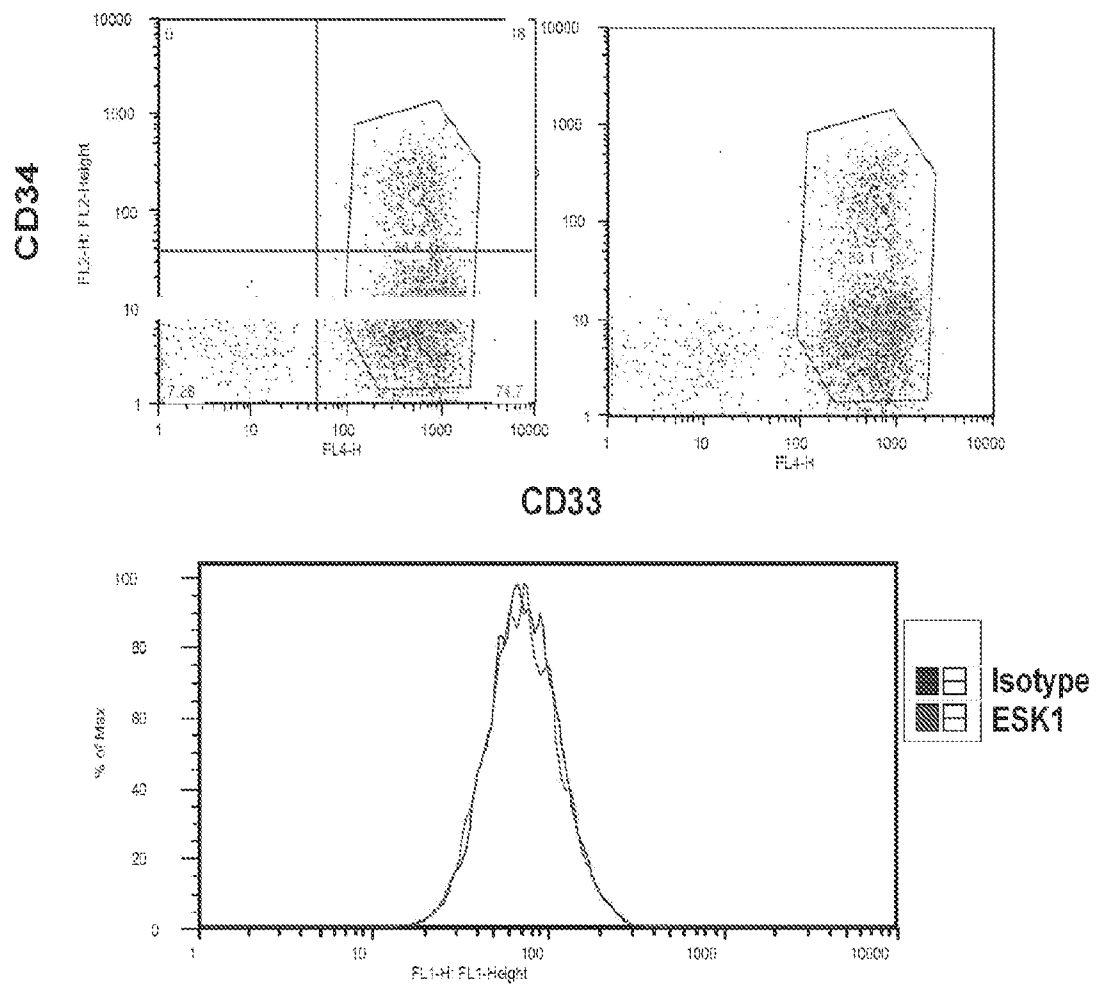


Figure 26

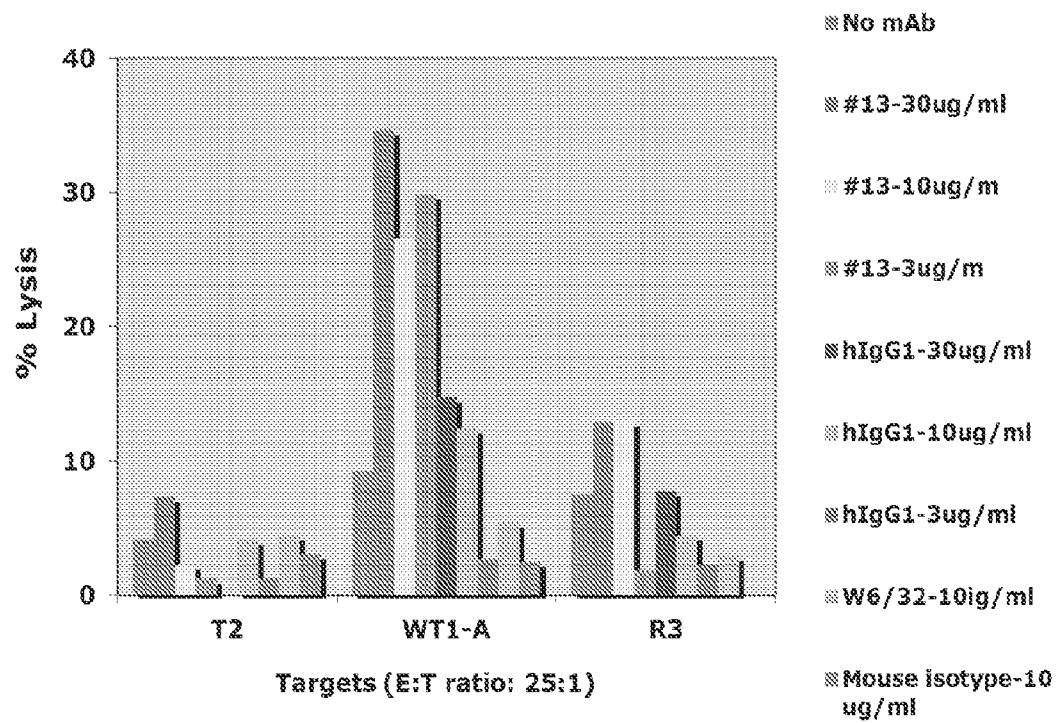
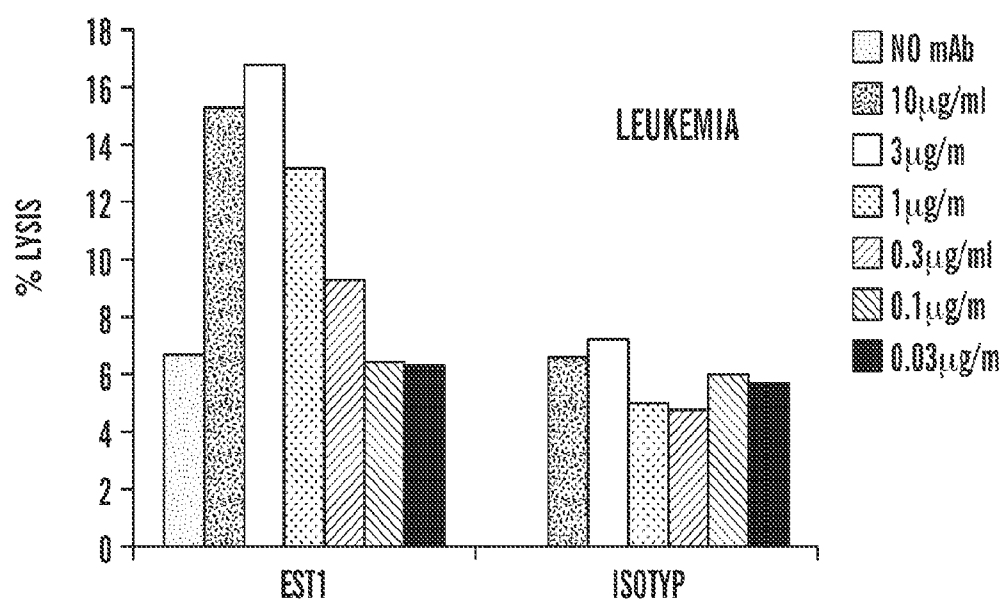
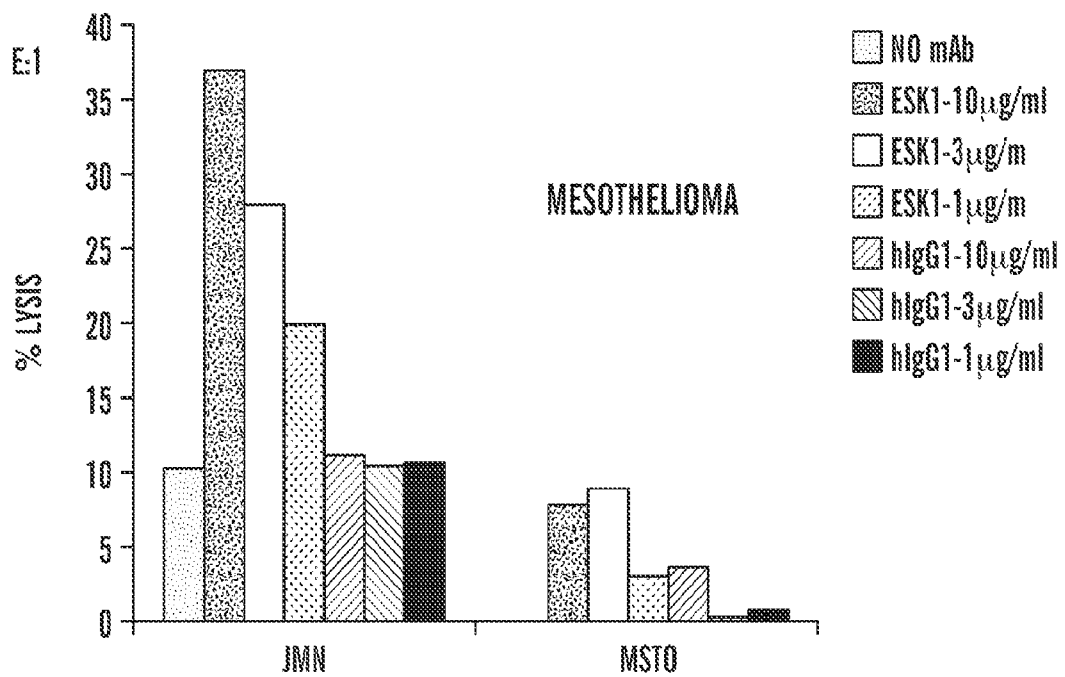
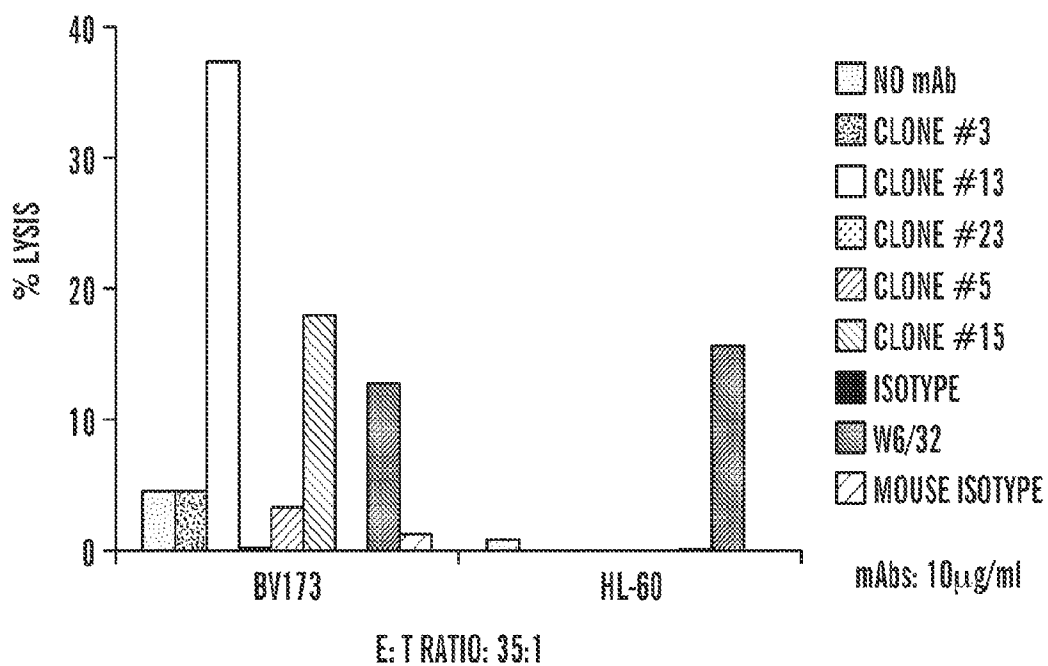


Figure 27

**Figure 28**



	HLA-A2	WT1 mRNA	mAb BINDING
BV173	(+)	(+)	13, 15, 23
HL-60	(-)	(+)	(-)

Figure 29

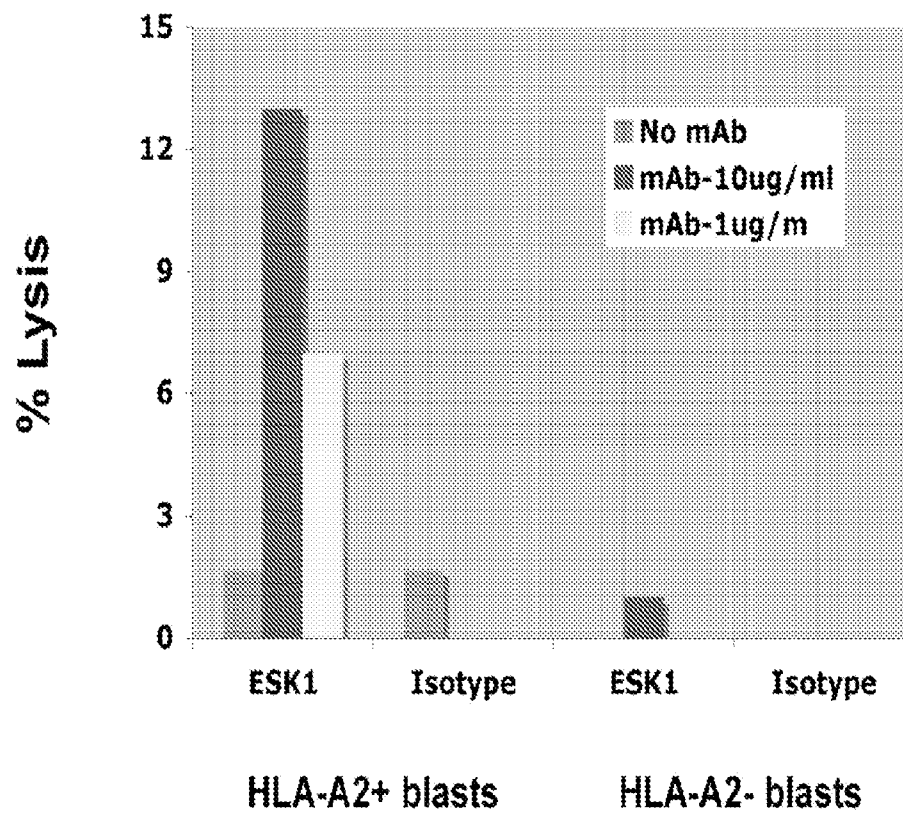


Figure 30

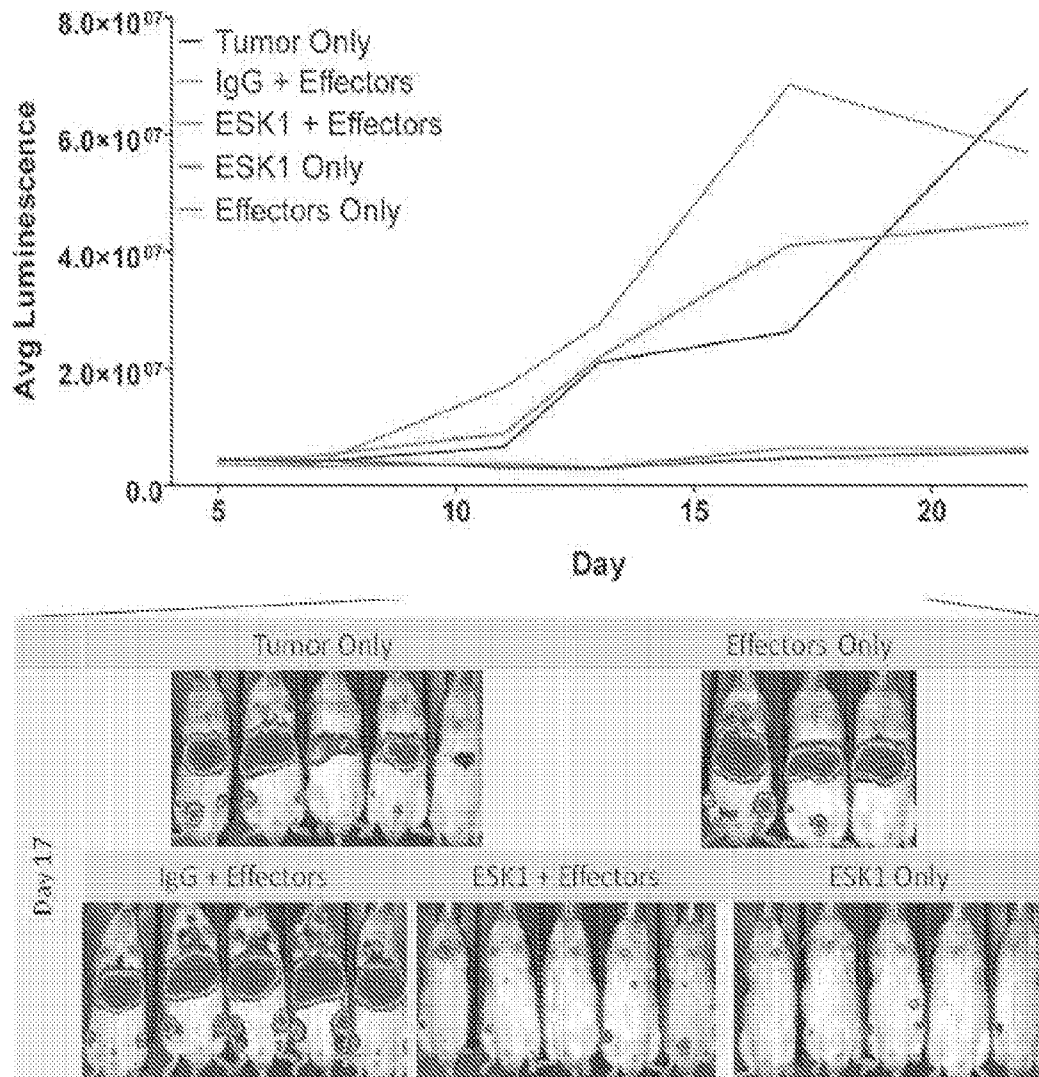


Figure 31

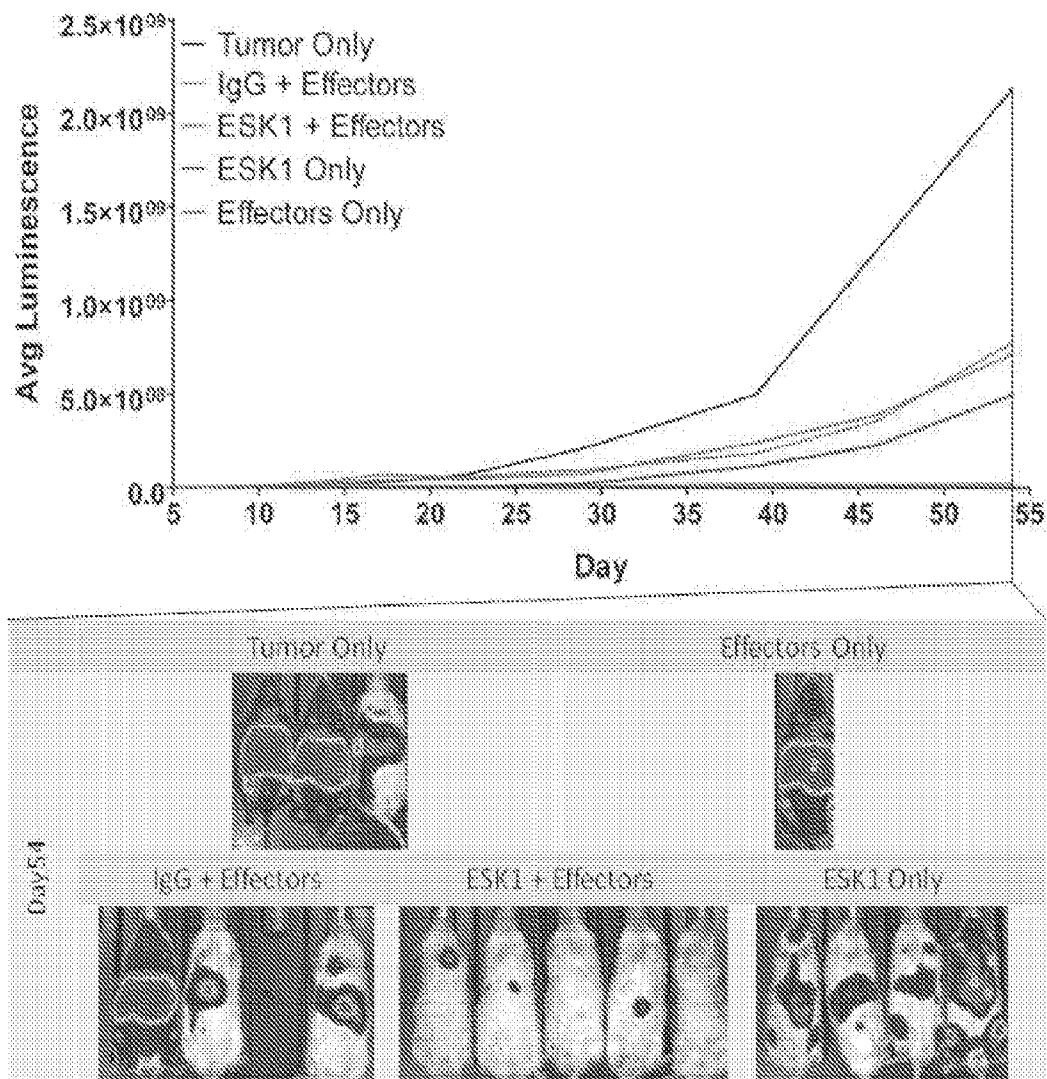


Figure 32

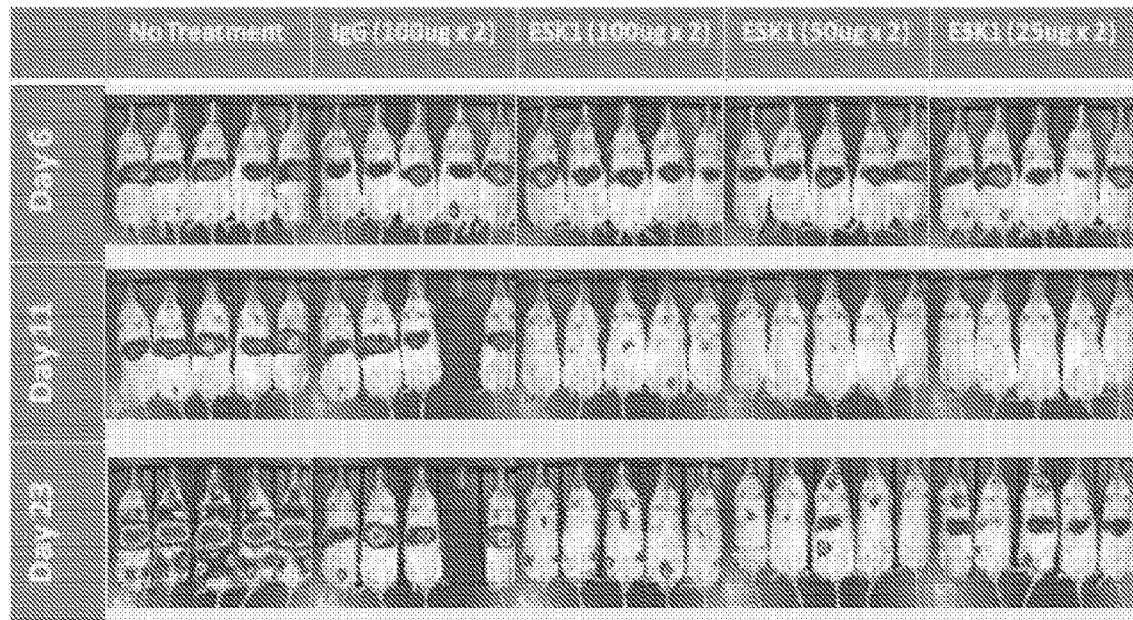


Figure 33

	HEK297-mAbs	CHO-mAbs	Cho-MAGE
No mAb	1	1	1
#13-10ug/ml	1	13	11
#13-3ug/m	8	8	15
#13-1ug/m	3	2	12
#13-0.3ug/ml	0		14
#13-0.1ug/m	3		5
#13-0.03ug/m	0		0
hIgG1-10ug/ml		0	0
hIgG1-3ug/ml		0	0
hIgG1-1ug/ml		0	0
hIgG1-0.3ug/ml			0
hIgG1-0.1ug/ml			2
hIgG1-0.03ug/ml			0

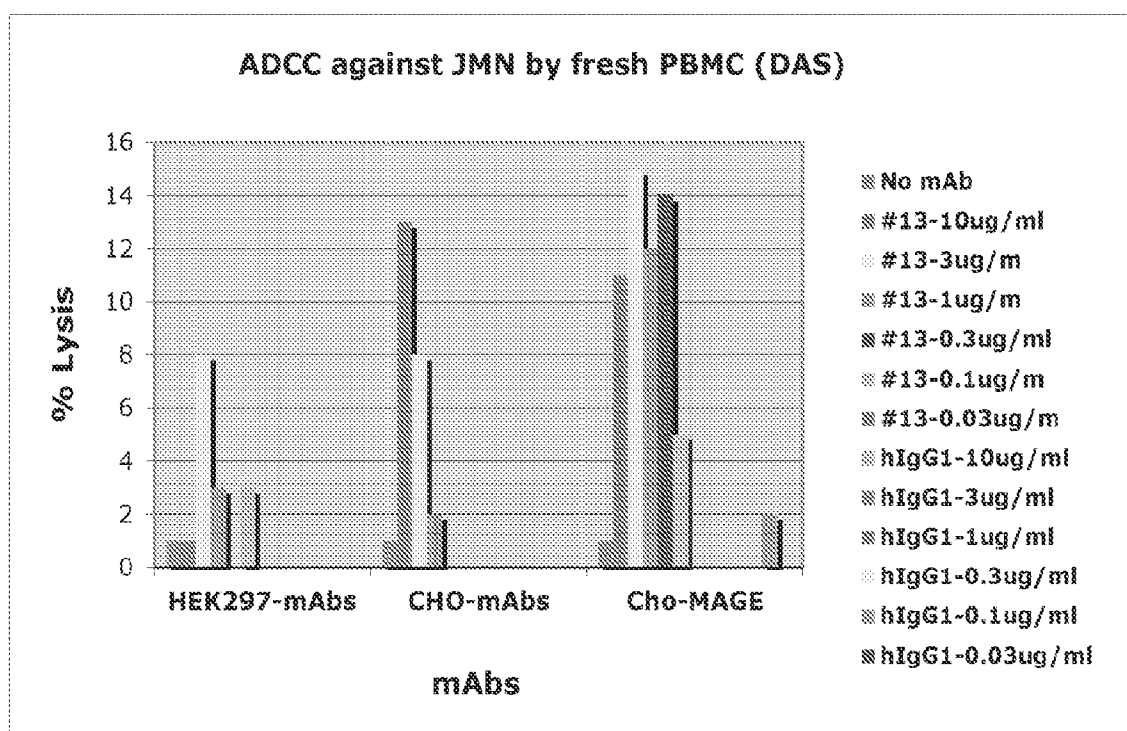


Figure 34

ANTICUERPOS TIPO RECEPTOR DE CÉLULAS T ESPECÍFICOS PARA UN PÉPTIDO WT1 PRESENTADO POR HLA-A2

Referencia cruzada a solicitudes relacionadas

[0001] Esta solicitud reivindica la prioridad de la solicitud provisional de EE.UU. N° 61/470,635, presentada el 1 de abril de 2011 y de la solicitud provisional de EE.UU. N ° 61/491,392 presentada el 31 de mayo de 2011. Estas solicitudes provisionales se incorporan para su referencia en su totalidad en la presente descripción.

Declaración de derechos según la investigación federal desarrollada

[0002] Esta invención se realizó con el apoyo del gobierno en virtud de las concesiones P01CA23766 y R01CA55349 otorgadas por los Institutos Nacionales de Salud de EE.UU. El gobierno tiene ciertos derechos sobre la presente invención.

Listado de Secuencias

[0003] Esta solicitud contiene una lista de secuencias, creada el 29 de marzo de 2012; el archivo en formato ASCII, se designa Listing_ST25.txt 3314013AWO_Sequence. El archivo se incorpora aquí en su totalidad como referencia en la solicitud.

Campo técnico

[0004] La presente invención se refiere en general a anticuerpos contra las proteínas citosólicas. Más particularmente, la presente invención se refiere a anticuerpos contra la proteína del oncogén del tumor de Wilms (WT1), específicamente a anticuerpos que reconocen un péptido WT1 en combinación con un antígeno de mayor histocompatibilidad.

Antecedentes de la presente invención

[0005] La proteína del oncogén del tumor de Wilms (WT1) es un objetivo atractivo para la inmunoterapia en la mayoría de las leucemias y una amplia gama de tipos de cáncer. La proteína WT1 es un factor de transcripción de los dedos de cinc que se expresa normalmente en tejidos mesodérmicos durante la embriogénesis. En el tejido adulto normal, la expresión de la WT1 se limita a bajos niveles en células CD34 + células madre hematopoyéticas pero se sobre-expresa en leucemias de múltiples linajes y en una amplia gama de tumores sólidos (1-

2). Más recientemente, la expresión de WT1 se ha reportado como un marcador de la enfermedad residual mínima. El aumento de los niveles de transcripción en los pacientes con leucemia mieloide aguda (LMA) en remisión morfológica ha sido predictivo de recaída clínica abierta (3, 4). Por otra parte, se detectan los anticuerpos WT1 en pacientes con neoplasias hematopoyéticas y tumores sólidos, lo que indica que la proteína WT1 es un antígeno altamente inmunogénico (7).

[0006] En su mayor parte, los anticuerpos monoclonales terapéuticos aprobados clínicamente (mAbs) reconocen las estructuras de las proteínas de superficie celular. La proteína WT1, sin embargo, es una proteína nuclear y, por lo tanto, es inaccesible a la terapia con anticuerpos clásicos. Hasta ahora, la inmunoterapia de marcado de WT1 se ha limitado a los enfoques celulares, destinados exclusivamente a la generación de células T CD8 (CTL) citotóxicas y específicas para WT1 con una respuesta de reconocimiento de los péptidos presentados en la superficie celular por moléculas de clase I de CMH.

[0007] Para la inducción de respuestas de las CTL, las proteínas intracelulares son generalmente degradadas por el proteasoma o por endo/lisosomas, y los fragmentos peptídicos resultantes se unen a las moléculas del CMH de clase I o II. Estos complejos péptido-CMH se muestran en la superficie de la célula donde se proporcionan dianas para el reconocimiento de células T a través de una interacción péptido-CMH (pCMH)-receptor de células T (TCR) (8, 9). Las vacunas con péptidos derivados de la proteína WT1 inducen células T CD8 citotóxicas que son restringidas por HLA, las cuales son capaces de matar a las células tumorales.

[0008] Para mejorar la eficacia, los antígenos del cáncer se pueden marcar en la terapia con anticuerpos monoclonales. La terapia con anticuerpos monoclonales (mAb) ha demostrado ejercer potentes efectos antitumorales mediante múltiples mecanismos, incluyendo la citotoxicidad dependiente del complemento (CDC), la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (CDAC) y la inhibición celular directa o de los efectos inductores de la apoptosis en las células tumorales que sobre-expresan las moléculas diana. Además, los mAb se pueden utilizar como portadores para entregar específicamente un grupo citotóxico, tal como un radionucleóido, una droga citotóxica o una toxina para las células tumorales (18).

[0009] Existiría un enorme beneficio si, además de un enfoque de inmunoterapia celular, estuviera disponible un enfoque de inmunoterapia humoral para marcar a los antígenos de las

células tumorales no-superficiales. Por lo tanto, un anticuerpo monoclonal (mAb) que imita a un receptor de células T en la que es específico para un blanco que comprende un fragmento de una proteína intracelular en conjunción con una molécula del CMH, por ejemplo, un complejo de péptido de WT1 /HLA-A2, sería un agente terapéutico novedoso y eficaz solo o como un vehículo capaz de suministrar reactivos potentes contra el cáncer, tales como fármacos, toxinas y elementos radiactivos. Tales mAbs también serían útiles como herramientas de diagnóstico o pronóstico.

Resumen de la presente invención

[0010] La presente descripción se identifica y caracteriza a las proteínas de unión a antígenos, tales como anticuerpos, que son capaces de marcar a las proteínas citosólicas/intracelulares, por ejemplo, a la oncoproteína WT1. Los anticuerpos descritos se dirigen a un complejo péptido / CMH ya que normalmente aparecen en la superficie de una célula seguido del procesamiento de antígenos de la proteína WT1 y de su presentación por la célula. A este respecto, los anticuerpos imitan a los receptores de células T en el que los anticuerpos tienen la capacidad de reconocer específicamente y unirse a un péptido de una manera restringido por el CMH, es decir, cuando el péptido se une a un antígeno del CMH. El complejo péptido / CMH recapitula al antígeno ya que sería como si apareciera normalmente en la superficie de una célula seguido del procesamiento y presentación de antígenos de la proteína WT1 a una célula T.

[0011] Los anticuerpos revelados reconocen y se unen específicamente a epítomos de un complejo péptido/HLA-A2, en particular a un complejo de WT1/HLA-A0201. Los ejemplos de péptidos que son reconocidos por las proteínas de unión a antígeno de la presente invención como parte de un complejo HLA-péptido incluyen, pero no se limitan a, los que se muestran en la Tabla 7, por ejemplo, un péptido con la secuencia de aminoácidos RMFPNAPYL (SEC ID N °: 1).

[0012] En un aspecto, por lo tanto, la presente invención se refiere a un anticuerpo aislado, o un fragmento de unión a antígeno del mismo, que se une a un péptido con la secuencia de aminoácidos, RMFPNAPYL, cuando dicho péptido está unido a un antígeno del CMH, tal como HLA-A2.

[0013] En otro aspecto, la presente invención se refiere a una proteína aislada de unión a antígeno, un anticuerpo, o un fragmento de unión a antígeno del mismo, que comprende (A)

(i) una región variable de la cadena pesada (HC) que comprende HC-CDR1, CDR2 y HC-CDR3, respectivamente, que comprende las secuencias de aminoácidos SEQ ID NOS: 2, 3, y 4, y una región variable de la cadena ligera (LC) que comprende LC-CDR1, CDR2 y LC-CDR3, respectivamente, que comprende las secuencias de aminoácidos SEQ ID NOS: 8, 9 y 10, (ii) una región variable de cadena pesada (HC) que comprende la HC-CDR1, CDR2 y HC-CDR3, respectivamente, que comprenden las secuencias de aminoácidos SEQ ID NOS: 20, 21 y 22, y una región variable de cadena ligera (LC) que comprende LC-CDR1, CDR2 y LC-CDR3, respectivamente, que comprende las secuencias de aminoácidos SEQ ID NOS: 26, 27 y 28; (iii) una región variable de la cadena pesada (HC) que comprende la HC-CDR1, CDR2 y HC-CDR3, respectivamente, que comprende las secuencias de aminoácidos SEQ ID NOS: 38, 39 y 40, y una región variable de cadena ligera (LC) que comprende LC-CDR1, CDR2 y LC-CDR3, respectivamente, que comprende las secuencias de aminoácidos seleccionadas de las SEQ ID NOS: 44, 45 y 46; (iv) una región variable de cadena pesada (HC) que comprende la HC-CDR1, HC-CDR2 y CDR3-HC, respectivamente, que comprende las secuencias de aminoácidos SEQ ID NOS: 56, 57 y 58, y una región variable de cadena ligera (LC) que comprende LC-CDR1, CDR2 y LC-CDR3, respectivamente, que comprende las secuencias de aminoácidos SEC ID NOS: 62, 63 y 64; (v) una región variable de cadena pesada (HC) que comprende la HC-CDR1, CDR2 y HC-CDR3, respectivamente, que comprende las secuencias de aminoácidos SEQ ID NOS: 74, 75 y 76, y una región variable de cadena ligera (LC) que comprende LC-CDR1, CDR2 y LC-CDR3, respectivamente, que comprende las secuencias de aminoácidos SEQ ID NOS: 80, 81 y 82; o (vi) una región variable de cadena pesada (HC) que comprende la HC-CDR1, CDR2 y HC-CDR3, respectivamente, que comprende las secuencias de aminoácidos SEQ ID NOS: 92, 93 y 94, y una de región variable de cadena ligera (LC) que comprende LC-CDR1, CDR2 y LC-CDR3, respectivamente, que comprende las secuencias de aminoácidos SEQ ID NOS: 98, 99 y 100.

[0014] En otro aspecto, la presente invención se refiere a una proteína aislada de unión a antígeno, un anticuerpo, o un fragmento de unión a antígeno del mismo, que comprende una VH y VL que comprenden una primera y segunda secuencias de aminoácidos, respectivamente, seleccionadas entre las SEQ ID NOS: 14 y 16; 32 y 34, 50 y 52; 68 y 70, 86 y 88, y 104 y 106.

[0015] En aún otro aspecto, la presente invención se refiere a una proteína aislada de unión a antígeno, un anticuerpo, o un fragmento de unión a antígeno del mismo, que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada entre SEC ID NOS: 18, 36, 54, 72, 90, and 108.

[0016] En un aspecto relacionado, la proteína aislada de unión a antígeno comprende una región de unión a antígeno como se describe en cualquiera de las Tablas 1-8. La proteína de unión a antígeno puede ser una proteína de fusión.

[0017] En otro aspecto, la presente invención se refiere a un inmunoconjugado que comprende un primer componente que es una proteína de unión a antígeno, un anticuerpo o un fragmento de unión a antígeno del mismo como se describe en este documento. El inmunoconjugado comprende un segundo componente que es una citotoxina, un marcador detectable, un radioisótopo, un agente terapéutico, una proteína de unión o una molécula que tiene una segunda secuencia de aminoácidos. Cuando el segundo componente es una proteína de unión o un segundo anticuerpo, la proteína de unión o segundo anticuerpo tiene especificidad de unión para un objetivo que es diferente del complejo péptido-HLA para el cual la primera es específica.

[0018] En un aspecto relacionado, por lo tanto, la presente invención se refiere a un anticuerpo biespecífico que comprende una proteína de unión a antígeno o un fragmento funcional de la misma como se describe en este documento.

[0019] En aún otro aspecto, la presente invención se refiere a ácidos nucleicos que codifican proteínas de unión a antígeno, incluyendo los anticuerpos y receptores de antígenos quiméricos específicos para un complejo péptido/HLA de WT1, en particular, el complejo de péptido WT1 RMFPNAPYL/HLA-A0201.

[0020] En otro aspecto relacionado, la presente invención se refiere a células que comprenden los ácidos nucleicos o proteínas de unión a antígenos descritos en este documento, incluyendo las células efectoras inmunes recombinantes, tales como, células T modificadas genéticamente para expresar un receptor de antígeno quimérico que comprende una región de unión a antígeno de acuerdo con la presente descripción. Las células que han sido diseñados para producir anticuerpos de acuerdo con la descripción también se son comprendidas por la presente invención.

[0021] En un aspecto relacionado, la presente invención se refiere a vectores que comprenden los ácidos nucleicos para codificar las proteínas de unión a antígenos descritos en este documento, incluyendo los vectores para facilitar la expresión y/o la secreción de una proteína de unión a antígeno tal como un anticuerpo o un receptor de antígeno quimérico de acuerdo con la presente divulgación.

[0022] En un aspecto relacionado, la presente invención se refiere a composiciones farmacéuticas que comprenden a las proteínas de unión a antígeno, anticuerpos, ácidos nucleicos, vectores o células que comprenden los ácidos nucleicos o proteínas de unión a antígenos descritos en este documento, junto con un vehículo farmacéuticamente aceptable.

[0023] En otro aspecto, la presente invención se refiere a un método para la detección de WT1 en la superficie de las células o tejidos usando los anticuerpos WT1 de la presente invención.

[0024] En aún otro aspecto, la presente invención se refiere a métodos para el tratamiento de un sujeto que tiene una enfermedad WT1-positiva, que comprende administrar al sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz de una proteína de unión a antígeno, del anticuerpo o de un fragmento de unión a antígeno del mismo, el ácido nucleico que codifica la proteína de unión al antígeno o al anticuerpo o a una célula que comprende a los ácidos nucleicos o proteínas como se describe aquí. La enfermedad WT1 positiva es una leucemia, leucemia aguda o crónica WT1+, un cáncer seleccionado de entre el grupo que consiste en leucemia mielocítica crónica, mieloma múltiple (MM), la leucemia linfoblástica aguda (LLA), leucemia mieloide / mielógena aguda (LMA), síndrome mielodisplásico (MDS), mesotelioma, cáncer de ovario, cáncer gastrointestinal, cáncer de mama, cáncer de próstata y glioblastoma. En algunas modalidades, la proteína de unión a antígeno o anticuerpo es un conjugado del mismo que tiene un grupo citotóxico relacionado con la misma.

Breve descripción de los dibujos

[0025] La Figura 1 muestra la secuencia de aminoácidos de la proteína del tumor de Wilms, (N ° de Acceso de GenBank P19544) con algunos péptidos restringidos por HLA en negrilla. El péptido 121-140 abarca además un 9-mer (subrayado), RMFPNAPYL (SEC ID N °: 1), que, junto con los análogos del mismo, ha demostrado que induce la actividad WT1-específica de células T citotóxicas.

[0026] La Figura 2 es un gráfico que muestra que la vacunación con péptidos WT1 induce a las células T citotóxicas contra las células de leucemia WT1 +.

[0027] La Figura 3 muestra los resultados de un ELISA de fagos para la unión específica de WT1/A2 (WA) frente al control PBS o R3/HLAA0201 (R3).

[0028] La Figura 4 muestra la unión específica de los anticuerpos WT1 de los fagos que sólo que se unen a células T2 pulsadas con péptido WT1A que fueron seleccionadas.

[0029] La Figura 5 muestra la afinidad de unión de una IgG1 de longitud completa con un anticuerpo WT1 para el complejo RMF/A0201 probado por titulación del anticuerpo a concentraciones diferentes. Los resultados se muestran para las células T2 pulsadas con 50ug/ml de RMF (panel superior). El anticuerpo de control se muestra en el panel inferior.

[0030] La Figura 6 muestra la dependencia de la densidad del complejo RMF/HLA-A0201 reconocido por anticuerpos WT1 en células T2 pulsadas con RMF (panel superior) o de control, RHAMM-R3 (panel inferior).

[0031] La figura 7 muestra un vector de expresión para la expresión de anticuerpos humanos.

[0032] La Figura 8 muestra los resultados del análisis de SDS-PAGE para los anticuerpos WT1/A2 en condiciones reductoras y no reductoras.

[0033] La Figura 9 muestra los resultados de análisis de unión cinética de un anticuerpo WT1/A2 que demuestran la afinidad del anticuerpo hacia WT1/A2.

[0034] La Figura 10 muestra la afinidad (K_D) de la unión del anticuerpo al complejo WT1/A2.

[0035] La Figura 11 muestra la intensidad de la fluorescencia media (IFM) por citometría de flujo de la titulación de los péptidos en la unión a algunas formas de realización, mAb clon 5 (panel superior), clon 15 (panel central) y el control (panel inferior) con células T2 vivas, pulsadas mediante concentraciones variables de péptido, WT1-A, WT1-A1 o de control.

[0036] La Figura 12 muestra los resultados de la titulación de los péptidos en la unión de un anticuerpo WT1, el mAb 5 (panel superior), mAb 15 (panel inferior) con células T2 vivas, pulsadas mediante concentraciones variables de péptido WT1A.

[0037] La Figura 13 muestra la especificidad de unión de una forma de realización, el anticuerpo mAb 5, a diferentes concentraciones (superior 50 mg/ml; media 25 µg/ml, y 12.5 g/ml inferior) del péptido (R3, A1-WT1, WT1-A o sin péptido.)

[0038] La Figura 14 muestra la especificidad de unión de una forma de realización, el anticuerpo mAb 15, a diferentes concentraciones (superior 50 mg/ml; 25 g/ml inferior) del péptido (R3, A1-WT1, WT1-A o sin péptido).

[0039] La Figura 15 muestra la unión dependiente de la dosis del mAb 5 (panel superior) y 15 (panel inferior) a las células T2 pulsadas con WT1-A, WT1-A1, o con el péptido RHAMM-R3.

[0040] La Figura 16 muestra la unión de mAb 5 y 15 a U266, una línea celular de mieloma.

[0041] La Figura 17 muestra la unión de mAb 15 a BV173, una línea celular derivada de un individuo con leucemia aguda positiva-(PH1).

[0042] La Figura 18 muestra la unión específica de ESK1 (# 13) al complejo WT1/A2 en la superficie de las células T2 pulsadas con el péptido WT1.

[0043] Las Figuras 19 y 20 muestran que el anticuerpo WT1 es capaz de reconocer al péptido RMF en el que se realiza una sustitución de diferentes posiciones del péptido RMF con alanina (véase también la Tabla 10) y que la pérdida de unión vista con la sustitución de la posición 1 por cualquier residuo que sea de alanina (WT1-A1-B) o tirosina (WT1-A1), no era debida a la reducción de la afinidad de unión del péptido a la molécula HLA-A2, ya que ambos péptidos mostraron la unión más fuerte en el ensayo de estabilización T2 utilizando el anticuerpo específico mAb para el clon BB7 de la molécula HLA-A2.

[0044] La Figura 21 muestra el reconocimiento por anticuerpos WT1 del complejo naturalmente presentado RMF/HLA-A0201 en la superficie celular de las líneas celulares de mesotelioma humanos, JM1 (WT1+/ A0201+) pero no de MSTO (WT1+ / HLA-A0201).

[0045] La figura 22 muestra la unión de anticuerpos WT1 al CML humano derivado de la línea celular BV173.

[0046] La Figura 23 es un análisis de Scatchard basado en la unión del anticuerpo WT1 a células JM1 y muestra una constante de afección de aproximadamente 0,2 nM.

[0047] La Figura 24 muestra la unión del anticuerpo WT1 a un panel de células de mesotelioma y de leucemia.

[0048] La Figura 25 muestra los resultados de un análisis de citometría de flujo cerrada en células AML eruptivas CD33 y CD34 dobles positivas de un paciente HLA-A2 positivo la. ESK1 se une a las células eruptivas de leucemia.

[0049] La Figura 26 muestra los resultados de un análisis de citometría de flujo cerrada en en células AML eruptivas CD33 y CD34 dobles positivas de un paciente HLA-A2 negativo WT1mAb ESK1 no se unió a las células eruptivas.

[0050] La figura 27 muestra al WT1mAb ESK1 mediada por ADCC contra las células T2 pulsadas con el péptido RMF.

[0051] La Figura 28 muestra la capacidad del anticuerpo WT1 para mediar ADCC con efectores humanos en JMN y en la línea celular de leucemia BV173 (panel inferior), pero no en las células MSTO.

[0052] La Figura 29 muestra que los anticuerpos monoclonales WT1 son eficaces contra la línea celular de leucemia humana BV173 pero no contra las células HL60, que no son HLA-A2 +.

[0053] La figura 30 muestra que los anticuerpos WT1 inducen ADCC contra erupciones primarias de AML en un paciente HLA-A2 positivo.

[0054] La Figura 31 muestra los resultados del tratamiento de la BV173 humana en ratones NSG usando los anticuerpos de la presente invención.

[0055] La Figura 32 muestra que en los puntos de tiempo posteriores, los ratones tratados con un único anticuerpo WT1 comenzaron a recaer, mientras que los anticuerpos con efectores curaron a 2 de 5 ratones.

[0056] La Figura 33 muestra que el anticuerpo WT1 reduce significativamente la carga tumoral en una manera dependiente de la dosis.

[0057] La Figura 34 muestra que el anticuerpo con hidratos de carbono alterados en Fc (MAGE) es más activo en la ADCC que el anticuerpo original.

Descripción detallada de la presente invención

[0058] Todas las publicaciones, patentes y otras referencias citadas en este documento se incorporan para su referencia en la presente descripción en su totalidad.

[0059] En la práctica de la presente invención, se utilizan muchas técnicas convencionales en biología molecular, microbiología, biología celular, bioquímica, e inmunología, que están dentro del campo de la técnica. Estas técnicas se describen en mayor detalle, por ejemplo, en Molecular Cloning: a Laboratory Manual 3^a edición, Sambrook JF y DW Russell, ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001; anticuerpos recombinantes para inmunoterapia, Melvyn Little, ed. Cambridge University Press 2009, "Síntesis de oligonucleótidos" (MJ Gait, ed, 1984.) "Animal Cell Culture" (RI Freshney, ed, 1987.), "Methods in Enzymology" (Academic Press, Inc.), "Current Protocols en Biología Molecular "(FM Ausubel et al, eds, 1987, y actualizaciones periódicas.), "PCR: Reacción en Cadena Polimerasa ", (Mullis et al, ed, 1994)," Una guía práctica para la clonación molecular " (Perbal BeARNrd V., 1988); "Phage Display: A Laboratory Manual" (Barbas et al, 2001.). El contenido de estas referencias y otras referencias que contienen protocolos estándar, ampliamente conocidos por las personas medianamente versadas en la materia, incluyendo instrucciones de los fabricantes se incorporan aquí para su referencia como parte de la presente descripción. Las siguientes abreviaturas se usan a lo largo de la aplicación:

[0060] **Ab:** Anticuerpo

[0061] **ADCC:** Citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos

[0062] **ALL:** leucemia linfocítica aguda

[0063] **AML:** Leucemia mieloide aguda

[0064] **APC:** Célula presentadora de antígeno

[0065] **β2M:** microglobulina-Beta-2

[0066] **BiTE:** Células T Bi- específicas de unión de anticuerpos

[0067] **CAR:** Receptor quimérico de antígeno

[0068] **CDC:** Citotoxicidad dependiente del complemento

- [0069] **CMC:** citotoxicidad mediada por el Complemento
- [0070] **CDR:** Región determinante de complementariedad (véase también a continuación HVR)
- [0071] **CL:** Dominio constante de la cadena ligera
- [0072] **CH₁:** Primer dominio constante de la cadena pesada
- [0073] **CH_{1,2,3}:** Primero, segundo y tercer dominios constantes de la cadena pesada
- [0074] **CH_{2,3}:** Segundo y tercer dominios constantes de la cadena pesada
- [0075] **CHO:** Ovario de hámster chino
- [0076] **CTL:** Células T citotóxicas
- [0077] **Razón E:T:** Razón efector:objetivo
- [0078] **Fab:** Fragmento de unión del anticuerpo
- [0079] **FACS:** Clasificación de células asistida por citometría de flujo
- [0080] **FBS:** Suero fetal bovino
- [0081] **FR:** Región Marco
- [0082] **HC:** Cadena pesada
- [0083] **HLA:** Antígeno leucocitario humano
- [0084] **HVR-H:** Región hipervariable de cadena pesada (véase también CDR)
- [0085] **HVR-L:** Región hipervariable de cadena de ligera (véase también CDR)
- [0086] **Ig:** Inmunoglobulina
- [0087] **IRES:** Sitio de entrada interno del ribosoma
- [0088] **K_D:** Constante de disociación
- [0089] **k_{off}:** Tasa de disociación

[0090] **K_{on}**: Tasa de Asociación

[0091] **CMH**: Complejo mayor de histocompatibilidad

[0092] **MM**: Mieloma múltiple

[0093] **scFv**: Fragmento variable de cadena sencilla

[0094] **TCR**: Receptor de células T

[0095] **V_H**: Cadena pesada variable que incluye una región hipervariable de la cadena pesada y la región marco variable de cadena pesada

[0096] **V_L**: Cadena ligera variable incluye la luz región hipervariable de la cadena y de la región marco variable de cadena ligera

[0097] **WT1**: Proteína del tumor de Wilms 1

[0098] En la descripción que sigue, ciertas convenciones estarán seguidas en lo que respecta al uso de la terminología. En general, los términos utilizados en este documento están destinados a interpretarse de manera coherente con el significado de esos términos como son conocidos por las personas medianamente versadas en la técnica.

[0099] Una "proteína de unión a antígeno" es una proteína o polipéptido que comprende una región de unión al antígeno o porción de unión a antígeno, es decir, tiene una fuerte afinidad a otra molécula a la que se une. Las proteínas de unión a antígenos abarcan anticuerpos, receptores de antígenos quiméricos (CAR) y proteínas de fusión.

[00100] "Anticuerpo" y "anticuerpos", tal como estos términos son conocidos en la técnica se refieren a las proteínas de unión a antígeno del sistema inmune. El término "anticuerpo" como se refiere en el presente documento, incluye anticuerpos completos de longitud completa que tienen una región de unión al antígeno, y cualquier fragmento de la misma en la que se retiene la "porción de unión al antígeno" o "región de unión a antígeno", o cadenas individuales, por ejemplo, un fragmento variable de cadena sencilla (scFv), de los mismos. Un "anticuerpo" de origen natural es una glicoproteína que comprende al menos dos cadenas pesadas (H) y dos cadenas ligeras (L) interconectadas mediante enlaces disulfuro. Cada cadena pesada está compuesta de una región variable de cadena pesada (abreviada en este documento como V_H) y una región constante de cadena pesada (CH). La región constante de

cadena pesada está compuesta de tres dominios, CH1, CH2 y CH3. Cada cadena ligera comprende una región variable de cadena ligera (en adelante abreviado como V_L) y una región constante de cadena ligera C_L. La región constante de la cadena ligera está compuesta de un dominio, CL. Las regiones V_H y V_L pueden subdividirse en regiones de hipervariabilidad, denominadas regiones determinantes de la complementariedad (CDR), intercaladas con regiones que están más conservadas, denominadas regiones marco (FR). Cada V_H y V_L está compuesta de tres CDR y cuatro FR dispuestas desde el extremo amino al extremo carboxi-terminal en el siguiente orden: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4. Las regiones variables de las cadenas pesada y ligera contienen un dominio de unión que interacciona con un antígeno. Las regiones constantes de los anticuerpos pueden mediar la unión de la inmunoglobulina a tejidos hospederos o factores, incluyendo varias células del sistema inmune (por ejemplo, células efectoras) y el primer componente del sistema clásico del complemento (C1q).

[00101] El término "porción de unión a antígeno" o "región de unión a antígeno" de un anticuerpo, como se usa aquí, se refiere a esa región o parte del anticuerpo que se une al antígeno y que confiere especificidad de antígeno al anticuerpo; los fragmentos de las proteínas de unión a antígeno, por ejemplo, los anticuerpos incluyen uno o más fragmentos de un anticuerpo que retienen la capacidad de unirse específicamente a un antígeno (por ejemplo, un complejo de péptido / HLA). Se ha demostrado que la función de unión a antígeno de un anticuerpo puede llevarse a cabo por fragmentos de un anticuerpo de longitud completa. Ejemplos de fragmentos de unión a antígeno comprendidos por la expresión "fragmentos de anticuerpo" de un anticuerpo incluyen un fragmento Fab, un fragmento monovalente que consiste en los dominios V_L, V_H, C_L y CH1; un fragmento F(ab)₂, un fragmento bivalente que comprende dos fragmentos Fab unidos mediante un puente disulfuro en la región de bisagra; un fragmento Fd que consiste de los dominios V_H y CH1; un fragmento Fv que consiste de los dominios V_L y V_H de un único brazo de un anticuerpo; un fragmento dAb (Ward et al, 1989 Naturaleza 341:544-546), que consiste en un dominio V_H, y una región determinante de la complementariedad (CDR) aislada.

[00102] Además, aunque los dos dominios V_L y V_H del fragmento Fv, están codificados por genes separados, pueden unirse, usando métodos recombinantes, mediante un enlazador sintético que les permite ser formarse como una sola cadena proteica en la que las regiones V_L y V_H se emparejan para formar moléculas monovalentes. Estas son conocidas como Fv de

cadena sencilla (scFv); véase, por ejemplo, Bird et al, 1988 Ciencia 242:423-426; Y Huston et al, 1988 Proc.. Natl. Acad. Ciencia. 85:5879-5883. Estos fragmentos de anticuerpo se obtienen usando técnicas convencionales conocidas por las personas medianamente versadas en la técnica, y los fragmentos son cribados por su utilidad de la misma manera que los anticuerpos intactos.

[00103] Un "anticuerpo aislado" o una "proteína aislada de unión a antígeno" es uno(a) que ha sido identificado(a) y separado(a) y / o recuperado(a) de un componente de su entorno natural. Los "Anticuerpos sintéticos" o "anticuerpos recombinantes" son originados generalmente por medio de tecnología recombinante o utilizando técnicas de síntesis de péptidos conocidos por las personas medianamente versadas en la técnica.

[00104] Tradicionalmente, el complejo CMH-péptido sólo podía ser reconocido por un receptor de células T (TCR), lo que limita nuestra capacidad de detectar un epítipo de interés utilizando ensayos de lectura basados en células T. En la presente descripción, se describen las proteínas de unión a antígeno, incluyendo anticuerpos, que tienen una región de unión a antígeno sobre la base de los scFv que se seleccionan a partir de bibliotecas de presentación de fagos de scFv humanos recombinantes utilizando complejos HLA-péptido. Estas moléculas demostraron una especificidad exquisita, por ejemplo como se muestra con los anticuerpos anti-WT1 que reconocen sólo complejos de HLA-A2-RMFPNAPYL. Además, junto con su incapacidad para unirse a los complejos HLA que contienen otros péptidos, las moléculas también fueron incapaces de unirse a los propios péptidos, lo que demuestra aún más su especificidad similar a la del TCR.

[00105] Los scFv seleccionados de la divulgación mediante presentación de fagos fueron ensayados inicialmente por su capacidad de unirse al péptido presentado en la superficie de las células HLA-positivas. Después las células T2 se incubaron en presencia del péptido, los anticuerpos marcados con fluorescencia se podrían utilizar para reconocer selectivamente las células unidas con antígeno utilizando citometría de flujo.

[00106] En algunas modalidades, la presente invención incluye anticuerpos que tienen la secuencia de scFv fusionada a uno o más dominios constantes de las cadenas pesadas para formar un anticuerpo con una región Fc de una inmunoglobulina humana para producir una proteína bivalente, aumentando así la avidéz global y la estabilidad del anticuerpo. Además, la porción Fc permite la conjugación directa con otras moléculas, incluyendo pero no

limitando a los colorantes fluorescentes, citotoxinas, radioisótopos etc. con el anticuerpo, por ejemplo, para su uso en estudios de cuantificación antigénica, para inmovilizar el anticuerpo en mediciones de afinidad, para el objetivo de entregar de un agente terapéutico, para la prueba de citotoxicidad mediada por Fc usando células efectoras inmunes y muchas otras aplicaciones.

[00107] Los resultados presentados aquí resaltan la especificidad, la sensibilidad y la utilidad de los anticuerpos de la presente invención en la selección de complejos CMH-péptido.

[00108] Las moléculas de la presente invención se basan en la identificación y selección de fragmentos de cadena sencilla (scFv variables) utilizando la visualización de fagos, la secuencia de aminoácidos de la que confiere especificidad de las moléculas para el péptido restringido del CMH de interés y forma la base de la todas las proteínas de unión de la divulgación. El scFv, por lo tanto, se puede utilizar para diseñar un conjunto diverso de moléculas de "anticuerpos", incluyendo, por ejemplo, anticuerpos de longitud completa, fragmentos de los mismos, tales como Fab y F(ab')₂, minicuerpos, proteínas de fusión, incluyendo fusiones scFv-Fc, anticuerpos multivalentes, es decir, anticuerpos que tienen más de una especificidad para el mismo antígeno o para antígenos diferentes, por ejemplo, anticuerpos biespecíficos de células T de acoplamiento (BiTE), tricuerpos, etc (véase Cuesta et al.,: Multivalent antibodies: when design surpasses evolution. *Trends in Biotechnology* 28:355-362 2010).

[00109] En una modalidad en la que la proteína de unión a antígeno es un anticuerpo de longitud completa, las cadenas pesada y ligera de un anticuerpo de la presente invención pueden ser de longitud completa (por ejemplo, un anticuerpo puede incluir al menos una, y preferiblemente dos cadenas pesadas completas, y al menos una, y preferiblemente dos, cadenas ligeras completas) o puede incluir una porción de unión al antígeno (un Fab, F(ab')₂, Fv o un fragmento Fv de cadena ("scFv")). En otras modalidades, la región constante de la cadena pesada del anticuerpo se selecciona entre, por ejemplo, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgM, IgA1, IgA2, IgD, e IgE. En algunas formas de realización, el isotipo de la inmunoglobulina se selecciona de IgG1, IgG2, IgG3, e IgG4, más en particular, IgG1 (por ejemplo, IgG1 humana). La elección del tipo de anticuerpo dependerá de la función efectora inmune del anticuerpo que ha sido diseñado para desencadenar.

[00110] En la construcción de una inmunoglobulina recombinante son conocidos las personas medianamente versadas en la técnica, las secuencias de aminoácidos apropiadas para las regiones constantes de varios isotipos y los métodos para la producción de una amplia gama de anticuerpos de inmunoglobulina.

[00111] En una modalidad, el anticuerpo u otra proteína de unión a antígeno es un scFv o anti-WT1/HLA-A2 o un fragmento de unión a antígeno del mismo que tiene una región de unión a antígeno que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 18 y se une específicamente a un péptido con la secuencia de aminoácidos RMFPNAPYL (SEC ID N °: 1), en relación con el HLA-A0201. En algunas formas de realización, el anticuerpo anti-WT1 es una proteína de fusión scFv-Fc o una IgG humana de longitud completa con las regiones VH y VL o CDR seleccionados de la Tabla 1.

Tabla 1

Antígeno	WT1 (Ext002 # 3)		
Péptido	RMFPNAPYL (SEC ID N °: 1)		
CDRS:	1	2	3
VH	GGTFSSY AIS (SEQ ID NO: 2)	GIIPFGTANYAQKFQG (SEQ ID NO: 3)	RIPPYYGMDV (SEQ ID NO: 4)
ADN	ggaggcaccttcagcagcta tgctatcagc (SEQ ID NO: 5)	gggatcatccctatcttggtagc aaactacgcacagaagtccaggg c (SEC ID N °: 6)	cggattccccgtactacggtatgg acgtc (SEQ ID NO: 7)
VL	SGSSSNIGSNYVY (SEC ID N °: 8)	RSNQRPS (SEQ ID NO: 9)	AAWDDSLNGVV (SEQ ID NO: 10)

Antígeno	WT1 (Ext002 # 3)		
Péptido	RMFPNAPYL (SEC ID N °: 1)		
ADN	tctggaagcagctccaacat cggaagtaattatgtatac (SEC ID N °: 11)	aggagtaatcagcggccctca (SEC ID N °: 12)	gcagcatgggatgacagcctgaat ggtgtggta (SEQ ID NO: 13)
H Completo	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSKASGGTFSSYAISWVRQAPGQGLEW MGGIPIFGTANYAQKFQGRVTITADESTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCA RRIPPYYGMDVWGQGTTVTVSS (SEQ ID NO: 14)		
ADN	caggtgcagctggtgcagctctggggctgaggtgaagaagcctgggtcctcggtgaaggtctcctgaaggtctct ggaggcaccttcagcagctatgctatcagctgggtgcgacaggccccctggacaagggttgagtggatgggag ggatcatccctatcttgggtacagcaaacacgcacagaagttccagggcagagtcacgattaccgcggacgaat ccacgagcacagcctacatggagctgagcagcctgagatctgaggacacggccgtgtattactgtgcgagacg gattccccgtactacgggtatggacgtctggggccaagggaccacggtcaccgtctcctca (SEQ ID NO: 15)		
VL Completo	QTVVTQPPSASGTPGQRVTISCSGSSSNIGSNYVYWYQQLPGTAPKLLIY RSNQRPSGVPDRFSGSKSGTSASLAISGPRSVDEADYYCAAWDDSLNGV VFGGGTKLTVLG (SEQ ID NO: 16)		
ADN	Cagactgtggtgactcagccaccctcagcgtctgggacccccgggcagagggtcaccatctctgttctggaag cagctccaacatcggaagtaattatgtatactggtaccaacagctcccaggaacggccccaaactcctcatctat aggagtaatcagcggccctcaggggtccctgaccgattctctggctccaagtctggcacctcagcctccctggcc atcagtgggccccgggtccgtggatgaggtgattattactgtgcagcatgggatgacagcctgaatggtgtggtat tcggcggagggaaccaagctgaccgtcctaggt (SEQ ID NO: 17)		
scFv	QTVVTQPPSASGTPGQRVTISCSGSSSNIGSNYVYWYQQLPGTAPKLLIY RSNQRPSGVPDRFSGSKSGTSASLAISGPRSVDEADYYCAAWDDSLNGV VFGGGTKLTVLGS SRGGGSGGGGSGGGSLEMA QVQLVQSGAEVKKP GSSVKVSKASGGTFSSYAISWVRQAPGQGLEWMGGIPIFGTANYAQK FQGRVTITADESTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARRIPPYYGMDVWGQ GTTVTVSS (SEQ ID NO: 18)		

Antígeno	WT1 (Ext002 # 3)
Péptido	RMFPNAPYL (SEC ID N °: 1)
ADN	cagactgtggtgactcagccaccctcagcgtctgggacccccgggcagagggtcaccatctctgttctggaagc agctccaacatcggaagtaattatgtatactggtaccaacagctcccaggaacggccccaaactcctcatctata ggagtaatcagcggccctcaggggtccctgaccgattctctggctccaagtctggcacctcagcctccctggcca tcagtgggccccgggtccgtggatgaggctgattattactgtgcagcatgggatgacagcctgaatggtgtgtatt cggcggaggggaccaagctgaccgtcctaggt tctagagggtggtggtgtagcggcggcggcggctctggtg gtggatccctcgagatggccc aggtgcagctggtgcagctctggggctgaggtgaagaagcctgggtcctcggt gaaggtctctgcaaggcttctggaggcaccttcagcagctatgctatcagctgggtgcgacaggccctggaca agggcttgagtggatgggaggatcatccctatcttgggtacagcaaactacgcacagaagtccagggcagagt cacgattaccgcgacgaatccagagcacagcctacatggagctgagcagcctgagatctgaggacaggcc gtgtattactgtgcgagacggattccccgtactacggtatggacgtctggggccaagggaccacggtcaccgtc tcctca (SEQ ID NO: 19)

[00112] En otra forma de realización, el anticuerpo o la proteína de unión a antígeno es un anticuerpo anti-WT1 scFv o un fragmento de unión a antígeno del mismo que tiene una región de unión al antígeno que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 36 y se une específicamente a un péptido con la secuencia de aminoácidos de RMFPNAPYL (SEQ ID NO: 1), en relación con el HLA-A0201. En otras formas de realización, el anticuerpo anti-WT-1 es una proteína de fusión scFv-Fc o una IgG humana de longitud completa con las regiones VH y VL o CDR seleccionados de la Tabla 2.

Tabla 2

Antígeno	WT1 (Ext002 # 5)		
Péptido	RMFPNAPYL (SEC ID N °: 1)		
CDRS	1	2	3

Antígeno	WT1 (Ext002 # 5)		
Péptido	RMFPNAPYL (SEC ID N °: 1)		
VH	GDSVSSNSAAWN (SEC ID N °: 20)	RTYYGSKWYNDYAVS VKS (SEC ID N °: 21)	GRLGDAFDI (SEQ ID NO: 22)
ADN	ggggacagtgtctctagcaac agtgtgcttggaac (SEC ID N °: 23)	aggacatactacgggtccaagtgt ataatgattatgcagtatctgtgaaa agt (SEC ID N °: 24)	ggtcgcttaggggatgctttgatat c (SEC ID N °: 25)
VL	RASQSISSYLN (SEQ ID NO: 26)	AASSLQS (SEQ ID NO: 27)	QQSYSTPLT (SEQ ID NO: 28)
ADN	cgggcaagtcagagcattagc agctatttaaat (SEQ ID NO: 29)	gctgcatccagttgcaaagt (SEQ ID NO: 30)	caacagagttacagtaccctctc act (SEC ID N °: 31)
VH Completo	QVQLQQSGPGLVKPSQTLSTCAISGDSVSSNSAAWNWIRQSPSRGLEW LGRYYGSKWYNDYAVSVKSRITINPDTSKNQFSLQLNSVTPEDTAVY YCARGRLGDAFDIWGQGTMTVSS (SEQ ID NO: 32)		
ADN	caggtacagctgcagcagtcagggtccaggactgggaagccctgcagaccctctcactcacctgtgccatctcc ggggacagtgtctctagcaacagtgtgcttggaactggatcaggcagtcctccatcgagaggccttgagtggtg ggaaggacatactacgggtccaagtgtataatgattatgcagtatctgtgaaaagtcgaataaccatcaaccag acacatccaagaaccagttctccctgcagctgaactctgtgactcccaggacacggctgtgtattactgtgcaag aggtcgcttaggggatgctttgatctctggggccaagggacaatggtcaccgtctctca (SEQ ID NO: 33)		
VL Completo	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYA ASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFLTISLQPEDFATYYCQQSYSTPLTFGGG TKVDIKR (SEQ ID NO: 34)		

Antígeno	WT1 (Ext002 # 5)
Péptido	RMFPNAPYL (SEC ID N °: 1)
ADN	gacatccagatgaccagctctccatcctccctgtctgcatctgtaggagacagagtcaccatcacttgccgggcaa gtcagagcattagcagctattftaaattggatcagcagaaaccagggaaagcccctaagctcctgatctatgctgca tccagtttgcaaagtggggtcccatcaagggtcagtggcagtggtatctgggacagatttcactctcaccatcagca gtctgcaacctgaagattttgcaacttactactgtcaacagagttacagtaccctctcactttcggcggaggggacc aaagtggatatcaaacgt (SEQ ID NO: 35)
scFv	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTTTCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYA ASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQSYSTPLTFGGG TKVDIKRSRGGGGSGGGGSGGGGSLEMAQVQLQQSGPGLVKPSQTL SLTCAISGDSVSSNSAAWNWIRQSPSRGLEWLGRYYGSKWYNDYAVS VKSRTINPDTSKNQFSLQLNSVTPEDTAVYYCARGRLGDAFDIWGQGT MVTVSS (SEQ ID NO: 36)
ADN	gacatccagatgaccagctctccatcctccctgtctgcatctgtaggagacagagtcaccatcacttgccgggcaa gtcagagcattagcagctattftaaattggatcagcagaaaccagggaaagcccctaagctcctgatctatgctgca tccagtttgcaaagtggggtcccatcaagggtcagtggcagtggtatctgggacagatttcactctcaccatcagca gtctgcaacctgaagattttgcaacttactactgtcaacagagttacagtaccctctcactttcggcggaggggacc aaagtggatatcaaacgt tctagaggtggtggtgtagcggcgggcgggcctctggtggtggtggatccctc gagatggccc aggtacagctgcagcagtcaggtccaggactggtgaagccctgcgagaccctctcactcacct gtgccatctccggggacagtgctctagcaacagtgtgcttggaactggatcaggcagtcctccatcgagaggcc ttgagtggctgggaaggacatactacgggtccaagtggatataatgattatgcagtatctgtgaaaagtcgaataacc atcaaccagacacatccaagaaccagttctccctgcagctgaactctgtgactcccaggacacggctgtgtatt actgtgcaagaggtcgcttaggggatgcttttgatatctggggccaagggacaatggtcaccgtctcttca (SEQ ID NO: 37)

[00113] En otra forma de realización, el anticuerpo o la proteína de unión a antígeno es un anticuerpo anti-WT1 scFv o un fragmento de unión a antígeno del mismo que tiene una región de unión a antígeno que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 54 y se une específicamente a un péptido con la secuencia de aminoácidos RMFPNAPYL (SEC

ID N °: 1), en relación con el HLA-A0201. En otras formas de realización, el anticuerpo anti-WT-1 es una proteína de fusión scFv-Fc o una IgG humana de longitud completa con las regiones VH y VL o CDR seleccionados de la Tabla 3.

Tabla 3

Antígeno	WT1 (Ext002 # 13)		
Péptido	RMFPNAPYL (SEC ID N °: 1)		
CDRS	1	2	3
VH	GYSFTNFWIS (SEQ ID NO: 38)	RVDPGYSYSTYSPSFQ G (SEC ID N °: 39)	VQYSGYYDWFDPP (SEQ ID NO: 40)
ADN	ggatacagcttcaccaactct ggatcagc (SEQ ID NO: 41)	aggggtgatcctggctactcttata gcacctacagcccgctctccaag gc (SEQ ID NO: 42)	gtacaatatagtggtactatgact gggtcgacccc (SEQ ID NO: 43)
VL	SGSSSNIGSNTVN (SEQ ID NO: 44)	SNNQRPS (SEQ ID NO: 45)	AAWDDSLNGWV (SEQ ID NO: 46)
ADN	tctggaagcagctccaacatc ggaagtaatactgtaaac (SEC ID N °: 47)	agtaataatcagcggccctca (SEQ ID NO: 48)	gcagcatgggatgacagcctgaa tggttggtg (SEQ ID NO: 49)
VH Completo	QMQLVQSGAEVKEPGESLRISCKGSGYSFTNFWISWVRQMPGKGLEW MGRVDPGYSYSTYSPSFQGHVTISADKSTSTAYLQWNSLKASDTAMY YCARVQYSGYYDWFDPPWGQGLTVTVSS (SEQ ID NO: 50)		

Antígeno	WT1 (Ext002 # 13)
Péptido	RMFPNAPYL (SEC ID N °: 1)
ADN	cagatgcagctggtgcagtcggagcagaggtgaaagagccccggggagctctctgaggatctcctgtaagggtt ctggatacagcttcaccaacttctggatcagctgggtgcgccagatgcccggaaggcctggagtgatggg gaggggtgactctggctactcttatagcacctacagcccgctctccaaggccacgtcaccatctcagctgacaa gtctaccagcactgcctacctgcagtggaaacagcctgaaggcctcggacaccgccatgtattactgtgcgagag tacaatatagtggtactatgactgggtcgaccctggggccagggaaccctggtcaccgtctcctca (SEQ ID NO: 51)
VL Completo	QAVVTQPPSASGTPGQRVTISCSGSSSNIGSNTVNWYQQVPGTAPKLLI YSNNQRPSGVPDRFSGSKSGTSASLAISGLQSEDEADYYCAAWDDSLN GWVFGGGTKLTVLG (SEQ ID NO: 52)
ADN	caggctgtggtgactcagccaccctcagcgtctgggacccccgggcagagggtcaccatctcttgttctggaag cagctccaacatcggaagtaatactgtaaactgtaccagcaggtcccaggaacggccccaaactcctcatct atagtaataatcagcggccctcaggggtccctgaccgattctctggctccaagtctggcacctcagcctccctgg ccatcagtggtgctccagctctgaggatgaggctgattattactgtgcagcatgggatgacagcctgaatggttggg tgttcggcggagggaaccaagctgaccgtcctaggt (SEQ ID NO: 53)
scFv	QAVVTQPPSASGTPGQRVTISCSGSSSNIGSNTVNWYQQVPGTAPKLLI YSNNQRPSGVPDRFSGSKSGTSASLAISGLQSEDEADYYCAAWDDSLN GWVFGGGTKLTVLGSRRGGGSGGGGSGGGGSLEMAQMQLVQSGA EVKEPGESLRISCKSGYSFTNFWISWVRQMPGKGLEWMGRVDPGYS YSTYSPSFQGHVTISADKSTSTAYLQWNSLKASDTAMYYCARVQYSG YYDWFDPPWGQGTLLTVSS (SEQ ID NO: 54)

Antígeno	WT1 (Ext002 # 13)
Péptido	RMFPNAPYL (SEC ID N °: 1)
ADN	caggctgtggtgactcagccaccctcagcgtctgggacccccgggcagagggtcaccatctcttgttctggaag cagctccaacatcggagtaataactgtaaactggtaccagcaggtcccaggaacggccccaaactcctcatct atagtaataatcagcggccctcaggggtccctgaccgattctctggctccaagtctggcacctcagcctccctgg ccatcagtggggtccagctctgaggatgaggctgatttactgtgcagcatgggatgacagcctgaatgggtggg tgttcggcggagggaaccaagctgaccgtcctaggttctagaggtggtggtggtagcggcggcggcggtctgg tggtggtggatccctcagatggccagatgcagctggtgcagtcggagcagaggtgaagagccggggg agtctctgaggatctcctgtaaggggtctggatacagcttcaccaactctggatcagctgggtgcgccagatgcc cgggaaaggcctggagtggatggggagggtgatcctggctactcttatagcacctacagccgctctccaag gccacgtcaccatctcagctgacaagtctaccagcactgcctacctgcagtgaacagcctgaaggcctcgga caccgccatgtattactgtgcgagagtacaatatagtggtactatgactggttcgaccctggggccagggaac cctggtcaccgtctctca (SEQ ID NO: 55)

[00114] En otra forma de realización, el anticuerpo o la proteína de unión a antígeno es un anticuerpo anti-WT1 scFv o un fragmento de unión a antígeno del mismo que tiene una región de unión a antígeno que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 72 y que se une específicamente a un péptido con la secuencia de aminoácidos RMFPNAPYL (SEC ID N °: 1), en relación con el HLA-A0201. En otras formas de realización, el anticuerpo anti-WT-1 es una proteína de fusión scFv-Fc o una IgG humana de longitud completa con las regiones VH y VL o CDR seleccionados de la Tabla 4.

Tabla 4

Antígeno	WT1 (Ext002 # 15)		
Péptido	RMFPNAPYL (SEC ID N °: 1)		
CDRS	1	2	3
VH	GYNFSNKWIG (SEQ ID NO: 56)	IIYPGYSDITYSPSFQG (SEQ ID NO: 57)	HTALAGFDY (SEQ ID NO: 58)

Antígeno	WT1 (Ext002 # 15)		
Péptido	RMFPNAPYL (SEC ID N °: 1)		
ADN	ggctacaactttagcaacaagt ggatcggc (SEQ ID NO: 59)	atcatctatcccggttactcggacat cacctacagcccgctcctccaaggc (SEC ID N °: 60)	cacacagcttggccggcttggact ac (SEC ID N °: 61)
VL	RASQNINKWLA (SEQ ID NO: 62)	KASSLES (SEQ ID NO: 63)	QQYNSYAT (SEQ ID NO: 64)
ADN	Cgggccagtcagaatatcaat aagtggctggcc (SEQ ID NO: 65)	aaggcgtctagtttagaaagt (SEC ID N °: 66)	caacaatataatagttatgcgacg (SEC ID N °: 67)
VH Completo	QVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGSGYNFSNKGWIGWVRQLPGRGLEWI AIIYPGYSDITYSPSFQGRVTISADTSINTAYLHWHSKASDTAMYVCVR HTALAGFDYWGLGTLTVSS (SEQ ID NO: 68)		
ADN	Caggtgcagctggtgcagctcggagcagaggtgaaaaagcccgagagctctgaagatcctcgtgaagggttc tggctacaactttagcaacaagtggatcggctgggtgcgccaattgccgggagaggcctggagtgatagcaa tcatctatcccggttactcggacatcacctacagcccgctcctccaaggccgcgtcaccatctccgccgacacgtc cattaacaccgcctacctgcactggcacagcctgaaggcctcggacaccgcatgtattattgtgtgcgacacaca gcttggccggcttggactactggggcctgggcaccctggtcaccgtctcctca (SEQ ID NO: 69)		
VL Completo	DIQMTQSPSTLSASVGDRVTITCRASQNINKWLAWYQQRPGKAPQLLIY KASSLESGVPSRFGSGSGGTEYTLTISSLQPDDFATYYCQQYNSYATFGQ GTKVEIKR (SEQ ID NO: 70)		
ADN	gacatccagatgaccagctcctccaccctgtctgcacatctgtaggagacagagtcacaatcacttgcggggcca gtcagaatatcaataagtggctggcctggatcagcagagaccagggaagccctcagctcctgatctataagg cgtctagtttagaaagtggggctccatctaggttcagcggcagtgatctgggacagaatacactctcaccatcag cagcctgcagcctgatgatttgcaacttattactgccaacaatataatagttatgcgacgttcggccaagggacca aggtggaaatcaaactg (SEQ ID NO: 71)		

Antígeno	WT1 (Ext002 # 15)
Péptido	RMFPNAPYL (SEC ID N °: 1)
scFv	DIQMTQSPSTLSASVGDRVITITCRASQNINKWLAWYQQRPGKAPQLLIY KASSLESGVPSRFSGSGSGTEYTLTISSLQPDDFATYYCQQYNSYATFGQ GTKVEIKRS RGGGGSGGGGSGGGGSLEMA QVQLVQSGAEVKKPGES LKISCKGSGYNFSNKGWVRQLPGRGLEWIAIIYPGYSDITYSPSFQGR VTISADTSINTAYLHWHLKASDTAMYCYVRHTALAGFDYWGLGTLV TVSS (SEQ ID NO: 72)
ADN	gacatccagatgaccagctctccaccctgtctgcacatcttaggagacagagtcacaatcactgccgggcca gtcagaatatcaataagtggctggcctggatcagcagagaccagggaagccctcagctcctgatctataagg cgtctagtttagaaagtgggtcccatctaggttcagcggcagtgatctgggacagaatacactctcaccatcag cagcctgcagcctgatgatttgcaactattactccaacaataataagttatgcgacgttcggccaagggacca aggtggaaatcaaacgt cttagaggtggtggtgtagcggcgggcggtctggtggtggtgatccctcg agatggccc caggtgcagctggtgcagctctggagcagaggtgaaaagcccgagagtcctgaagatctcctgt aagggttctggctacaactttagcaacaagtggatcggctgggtgcgccaattgccgggagaggcctggagtg gatagcaatcatctatcccgggtactcggacatcacctacagcccgctcctccaaggccgctcaccatctccgc gacacgtccattaacaccgcctacctgcactggcacagcctgaaggcctcggacaccgcatgtattattgtgtgc gacacacagctttggcggctttgactactggggcctgggcaccctggtcaccgtctcctca (SEQ ID NO: 73)

[00115] En otra forma de realización, el anticuerpo o la proteína de unión a antígeno es un anticuerpo anti-WT1 scFv o un fragmento de unión a antígeno del mismo que tiene una región de unión a antígeno que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 90 y se une específicamente a un péptido con la secuencia de aminoácidos RMFPNAPYL (SEC ID N °: 1), en relación con el HLA-A0201. En otras formas de realización, el anticuerpo anti-WT-1 es una proteína de fusión scFv-Fc o una IgG humana de longitud completa con las regiones VH y VL o CDR seleccionados de la Tabla 5.

Tabla 5

Antígeno	WT1 (Ext002 # 18)		
Péptido	RMFPNAPYL (SEC ID N °: 1)		
CDRS:	1	2	3
VH	GFTFDDYGMS (SEQ ID NO: 74)	GINWNGGSTGYADS VRG (SEC ID N °: 75)	ERGYGYHDPHDY (SEQ ID NO: 76)
ADN	gggttcacctttgatgattatgg catgagc (SEQ ID NO: 77)	ggtattaattggaatggtgtagc acaggttatgcagactctgtgag gggc (SEC ID N °: 78)	gagcgtggctacgggtaccatga tccccatgactac (SEQ ID NO: 79)
VL	GRNNIGSKSVH (SEQ ID NO: 80)	DDSDRPS (SEQ ID NO: 81)	QVWDSSSDHVV (SEQ ID NO: 82)
ADN	gggagaaacaacattggaagt aaaagtgtgcac (SEQ ID NO: 83)	gatgatagcgaccggccctca (SEQ ID NO: 84)	caggtgtgggatagtagtagtga tcatgtgta (SEQ ID NO: 85)
VH Completo	EVQLVQSGGGVVRPGGSLRLSCAASGFTFDDYGMSWVRQAPGKGL EWVSGINWNGGSTGYADSVRGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDT ALYYCARERGYGYHDPHDYWGQGLVTVSS (SEQ ID NO: 86)		
ADN	gaagtgcagctggtgcagtctgggggaggtgtgtacggcctggggggtccctgagactctcctgtgcagc ctctgggttcacctttgatgattatggcatgagctgggtccgccaagctccaggaaggggctggagtgggtc tctggtattaattggaatggtgtagcacaggttatgcagactctgtgaggggccgattcaccatctccagaga caacgccaagaactccctgtatctgcaaatgaacagtctgagagccgaggacacggccttgattactgtgcg agagagcgtggctacgggtaccatgatccccatgactactggggccaaggcacctggtgaccgtctcctca (SEQ ID NO: 87)		

Antígeno	WT1 (Ext002 # 18)
Péptido	RMFPNAPYL (SEC ID N °: 1)
VL Completo	QSVVTQPPSVSVAPGKTARITCGRNNIGSKSVHWYQQKPGQAPVLV VYDDSDRPSGIPERFSGSNSGNTATLTISRVEAGDEADYYCQVWDSS SDHVVFGGGTKLTVLG (SEQ ID NO: 88)
ADN	cagtctgtcgtgacgcagccgccctcggtgtcagtggccccaggaaagacggccaggattacctgtgggag aaacaacattggaagtaaaagtgtgcactggtaccagcagaagccaggccaggccctgtgctggtcgtcta tgatgatacgaccggccctcaggatccctgagcgattctctggctccaactctgggaacacggccacct gaccatcagcagggtcgaagccggggatgagggcgactattactgtcaggtgtgggatagtagtagtgatca tgtggtattcggcggagggaaccaagctgacctcctaggt (SEQ ID NO: 89)
scFv	QSVVTQPPSVSVAPGKTARITCGRNNIGSKSVHWYQQKPGQAPVLV VYDDSDRPSGIPERFSGSNSGNTATLTISRVEAGDEADYYCQVWDSS SDHVVFGGGTKLTVLGS RRGGGGSGGGSGGSLEMAE VLVQSGG GVVRPGGSLRLSCAASGFTFDDYGMWVRQAPGKGLEWVSGINWN GGSTGYADSVRGRFTISRDNANKNSLYLQMNSLRAEDTALYYCARER GYGYHDPHDYWGQGTLVTVSS (SEQ ID NO: 90)
ADN	cagtctgtcgtgacgcagccgccctcggtgtcagtggccccaggaaagacggccaggattacctgtgggag aaacaacattggaagtaaaagtgtgcactggtaccagcagaagccaggccaggccctgtgctggtcgtcta tgatgatacgaccggccctcaggatccctgagcgattctctggctccaactctgggaacacggccacct gaccatcagcagggtcgaagccggggatgagggcgactattactgtcaggtgtgggatagtagtagtgatca tgtggtattcggcggagggaaccaagctgacctcctaggt tctagaggtggtggttagcggcgggcgc ggctctggtggatccctcgagatggcc gaagtgcagctggtgcagtctggggaggtgtggtacggcctg gggggtccctgagacttcctgtgcagcctctgggttcaccttgatgattatggcatgagctgggtccgcaa gctccagggaaggggctggagtgggtctctggtattaatggaatggtgtagcacaggttatgcagactctg tgaggggccgattcaccatctccagagacaacccaagaactccctgtatctgcaaatgaacagtctgagag ccgaggacacggccttgattactgtgcgagagagcgtggctacgggtaccatgatcccatgactactggg gccaaggcacccctggtgacctctcctca (SEQ ID NO: 91)

[00116] En otra forma de realización, el anticuerpo o la proteína de unión a antígeno es un anticuerpo anti-WT1 scFv o un fragmento de unión a antígeno del mismo que tiene una región de unión a antígeno que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N °: 108 y se une específicamente a un péptido con la secuencia de aminoácidos RMFPNAPYL (SEC ID N °: 1), en relación con el HLA-A0201. En otras formas de realización, el anticuerpo anti-WT-1 es una proteína de fusión scFv-Fc o una IgG humana de longitud completa con las regiones VH y VL o CDR seleccionados de la Tabla 6.

Tabla 6

Antígeno	WT1 (Ext002 # 23)		
Péptido	RMFPNAPYL (SEQ ID NO. 1)		
CDRS:	1	2	3
VH	GFSVSGTYMG (SEQ ID NO. 92)	LLYSGGGTYHPASLQG (SEQ ID NO. 93)	GGAGGGHFDS (SEQ ID NO. 94)
ADN	gggttctccgtcagtggcacct acatgggc (SEQ ID NO. 95)	cttctttatagtggggcgccacata ccaccgcgcctgcagggc (SEQ ID NO. 96)	gaggggcaggaggtggccactt tgactcc (SEQ ID NO. 97)
VL	TGSSSNIGAGYDVH (SEQ ID NO. 98)	GNSNRPS (SEQ ID NO. 99)	AAWDDSLNGYV (SEQ ID NO. 100)
ADN	actgggagcagctccaacatc ggggcaggttatgatgtacac (SEQ ID NO. 101)	ggtaacagcaatcgccctca (SEQ ID NO. 102)	gcagcatgggatgacagcctga atggttatgtc (SEQ ID NO. 103)
VH Completo	EVQLVETGGGLLQPGSLRLSCAASGFSVSGTYMGWVRQAPGKGLEW VALLYSGGGTYHPASLQGRFIVSRDSSKNMVYLMNSLKAEDTAVYY CAKGGAGGGHFDSWGQGLTVTVSS (SEQ ID NO. 104)		

Antígeno	WT1 (Ext002 # 23)
Péptido	RMFPNAPYL (SEQ ID NO. 1)
ADN	Gaggtgcagctggtggagaccggaggaggcttgctccagccgggggggtccctcagactctcctgtgcagcct ctgggttctccgtcagtggtcacctacatgggctgggtccgccaggtccagggaagggaactggagtggtcgca cttctttatagtgtggcgccacataccaccagcgtccctgcagggccgattcatcgtctccagagacagctcca agaatatggtctatcttcaaatgaatagcctgaaagccgaggacacggccgtctattactgtgcgaaaggagggg caggaggtggccacttgactcctggggccaaggcaccctggtgaccgtctcctca (SEQ ID NO. 105)
VL Completo	QSVLTQPPSVSGAPGQRVTISCTGSSSNIGAGYDVHWYQQLPGTAPKLLI YGNSNRPSGVPDRFSGSKSGTSASLAISGLQSEDEADYYCAAWDDSLN GYVFGTGTKLTVLG(SEQ ID NO. 106)
ADN	cagtctgtgttgacgcagccgccctcagtgtctggggcccccagggcagagggtcaccatctcctgcactgggag cagctccaacatcggggcaggttatgatgtacactggtaccagcagcttcagggaacagccccaaactcctcat ctatggtaacagcaatcggccctcaggggtccctgaccgattctctggctccaagtctggcacctcagcctcctg gccatcagtgggctccagtctgaggatgaggctgattattactgtgcagcatgggatgacagcctgaatggttatgt cttcggaactgggaccaagctgaccgtcctaggt (SEQ ID NO. 107)
scFv	QSVLTQPPSVSGAPGQRVTISCTGSSSNIGAGYDVHWYQQLPGTAPKLLI YGNSNRPSGVPDRFSGSKSGTSASLAISGLQSEDEADYYCAAWDDSLN GYVFG TGTKLTVLGSRRGGGSGGGGSGGGGSLEMAEVQLVETGGGLLQPGG SLRLSCAASGFSVSGTYMGWVRQAPGKGLEWVALLYSGGGTYHPASL QGRFIVSRDSSKNMVYLMNSLKAEDTAVYYCAKGGAGGGHFDSWG QGTLVTVSS (SEQ ID NO. 108)

Antígeno	WT1 (Ext002 # 23)
Péptido	RMFPNAPYL (SEQ ID NO. 1)
ADN	cagtctgtgttgacgcagccgccctcagtgtctggggccccagggcagagggtcaccatctcctgcactgggag cagctccaacatcggggcaggttatgatgtacactggtaccagcagctccaggaacagccccaaactcctcat ctatggtaacagcaatcgccctcaggggtccctgaccgattctctggctccaagtctggcacctcagcctccctg gccatcagtgggtccagtctgaggatgaggctgattattactgtgcagcatgggatgacagcctgaatggttatgt cttcggaactgggaccaagctgaccgtcctaggttctagaggtgggtggtagcggcgggcggtcctgtgt gggtggatccctcgagatggcc gaggtgcagctggtggagaccggaggaggcttctccagccgggggg gtccctcagactctcctgtgcagcctctgggttctccgtcagtggcacctacatgggctgggtccgccaggtcca gggaagggactggagtgggtcgcacttctttatagtgggtggcgccacataccaccagcgtccctgcagggccg attcatcgtctccagagacagctccaagaatatggtctatcttcaaatgaatagcctgaaagccgaggacacggcc gtctattactgtgcgaaaggaggggcaggaggtggccacttgactcctggggccaaggcacctggtgaccgt ctcctca (SEQ ID NO. 109)

[00117] Otras formas de realización de los anticuerpos descritos y de las proteínas de unión a antígeno comprenden aquellas que comprenden las regiones pesadas y ligeras hipervariables y las regiones constantes, por ejemplo, como se muestra en las Tablas 7 (cadena pesada), 8 (cadena ligera) y 9 (regiones constantes).

Tabla 7

Grupo I	CDR-H1	CDR-H2	CDR-H3	SEQ ID N°.
EXT002-12 (166)	SNAVAWN	RTYRGSTYY --- ALSV	G-SNSAFDF	119-121
EXT002-5 (184)	SNSAAWN	RTYYGSKWYNDYAVSV	GRLGDAFDI	122-124

EXT002-8 (184)	SDGAAWN	RTYYRSKWYNDYAVSV	GDYYYGMDV	125-127
Consenso (191)	SNAAAWN	RTYYGSKWYNDYAVSV	T AFDI	128-130
Grupo II				
EXT002-14 (163)	SYWIS	RIDPSDSYTNYSFQ	GD ----- YDFYLD -	131-133
EXT002-25 (163)	SYGIS	WISAYNGNTNYAQLQ	DLYSSGWYESYYYGMDV	134-136
EXT002-3 (186)	SYAIS	GIPIFGTANYAQKFQ	RIP-P ----- YGMDV	137-139
EXT002-30 (163)	SYGIS	WISAHNGNTNYAQLQ	DR ----- VWFGDLSD	134, 140, 141
EXT002-33 (163)	SYAIS	GIPIFGTANYAQKEQ	NYDFWSG ----- DAFDI	137, 142, 143
Consenso (188)	SYAIS	IP G TNYAQKFQ	FY GMDV	137, 144, 145
Grupo III				
EXT002-	DYGMS	GINWNGGSTGYADSV	ERGY-GYHDPHDY	146-

34 (161)				148
EXT002-40 (157)	NYTMN	SISLSGAYIYYADSL	EGYSSSVYDAFDL	149-151
EXT002-45 (165)	SYGMH	GILSDGGKDYYVDSV	CSSN-YGNDAFDI	152-154
EXT002-48 (165)	TYSMN	SISSGAYSIFYADSV	DQYYGDKWDAFDI	155-157
Consenso (170)	SYGMN	SISS GGSIIYYADSV	E YY WDAFDI	158-160

Tabla 8

	CDR-L1	CDR-L2	CDR-L3	SEQ ID NOS.
Grupo I				
EXT002-1 (46)	CSGSSSNIGS-NTVN	SNNQRPSG	AAWDDSLNG - WVFG	161-163
EXT002-10 (46)	CSGSSSNIGS-NTVN	SNNQRPSG	EAWDDSLKG - PVFG	161, 162, 164
EXT002-12 (22)	CTGSSSNIGAGYDV H	GNSNRPSG	QSYDSSLADNYVFG	165-167
EXT002-13 (46)	CSGSSSNIGS-NTVN	SNNQRPSG	AAWDDSLNG - WVFG	161-163
EXT002-2 (46)	CSGSSSNIGR-NIVN	SNIERPSG	ASWDDSLNG - VLFG	168-170
EXT002-20 (46)	CSGSRSNIAS- NGVG	KNDQRPSG	SAWDDSLDGH- VVFG	171-173

EXT002-23 (46)	CTGSSSNIGAGYDV H	GNSNRPSG	AAWDDSLNG - YVFG	165, 166, 174
EXT002-25 (22)	CSGSSSNIGS-Stvn	SNSQRPSG	AAWDDSLNG - VVFG	175-177
EXT002-3 (46)	CSGSSSNIGS-NYVY	RSNQRPSG	AAWDDSLNG - VVFG	178, 179, 177
EXT002-30 (22)	CSGSSSNIGR-NTVN	SNNQRPSG	AAWDDSLNG - YVFG	180, 162, 174
EXT002-33 (22)	CSGSSSNIGN-DYVS	DNNKRPSG	GTWDNSLSA - WVFG	181-183
EXT002-36 (22)	CSGSSSNIGS-NSVY	NNNQRPSG	ATWDDSLSG - WVFG	184-186
EXT002-40 (22)	CSGSSSNIGS-NYVY	RNNQRPSG	AAWDDSLSA - WVFG	178, 187, 188
EXT002-42 (46)	CSGSTSNIGS-YYVS	DNNNRPSG	GTWDSSLSA - WVFG	189-191
EXT002-45 (22)	CSGSSSNIGN-NYVS	DNNKRPSG	GTWDSSLSA - WVFG	192, 182, 191
EXT002-48 (22)	CSGSNSNIGT-NTVT	SNFERPSG	SAWDDSFNG - PVFG	193-195
EXT002-6 (46)	CSGSSSNIGS-NYVS	RNNQRPSG	AAWDDGLRG - YVFG	196, 187, 197
EXT002-9 (22)	CSGSSSNIGS-NTVN	SNNQRPSG	EAWDDSLKG - PVFG	161, 162, 164
Consenso (46)	CSGSSSNIGS N V	NNQRPSG	AAWDDSL T WVFG	161-163
Grupo II				
EXT002-24 (24)	RASQSISSYLN	AASSLQS	QQSYSTP - T	198-200

EXT002-31 (24)	RASQGISNYLA	AASTLQS	QKYNSAPGVT	201-203
EXT002-35 (24)	RASQSINGWLA	RASTLQS	QQSSSLP-FT	204-206
EXT002-5 (48)	RASQSISSYLN	AASSLQS	QQSYSTP-LT	198-200
EXT002-7 (48)	RASQGISYYLA	AASTLKS	QQLNSYP-LT	207-209
EXT002-B (48)	RASQSISSYLN	AASSLQS	QQSYSTP-WT	198-200
Consenso (48)	RASQSISSYLN	AASSLQS	QQSYSTP LT	198-200
Grupo III				
EXT002-16 (23)	GGNNIGSKSVH	DDSDRPS	QVWDSSSDHPV	210-212
EXT002-17 (47)	GGNNIGSKSVH	DDSDRPS	QVWDSSGDHPV	210, 211, 213
EXT002-19 (47)	GGNNIGSKSVH	YDSDRPS	QVWDSSSDHPV	210, 214, 212
EXT002-21 (19)	GGTNIGSRFVH	DDSDRPS	QVWDSSGDHPV	215, 211, 213
EXT002-22 (47)	GGNNVESKSVH	YDRDRPS	EVWDSGSDHPV	216-218
EXT002-32 (23)	GGKNIGSKSVH	YDSDRPS	QVWDSGSDHYV	219, 214, 220
EXT002-34 (23)	GGNNIGSKSVH	DDSDRPS	QVWISSGDRVI	210, 211, 221
EXT002-43 (23)	GGDNIGSQGVH	YDTRDRPS	QVWGASSDHPV	222-224
Consenso (47)	GGNNIGSKSVH	YDSDRPS	QVWDSSSDHPV	210, 214, 212

Grupo IV				
EXT002-11 (47)	TGTSSDVGGYNYV S	DVSKRPS	GIYTYSDSW - V	225-227
EXT002-14 (23)	TGTSSDVGGYNYV S	DVGNRPS	SSYTSSSTR - V	225, 228, 229
EXT002-26 (23)	TGTRSDVGLYNYV A	DVIYRPG	SSYTNTGTV - L	230-232
EXT002-4 (47)	TGTSSDFGDYDYVS	DVSDRPS	QSYDSSLSGSGV	233-235
Consenso (47)	TGTSSDVGGYNYV S	DVS RPS	SSYTSS S V	225, 234, 229

Tabla 9

Regiones constantes				
región constante de cadena pesada de la IgG1 humana y secuencia del dominio Fc	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNS GALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVN HKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPK PKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNA KTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKAL PAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGF YPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPVLDSGDSFFLYSKLTVDKS RWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO. 236)			

Cadena ligera humana (kappa)	TVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKV DNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYLSSTLTLSKADYEKHKVY ACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO. 237)			
Cadena ligera humana (lambda)	QPKANPTVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWK ADGSPVKAGVETTKPSKQSNNKYAASSYLSLTPEQWKSHRSY SCQVTHEGSTVEKTVAPTECS (SEQ ID NO. 238)			

[00118] La presente invención se refiere a proteínas recombinantes de unión a antígeno, anticuerpos y fragmentos de unión a antígeno de los mismos que reconocen específicamente epítomos de un complejo formado por un fragmento de péptido/proteína derivada de una proteína intracelular, y una molécula del CMH de clase I, por ejemplo, como el complejo debe mostrarse en la superficie de la célula durante la presentación de los antígenos. Las cadenas pesada y ligera de un anticuerpo de la presente invención pueden ser de longitud completa (por ejemplo, un anticuerpo puede incluir al menos una, y preferiblemente dos, cadenas pesadas completas, y al menos una, y preferiblemente dos, cadenas ligeras completas) o puede incluir una porción de unión al antígeno (un Fab, F (ab')₂, Fv o un fragmento Fv de cadena ("scFv")). En otras formas de realización, la región constante de la cadena pesada del anticuerpo se selecciona de entre, por ejemplo, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgM, IgA1, IgA2, IgD, e IgE, en particular se elige entre, por ejemplo, IgG1, IgG2, IgG3, e IgG4, más en particular, IgG1 (por ejemplo, IgG1 humana). En otra forma de realización, la región constante de la cadena ligera del anticuerpo se selecciona de entre, por ejemplo las regiones, kappa o lambda, particularmente kappa.

[00119] Los anticuerpos y las proteínas de unión a antígeno de la presente invención están destinadas a abarcar anticuerpos biespecíficos, incluyendo anticuerpos biespecíficos de unión a células T, es decir, anticuerpos que comprenden dos dominios variables del anticuerpo sobre una única cadena de polipéptido que son capaces de unirse a dos antígenos separados. Cuando una primera porción de un anticuerpo biespecífico se une a un antígeno en una célula tumoral, por ejemplo, y una segunda porción de un anticuerpo biespecífico reconoce un antígeno en la superficie de una célula inmune humana efectora, el anticuerpo es capaz de reponer la actividad de esa célula efectora mediante la unión específica del antígeno efector sobre la célula inmune humana efectora. En algunos casos, los anticuerpos biespecíficos, por lo tanto, son capaces de formar una unión entre las células efectoras, por ejemplo, células T y células tumorales, mejorando de este modo la función efectora.

[00120] En una forma de realización, la región constante / región marco es alterada, por ejemplo, mediante sustitución de aminoácidos, para modificar las propiedades del anticuerpo (por ejemplo, para aumentar o disminuir la afinidad de unión a uno o más antígenos, la unión al receptor Fc, hidratos de carbono del anticuerpo, por ejemplo, glicosilación, etc.

fucosilación, el número de residuos de cisteína, la función de la célula efectora, la función del complemento o la introducción de un sitio de conjugación). Por otra parte, también se contempla la conjugación del anticuerpo con un fármaco, toxina, radioisótopo, citoquina, péptido inflamatorio o citotóxico.

[00121] En una forma de realización, el anticuerpo es un anticuerpo anti -WT1/A2 y comprende la región constante de la IgG1 humana y el dominio Fc que se muestra en la Tabla 9. En una forma de realización, el anticuerpo comprende una secuencia kappa anti-WT1/A2 humana, o una secuencia humano lambda que tiene la secuencia expuesta en la Tabla 9. Las secuencias de aminoácidos de algunas regiones determinantes de la complementariedad (CDRs) de los anticuerpos de la presente invención se muestran en las Tablas 1-8.

[00122] La presente invención se basa en la identificación de secuencias de unión específicos a antígenos de la que se puede producir una variedad de proteínas de unión a antígeno. Además de los anticuerpos específicos para un antígeno que representa un complejo de fragmento de proteína (péptido)/HLA similar al que normalmente es reconocido por un receptor de células T tras el procesamiento y presentación de antígenos de la proteína de la célula T, la identificación de las secuencias de aminoácidos y de ácidos nucleicos tal como se describen en este documento para la preparación de anticuerpos también se puede utilizar para generar otras moléculas de unión a antígeno, incluyendo receptores de antígenos quiméricos (CARs), con especificidad para el complejo de fragmento de proteína (péptido)/HLA. Estos pueden ser incorporados en las células para que sean específicamente citotóxicos para la célula que expresa el antígeno.

[00123] La presente invención emplea un enfoque novedoso para la obtención de anticuerpos terapéuticos de cualquier proteína, incluyendo aquellas proteínas que son inaccesibles debido a que no se expresan en la superficie celular. Casi cualquier proteína intracitoplasmática o intranuclear(en adición a las proteínas de la superficie celular) es una diana potencial para el enfoque descrito en este documento. Esto incluye, pero no se limita a, proteínas oncogénicas, factores de transcripción, enzimas, etc.

[00124] Con el fin de apuntar los antígenos tumorales derivados de proteínas intracelulares o nucleares, se requiere el desarrollo de un anticuerpo terapéutico de enfoque no común. Este enfoque es generar mAb recombinantes que reconocen el complejo de péptido/CMH expresado en la superficie celular, con la misma especificidad que un receptor de células T

(TCR). Tales mAbs comparten homología funcional con las TCR respecto al reconocimiento del objetivo, pero confieren una mayor afinidad y capacidad de unión con agentes citotóxicos potentes que los anticuerpos caracterizados. Técnicamente, como los mAb semejantes a TCR pueden ser generados mediante técnicas convencionales de hibridoma conocidos por las personas medianamente versadas en la técnica, para producir anticuerpos humanos, humanizados o quiméricos.

[00125] Por otra parte, Se prefieren los anticuerpos monoclonales totalmente humanos para uso terapéutico en los seres humanos ya que los anticuerpos murinos causan una reacción de inmunogenicidad, conocida como la respuesta HAMA (24, 25), (anticuerpos humanos anti-ratón) cuando se administran a los seres humanos, causando efectos secundarios graves, incluyendo anafilaxis y reacciones de hipersensibilidad. Esta reacción de inmunogenicidad se activa por el sistema inmune humano que reconoce a los anticuerpos murinos como extranjeros debido a secuencias de aminoácidos ligeramente diferentes de los anticuerpos humanos naturales. Los métodos de humanización conocidos en la técnica (26, 27) se pueden emplear para reducir la inmunogenicidad de los anticuerpos de origen murino (28).

[00126] Recientemente, el uso de bibliotecas de expresión de fagos ha hecho posible seleccionar un gran número de repertorios Ab de Abs únicos y raros contra epítomos muy definidos (para más detalles sobre la visualización de fagos ver McCafferty et al, Phage antibodies: filamentous phage displaying antibody variable domains. *Nature*, 348: 552-554) Así pues, ha llegado a ser posible la rápida identificación de los fragmentos de un Fab humano o un Fv de cadena sencilla (scFv) altamente específica para el tumor de las moléculas de complejos péptido-CMH-antígeno derivados (19-22). Más recientemente, las inmuno-toxinas, generadas por la fusión de Fab similar a TCR específico para melanoma Ag MART-1 26-35/A2 o gp100 280-288/A2 a una forma truncada de endotoxinas de *Pseudomonas*, ha demostrado que inhibe el crecimiento del melanoma humano tanto in vitro como in vivo (23). Además, mediante la ingeniería es posible generar directamente los mAb de longitud completa usando fragmentos Fab, un mAb humano terapéutico, sin permanecer meses de tiempo trabajando que se necesitan normalmente para el desarrollo de mAbs terapéuticos. La presente invención implica el desarrollo de un mAb semejante a TCR, completamente humano que reconoce, por ejemplo, el complejo péptido/HLA-A2 WT1 (RMFPNAPYL, SEQ ID NO: 1) para la terapia del cáncer.

[00127] Los anticuerpos recombinantes con especificidad similar a TCR representan una herramienta nueva y valiosa para la investigación y para las aplicaciones terapéuticas de la inmunología tumoral y de la inmunoterapia. El WT1 es un antígeno tumoral bien establecido y validado que se ha investigado en todo el mundo como un marcador, factor de pronóstico y diana terapéutica. Se priorizó recientemente como el antígeno tumoral principal por un grupo de trabajo del NCI (29).

Identificación de péptidos con unión altamente predictiva a las moléculas de HLA

[00128] En una forma de realización, la presente invención se refiere a un método para la generación de anticuerpos que se unen específicamente a los péptidos restringidos por HLA, que, cuando se presentan como parte de un complejo péptido/CMH son capaces de provocar una respuesta específica de células T citotóxicas. Las moléculas de HLA de clase I presentan péptidos endógenos derivados de cerca de 8-12 aminoácidos de longitud a linfocitos T CD8 + citotóxicos. Los péptidos que serán utilizados en el método de la presente invención son general y aproximadamente de 6-22 aminoácidos de longitud, y en algunas formas de realización, entre aproximadamente 9 y 20 aminoácidos y comprenden una secuencia de aminoácidos derivada de una proteína de interés, por ejemplo, la proteína humana WT1 (No de acceso GenBank. P19544) o un análogo de la misma.

[00129] Los péptidos adecuados para su uso en la generación de anticuerpos de acuerdo con el método de la presente invención se pueden determinar sobre la base de la presencia de fragmentos de unión de HLA-A*0201 y de los sitios de escisión para proteasomas e inmuno-proteasomas utilizando modelos de predicción de ordenador conocidos por las personas medianamente versadas en el arte. Para la predicción de los sitios de unión del CMH de clase I, estos modelos incluyen, pero no se limitan a, ProPred1 (que se describe con más detalle en Singh and Raghava, *ProPred: prediction of HLA-DR binding sites. BIOINFORMATICS* 17(12):1236-1237 2001). y SYFPEITHI (véase Schuler et al. *SYFPEITHI, Database for Searching and T-Cell Epitope Prediction. in Immunoinformatics Methods in Molecular Biology, vol 409(1): 75-93 2007*).

[00130] HLA-A*0201 se expresa en el 39-46% de todos los caucásicos y por lo tanto, representa una elección adecuada de antígeno de CMH para su uso en el presente método. Para la preparación de una forma de realización de un antígeno peptídico WT1, se identificaron las secuencias de aminoácidos y los epítomos putativos de la unión de CD8 + de

las moléculas de HLA-A0201 utilizando el algoritmo de predicción de la base de datos SYFPEITHI (see Schuler et al. *SYFPEITHI, Database for Searching and T-Cell Epitope Prediction*. in *Immunoinformatics Methods in Molecular Biology*, vol 409(1): 75-93 2007).

[00131] Una vez se han identificado los péptidos apropiados, se puede realizar la síntesis de los péptidos de acuerdo con protocolos bien conocidos por las personas medianamente versadas en la técnica. Debido a su tamaño relativamente pequeño, los péptidos de la presente invención pueden ser sintetizados directamente en solución o sobre un soporte sólido de acuerdo con técnicas convencionales de síntesis de péptidos. Varios sintetizadores automáticos están disponibles comercialmente y pueden utilizarse de acuerdo con protocolos conocidos. La síntesis de péptidos en fase de solución se ha convertido en un procedimiento bien establecido para la producción de péptidos sintéticos a gran escala y, como tal, es un método adecuado para la preparación de los péptidos de la presente invención. (Véase, por ejemplo, *Solid Phase Peptide Synthesis* by John Morrow Stewart and Martin et al. *Application of Alkyl-mediated Amidation Reactions to Solution Phase Peptide Synthesis*, Tetrahedron Letters Vol. 39, pages 1517-1520 1998.)

[00132] Cada uno de los péptidos utilizados en los protocolos descritos en este documento fue comprado y sintetizado por Genemed Synthesis, Inc. (San Antonio, TX) usando la química de fluorenilmetoxycarbonilo y la síntesis en fase sólida, y se purificaron mediante cromatografía líquida de alta presión. La calidad de los péptidos se evaluó mediante análisis de cromatografía líquida de alto rendimiento, y el peso molecular esperado se observó mediante espectrometría de masas asistida por matriz de desorción láser. Los péptidos eran estériles y entre un 70% y 90% puros. Los péptidos se disolvieron en DMSO y se diluyeron en PBS (pH 7,4) o solución salina a 5 mg/ml y se almacenaron a -80 °C.

[00133] Con posterioridad a la selección de los péptidos, se prueba la actividad de unión de los péptidos seleccionados utilizando la línea celular T2 de procesamiento de antígenos-deficiente, lo que aumenta la expresión de HLA-A cuando se estabiliza por un péptido en la ranura de presentación de antígenos. Brevemente, las células T2 se pulsaron con el péptido durante un tiempo suficiente para inducir la expresión de HLA-A. La expresión de HLA-A en las células T2 se mide entonces mediante inmunotinción con un anticuerpo monoclonal marcado con fluorescencia específico para HLA-A (por ejemplo, BB7.2) y mediante una citometría de flujo. El índice de fluorescencia (FI) se calcula como la intensidad media de la fluorescencia (IMF) de HLA-A0201 en las células T2 como se determina por análisis de

clasificación de células activadas por fluorescencia, usando la fórmula $FI = (IMF \text{ [células T2con péptido]} / IMF \text{ [T2 células sin péptido]}) - 1$.

[00134] Los receptor de células T totalmente humano (TCR), como los anticuerpos de la proteína del oncogén del tumor de Wilms (WT1) se produjeron usando el método descrito en este documento. Los anticuerpos anti-WT1 similares a TCR generados mediante la tecnología de presentación en fagos son específicos para un complejo péptido WT1 /HLA similar a la que inducen las células T CD8 citotóxicas restringidas por HLA.

[00135] La secuencia de la proteína WT1 se cribó mediante el algoritmo SYFPEITHI y los péptidos WT1 (por ejemplo, los péptidos designados 428, 328, y 122) fueron identificados como que habían predicho la alta afinidad de unión a múltiples moléculas de HLA que están altamente expresados en la población caucásica. El péptido 428 se extiende por los aminoácidos 428 a 459 de WT1, el péptido 328 se extiende por los aminoácidos 328 a 349 de WT1, y el péptido 122 se extiende por los aminoácidos 122-140 de WT1 (véase la Figura 1).

[00136] Los péptidos heterocíclicos también pueden ser diseñados mediante sustituciones conservadoras de aminoácidos de los residuos de unión al CMH estimadas para mejorar la afinidad hacia el alelo de clase 1 del CMH, tal como se predijo por el algoritmo de predicción. El péptido WT1 122 comprende en su interior un epítipo conocido CD8⁺ (126-134). En una forma de realización, por lo tanto, se puede utilizar un péptido modificado del péptido que abarca los residuos de aminoácidos 126-134 del WT1 y contiene un aminoácido modificado en dichas posiciones. Los péptidos utilizados para la mutagénesis de alanina del WT1A (RFM a menos que se indique otra cosa) fueron nombrados en base a la posición en la que se hizo la sustitución. Ejemplos de WT1 péptidos que pueden ser utilizados se muestran en la Tabla 10 junto con péptidos irrelevantes, RHAMM-R3 y EW.

Tabla 10

WT1A (RMF)	RMFPNAPYL	SEC ID N °: 1
WT1A1-B	AMFPNAPYL	SEC ID N °: 110
WT1A-3	RMAPNAPYL	SEC ID N °: 111
WT1A-4	RMFANAPYL	SEC ID N °: 112
WT1A-5	RMFPAAPYL	SEC ID N °: 113

WT1A-7	RMFPNAAYL	SEC ID N °:. 114
WT1A-8	RMFPNAPAL	SEC ID N °:. 115
RHAMM-R3	ILSLELMKL	SEC ID N °:. 116
EW	QLQNPSYDK	SEC ID N °:. 117
RSDELVRHHNMHQ RNMTKL		SEC ID N °:. 118
PGCNKRYFKLSHLQMHSRKHTG		SEC ID N °:. 119
SGQARMFPNAPYLPSCLES		SEC ID N °:. 120
SGQAYMFPNAPYLPSCLES		SEC ID N °:. 121

[00137] Una vez que un péptido adecuado ha sido identificado, el antígeno diana para ser utilizado en la selección de la biblioteca de visualización de fagos, que es, un complejo péptido/HLA (por ejemplo, péptido WT1/HLA-A0201) se prepara mediante la unión del péptido y del antígeno de histocompatibilidad que juntos en solución pueden formar al complejo.

Selección de un scFv de alta afinidad contra un péptido WT1

[00138] El siguiente paso es la selección de un fagos que se une con alta afinidad al antígeno diana de interés, a partir del fago en una biblioteca de presentación en fagos humana, que no se une o bien que no se unen con baja afinidad. Esto se logra mediante una unión interactiva del fago al antígeno, que está unido a un soporte sólido, por ejemplo, perlas o células de mamífero seguido por la retirada del fago no unido y de la elución específicamente del fago unido. En una forma de realización, los antígenos están biotinilados primero para la inmovilización de, por ejemplo, “Dynabeads” M-280 conjugadas con estreptavidina. La biblioteca de fagos se incuba con las células, perlas u otro soporte sólido y el fago que no se unió se elimina mediante lavado. Los clones que se unen son seleccionados y evaluados.

[00139] Una vez seleccionados, se ensayaron los clones scFv positivos para determinar su unión a los complejos de HLA-A2/péptido en la superficie celular T2 en vivo mediante una citometría de flujo indirecta. Brevemente, los clones de los fagos se incubaron con células T2 que han sido pulsadas con péptido WT1 A, o un péptido irrelevante (de control). Las células

se lavan y luego son cubiertas con un mAb de proteína de ratón anti-M13. Las células se lavaron de nuevo y se marcaron con un FITC de cabra (Fab)₂ anti-Ig de ratón antes de la citometría de flujo.

[00140] En otras formas de realización, los anticuerpos anti-WT1/A pueden comprender una o más sustituciones de aminoácidos de la región marco diseñado para mejorar la estabilidad de la proteína, la unión de los anticuerpos, los niveles de expresión o para introducir un sitio para la conjugación de agentes terapéuticos. Estos scFv se utilizan entonces para producir una Ig monoclonal recombinante humana de acuerdo con los métodos conocidos por las personas medianamente versadas en la técnica.

[00141] En los métodos para la reducción de la proliferación de las células de leucemia también se incluye, los que comprenden células de leucemia en contacto con un anticuerpo WT1 de la presente invención. En un aspecto relacionado, los anticuerpos de la presente invención pueden utilizarse para la prevención o tratamiento de la leucemia. La administración de anticuerpos terapéuticos es una terapia conocida en la técnica.

Conjugados de anticuerpos con agentes anticancerígenos

[00142] Los anticuerpos monoclonales representan el vehículo preferido para el suministro dirigido de agentes bioactivos a sitios con cáncer, incluyendo anticuerpos basados en entrega de citotóxicos, radionucleidos o citoquinas inmunomoduladoras. Los conjugados de los anticuerpos de la presente invención con agentes terapéuticos, incluyendo, sin limitación, a fármacos (tales como calecheamicina, aureostatina, doxorubicina), o toxinas (tales como ricina, difteria, gelonina) o radioisótopos que emiten partículas alfa o beta (tal como, ⁹⁰Y, ¹³¹I, ²²⁵Ac, ²¹³Bi, ²²³Ra y ²²⁷Th), péptidos inflamatorios (tales como IL-2, TNF, IFN- γ) están abarcados por la presente invención.

[00143] *Composiciones farmacéuticas y métodos de tratamiento*

[00144] Los anticuerpos WT1 de la presente invención se pueden administrar para tratamientos terapéuticos a un paciente que sufre de una condición patológica de tumor o asociado a WT1 en una cantidad suficiente para prevenir, inhibir, o reducir la progresión del tumor o afección patológica. La progresión incluye, por ejemplo, el crecimiento, invasión,

metástasis y / o recurrencia del tumor o afección patológica. Las cantidades eficaces para este uso dependerán de la gravedad de la enfermedad y del estado general del propio sistema inmune del paciente. Los programas de dosificación también variarán con el estado de la enfermedad y el estado del paciente, y variarán típicamente de una dosis única en bolo o infusión continua a múltiples administraciones al día (por ejemplo, cada 4-6 horas), o según lo indicado por el médico tratante y la condición del paciente.

[00145] La identificación de las condiciones médicas tratables por los anticuerpos WT1 de la presente invención está bien dentro de la capacidad y conocimiento de un experto en la técnica. Por ejemplo, los individuos humanos que, o bien están sufriendo de una enfermedad leucémica clínicamente significativa o que están en riesgo de desarrollar síntomas clínicamente significativos son adecuados para la administración de los presentes anticuerpos WT1. Un médico experto en la técnica puede determinar fácilmente, por ejemplo, por el uso de pruebas clínicas, examen físico e historial médico/familiar, si un individuo es un candidato para dicho tratamiento.

[00146] Ejemplos no limitativos de condiciones patológicas caracterizadas por la expresión de WT1 incluyen a la leucemia mieloide crónica, la leucemia linfoblástica aguda (LLA), leucemia mieloide / mielógena aguda (AML) y el síndrome mielodisplásico (MDS). Además, los tumores sólidos, en general y, en particular, los tumores asociados con mesotelioma, cáncer de ovario, cáncer gastrointestinal, cáncer de mama, cáncer de próstata y el glioblastoma son susceptibles de tratamiento utilizando anticuerpos WT1.

[00147] En otra forma de realización, la presente invención proporciona por lo tanto, un método de tratamiento de una condición médica mediante la administración de un anticuerpo WT1 de la presente invención en combinación con uno o más agentes. Por ejemplo, una realización de la presente invención proporciona un método de tratamiento de una condición médica mediante la administración de un anticuerpo WT1 de la presente invención con un agente antineoplásico o antiangiogénico. El anticuerpo WT1 puede estar ligado químicamente o biosintéticamente a uno o más de los agentes antineoplásicos o antiangiogénicos.

[00148] Se puede usar cualquier método o vía adecuada para administrar un anticuerpo WT1 de la presente invención, y opcionalmente, coadministrar agentes antineoplásicos y/o antagonistas de otros receptores. Las vías de administración incluyen, por ejemplo, la

administración oral, intravenosa, intraperitoneal, subcutánea, o intramuscular. Cabe destacar, sin embargo, que la presente invención no se limita a ningún método o vía de administración particular.

[00149] Se observa que un anticuerpo WT1 de la presente invención puede ser administrado como un conjugado, que se une específicamente al receptor y entrega una, carga útil letal seguida de una internalización tóxica ligando-toxina.

[00150] Se entiende que los anticuerpos WT1 de la presente invención se pueden administrar en la forma de una composición que además comprende un vehículo farmacéuticamente aceptable. Los vehículos farmacéuticamente aceptables adecuados incluyen, por ejemplo, uno o más entre agua, solución salina, solución salina tamponada con fosfato, dextrosa, glicerol, etanol y similares, así como combinaciones de los mismos. Los vehículos farmacéuticamente aceptables pueden comprender además cantidades menores de sustancias auxiliares tales como agentes humectantes o emulsionantes, conservantes o tampones, que potencian la vida útil o la eficacia de las proteínas de unión. Las composiciones de la inyección pueden, como es bien conocido en la técnica, formularse de forma que proporcionen una liberación rápida, sostenida o retardada del ingrediente activo después de la administración al mamífero.

[00151] Otros aspectos de la presente invención incluyen, sin limitación, el uso de anticuerpos y ácidos nucleicos que los codifican para el tratamiento de la enfermedad asociada con WT1, para aplicaciones de diagnóstico y pronóstico, así como el uso como herramientas de investigación para la detección de WT1 en células y tejidos. Las composiciones farmacéuticas que comprenden los anticuerpos y ácidos nucleicos descritos están abarcadas por la presente invención. Los vectores que comprenden los ácidos nucleicos de la presente invención para el tratamiento basado en anticuerpos por la inmunoterapia vectorizada también se contemplan en la presente invención. Los vectores incluyen vectores de expresión que permiten la expresión y secreción de anticuerpos, así como los vectores que se dirigen a la expresión en la superficie celular de las proteínas de unión a antígeno, tales como receptores quiméricos de antígenos.

[00152] Las células que comprenden los ácidos nucleicos, por ejemplo, las células que han sido transfectadas con los vectores de la presente invención están también abarcados en la divulgación.

[00153] Para uso en aplicaciones de diagnóstico y de investigación, se proporcionan también kits que contienen un anticuerpo WT1 o ácidos nucleicos de la presente invención, los reactivos de ensayo, tampones, y similares.

[00154] El método de la presente invención se describirá ahora en más detalle con respecto a las modalidades representativas.

Materiales

[00155] *Muestras de células, líneas celulares y anticuerpos.* Después del consentimiento informado en la Junta de Revisión de Memorial del Sloan-Kettering Cancer Institutional Center y de la aprobación de los protocolos, las células mononucleares de la sangre periférica (PBMC) de donantes sanos son HLA-mecanografiadas y se obtuvieron las células de los pacientes por centrifugación de densidad de Ficoll. Las fuentes para la obtención de las líneas celulares de mesotelioma humanos se han descrito previamente (29). Las líneas celulares incluyen: H-Meso1A, JMN, VAMT, H2452, H2373, H28, MSTO, Meso 11, Meso 34, Meso 37, Meso 47 y Meso 56. Todas las células fueron HLA mecanografiadas por el Departamento de Inmunología Celular del Sloan-Kettering Cancer Institutional Center. Las líneas celulares de leucemia LAMA81, BV173 y 697, (WT1 +, A0201 +) fueron amablemente proporcionadas por el doctor HJ Stauss (University College London, Londres, Reino Unido). La línea de células de melanoma MEWO (WT1-, A201 +), SKLY16 (linfoma de células B.; WT1, A0201 +); K562, RwLeu4, y HL60, todas las leucemias WT1+, y una línea celular T2 deficiente de TAP- se obtuvieron de la American Type Culture Collection. Las líneas celulares se cultivaron en medio RPMI 1640 suplementado con 5% de FCS, penicilina, estreptomycin, 2 mmol/L de glutamina, y 2-mercaptoetanol a 37 °C y CO₂ al 5%.

[00156] El anticuerpo monoclonal humano contra HLA-A2 (clon BB7.2) conjugado con FITC o APC, y su control de isotipo de ratón IgG2b/FITC o APC, para CD3, CD19, CD56, CD33, CD34 humanos o de ratón, (BD Biosciences, San Diego), el F(ab)₂ de cabra anti-IgG humana conjugado con PE o FITC y el F(ab)₂ de cabra anti Ig de ratón conjugado con fluorescencia (Invitrogen, Ciudad) fueron adquiridos. El mAb de ratón para HLA-clase I (W6/32) se obtuvo del anticuerpo monoclonal de centro facilitado del MSKCC.

[00157] *Péptidos.* Todos los péptidos fueron adquiridos y sintetizados por Genemed Synthesis, Inc. (San Antonio, TX). Los péptidos fueron puros en un porcentaje mayor al 90% (Tabla 1.) Los péptidos se disolvieron en DMSO y se diluyeron en solución salina a 5 mg/ml

y se congelaron a -180°C. Los complejos de péptido WT1 biotinilado de una sola cadena /HLA-A0201 y RHAMM-3/HLA-A0201 fueron sintetizados para replegar los péptidos recombinantes con HLA-A2 y microglobulinabeta2 (β 2M) facilitado en el tetrámero en el MSKCC.

[00158] *Animales.* Se adquirieron ratones NOD.Cg-Prkdc scid IL2rgtm1Wjl/SzJ De ocho a 10 semanas de edad, conocidos como ratones NOD scid gamma (GSN), al Jackson Laboratory (Bar Harbor, ME) o fueron obtenidos a partir de las instalaciones para la cría de animales del MSKCC.

Métodos

[00159] *Análisis de citometría de flujo.* Para la tinción de la superficie celular, las células fueron incubadas con mAbs apropiados durante 30 minutos en hielo, se lavaron y se incubaron con reactivos de anticuerpos secundarios cuando fue necesario. Los datos de la citometría de flujo se recogieron en un FACS Calibur (Becton Dickinson) y se analizaron con software FlowJo V8.7.1 y 9.4.8.

[00160] *Selección y caracterización del scFv específico para los complejos del péptido WT1/HLA-A0201.* Una biblioteca de presentación en fagos de anticuerpos scFv humana se utilizó para la selección de clones de los mAb. Con el fin de reducir el cambio conformacional del complejo CMH1 se introduce mediante la inmovilización sobre superficies de plástico, se utilizó un método de paneo de solución en lugar de la placa convencional de paneo. En resumen, los antígenos biotinilados fueron mezclados primero con la biblioteca de fagos scFv humanos, entonces los complejos antígeno-anticuerpo scFv se precipitaron por “Dynabeads” conjugadas con estreptavidina M-280 a través de una rejilla magnética. Los clones unidos se eluyeron a continuación y se utilizaron para infectar E. coli XL1-Azul. Los clones del fago scFv expresados en las bacterias se purificaron (35, 36). Se realizó un paneo durante 3-4 ciclos para enriquecer a los clones de los scFv de fagos que se unen específicamente al complejo HLA-A0201/WT1. Los clones positivos se determinaron por el método de ELISA estándar contra la cadena los complejos de HLA-A0201/WT1 de péptidos individuales biotinilados. Los clones positivos fueron probados adicionalmente para medir su unión a los complejos HLA-A2/péptido en las superficies de células vivas mediante una citometría de flujo, utilizando una línea celular T2 deficiente en TAP HLA-A0201+. Las células T2 fueron pulsadas con péptidos (50ug/ml) en medio RPMI 1640 libre de suero, en

presencia de β 2 M ON 20 mg/ml. Las células se lavaron, y la tinción se llevó a cabo mediante los siguientes pasos.

[00161] Las células se tiñeron primero con clones de fagospurificados de scFv, y seguido de esto se realizó una tinción con un mAb de ratón anti-M13, y, finalmente, el conjugado de F(ab)2 de cabra anti- Ig de ratón con FITC. Cada paso de la tinción se llevó a cabo entre 30 - 60 minutos en hielo y las células se lavaron dos veces entre cada paso de la tinción.

[00162] *Ingeniería de Ab de longitud completa usando los fragmentos seleccionados de scFv.* La IgG1 humana de longitud completa de los clones de fagos seleccionados fueron producidos en células HEK293 y en líneas celulares de ovario de hámster chino (CHO), tal como se describe (37). En resumen, las regiones variables del anticuerpo se subclonaron en vectores de expresión de mamíferos, que se combina con regiones humanas constantes lambda o kappa de la cadena ligera y las secuencias de regiones constantes de la IgG1 humana. El peso molecular de los anticuerpos IgG de longitud completa purificada se midió en condiciones tanto reductoras como no reductoras mediante electroforesis.

[00163] *Receptores de antígenos quiméricos de ingeniería y células efectoras inmunes.* Los ácidos nucleicos que codifican a los anticuerpos y a las proteínas de unión al antígeno identificados en este documento se pueden utilizar en de células efectoras inmunes recombinantes obtenidas mediante ingeniería. Los métodos y los vectores para generar alas células T genéticamente modificadas, por ejemplo, son conocidos en la técnica (véase Brentjens et al., *Safety and persistence of adoptively transferred autologous CD19-targeted T cells in patients with relapsed or chemotherapy refractory B-cell leukemias* in Blood 118(18):4817-4828, , noviembre de 2011).

[00164] *Caracterización de la IgG1 humana de longitud completa para el complejo WT1p/A2.* Inicialmente, las especificidades de los anticuerpos monoclonales totalmente humanos IgG1 para el complejo del péptido WT1/A2 se determinaron mediante la tinción de las células T2 sometidas a pulsos con o sin péptidos de control RMF o RHAMM-R3, seguidos anticuerpos monoclonales F(ab)2 de cabra anti- IgG humana secundarios conjugados con PE o FITC. La intensidad de la fluorescencia se midió mediante citometría de flujo. Se utilizó el mismo método para determinar la unión de los mAb a las células tumorales frescas y a las líneas celulares.

[00165] *Radioinmunoanálisis.* El Ab1 WT1 se marcó con 125-I (PerkinElmer) usando el método de la cloramina-T (38). se hizo reaccionar 100 microgramos de anticuerpo con 1mCi 125-I y 20 microgramos de cloramina-T, se inactivó con 200µg de metabisulfito de Na, luego se separa del 125-I libre utilizando una columna 10DG (company) equilibrada con 2% de suero de albúmina bovina en PBS. Las actividades específicas de los productos estaban en el rango de 7-8 mCi / mg.

[00166] Líneas celulares Hematopoyéticas, líneas celulares adherentes (cosechadas con un separador de células no enzimático (nombre)), las PBMC de donantes normales y pacientes de AML se obtuvieron como se ha descrito. Las células se lavaron una vez con PBS y se volvieron a suspender en suero humano al 2% en PBS a 10⁷ células/ml en 0⁰. Las células (106 tubos por duplicado) se incubaron con 125-I marcado con AB1 WT1 (1µg/mL) durante 45 minutos en hielo, después se lavaron extensivamente con albúmina sérica bovina al 1% en PBS a 0⁰. Para determinar la unión específica, se ensayó un conjunto duplicado de células después de la pre-incubación en la presencia de un exceso de 50 veces de AB1 WT1 sin marcar durante 20 minutos en hielo. La radioactividad de la unión se midió mediante un contador gamma, la unión específica se determinó, y el número de anticuerpos unidos por célula se calculó a partir de la actividad específica.

[00167] *Citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC).* Las células diana fueron utilizadas para la ADCC, donde las células T2 pulsadas con o sin péptidos WT1 o RHAAM-3, y las líneas de células tumorales sin un péptido pulsante. Se incubaron el AB1 WT1 o su control de isotipo de IgG1 humana en diversas concentraciones con las células diana y con los PBMCs frescos en diferentes relaciones efector: diana (E: T) durante 16 hrs. El sobrenadante se cosechó y la citotoxicidad se midió mediante un ensayo de liberación de LDH utilizando un kit no radioreactivo Cytotox 96 de Promega después de su instrucción. La citotoxicidad se mide también mediante un estándar de 4 horas de ensayo de liberación de 51Cr

[00168] *Transducción y selección de células positivas de luciferasa / GFP.* Las Células BV173 y JMN eran modificadas mediante ingeniería genética para expresar un alto nivel de la proteína de fusión GFP-luciferasa, utilizando vectores lentivirales que contienen un plásmido que codifica a la luc / GFP (39). Utilizando la clonación de células individuales, sólo las células que muestran la expresión de GFP en un alto nivel fueron seleccionadas

mediante un análisis de citometría de flujo y se mantuvieron y utilizaron para el estudio de los animales.

[00169] *Ensayos terapéuticos del AB1 WT1 en un modelo de xenoinjerto de leucemia humana NSG.* Dos millones de células de leucemia humana BV173 se inyectaron IV en ratones NSG. En el día 5, el injerto del tumor fue confirmado mediante imágenes de luciferasa de luciéARNga en todos los ratones que habían de ser tratados; los ratones fueron divididos al azar en diferentes grupos de tratamiento. En el día 6 y el día 10, el mAb AB1 WT1 o el mAb de control de isotipo fueron inyectados IV. En los animales que también recibieron células efectoras humanas con o sin mAb, las células (CD34 y CD3-agotado PBMCs humanos de donantes sanos) fueron inyectados IV en ratones (107 células/ratón) 4 h antes de la inyección del mAb. El crecimiento del tumor se evaluó por la formación de las imágenes de luminiscencia de una vez a dos veces por semana, y se evaluó la actividad clínica diaria.

[00170] *Selección y caracterización de scFv específicos para los complejos péptido WT1/HLA-A0201.* La selección de un scFv específico de WT1 se consigue utilizando un péptido derivado de WT1 9-mer que comprende los aminoácidos 126-134 (RMFPNAPYL, SEC ID N°:1) de WT1. Este péptido ha demostrado que al ser procesado y presentado por HLA-A0201 puede inducir Células T CD8⁺ citotóxicas que son capaces de matar a las células tumorales positivas para WT1.

[00171] Los datos representativos de un paciente con LMA después de 6 vacunas con un péptido MGR WT1 se muestran en la Figura 2 como evidencia de que los péptidos de WT1 son inmunogénicos en los seres humanos. Las Células T CD3 fueron estimuladas con péptidos WT1-A (aminoácidos 126-134) y la citotoxicidad se midió utilizando un ensayo de liberación de ⁵¹Cr estándar contra líneas celulares 697 (A0201 + WT1 +) o Skly-16 (WT1-A0201 +). Las células Skly-16 pulsadas con péptido WT1-A o EW irrelevante se utilizaron como controles positivos y negativos para la especificidad de la matanza. Las relaciones efector: diana (E: T) se indican en el eje-X. Los datos demuestran que las células T mataron a las células WT1 + tumorales de una manera restringido por HLA-A0201.

[00172] Las bibliotecas de presentación en fagos están bien establecidas y los métodos de detección son conocidos por las personas medianamente versadas en la técnica y se utilizan para seleccionar fragmentos scFv altamente específicos para un complejo de péptido WT1-A

/HLA-A2. En una forma de realización, un anticuerpo scFv de una biblioteca de presentación de fagos humanos (7×10^{10} clones) se utilizó para la selección de clones de mAb. Con el fin de reducir el cambio conformacional del complejo CMH1 introducido mediante la inmovilización sobre superficies de plástico, se utiliza un método paneo de solución en lugar de la placa convencional de paneo. En resumen, los antígenos biotinilados fueron mezclados primero con la biblioteca de fagos scFv humano, entonces los complejos antígeno-anticuerpo scFv fagos fueron precipitados mediante "Dynabeads2 conjugados con estreptavidina M-280 a través de una rejilla magnética.

[00173] Los clones unidos se eluyen a continuación y se utilizan para infectar E. coli XL1-azul. Los clones expresados del fago scFv en las bacterias se purificaron (35, 36). se realizó un paneo durante 3-4 ciclos para enriquecer a los clones scFv de los fagos que se unen al complejo HLA-A0201/péptido WT1 específicamente. Los clones positivos fueron determinados por el método de ELISA estándar contra la cadena de complejos HLA-A0201/WT1 de péptidos individuales biotinilados (Figura 3). Los clones positivos fueron probados en su unión a complejos HLA-A2/péptido en las superficies de células vivas mediante citometría de flujo, utilizando una, línea celular deficiente en TAP HLA-A0201 +, T2. Las células T2 se pulsaron con péptidos (50µg/ml) en suero libre de medio RPMI 1640, en presencia de 20µg/ml de $\beta 2$ M durante la noche. Las células se lavaron, y la tinción se realizó como se indica a continuación.

[00174] Las células se tiñeron primero con clones purificados de fago scFv, seguido de un tinción con un mAb de ratón anti-M13, y finalmente, unF(ab)2 de cabra anti-Ig de ratón conjugado con FITC. Cada paso de la tinción se llevó a cabo durante 30-60 minutos en hielo. Las células se lavaron dos veces entre cada etapa de la tinción. Los resultados se muestran en la Figura 4. El clon del fago de AB1 WT1 demostró unirse a células T2 pulsadas con sólo un péptido WT1-(RMFPNAPYL: en lo sucesivo abreviado como RMF), pero no a las células solas T2, o a las células T2 pulsadas con péptido de control EW, o con péptido heterocíclico WT1.

[00175] La afinidad de unión de la IgG1 de longitud completa de AB1 WT1 al complejo péptido/A0201 se ensayó por titulación de AB1 WT1 bajo las concentraciones indicadas. Las células T2 se pulsaron con 50 mg/ml o 10µg/ml, seguido de un F (ab) secundario de cabra anti- IgG humana/PE. Los resultados se muestran en la Figura 5.

[00176] La figura 6 muestra la densidad del complejo péptido/HLA-A0201 reconocido por el WT1 ab. Las células T2 se pulsaron durante la noche (ON) con RMF (panel superior) o con péptidos RHAMM-R3 (panel inferior) bajo las concentraciones indicadas, y se analizó la unión de Ab1 WT1, Ab3 WT1 y Ab5 WT1 a una concentración de 1 µg/ml mediante una citometría de flujo.

Tabla 11: Resumen del paneo de los fagos de WT1/A2

<i>Bibliotecas de Fagos</i>	<i>Rondas de paneo</i>	<i>Número de clon individual analizado</i>	<i>Tasa de solución positiva de ELISA</i>	<i>Número de clones únicos</i>
<i>scFv-spleen A</i>	4	72	41/96	13
<i>scFv-spleen B</i>	4	47	3/47	2
<i>scFv-spleen C</i>	3	58	0/58	0
<i>scFv-PBMC A</i>	4	68	34/68	10
<i>scFv-PBMC B</i>	3	90	19/90	7
<i>Fab-spleen A</i>	4	12	2/12	0
<i>Fab-spleen B</i>	4	36	0/36	0
<i>Fab-spleen C</i>	4	24	2/24	1
<i>Fab-spleen C</i>	3	72	38/72	5
<i>Fab-spleen D</i>	4	72	4/72	1
<i>Fab-spleen D</i>	4	72	4/72	3

[00177] Se ensayaron los clones positivos de scFv para determinar su unión a los complejos HLA-A2/péptido en la superficie celular mediante una citometría de flujo indirecta en vivo en: (i) En células T2 TAPA0201⁺ deficientes de HLA pulsadas con péptido WT1 o con un

péptido irrelevante, (ii) líneas celulares WT1⁺ HLAA0201⁺ tales como BV173, U266 y un control WTI-HLA-A0201⁺, línea celular SKLY-16 o línea celular WT1⁺ HLA-A0201⁻, K562, sin ser pulsada con el péptido. Este último determina el reconocimiento y la afinidad de unión del scFv al complejo WT1p/A2 procesado naturalmente en las células tumorales.

[00178] Fueron seleccionados un total de 28 clones de fagos por su capacidad para producir mAb específicos para el complejo WTI- péptido/A2. El reconocimiento del complejo WT1p/A2 en células vivas fue medido por la unión del fago de scFv a células T2 pulsadas con el péptido WTI-A y los otros péptidos HLA-A2 de unión (50 µg/ml). Estos incluyen: solamente células T2, células T2 pulsadas con péptido WTI-A; células T2 pulsadas con péptido WT1 heterocíclico-A1; células T2 pulsadas con péptido EW irrelevante (HLA-A0201 de unión de péptido 9-mer, derivado del sarcoma de Ewing), o RHAMM-R3 (Figura 4).

Tabla 12

Clon #	Positivo para unirse a Tot2 pulsadas con WT1A	Seleccionado para la construcción de unaIgG1 de longitud completa
1	+	
2	+	
3	+	+
4	+	
5	+	+
6	+	
7		
8	+	
9		
10		
11		
12		
13	+	+

14		
15	+	+
16		
17	+	
18	+	+
19	+	
20	+	
21		
22	+	
23	+	+
24-28		

Ingeniería de los mAb de longitud completa usando los fragmentos seleccionados de scFv.

[00179] La tecnología de presentación en fagos permite la rápida selección y producción de scFv específicas de antígeno y de fragmentos Fab, que son útiles dentro y fuera de sí mismos, o que pueden desarrollarse más para proporcionar anticuerpos completos, proteínas de unión a antígeno o fragmentos de unión a antígeno de los mismos. Los mAbs completos con dominios Fc tienen un número de ventajas sobre los anticuerpos scFv y Fab. En primer lugar, sólo Abs ejercen la función inmunológica, tales como CDC y ADCC mediados a través del dominio Fc. En segundo lugar, los mAb bivalentes ofrecen una afinidad de unión al antígeno más fuerte que el monómero Fab o Abs. En tercer lugar, la vida media y el aclaramiento renal de plasma será diferente con los Fab y con los mAb bivalentes. Las características y ventajas particulares de cada uno pueden ser adaptados a la estrategia planificada del efector. En cuarto lugar, los mAb bivalentes puede ser internalizados a diferentes velocidades de scFv y que los Fab, alterando a la función inmune o a la función del portador. Los emisores alfa, por ejemplo, no necesitan ser internalizado para matar a los objetivos, pero muchos fármacos y toxinas se beneficiarán de la internalización del complejo inmune. En una forma de realización, por lo tanto, una vez que los clones scFv específicos para WT1p/A2 fueron obtenidos a partir de bibliotecas de presentación de fagos, un mAb de IgG de longitud completa fue producido usando los fragmentos scFv.

[00180] Para producir una IgG monoclonal humana recombinante en células de ovario de hámster chino (CHO), se diseñó un mAb IgG de longitud completa basado en un método conocido por las personas medianamente versadas en la técnica (Tomomatsu et al., Production of human monoclonal antibodies against FceRIa by a method combining *in vitro* immunization with phage display. Biosci Biotechnol Biochem 73(7): 1465-1469 2009). En resumen, las regiones variables del anticuerpo se subclonaron en vectores de expresión en mamíferos (Figura 7), con la coincidencia de que las regiones lambda o kappa constantes de la cadena ligera corresponden a las secuencias de la subclase Fc de la IgG1 (por ejemplo, véase la Tabla 9) (33,34). Los anticuerpos purificados de longitud completa de IgG mostraron un peso molecular esperado bajo condiciones tanto reductoras como no reductoras (Figura 8). El análisis de la unión cinética (35) confirmó la unión específica de la IgG de longitud completa a WT1/A2, con una KD en el rango nanomolar (Figuras 9 y 10.)

Ejemplo 1

Selección de un scFv específico para el complejo WT1p/A2 usando una biblioteca de presentación de fagos completamente humanos.

[00181] La presentación en fagos contra el complejo HLA-A0201/ péptido WT1 se realizó para las rondas de paneo 3-4 con el fin de enriquecer los clones de los fagos scFv que se unen específicamente al complejo HLA-A0201/ péptido WT1. Los clones individuales scFv de los fagos positivos para el complejo de WT1 péptido/A2 se determinaron mediante ELISA y los clones que poseían secuencias únicas de codificación de ADN fueron sometidos a una caracterización adicional. Para probar si el scFv se unía al complejo WT1p/A2 en células vivas, los clones de los fagos positivos se ensayaron en la unión a una línea celular T2 HLA-A0201-positiva TAP deficiente. Las células T2 sólo pueden presentar péptidos exógenos y por lo tanto han sido ampliamente utilizados para la detección de epítomos específicos presentados por las moléculas de HLA-A2. Se rastreó un total de 35 clones de fago en células T2 y 15 clones mostraron una unión específica a las células T2 pulsadas sólo con péptido WT1 RMF, pero no a las células T2 solas o pulsadas con péptido de control RHAMM-3 (Figura 4). Los clones scFv de fago eran incapaces de unirse a varias líneas de células tumorales que son WT1-y HLA-A2 positivas lo que sugiere la afinidad del scFv era débil, en comparación con el mAb de longitud completa bivalente.

Ejemplo 2

Generación de una IgG1 humana de longitud completa.

[00182] La función inmunológica, tal como CDC y ADCC depende del dominio Fc de la IgG bivalente. Además, los mAb bivalentes ofrecen avidez de unión al antígeno más fuerte que el scFv monomérico Abs. Por lo tanto, fueron seleccionados 6 clones del fago ScFv entre 15 clones de fagos positivos para producir la IgG1 monoclonal humano de longitud completa en células HEK293 y células de ovario de hámster chino (CHO). En resumen, las regiones variables de los mAbs fueron sub-clonadas en vectores de expresión de mamíferos donde las regiones lambda o kappa humana eran constantes de cadena ligera y correspondían con las secuencias de la región constante de la IgG1 humanas. Los anticuerpos purificados de longitud completa de IgG mostraron un peso molecular esperado bajo condiciones tanto reductoras como no reductoras (Figura 8). Cinco clones fueron diseñados con éxito en la IgG1 humana.

Ejemplo 3**Especificidad y avidez de unión del mAb IgG1***Unión a líneas celulares humanas.*

Las células T2 pulsadas con o sin péptidos MMR o RHAMM-3 fueron utilizadas inicialmente para determinar la especificidad de unión del mAb. Tres de cinco IgG1 humanas, incluyendo WT1 Ab1, mostraron unión específica a las células T2 que se pulsaron sólo con péptido WT1, pero no a las células T2 solas o T2 pulsadas un con péptido de control RHAMM-R3. La avidez de unión del mAb se incrementó sustancialmente (50 a 100 veces), en comparación con sus parentales clones scFv de fago. Dos mAbs entre los cinco mostraron unión a células T2 solos o pulsadas con el péptido de control RHAMM-R3, aunque la unión se ha mejorado en gran medida mediante un pulso de las células con el péptido RMF. Esto sugiere que estos dos mAb también tenían gran avidez de epítomos de la molécula HLA-A2 solo y por lo tanto, fueron excluidos de análisis adicionales. Esto no fue inesperado, ya que ha sido un problema común para la producción de tales mAb contra complejos de péptido/CMH, dado el predominio de epítomos de la molécula del CMH de clase I dentro de los complejos. También sugiere que la especificidad precisa del mAb para los complejos no podría determinarse fácilmente en la etapa del scFv, debido a la menor afinidad en comparación con el mAb IgG1 bivalente.

[00183] La afinidad de unión de los tres mAb restantes específicos para el complejo WT1p/A2 se investigó primero en células T2 pulsadas con o sin MMR y el péptido de control RHAMM-R3 (50 µg/ml) mediante titulación de los mAbs. El mAb AB1 WT1 mostró la unión más fuerte, hasta una concentración de 0.01µg/ml. El isotipo control de la IgG1 humana no mostró ninguna unión en cualquiera de las concentraciones ensayadas (Figura 5). Además del WT1 Ab1, los otros dos mAb, Ab3 WT1 y AB5 WT1, mostraron una unión específica en un intervalo de <1 µg/ml de las concentraciones de mAb utilizados. El reconocimiento específico del mAb también dependía de la densidad antigénica en la superficie celular. Las células T2 se pulsaron con RMF o péptidos R3 en 50, 25, 12,5, 6,25, 3,13 y 1,6 µg/ml; en la prueba de mAb se usaron los mAb a una concentración de 1µg/ml para el ensayo de unión a T2. AB1 WT1 podría detectar el complejo RMF péptido/A2 en células T2 de una manera dependiente de la concentración a concentraciones tan bajas como 1,6 µg/ml, con una intensidad de fluorescencia significativamente mayor que la de los otros 2 mAb (Figura 6). Estos resultados confirman además que el AB1 WT1 poseía el más alto grado de avidez por el complejo RMFp/A0201.

Ejemplo 4

Mapeo del epítipo.

[00184] Para investigar con más precisión el epítipo de reconocimiento del WT1 Ab1, los péptidos RMF fueron sustituidos en las posiciones 1, 3, 4, 5, 6, 7 y 8 con alanina y se pulsaron sobre células T2 y se ensayaron para la unión a Ab1 WT1. Las posiciones 2 y 9 de la RMF se dejaron intactas, ya que estos son los restos de anclaje para la unión del péptido a la molécula HLA-A0201. A excepción de la posición 1, las sustituciones de alanina en las otras posiciones no afectan en gran medida la unión del Ab1 WT1, en comparación con el péptido nativo RMF (Figura 19). Sin embargo, la sustitución de la posición 1 por cualquier aminoácido distinto de alanina (WT1-A1-B) o tirosina (WT1-A1), abrogó completamente la unión de Ab1 WT1. La pérdida de la unión no era debida a la reducción de la afinidad de unión del péptido a la molécula HLA-A2, ya que ambos péptidos demostraron la unión más fuerte en el ensayo de estabilización T2 utilizando el mAb específico para la molécula HLA-A2, clon BB7 (Figura 20). Estos resultados muestran que la arginina en la posición 1 del péptido RMF es uno de los más cruciales para el reconocimiento del WT1 Ab1. El papel de los residuos en las posiciones # 2 y 9, no puede ser evaluado.

[00185] La siguiente cuestión importante es si el AB1 WT1 era capaz de reconocer al epítipo WT1 RMF procesado naturalmente presentado por las moléculas de HLA-A0201 en la superficie celular. Un panel de líneas celulares se seleccionó sobre la base de la expresión de ARNm de WT1 y se determinó el genotipo HLA (Tabla 12).

Tabla 12

Mesotelioma / tumor sólido	genotipo HLA-A2	ARNm de WT1	AB WT1 vinculante	Relación de BB7.2: Isotipo
JMN	+	+	+	248
Meso 37	+	+	+	68
Meso 47	+ (02xx)	+	+	17
H2452	+	+	+	20
Meso34	+	+	+	37.3
Meso-56	+ (02xx)	+	+	23
H2373	+	+	-	1.6
MSTO	-	+	-	1.4
VAMT	-	3 +	-	NT
Mewo	+	-	-	3
Leucemias y otras líneas de células hematopoyéticas				
BV173	+	++	+	196
BA25	+	?	+	117,5
ALL-3	+	+	+	60
U266	+	+	-	1.8
697	+	5 +	-	4.1

Mesotelioma / tumor sólido	genotipo HLA-A2	ARNm de WT1	AB WT1 vinculante	Relación de BB7.2: Isotipo
LAMA	+	2 +	-	6
Skly-16	+	-	-	1.9
HL-60	-	3 +	-	0.4
K562	-	2 +	-	1.5
T2	+	NT	-	> 20

[00186] Se estimó el nivel de expresión del ARNm de WT1 de acuerdo a un estudio previo (Rena), mediante una PCR-RT cuantitativa.

[00187] Entre las 7 líneas celulares humanas de mesotelioma que son positivas tanto para HLA-A0201 como para WT1 ARNm, ElAB1 WT1 se unió a 6 de las 7 líneas de células, pero no a las células que eran o HLA-A0201 negativo (MSTO y VAMT) o a las células negativas para ARNm de WT1, tal como la línea celular de melanoma, Mewo (Figura 21).

[00188] Del mismo modo, entre las 9 líneas celulares de leucemia ensayadas, El AB1 WT1 se unió a 3 líneas de células BV173 (Figura 22), BA25 y ALL-3, que son positivas tanto para ARNm de WT1 y HLA-A0201, pero no a las líneas celulares HLA-A2-negativos HL60 y K562, que se han demostrado que expresan un alto nivel de transcripciones de WT1 en numerosos estudios.

[00189] Como era de esperar, la intensidad de la unión del AB1 WT1 también parece estar asociada directamente con el nivel de expresión de las moléculas de HLA-A0201, como se muestra en las células del mesotelioma H2373, en las líneas celulares de leucemia y LAMA 697, y en la línea celular de mieloma U266. Aunque estas líneas celulares fueron positivas para ambas transcripciones WT1 y HLA-A2, el nivel de expresión de la HLA-A2 fue bajo (Tabla 12) y el mAb no mostró unión. Por otra parte, los resultados obtenidos con células T2 argumentan en contra de la posibilidad de unión de AB1 WT1 Ab1 a moléculas solas de HLA-A0201 como en células T2 que expresaron un alto nivel de la molécula de HLA-A2. En

particular, AB1 WT1 no se une a células T2 solas o pulsadas con péptidos de unión-A0201-HLA R3 y otros tales como el derivado del sarcoma de Ewing (EW) o el péptido heterocíclico para el péptido RMF, WT1-A1; estos dos péptidos han demostrado tener una mayor afinidad por la molécula HLA-A0201 en ensayo de estabilización de T2 (28). Estos resultados proporcionan fuertes evidencias de que el reconocimiento del AB1 WT1 fue específico para los epítomos mixtos que el péptido RMF y para la molécula A0201 en un complejo. La unión de los otros dos mAb, Ab3 WT1 y AB5 WT1, a las células BV173 y JMN era también más débil que la unión del Ab1WT1.

Ejemplo 5

Cuantificación de los sitios de unión de WT1 en las células.

[00190] Se utilizó un radioinmunoensayo utilizando un AB1 WT1 marcado con ^{125}I para confirmar la especificidad del anticuerpo para las líneas celulares WT1⁺ HLA-A0201⁺, para determinar una constante de afinidad y para evaluar el número de sitios de unión de los anticuerpos por célula en un panel de líneas celulares. El análisis de Scatchard basado en la unión a las células JMN mostró una constante de aversez de alrededor de 0,2 nM (Figura 23). Esta cifra fue confirmada mediante una interferometría mediante un dispositivo Bio Forte. El AB1 WT1 marcado con ^{125}I -se utilizó para confirmar la especificidad del anticuerpo para las líneas celulares WT1⁺ HLA-A0201⁺, y para evaluar el número de sitios de unión de los anticuerpos en un panel de líneas celulares (Figura 24). Porque no podemos determinar si el mAb bivalente es vinculante para 1 o 2 complejos en la superficie, los epítomos totales por célula podrían ser tan alto como el doble del número de los sitios de unión del mAb. Una vez más, el AB1 WT1 se unió a JMN, ALL-3, BA25, BV173, que son positivas tanto para HLA-A0201 y ARNm de WT1, pero no a las células HLA-A0201 negativas (HL60) o células de ARNm de WT1 negativas (Skly-16). El AB1 WT1 no se unió a las células 697, que son ambos HLA-A0201 y WT1 positivas, pero que contienen niveles bajos de HLA-A0201 (Tabla 12), lo que confirma que es necesario un cierto nivel total de complejo CMH para presentar al péptido WT1 suficientemente ante una WT1 de unión a Ab1. Las células T2 pulsadas con RMF se unieron al mayor número de mAb (50.000 por célula), seguido por las células JMN que se unían $\sim 6 \times 10^3$ AB1 WT1 moléculas por célula, la traducción de entre 6×10^3 y 1.2×10^4 de los complejos péptido RMF/A2 por célula suponiendo la unión del anticuerpo monovalente o bivalente, respectivamente. Las tres líneas celulares de leucemia positivas unidas entre 1×10^3 y 2×10^3 a las moléculas de WT1 ab1, o 2×10^3 - 4×10^3 sitios de

unión (Figura 24). Estos resultados se confirmaron mediante una citometría de flujo cuantitativa.

Ejemplo 6

Unión de Ab1 WT1 a muestras de pacientes leucémicos.

[00191] A continuación se investigó si el AB1 WT1 es capaz de detectar al epítipo de RMF en células primarias de AML. El radioinmunoensayo mostró una unión significativa del AB1 WT1 a los blastocitos de las células AML del paciente 1, que es HLA-A2 positivo y WT1 ARNm⁺. El AB1 WT1 se une a las células dobles positivas CD33⁺ y CD34⁺ que dan cuenta de más del 83% de las poblaciones de células enteras (Figura 25). El AB1 WT1 no se unió a las células de otros 3 pacientes que son ya sea HLA-A2 positivo pero ARNm negativo o HLA-A2 negativo. El AB1 WT1 no se unió a PBMCs de HLA-A2 ya sea donantes sanos positivos o negativos. Los resultados fueron confirmados mediante un análisis de citometría de flujo. El AB1 WT1 no mostró unión significativa a las erupciones de los pacientes que eran A0201 negativos (Figura 26). Los resultados fueron consistentes con los resultados obtenidos con la expresión del ARNm de las células. Estos datos confirman que el nivel de RMFp/HLA-A0201 en la superficie de las células de leucemia es adecuado para permitir la reactividad con el AB1 WT1 y que los niveles de WT1 en células sanas negativas no son significativos.

Ejemplo 7

AB1 WT1 media la ADCC en contra las células tumorales

[00192] Se considera que la ADCC es uno de los principales mecanismos efectores de los mAb terapéuticos en los seres humanos. En presencia de PBMC humanas, el AB1 WT1 media la ADCC de PBMC dependiente de la dosis frente a las células T2 cargadas con el péptido RMF, pero no a células T2 solas o células T2 pulsadas con el péptido de control R3 (Figura 27). Es importante destacar que, el AB1 WT1 era capaz de mediar la ADCC contra el epítipo RMF naturalmente presentado por la molécula HLA-A0201 en las células tumorales, tales como las de la línea celular de mesotelioma, JMN (Figura 33), y la línea celular de leucemia BV173 (Figura 34), pero no en células negativas HLA-A2 MSTO (Figura 28) o de HL-60 (Figura 29). La Eliminación de células se observó consistentemente a concentraciones de 1µg/ml o por debajo del AB1 WT1 utilizando a las PBMC como células efectoras

procedentes de múltiples donantes sanos. Es importante destacar que, elAB1 WT1 también mató a blastocitos primarios de las AML A0201-positivas que fueron positivos para la unión de Ab1 WT1, pero no las erupciones que eran HLA-A0201 negativas (Figura 30). Estos resultados demostraron que elAB1 WT1 media la ADCC específica contra las células que expresan de forma natural al RMF y al complejo HLA-A0201 en niveles fisiológicos, así como en líneas celulares.

Ejemplo 8

AB1 WT1 elimina a las células humanas de leucemia en ratones NSG

[00193] Se comprobó la eficacia delAB1 WT1 in vivo en ratones NOD SCID gamma (NSG) transplantados por vía intravenosa 6 días antes con BV173 bcr / leucemia linfoblástica aguda positiva abl. En el momento del tratamiento, los ratones tenían leucemia en el hígado, el bazo, y BM visibles mediante imágenes de luciferasa. Los ratones NSG que carecen de células B maduras, NK y T-, y la hipótesis de que la introducción de las células efectoras humanas (CD3, CD34-, PBMCs) junto con el tratamiento cpn AB1 WT1 recapitularía in vivo los efectos antitumorales como la ADCC mediada observados en in vitro. La inyección de los efectores junto con dos dosis de 100 µg de AB1 WT1 casi inhibe el crecimiento del tumor en comparación con los controles (Figura 31). Este efecto era duradero durante el transcurso del experimento (Figura 32). Curiosamente, al principio de los ensayos, por sí solos o en combinación con el control de IgG las células efectoras aparecieron para promover un crecimiento más rápido de la leucemia con respecto a los ratones inyectados solo con leucemia, lo que demuestra que el efecto antitumoral no tenía relación con los efectores por sí mismos. Varios de los ratones a los que se les administraron efectores (con o sin mAb de control) murieron temprano en el experimento con la infiltración masiva de la BV173.

[00194] Sorprendentemente, el tratamiento con Ab1 WT1sin efectores humanos también reduce drásticamente la carga tumoral, así como el AB1 WT1 combinado con efectores de aproximadamente 30 días (Figura 32), aunque los tumores finalmente recayeron mucho más rápidamente en el grupo que sólo recibió Ab1 WT1, en comparación con AB1 WT1 combinado con el grupo de efectores (Figura 32). Se confirmó el efecto solo del AB1 WT1 de y se valoró la dosis para evaluar la potencia. El AB1 WT1 solo produjo una marcada reducción en la carga tumoral en los puntos de tiempo iniciales en todas las dosis probadas (25-100 µg por veces 2 dosis). Los tumores en todos los grupos de tratamiento disminuyeron

lentamente después de que la terapia con anticuerpos se detuvo, y por el día 23 (13 días después de la última inyección del anticuerpo), se observaba significativamente la recaída de más tumores en el grupo de 25 µg en comparación con el grupo de dosis de 100 µg, lo que indica una dosis -la respuesta a la terapia Ab1 WT1 (Figura 33). Antes del tratamiento, los ratones muestran la mayor carga del tumor en el hígado, que fue expulsado rápidamente por el WT1 Ab1. Después de la recaída, el tumor en el grupo de dosis más alta de desarrollar apareció principalmente en la médula ósea, mientras que del tumor volvió más rápidamente en el hígado en los ratones tratados con la dosis más baja.

Ejemplo 9

Anticuerpos obtenidos mediante ingeniería para mejorar sus capacidades citotóxicos.

[00195] Los anticuerpos biespecíficos se construyen para reconocer tanto al complejo WT1/A2 y al CD3 en las células T inmunes como se ha descrito (43,44) con un Fc de IgG1 humana. Se espera que los anticuerpos biespecíficos puedan reclutar y dirigir a las células T citotóxicas hacia las células cancerosas WT1/A2 positivas, mientras que el mantienen las funciones efectoras Fc y tienen una larga vida media in vivo. Tres mecanismos están implicados en la destrucción específica de las células cancerosas mediadas por anticuerpos biespecíficos: i) muerte por las células T activadas, ii) actividad de ADCC, iii) actividad CDC. Se pueden construir otros formatos de anticuerpos biespecíficos, tales moléculas scFv en tándem (taFv), diacuerpos (dB), o diacuerpos de cadena sencilla (SCDB), y proteínas de fusión con albúmina de suero humano (45, 46, 47, 48), pero están desprovistos de funciones efectoras Fc y cuentan con distintos perfiles farmacocinéticos.

[00196] El objetivo de actividad específica-ADCC de WT1/A2 se potencia mediante la expresión de anticuerpos de forma recombinante en células de glicol CHO obtenidas mediante ingeniería- como se describe en las Patentes de EE.UU. 8.025.879; 8.080.415, y 8.084.022. El oligosacárido modificado de N-glicanos en la Asn297 altera las funciones efectoras de la siguiente manera: 1) mayor unión a CD16/FcRIIIa para la mejora de la actividad ADCC mediada por las células asesinas naturales humanos, 2) reducen la afinidad de unión a CD32b/FcRIIb, un inhibidor del receptor expresado en múltiples tipos de células inmunes (excepto las células NK), para la mejora de la actividad ADCC mediada por células efectoras tales como neutrófilos y de la presentación de antígeno por las células DC (50, 51,

52) y los macrófagos. Se espera que los anticuerpos mejorados puedan lograr una mayor eficacia en el tratamiento del cáncer *in vivo*.

[00197] La glicosilación (específicamente la fucosilación) de las variantes de Fc de IgG se pueden producir usando las células hospederas de expresión y los métodos descritos en las patentes US 8.025.879; 8.080.415, y 8.084.022, los contenidos de la cual se incorporan por referencia. Brevemente, el ARN mensajero (ARNm) que codifica para la cadena pesada o ligera de los anticuerpos descritos en este documento, se obtiene mediante el empleo de técnicas estándar de purificación y de aislamiento de ARN y, opcionalmente, aislamiento basado en el tamaño. Los ADNc correspondientes a los ARNm que codifican para la cadena pesada o ligera se producen entonces y se aíslan usando técnicas conocidas en la técnica, tales como la construcción de una biblioteca de ADNc, la construcción de bibliotecas de fagos y de cribado o PCR-RT utilizando cebadores específicos pertinentes. En algunas formas de realización, la secuencia de ADNc puede ser uno que está fabricada total o parcialmente utilizando técnicas conocidas en la manipulación de ADN *in vitro* para producir un ADNc específico deseado. La secuencia de ADNc puede colocarse entonces en un vector que contiene un promotor en el marco de lectura con el gen y que es compatible con la célula hospedera modificada con un contenido bajo de fucosa.

[00198] Se conocen en la técnica numerosos plásmidos que contienen promotores apropiados, secuencias de control, sitios de unión al ribosoma, y sitios de terminación de la transcripción, y opcionalmente marcadores, estos incluyen, pero no se limitan a, los vectores descritos en las Patentes de EE.UU. Nos. 4.663.283 y 4.456.748. En una forma de realización, el ADNc que codifica la cadena ligera y el que codifica para la cadena pesada pueden insertarse en plásmidos de expresión separados. En una realización alternativa, el ADNc que codifica la cadena ligera y el que codifica para la cadena pesada pueden estar insertados juntos en el mismo plásmido, siempre y cuando cada uno sea regulado por un promotor adecuado y controlado en la traducción. Los resultados se muestran en la Figura 34.

Referencias

1. Mundlos S, et al. Nuclear localization of the protein encoded by the Wilms' tumor gene WT1 in embryonic and adult tissues. *Development* 1993;119: 1329-41.
2. Keilholz U, et al. Wilms' tumor gene 1 (WT1) in human neoplasia. *Leukemia* 2005; 19: 1318-1323.
3. Inoue K, et al. WT1 as a new prognostic factor and a new marker for the detection of minimal residual disease in acute leukemia. *Blood* 1994; 84 (9): 3071-3079.
4. Ogawa H, et al. The usefulness of monitoring WT1 gene transcripts for the prediction and management of relapse following allogeneic stem cell transplantation in acute type leukemia. *Blood* 2003; 101 (5): 1698- 1704.
5. Yarnagarni T, et al. Growth Inhibition of Human Leukemic Cells by WT1 (Wilms Tumor Gene) Antisense Oligodeoxynucleotides: Implications for the Involvement of WT1 in Leukemogenesis. *Blood* 1996; 87: 2878- 2884.
6. Bellantuono I, et al. Two distinct HLA-A0201-presented epitopes of th Wilms tumor antigen 1 can function as targets for leukemia-reactive CTL. *Blood* 2002; 100 (10): 3835-3837.
7. Gaiger A, et al. WT1- specific serum antibodies in patients with leukemia. *Clin. Cancer Res.* 2001; 7 (suppl 3): 761-765.
8. Oka Y, et al. WT1 peptide cancer vaccine for patients with hematopoietic malignancies and solid cancers. *The Scientific World Journal* 2007; 7: 649-665.
9. Kobayashi H, et al. Defining MHC class II T helper epitopes from WT1 antigen. *Cancer Immunol.Immunother.* 2006; 55 (7): 850-860.
10. Pinilla-Ibarz J, et al. Improved human T-cell responses against synthetic HLA-A0201 analog peptides derived from the WT1 oncoprotein. *Leukemia* 2006; 20 (11): 2025-2033.
11. May RJ, et al. Peptide epitopes from the Wilms tumor 1 oncoprotein stimulate CD4+ and CD8+ T cells that recognize and kill human malignant mesothelioma tumor cells. *Clin Cancer Res.* 2007; 13:4547-4555.
12. Keilholz U, et al. A clinical and immunologic phase 2 trial of Wils tumor gene product (WT1) peptide vaccination in patients with AML and MDS. *Blood* 2009; 113: 6541-6548.
13. Rezvani K, et al. Leukemia-associated antigen-specific T-cell responses following combined PR1 and WT1 peptide vaccination in patients with myeloid malignancies. *Blood* 2008; 111 (1): 236-242.
14. Maslak P, et al.. Vaccination with synthetic analog peptides derived from WT1 oncoprotein induces T cell responses in patients with complete remission from acute myeloid leukemia. *Blood* 2010; Acpt Minor rev.

15. Krug LM, et al. WT1 peptide vaccinations induce CD4 and CD8 T cell immune responses in patients with mesothelioma and non-small cell lung cancer. *Cancer Immunol Immunother* 2010; in revision.
16. Morris E, et al. Generation of tumor-specific T-cell therapies. *Blood Reviews* 2006; 20: 61-69.
17. Houghton AN et al. Monoclonal antibody therapies- a “constant” threat to cancer. *Nat Med* 2000; 6:373- 374.
18. Miederer M, et al. Realizing the potential of the Actinium-225 radionuclide generator in targeted alpha particle therapy applications. *Adv Drug Deliv Rev* 2008; 60 (12): 1371-1382.
19. Noy R, T-cell-receptor-like antibodies: novel reagents for clinical cancer immunology and immunotherapy. *Expert Rev Anticancer Ther* 2005; 5 (3): 523-536.
20. Chames P, et al. Direct selection of a human antibody fragment directed against the tumor T-cell epitope HLA-A1-MAGE-A1 from a nonimmunized phage-Fab library. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000; 97: 7969-7974.
21. Held G, et al. Dissecting cytotoxic T cell responses towards the NY-ESO-1 protein by peptide/MHC- specific antibody fragments. *Eur J Immunol*. 2004; 34:2919-2929.
22. Lev A, et al. Isolation and characterization of human recombinant antibodies endowed with the antigen- specific, major histocompatibility complex-restricted specificity of T cells directed toward the widely expressed tumor T cell-epitopes of the telomerase catalytic subunit. *Cancer Res* 2002; 62: 3184-3194.
23. Klechevsky E, et al. Antitumor activity of immunotoxins with T-cell receptor-like specificity against human melanoma xenografts. *Cancer Res* 2008; 68 (15): 6360-6367.
24. Azinovic I, et al. Survival benefit associated with human anti-mouse antibody (HAMA) in patients with B-cell malignancies. *Cancer Immunol Immunother* 2006; 55(12):1451-8.
25. Tjandra JJ, et al. Development of human anti-murine antibody (HAMA) response in patients. *Immunol Cell Biol* 1990; 68(6):367-76.
26. Riechmann L, et al. Reshaping human antibodies for therapy. *Nature* 1988; 332 (6162): 332:323.
27. Queen C, et al. A humanized antibody that binds to the interleukin 2 receptor. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989; 86 (24): 10029–33.
28. Gerd R, et al. Serological Analysis of Human Anti-Human Antibody Responses in Colon Cancer Patients Treated with Repeated Doses of Humanized Monoclonal Antibody A33. *Cancer Res* 2001; 61, 6851– 6859.
29. Cheever MA, et al. The prioritization of cancer antigens: A national Cancer Institute pilot project for the acceleration of translational research. *Clin Cancer Res* 2009; 15 (17): 5323-5337.

30. Drakos E, et al. Differential expression of WT1 gene product in non-Hodgkin lymphomas. *Appl Immunohistochem Mol Morphol* 2005; 13 (2): 132-137.
31. Asemissen AM, et al. Identification of a highly immunogenic HLA-A*01-binding T cell epitope of WT1. *Clin Cancer Res* 2006; 12 (24):7476-7482.
32. Tomimatsu K, et al. Production of human monoclonal antibodies against FcεRIα by a method combining in vitro immunization with phage display. *Biosci Biotechnol Biochem* 2009; 73 (7): 1465-1469.
33. Lidija P, et al. An integrated vector system for the eukaryotic expression of antibodies or their fragments after selection from phage display libraries. *Gene* 1997; 187(1): 9-18.
34. Lisa JH, et al. Crystallographic structure of an intact IgG1 monoclonal antibody. *Journal of Molecular Biology* 1998; 275 (5): 861-872.
35. Yasmina NA, et al. Probing the binding mechanism and affinity of tanezumab, a recombinant humanized anti-NGF monoclonal antibody, using a repertoire of biosensors. *Protein Science* 2008; 17(8): 1326–1335.
36. Roberts WK, et al. Vaccination with CD20 peptides induces a biologically active, specific immune response in mice. *Blood* 2002; 99 (10): 3748-3755.
37. Caron PC, Class K, Laird W, Co MS, Queen C, Scheinberg DA. Engineered humanized dimeric forms of IgG are more effective antibodies. *J Exp Med* 176:1191-1195. 1992.
38. McDevitt M, et al. Tumor targeting with antibody-functionalized, radiolabeled carbon nanotubes. *J. Nuclear Med* 2207; 48 (7):1180-1189.
39. Xue SA, et al. Development of a Wilms' tumor-specific T-cell receptor for clinical trials: engineered patient's T cells can eliminate autologous leukemia blasts in NOD/SCID mice. *Haematologica* 2010; 95 (1): 126-134.
40. McDevitt MR, et al. Tumor therapy with targeted atomic nanogenerators. *Science* 2001; 294 (5546): 1537-1540.
41. Borchardt PE, et al. Targeted Actinium-225 in vivo generators for therapy of ovarian cancer. *Cancer Res* 2003; 63: 5084-5090.
42. Singh Jaggi J, et al. Selective alpha-particle mediated depletion of tumor vasculature with vascular normalization. *Plos One* 2007; 2 (3): e267.
43. Yan W, et al. Enhancing antibody Fc heterodimer formation through electrostatic steering effects. *J. Biol. Chem.* 2010; 285: 19637-19646.
44. Rossi EA, et al. Stably tethered multi-functional structures of defined composition made by the dock and lock method for use in cancer targeting. *Proc Natl Aca Sci USA* 2006; 103:6841-6.
45. Ryutaro A, et al. Cytotoxic enhancement of a bispecific diabody by format conversion to tandem single-chain variable fragment (taFv). *J Biol Chem* 2011; 286: 1812-1818.

46. Anja L, et al. A recombinant bispecific single-chain antibody, CD19 × CD3, induces rapid and high lymphoma-directed cytotoxicity by unstimulated T lymphocytes. *Blood* 2000; 95(6): 2098-2103.
47. Weiner GJ, et al. The role of T cell activation in anti-CD3 x antitumor bispecific antibody therapy. *J. Immunology* 1994; 152(5): 2385-2392.
48. Dafne M, et al. Improved pharmacokinetics of recombinant bispecific antibody molecules by fusion to human serum albumin. *J Biol Chem* 2007; 282: 12650-12660.
49. Liu C, et al. Modified host cells and uses thereof, PCT/US2010/0081195.
50. Francisco J, et al. Neutrophils Contribute to the Biological Antitumor Activity of Rituximab in a Non-Hodgkin's Lymphoma Severe Combined Immunodeficiency Mouse Model. *Clin Cancer Res* 2003; 9: 5866.
51. Kavita M, et al. Selective blockade of inhibitory Fc receptor enables human dendritic cell maturation with IL-12p70 production and immunity to antibody-coated tumor cells. *Proc natl Aca Sci USA* 2005; 102(8): 2910–2915.
52. Raphael A, et al. Inhibitory Fc receptors modulate in vivo cytotoxicity against tumor targets. *Nature Medicine* 2000; 6:443-446.
53. Milenic ED. Monoclonal antibody-based therapy strategies: providing options for the cancer patient. *Curr Pharm Des.* 2002; 8: 1794-1764.
54. Grillo-Lopez AJ. Anti-CD20 mAbs: modifying therapeutic strategies and outcomes in the treatment of lymphoma patients. *Expert Rev Anticancer Ther.* 2002; 2 (3): 323-329.
55. Jones KL & Buzdar AU. Evolving novel anti-Her2 strategies. *Lancet Oncol.* 2009; 10 (12): 1179-1187.
56. Reddy MM, Deshpande A & Sattler M. targeting JAK2 in the therapy of myeloproliferative neoplasms. *Exper Opin Ther targets* 2012; 3: 313-324.
57. Takeuchi K & Ito F. Receptor tyrosine kinases and targeted cancer therapeutics. *Biol Pharm Bull.* 2011; 34 (12) 1774-1780.
58. Roychowdhury S & Talpaz M. Managing resistance in chronic myeloid leukemia. *Blood Rev.* 2011; (6): 279- 290.
59. Konnig R. Interactions between MHC molecules and co-receptors of the TCR. *Curr Opin Immunol* 2002; 14 (1) 75-83.
60. Sergeeva A, Alatrash G, He H, Ruusaard K, Lu S, Wygant J, McIntyre BW, Ma Q, Li D, St John L, Clise-Dwyer K & Molldrem JJ. An anti-PR1/HLA-A2 T-cell receptor-like antibody mediated complement-dependent cytotoxicity against acute myeloid leukemia progenitor cells. *Blood* 2011; 117 (16): 4262-4272).
61. Takigawa N, Kiura K & Kishimoto T. Medical Treatment of Mesothelioma: Anything New? *Curr Oncol Rep* 2011; DOI 10.1007/s11912-011-0172-1.

62. Raja S, Murthy SC & Mason DP. Malignant Pleural Mesothelioma. *Curr Oncol Rep* 2011; DOI 10. 1007/s11912-0177-9.
63. Gerber JM, Qin L, Kowalski J, Smith D, Griffin CA, Vala MS, Collector MI, Perkins B, Zahurak M, Matsui W, Gocke CD, Sharkis S, Levitsky H & Jones RJ. Characterization of chronic myeloid leukemia stem cells. 2011; *Am J Hematol*. 86: 31-37.
64. Rezvani K, Yong AS, Savani BN, Mielke S, Keyvanfar K, Gostick E, Price DA, Douek DC & Barrett AJ. Graft-versus-leukemia effects associated with detectable Wilms tumor-1 specific T lymphocytes after allogeneic stem-cell transplantation for acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 2007; 110 (6): 1924-1932.
65. Persic L, Roberts A, Wilton J et al. An integrated vector system for the eukaryotic expression of antibodies or their fragments after selection from phage display libraries. *Gene* 1997; 187(1): 9-18.
66. Cheng L, Xiang JY, Yan S et al. Modified host cells and uses thereof. *PCT/US2010/0081195*.
67. Lindmo T, Boven E, Cuttitta F, Fedorko J & Bunn PA Jr. Determination of the immunoreactive fraction of radiolabeled monoclonal antibodies by linear extrapolation to binding at infinite antigen excess. *J Immunol Methods*. 1984; 72 (1): 77-89.
68. Feng M, Zhang JL, Anver M, Hassan R & Ho M. *In vivo* imaging of human malignant mesothelioma growth orthotopically in the peritoneal cavity of nude mice. *J Cancer* 2011; 2: 123-131.

REIVINDICACIONES

Lo que se reivindica es:

1. Un anticuerpo aislado, o un fragmento de unión a antígeno del mismo, que comprende:

(A) (i) una región variable de cadena pesada (HC) que comprende la HC-CDR1, CDR2 y HC-HC-CDR3, respectivamente, que comprende las secuencias de aminoácidos SEQ ID NOS: 2, 3, y 4, y una región variable de cadena ligera (LC) que comprende LC-CDR1, CDR2 y LC-LC-CDR3, respectivamente, que comprenden secuencias de aminoácidos SEQ ID NOS: 8, 9 y 10;

(ii) una región variable de cadena pesada (HC) que comprende las HC-CDR1, CDR2 y HC-HC-CDR3, respectivamente, que comprende las secuencias de aminoácidos SEQ ID NOS: 20, 21 y 22, y una región variable de cadena ligera (LC) que comprende las LC- CDR1, CDR2 y LC-LC-CDR3, respectivamente, que comprende las secuencias de aminoácidos SEQ ID NOS: 26, 27 y 28;

(iii) una región variable de cadena pesada (HC) que comprende las HC-CDR1, CDR2 y HC-HC-CDR3, respectivamente, que comprende las secuencias de aminoácidos SEQ ID NOS: 38, 39 y 40, y una región variable de cadena ligera (LC) que comprende las LC- CDR1, CDR2 y LC-LC-CDR3, respectivamente, que comprende las secuencias de aminoácidos SSEQ ID NOS: 44, 45 y 46;

(iv) una región variable de cadena pesada (HC) que comprende las HC-CDR1, CDR2 y HC-HC-CDR3, respectivamente, que comprende las secuencias de aminoácidos SEQ ID NOS: 56, 57 y 58, y una región variable de cadena ligera (LC) que comprende las LC- CDR1, CDR2 y LC-LC-CDR3, respectivamente, que comprende las secuencias de aminoácidos SSEQ ID NOS: 62, 63 y 64;

(v) una región variable de cadena pesada (HC) que comprende las HC-CDR1, CDR2 y HC-HC-CDR3, respectivamente, que comprende las secuencias de aminoácidos SEQ ID NOS: 74, 75 y 76, y una región variable de cadena ligera (LC) que comprende las LC- CDR1, CDR2 y LC-LC-CDR3, respectivamente, que comprende las secuencias de aminoácidos S SEQ ID NOS: 80, 81 y 82, o

(vi) una región variable de cadena pesada (HC) que comprende las HC-CDR1, CDR2 y HC-HC-CDR3, respectivamente, que comprende las secuencias de aminoácidos SEQ ID NOS: 92, 93 y 94, y una región variable de cadena ligera (LC) que comprende las LC- CDR1, CDR2 y LC-LC-CDR3, respectivamente, que comprende las secuencias de aminoácidos SEQ ID NOS: 98, 99 y 100; o

(B) una V_H y V_L que comprenden una primera y segunda secuencia de aminoácidos, respectivamente, seleccionado entre las SEQ ID NOS: 14 y 16; 32 y 34, 50 y 52; 68 y 70, 86 y 88, y 104 y 106; o

(C) una secuencia de aminoácidos seleccionada entre las SEC ID NOS: 18, 36, 54, 72, 90, and 108.

2. Un anticuerpo aislado, o un fragmento de unión a antígeno del mismo, que comprende:

(A) una región variable de cadena pesada (HC) que comprende las HC-CDR1, CDR2 y HC-HC-CDR3, respectivamente, que comprende las secuencias de aminoácidos seleccionadas de las SEQ ID NOS: (i) 2, 3, y 4; (ii) 20, 21 y 22, (iii) 38, 39 y 40; (iv) 56, 57 y 58; (v) 74, 75 y 76, y (vi) 92, 93 y 94; y

(B) una región variable de cadena ligera (LC) que comprende las LC-CDR1, CDR2 y LC-LC-CDR3, respectivamente, que comprende las secuencias de aminoácidos seleccionadas de las SEQ ID NOS: (i) 8, 9 y 10, (ii) 26, 27 y 28; (iii) 44, 45 y 46; (iv) 62, 63 y 64; (v) 80, 81 y 82, y (vi) 98, 99 y 100.

3. Un anticuerpo aislado, o un fragmento de unión a antígeno del mismo, que comprende:

una V_H y V_L que comprenden una primera y segunda secuencias de aminoácidos, respectivamente, seleccionadas entre las SEQ ID NOS: (i) 14 y 16, (ii) 32 y 34; (iii) 50 y 52; (iv) 68 y 70; (v) 86 y 88, y (vi) 104 y 106.

4. Un anticuerpo aislado, o un fragmento de unión a antígeno del mismo, que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada de SEC ID NOS: 18, 36, 54, 72, 90, y 108.

5. El anticuerpo de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que el anticuerpo comprende una región de marco de la región variable humana.
6. El anticuerpo de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que el anticuerpo es totalmente humano.
7. El anticuerpo de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que dicho anticuerpo se une específicamente a un péptido WT1 unido a HLA-A2.
8. El anticuerpo de la reivindicación 7, en el que dicho péptido WT1 tiene la secuencia de aminoácidos RMFPNAPYL.
9. El anticuerpo de la reivindicación 7, en el que dicho HLA-A2 es HLA-A0201.
10. El anticuerpo de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en el que el fragmento de unión a antígeno de dicho anticuerpo es un Fab, Fab', F(ab')₂, Fv o un Fv de cadena sencilla (scFv).
11. El anticuerpo de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, conjugado con un agente terapéutico.
12. El anticuerpo de la reivindicación 11, en el que dicho agente terapéutico es un fármaco, toxina, radioisótopo, proteína o péptido.
13. Un ácido nucleico aislado que codifica un anticuerpo de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4.
14. Un ácido nucleico aislado que comprende:
 - (A) (i) Una primera, segunda y tercera secuencias de nucleótidos seleccionados del grupo que consiste en las SEQ ID NOS: 5, 6 y 7; 23, 24 y 25; 41, 42 y 43; 58, 59 y 60; 77, 78 y 79, y 95, 96 y 97; y
 - (ii) Las secuencias de nucleótidos cuarta, quinta y sexta seleccionados del grupo que consiste en las SEQ ID NOS: 11, 12 y 13; 29, 30 y 31; 47, 48 y 49; 65, 66 y 67; 83, 84 y 85; y 101, 102 y 103; o

(B) Una primera y segunda secuencias de nucleótidos seleccionados del grupo que consiste de las SEQ ID NOS: 15 y 17; 33 y 35, 51 y 53; 69 y 71, 87 y 89 y 105 y 107; o

(C) una secuencia de nucleótidos seleccionada del grupo que consiste de las SEQ ID NOS: 19, 37, 55, 73, 91 y 109.

15. Un ácido nucleico aislado que comprende:

(A) Una primera, segunda y tercera secuencias de nucleótidos seleccionados del grupo que consiste en las SEQ ID NOS: (i) 5, 6 y 7, (ii) 23, 24 y 25; (iii) 41, 42 y 43; (iv) 58, 59 y 60; (v) 77, 78 y 79, y (vi) 95, 96 y 97; y

(B) Las secuencias de nucleótidos cuarta, quinta y sexta seleccionados del grupo que consiste en las SEQ ID NOS: (vii) 11, 12 y 13; (viii) 29, 30 y 31; (ix) 47, 48 y 49; (x) 65, 66 y 67; (xi) 83, 84 y 85, y (xii) 101, 102 y 103.

16. El ácido nucleico de la reivindicación 15, en el que dicha primera, segunda y tercera secuencias de nucleótidos que codifican las HC-CDR1, CDR2 y HC-CDR3, respectivamente, de un anticuerpo y dichas secuencias de nucleótidos cuarta, quinta y sexta codifican las LC-CDR1, LC -LC-CDR2 y CDR3, respectivamente, de dicho anticuerpo.

17. Un ácido nucleico aislado que comprende una primera y segunda secuencias de nucleótidos, respectivamente, seleccionadas del grupo que consiste en las SEQ ID NOS: (i) 15 y 17, (ii) 33 y 35; (iii) 51 y 53; (iv) y 69 71; (v) 87 y 89 y (vi) 105 y 107.

18. El ácido nucleico de la reivindicación 17, en el que dicha primera secuencia de nucleótidos que codifica una V_H, y dicha segunda secuencia de nucleótidos que codifica una V_L de un anticuerpo.

19. Un ácido nucleico aislado, que comprende una secuencia de nucleótidos seleccionada del grupo que consiste de las SEQ ID NOS: 19, 37, 55, 73, 91 y 109.

20. El ácido nucleico de la reivindicación 19, en el que dicho ácido nucleico codifica un scFv.

21. Un vector que comprende un ácido nucleico de una cualquiera de las reivindicaciones 13 a 20.

22. Una célula que comprende un ácido nucleico de una cualquiera de las reivindicaciones 13 a 20.

23. La célula de la reivindicación 22, en el que dicha célula expresa en su superficie un anticuerpo de las reivindicaciones 1 a 4.

24. Un método para la detección de WT1 en una célula o tejido completo, comprendiendo dicho método:

(A) poner en contacto una célula o tejido con un anticuerpo o un fragmento de unión a antígeno del mismo que se une específicamente a un WT1peptide que se une a HLA-A2, en el que dicho anticuerpo comprende un marcador detectable;

(B) determinar la cantidad de anticuerpo unido a dicha célula o tejido mediante la medición de la cantidad del marcador detectable asociado con dicha célula o tejido, en el que la cantidad de anticuerpo unido indica la unión de WT1 en dicha célula o tejido.

25. El método de la reivindicación 24, en el que el anticuerpo se une específicamente a un péptido WT1 con la secuencia de aminoácidos RMFPNAPYL (SEC ID N °: 1), unido a HLA-A2.

26. El método de la reivindicación 25, en el que el péptido WT1 está unido a HLA-A0201.

27. El método de la reivindicación 24, en el que el anticuerpo es un anticuerpo aislado o un fragmento de unión a antígeno de los mismos que comprende uno de:

(A) (i) una región variable de cadena pesada (HC) que comprende las HC-CDR1, CDR2 y HC-HC-CDR3, respectivamente, que comprende las secuencias de aminoácidos SEQ ID NOS: 2, 3, y 4, y una región variable de cadena ligera (LC) que comprende las LC- CDR1, CDR2 y LC-LC-CDR3, respectivamente, que comprende las secuencias de aminoácidos SEQ ID NOS: 8, 9 y 10;

(ii) una región variable de cadena pesada (HC) que comprende las HC-CDR1, CDR2 y HC-HC-CDR3, respectivamente, que comprende las secuencias de aminoácidos SEQ ID NOS: 20, 21 y 22, y una región variable de cadena ligera (LC)

que comprende las LC- CDR1, CDR2 y LC-LC-CDR3, respectivamente, que comprende las secuencias de aminoácidos SEQ ID NOS: 26, 27 y 28;

(iii) una región variable de cadena pesada (HC) que comprende las HC-CDR1, CDR2 y HC-HC-CDR3, respectivamente, que comprende las secuencias de aminoácidos SEQ ID NOS: 38, 39 y 40y una región variable de cadena ligera (LC) que comprende las LC- CDR1, CDR2 y LC-LC-CDR3, respectivamente, que comprende las secuencias de aminoácidos seleccionadas de las SEQ ID NOS: 44, 45 y 46;

(iv) una región variable de cadena pesada (HC) que comprende las HC-CDR1, CDR2 y HC-HC-CDR3, respectivamente, que comprende las secuencias de aminoácidos SEQ ID NOS: 56, 57 y 58, y una región variable de cadena ligera (LC) que comprende las LC- CDR1, CDR2 y LC-LC-CDR3, respectivamente, que comprende las secuencias de aminoácidos SEQ ID NOS: 62, 63 y 64;

(v) una región variable de cadena pesada (HC) que comprende las HC-CDR1, CDR2 y HC-HC-CDR3, respectivamente, que comprende las secuencias de aminoácidos SEQ ID NOS: 74, 75 y 76, y una región variable de cadena ligera (LC) que comprende las LC- CDR1, CDR2 y LC-LC-CDR3, respectivamente, que comprende las secuencias de aminoácidosSEQ ID NOS: 80, 81 y 82, o

(vi) una región variable de cadena pesada (HC) que comprende las HC-CDR1, CDR2 y HC-HC-CDR3, respectivamente, que comprende las secuencias de aminoácidos SEQ ID NOS: 92, 93 y 94, y una región variable de cadena ligera (LC) que comprende las LC- CDR1, CDR2 y LC-LC-CDR3, respectivamente, que comprende las secuencias de aminoácidos SEQ ID NOS: 98, 99 y 100; o

(B) una V_H y V_L que comprende una primera y segunda secuencias de aminoácidos, respectivamente, seleccionadas de SEQ ID NOS: 14 y 16; 32 y 34, 50 y 52; 68 y 70, 86 y 88, y 104 y 106; o

(C) una secuencia de aminoácidos seleccionada de SEC ID NOS: 18, 36, 54, 72, 90, and108.

28. Un kit que comprende un anticuerpo de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4.

29. El uso de un anticuerpo de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 para el tratamiento de una enfermedad WT1positiva.
30. Una composición farmacéutica que comprende un anticuerpo de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 y un vehículo farmacéuticamente aceptable.
31. Un método para el tratamiento de un sujeto que tiene una enfermedad WT1 positiva, que comprende administrar al sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz de un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4.
32. El método de la reivindicación 31, en el que la enfermedad WT1 positiva es una leucemia crónica o leucemia aguda o cáncer WT1⁺.
33. El método de la reivindicación 31, en el que la enfermedad WT1-positiva se selecciona entre el grupo que consiste en leucemia mielocítica crónica, mieloma múltiple (MM), leucemia linfoblástica aguda (LLA), leucemia mieloide/mielógena aguda (LMA), síndrome mielodisplásico (MDS), mesotelioma, cáncer de ovario, cáncer gastrointestinal, cáncer de mama, cáncer de próstata y glioblastoma.
34. El método de la reivindicación 34, en el que dicho anticuerpo es un conjugado que tiene un residuo citotóxico relacionado con la misma.
35. Un método para el tratamiento de un sujeto que tiene una enfermedad WT1 positiva, que comprende administrar al sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz de un ácido nucleico de cualquiera de las reivindicaciones 13 a 20.
36. El método de la reivindicación 35, en el que la enfermedad WT1 positiva es una leucemia crónica, leucemia aguda o cáncer WT⁺.
37. El método de la reivindicación 35, en el que la enfermedad WT1-positiva se selecciona entre el grupo que consiste en leucemia mielocítica crónica, mieloma múltiple, la leucemia linfoblástica aguda (LLA), leucemia mieloide/mielógena aguda (LMA), síndrome mielodisplásico (MDS), mesotelioma, cáncer de ovario, cáncer gastrointestinal, cáncer de mama, cáncer de próstata y el glioblastoma.
38. El uso de un ácido nucleico de cualquiera de las reivindicaciones 13 a 20 para el tratamiento de una enfermedad positiva WT1.

39. Una composición farmacéutica que comprende un ácido nucleico de cualquiera de las reivindicaciones 13 a 20.

40. Un método para matar a un célula WT1⁺, comprendiendo dicho método:

Poner en contacto la célula con un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo que se une específicamente a un péptido WT1 que está unido a HLA-A2.

41. El método de la reivindicación 40, en el que dicho anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo tiene un residuo citotóxico relacionado con el mismo.

RESUMEN DE LA DIVULGACIÓN

La presente invención proporciona proteínas de unión a antígeno que se unen específicamente a la proteína del tumor de Wilms (WT1), incluyendo anticuerpos humanizados, quiméricos y totalmente humanos contra WT1, fragmentos de anticuerpos, receptores de antígenos quiméricos (CARs), proteínas de fusión, y conjugados de los mismos. Las proteínas y los anticuerpos de unión a antígeno se unen a un péptido WT1 restringido por HLA-A0201-. Tales anticuerpos, fragmentos, proteínas de fusión y conjugados de los mismos son útiles para el tratamiento de cánceres asociados con la proteína WT1, incluyendo, por ejemplo, cáncer de mama, cáncer de ovario, cáncer de próstata, leucemia mielocítica crónica, mieloma múltiple, la leucemia linfoblástica aguda (LLA), leucemia mieloide aguda/Síndrome de la leucemia mielógena (AML) y mielodisplásico (MDS). En formas de realización más particulares, los anticuerpos anti- WT1/A pueden comprender una o más sustituciones de aminoácidos de la región marco diseñados para mejorar la estabilidad de la proteína, la unión de anticuerpos y/o los niveles de expresión.

Scheinberg et al.
Attorney Docket No. 3314.013AWO
1 / 34
Replacement Sheet

1 mgsdvrdlna llpavpslgg gggcalpvsg aaqwapvldf appgasaygs lggpappppap
61 pppppppphs fikqepswgg aepheeqcls aftvhfsgqf tgtagacryg pfgpppppsqa
121 **ssgqarmfpn** **apylpscles** qpainrggys tvtfidgtpsy ghtpshhaaq fpnhsfkhed
181 pmgqqqslge qqysvpppvy gchtptdsct gsqalllrtp yssdnlyqmt sqlecmtwnq
241 mnlgatlkgv aagsssssvkw tegqsnhstg yesdnhttpi lcgaqyriht hgvfrgiqdv
301 rrvpgvaptl vrsasetsek rpfmcay**pgc** **nkryfklshl** **qmhsrkhtge** kpyqcdfkdc
361 errfsrsdql krhqrrhtgv kpfqcktcqr kfsrsdhlkt htrthtgkts ekpfscrwps
421 cqkkfars**de** **lvrrhnmhqr** **nmtklqlal** (SEQ ID NO: 118)

Figure 1

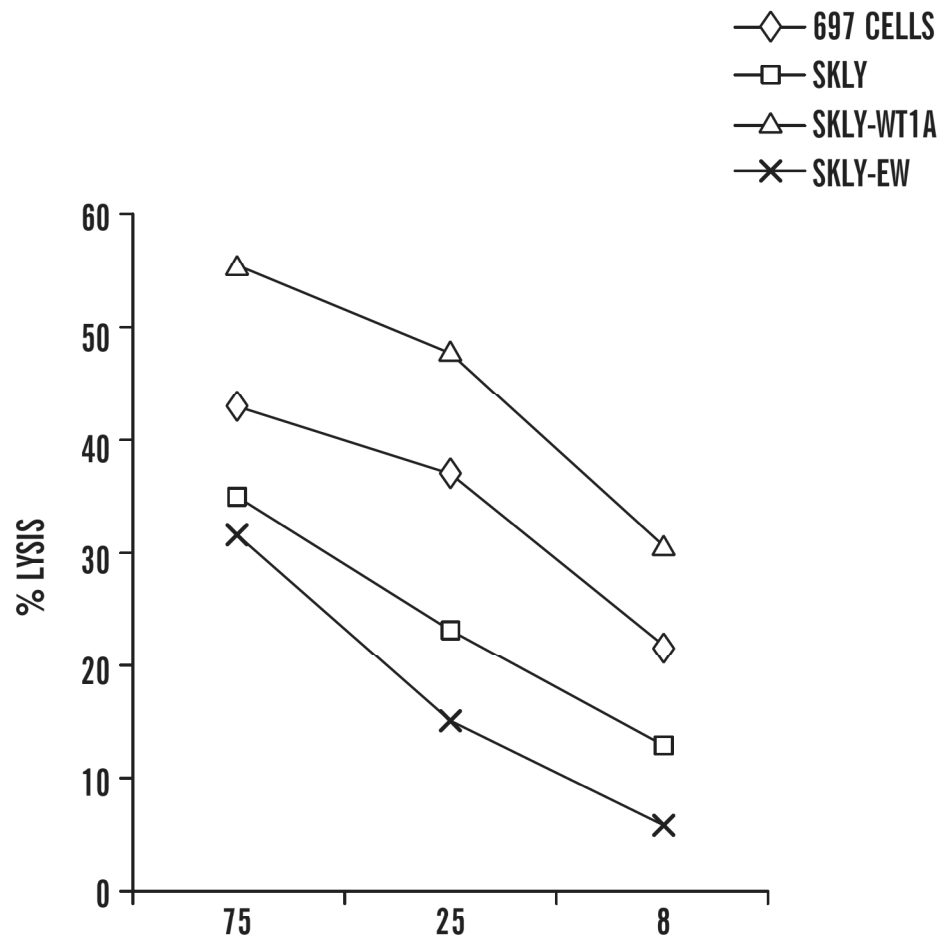


Figure 2

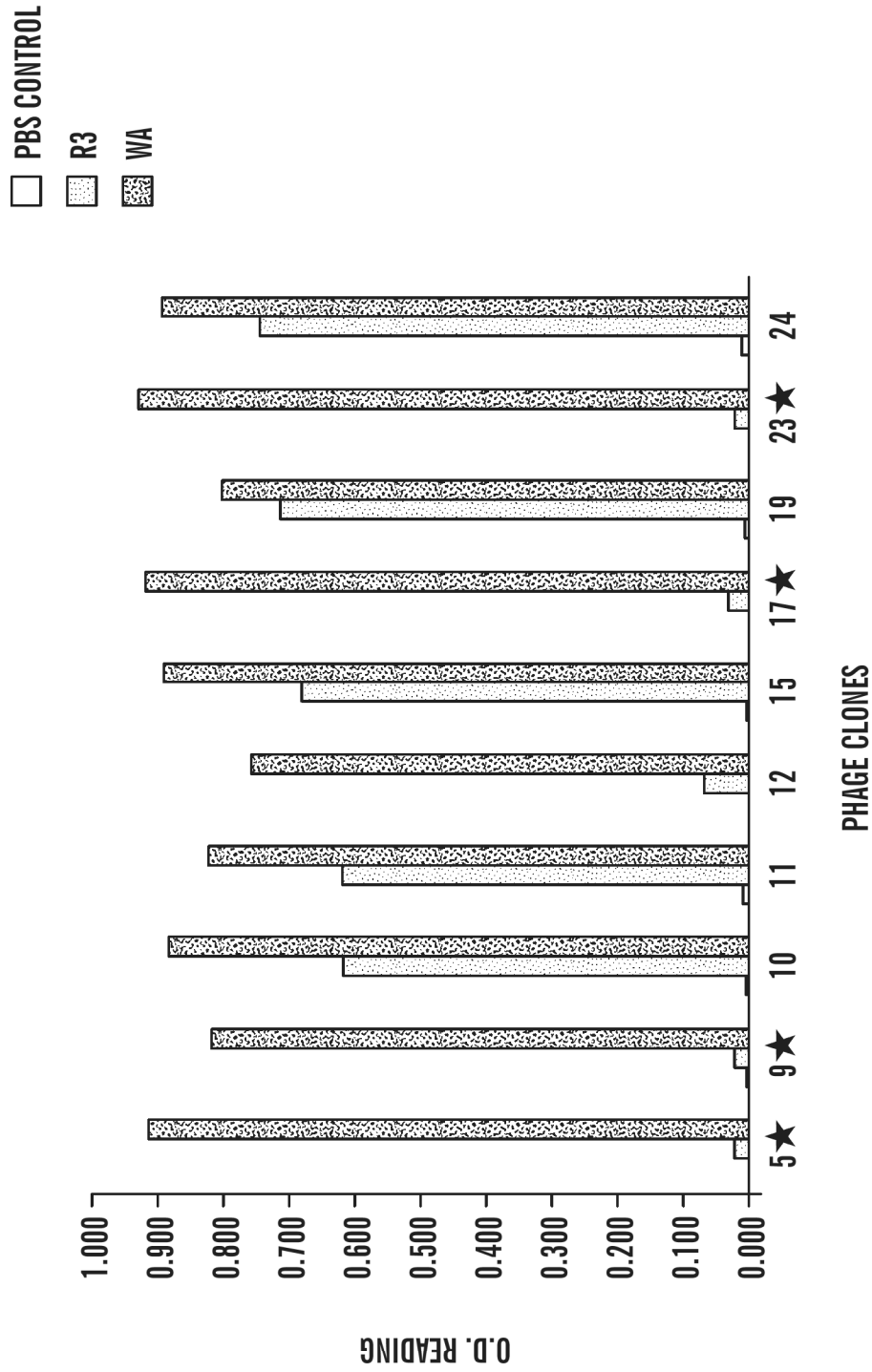


Figure 3

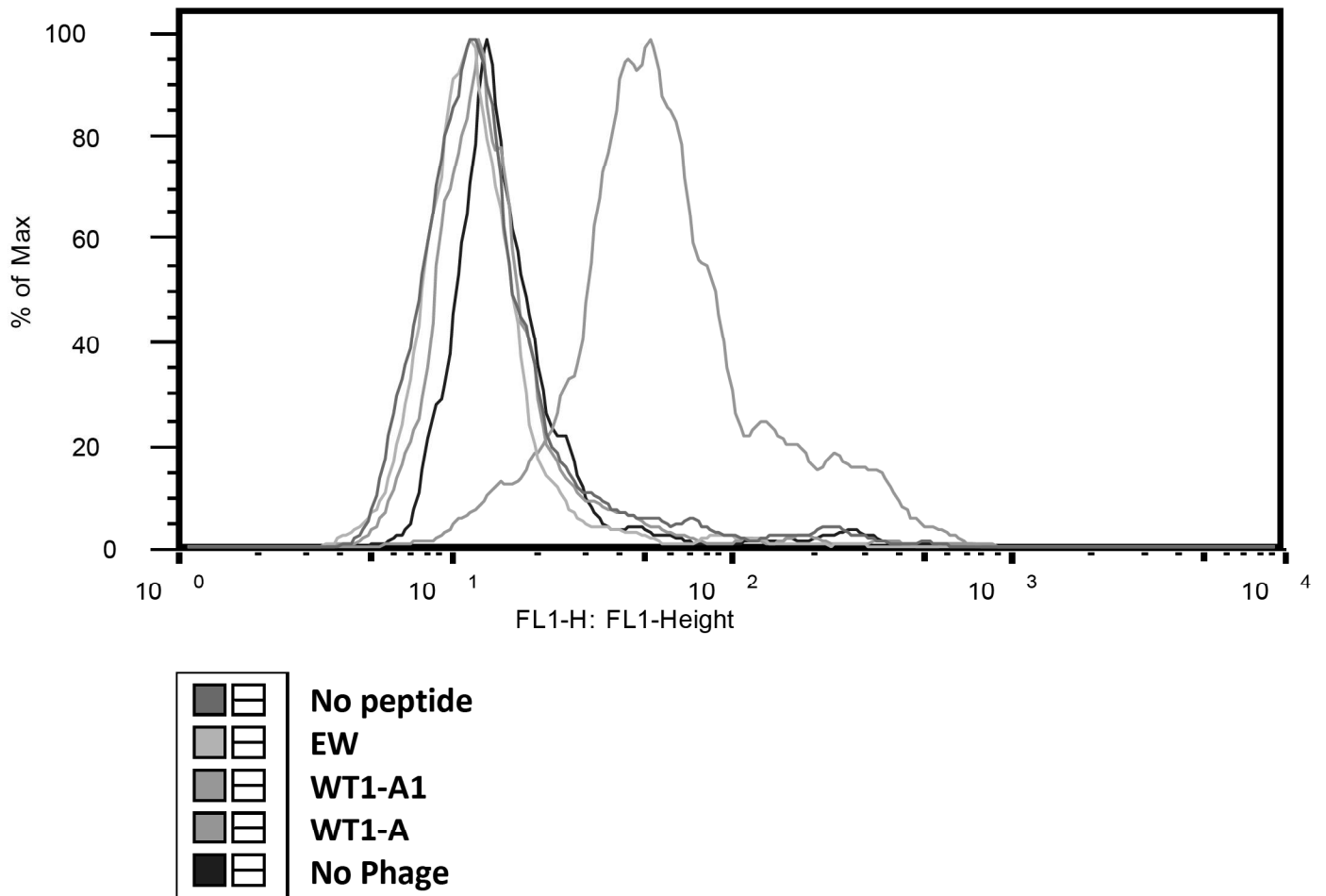
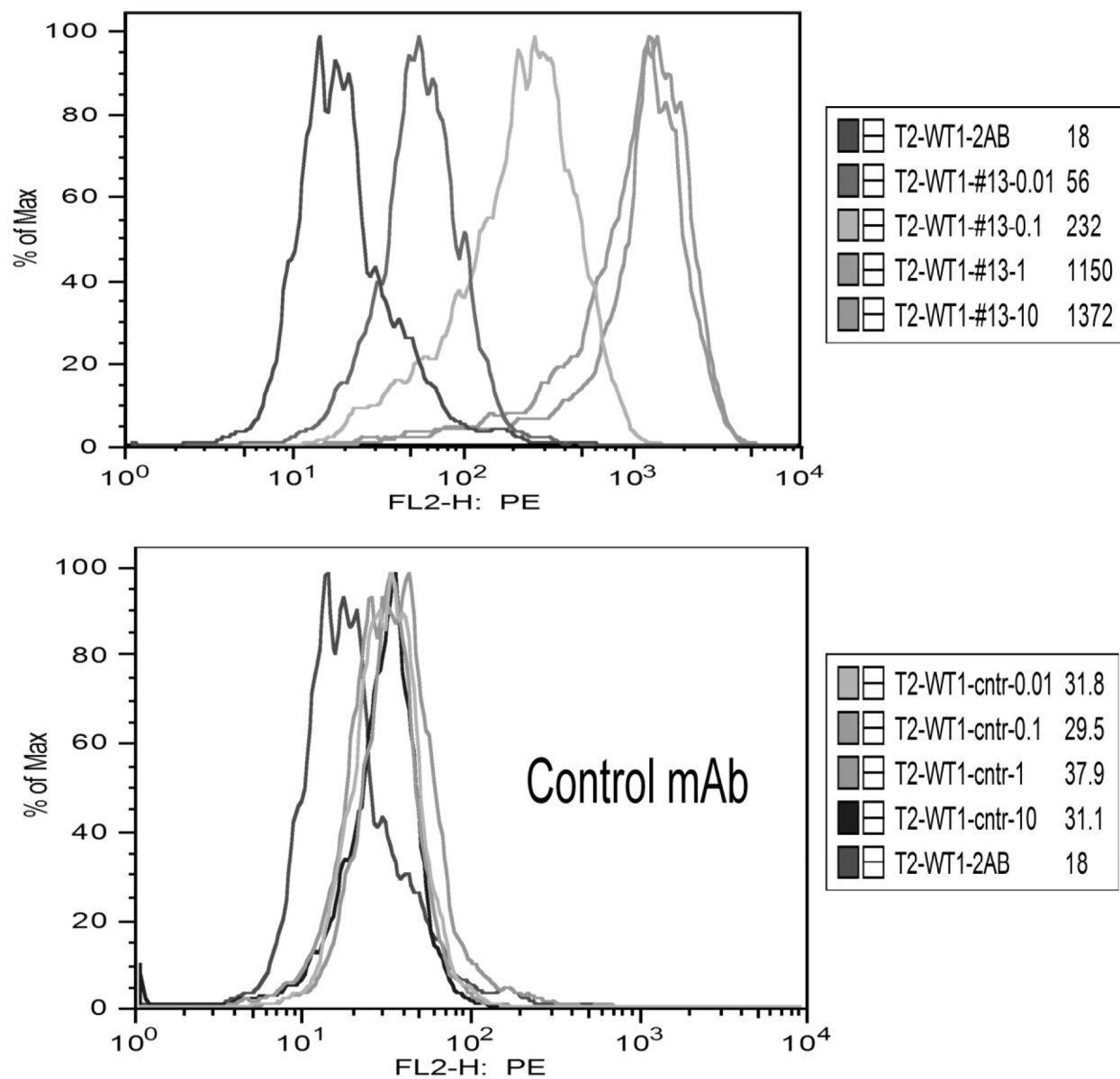


Figure 4



Flow cytometric titration of mAb #13 on T2 cells pulsed w/ WT1 peptide

Figure 5

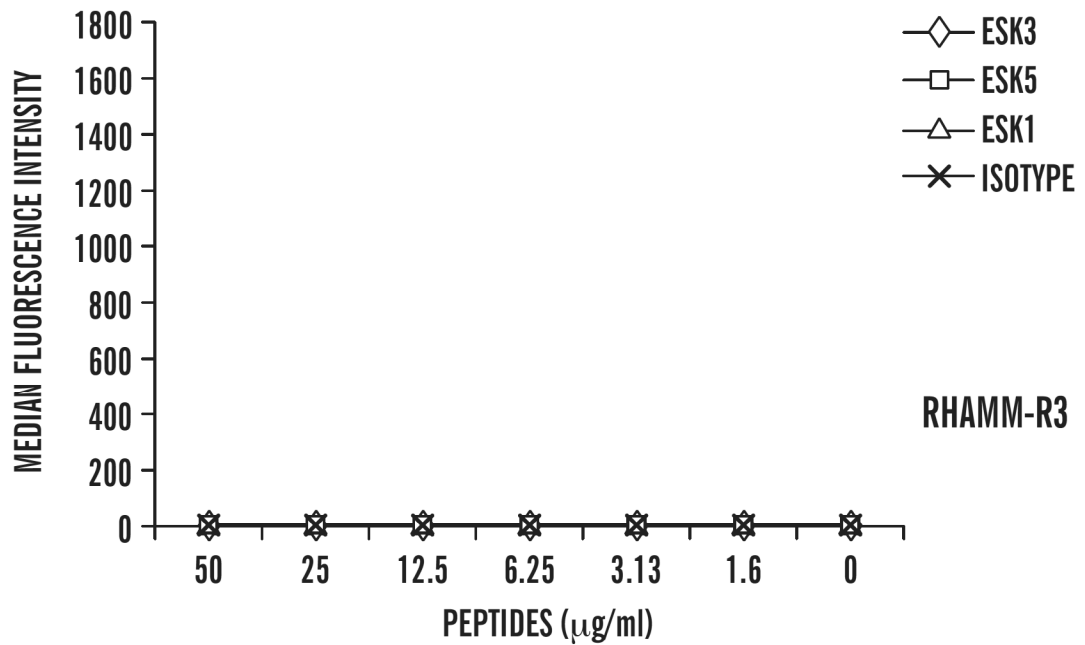
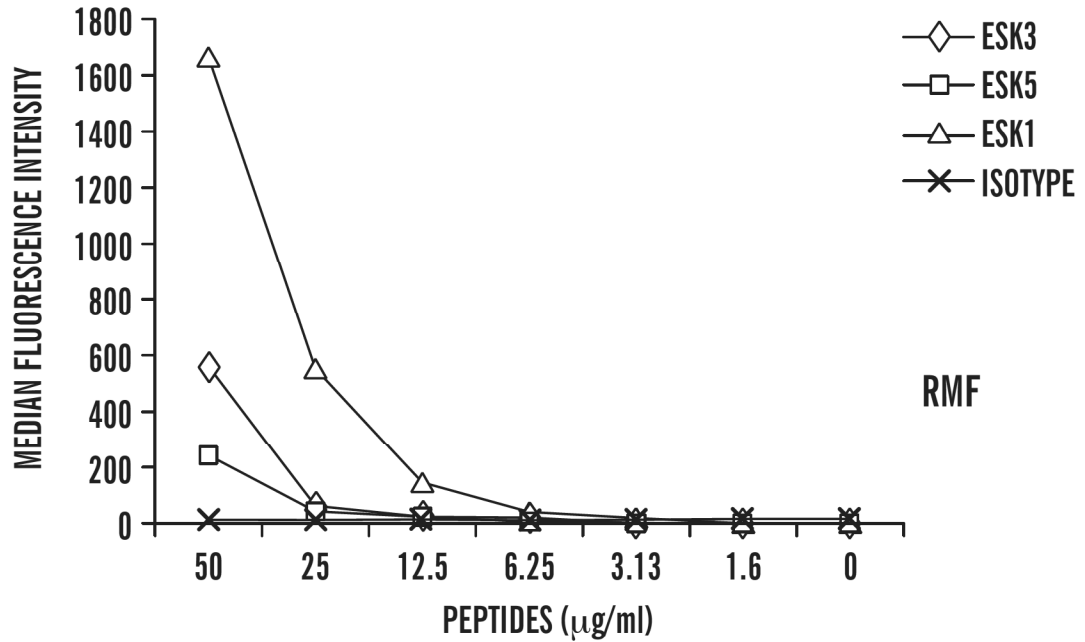


Figure 6

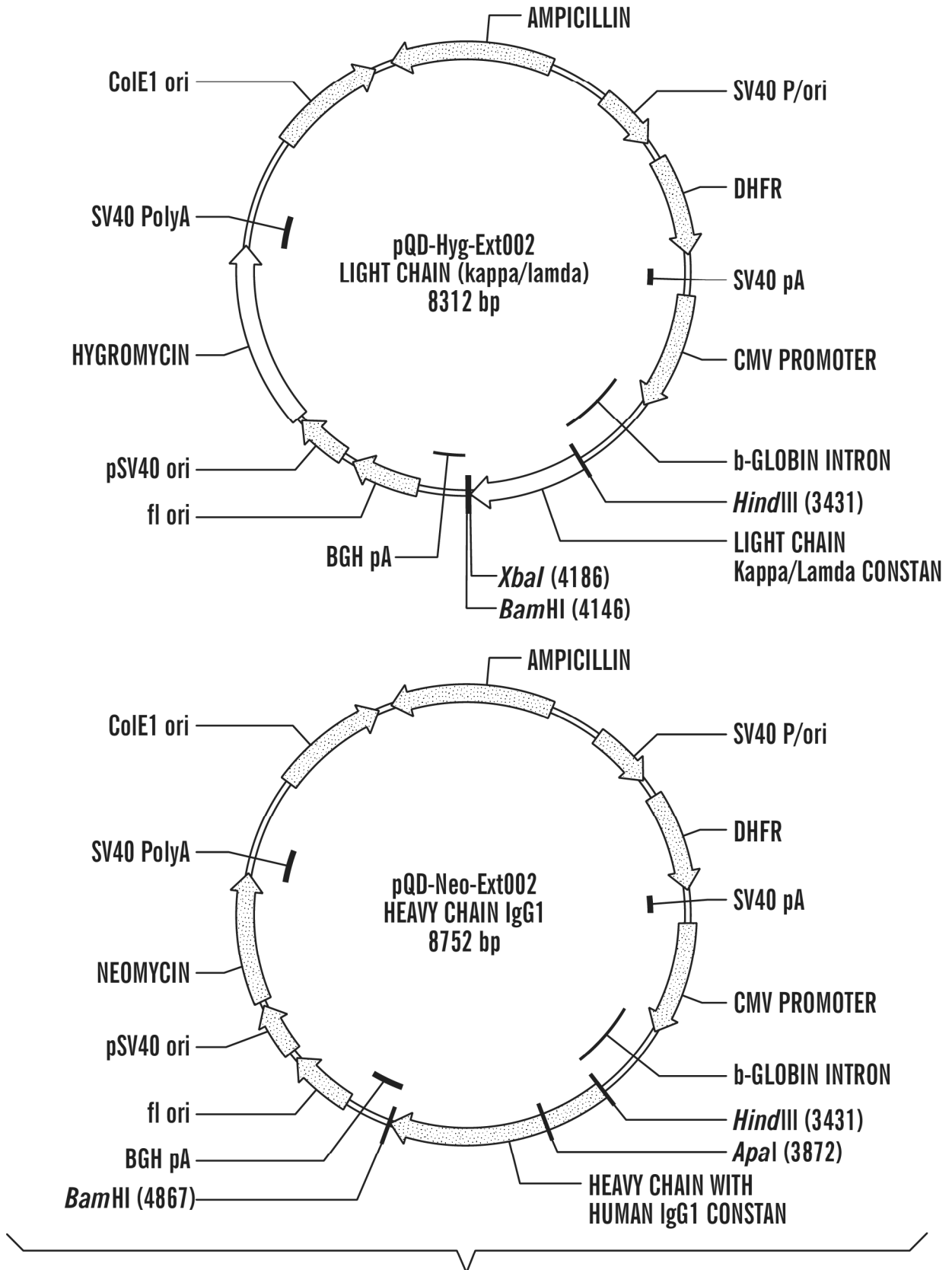


Figure 7

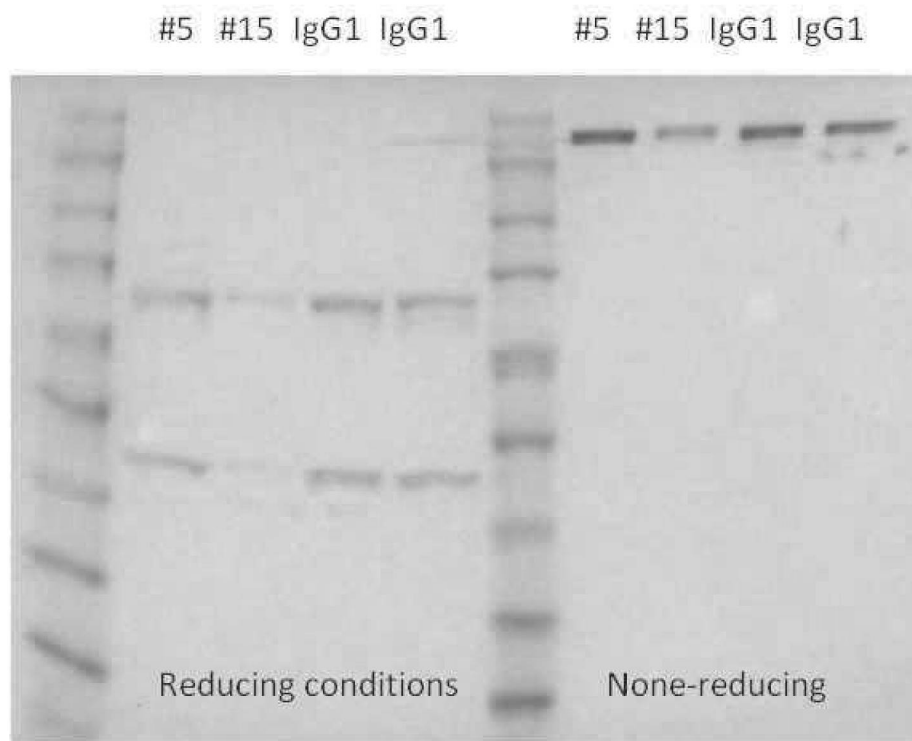


Figure 8

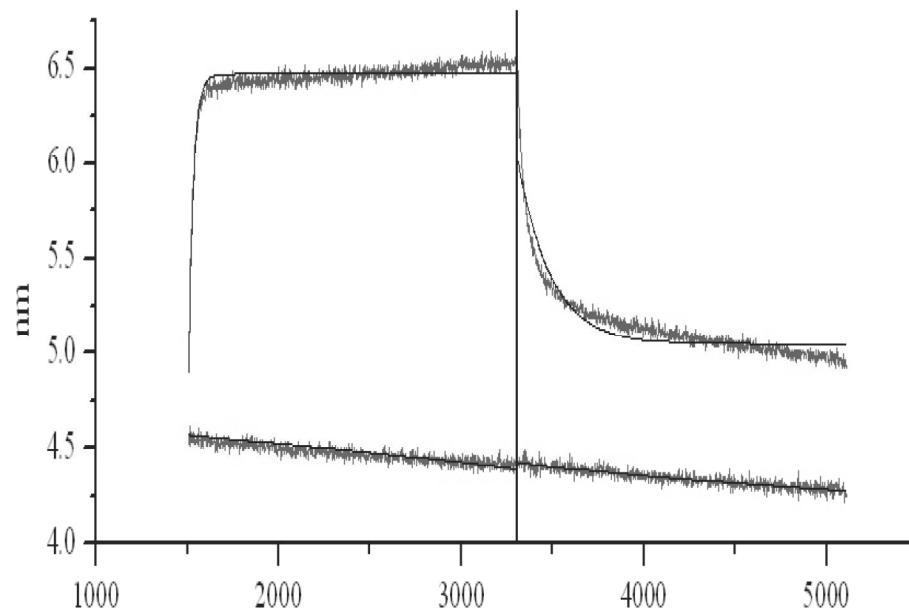
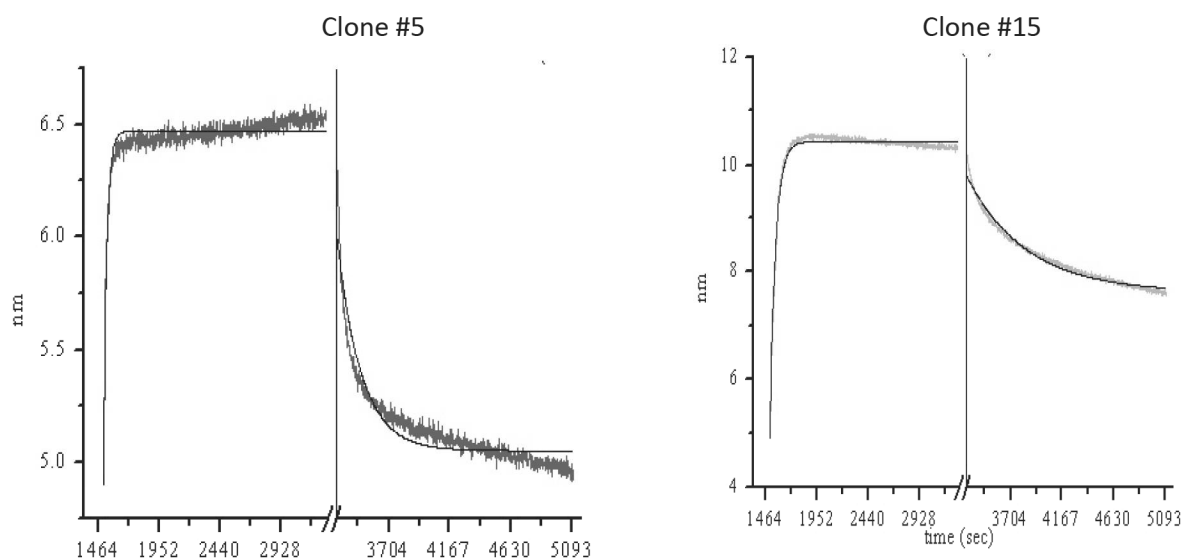


Figure 9



Samples	k_d [1/s]	Error in k_d	k_a [1/Ms]	K_D [M]
EXT002- Clone #5 IgG1	5.48E-3	1.12E-4	4.68E5	1.17E-8
EXT002- Clone #15 IgG1	1.88E-3	2.25E-5	2.45E5	7.68E-9

Figure 10

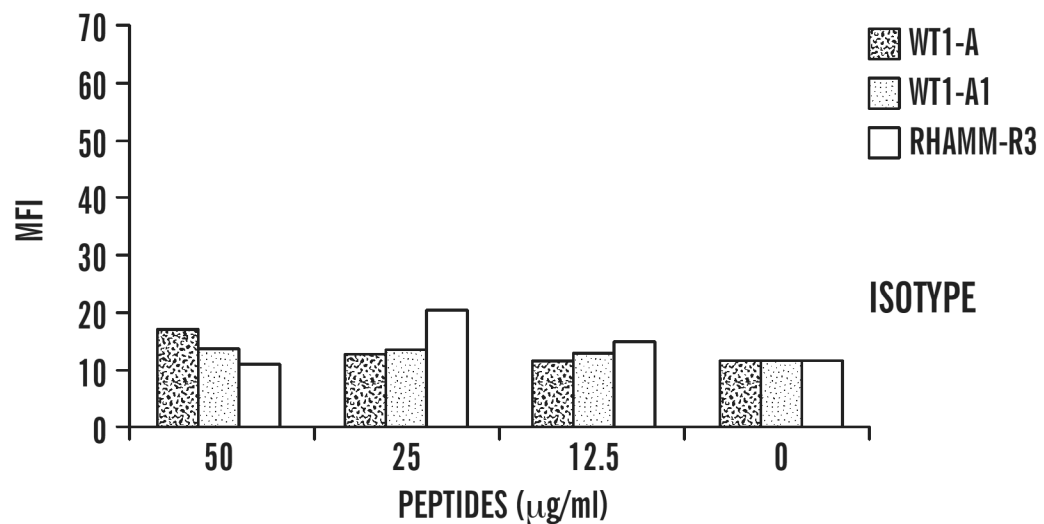
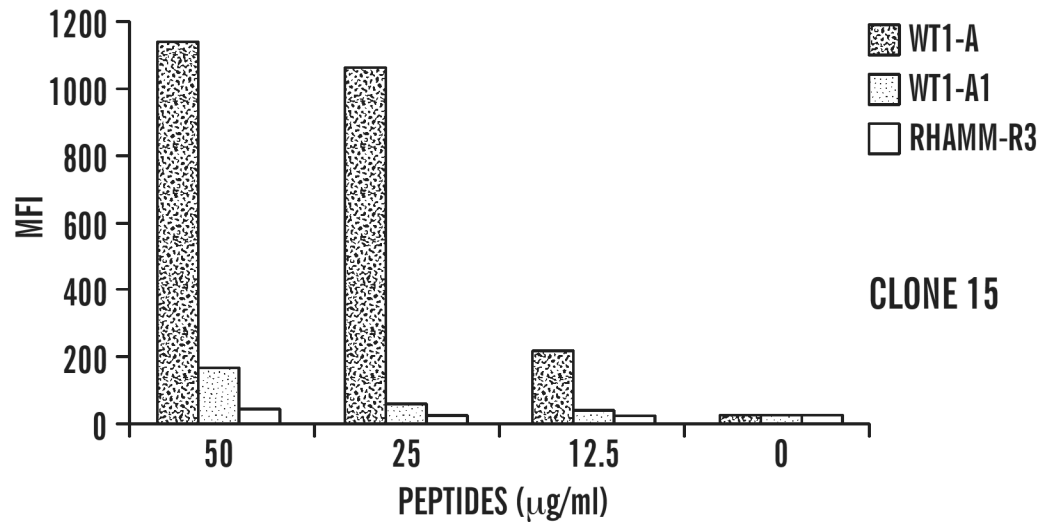
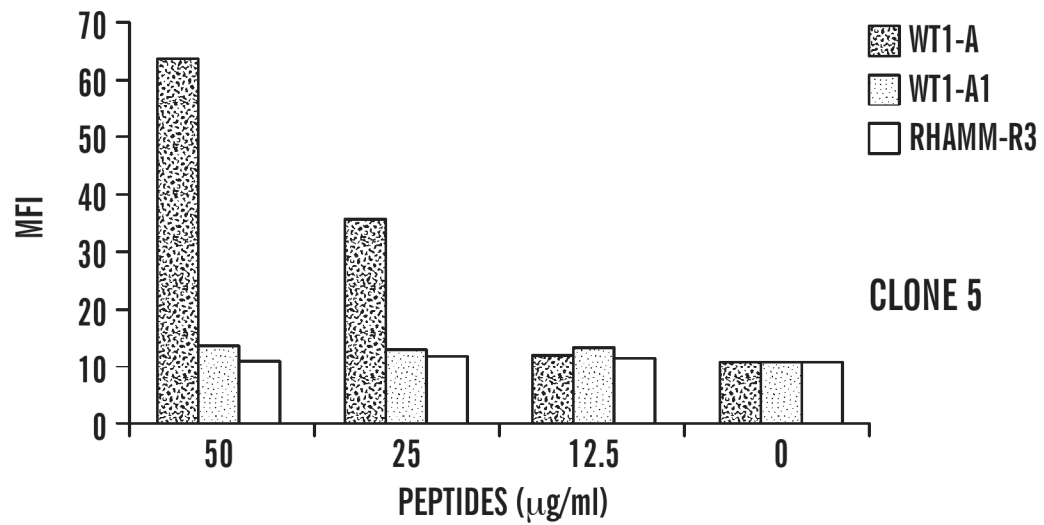


Figure 11

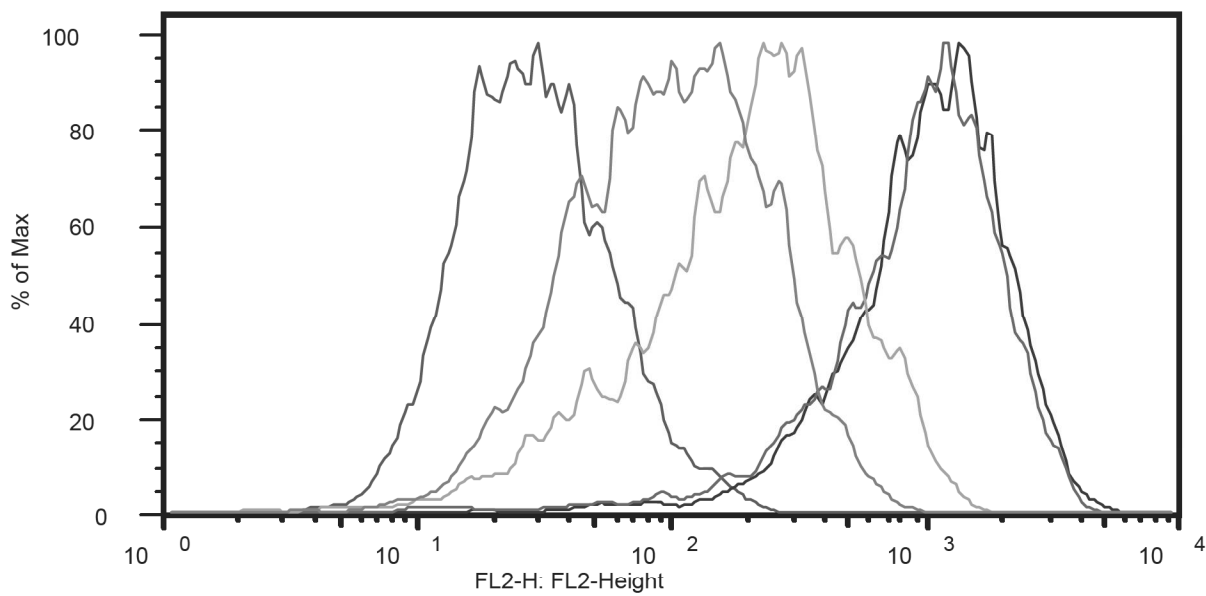
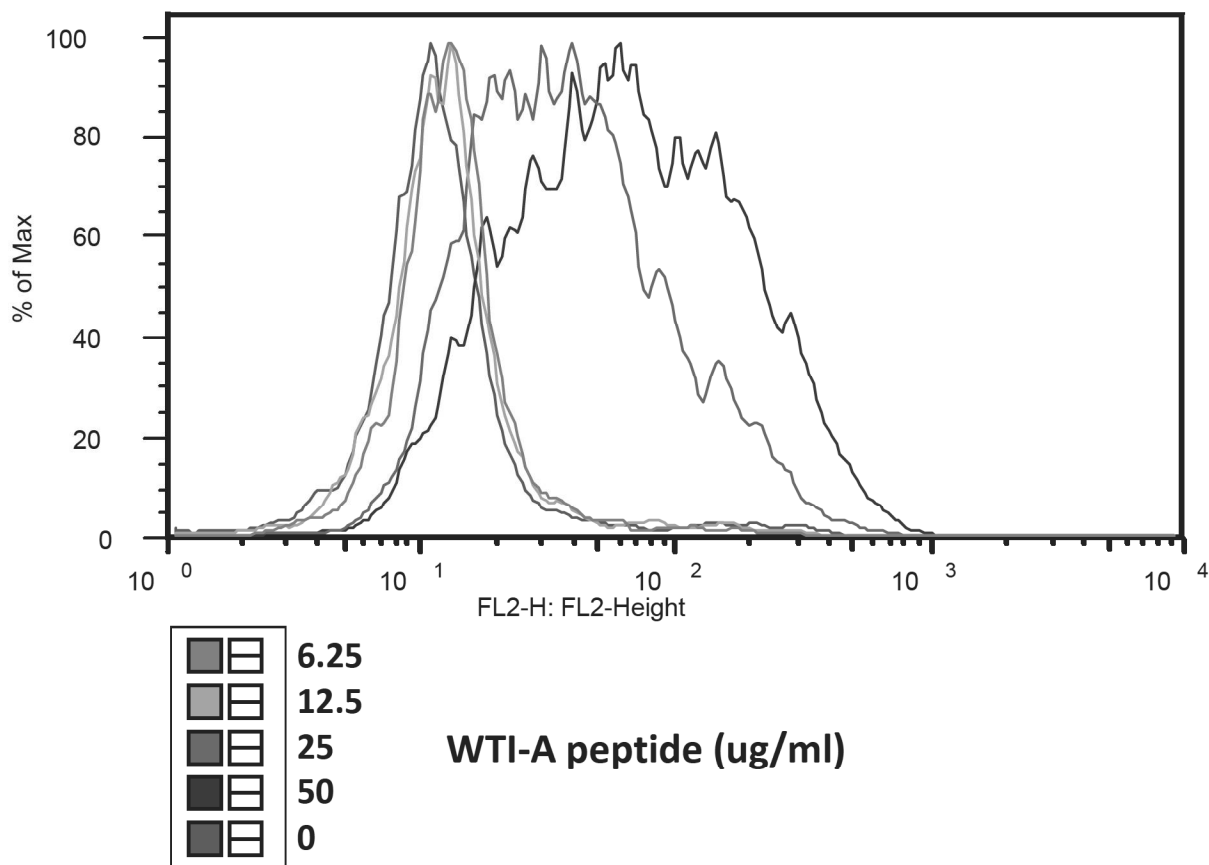


Figure 12

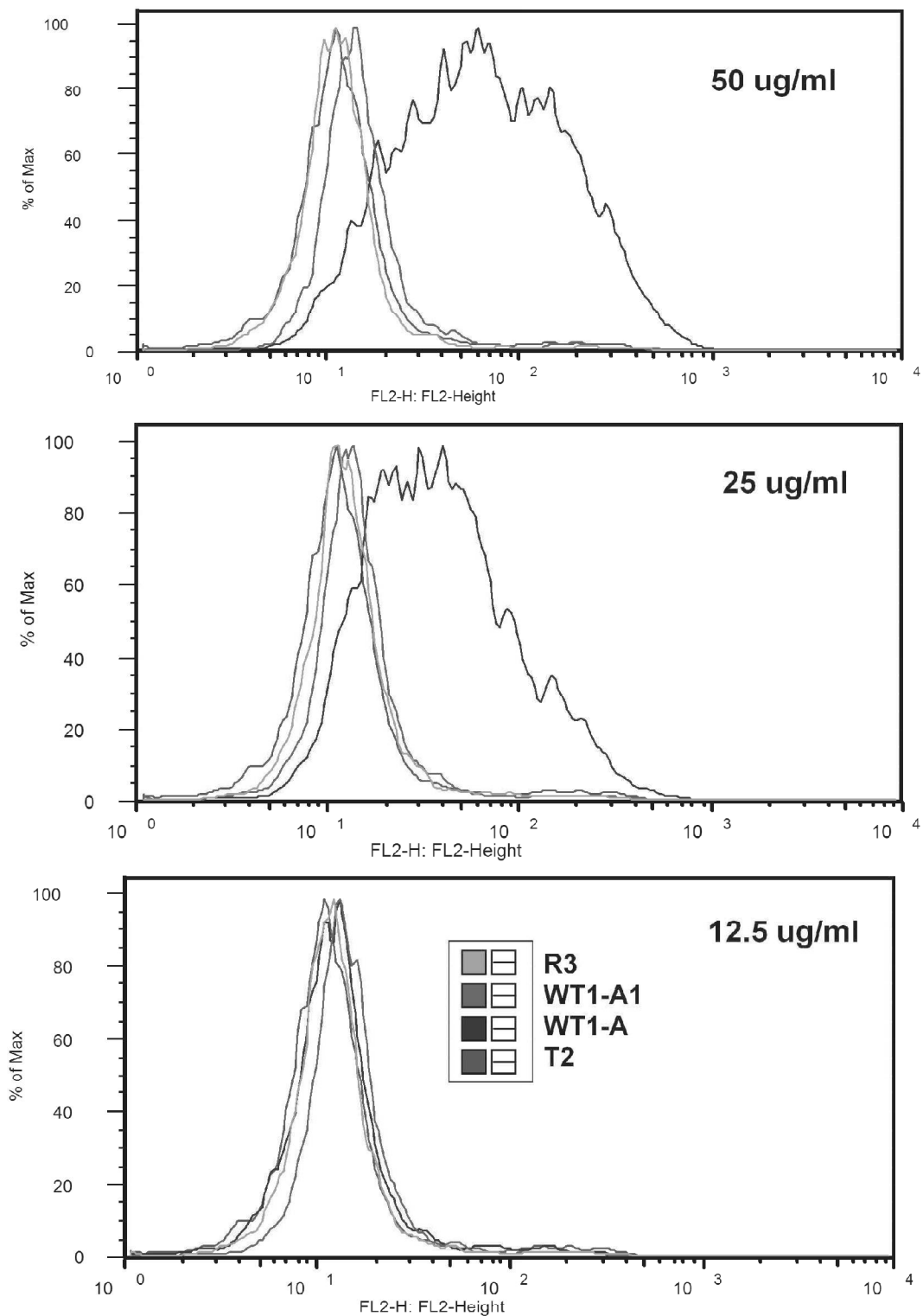
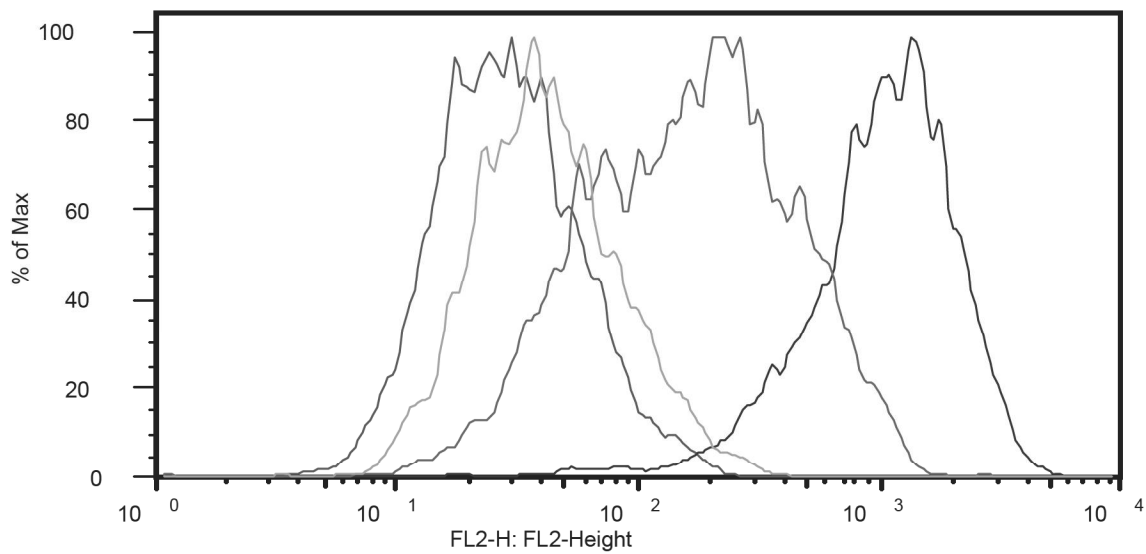
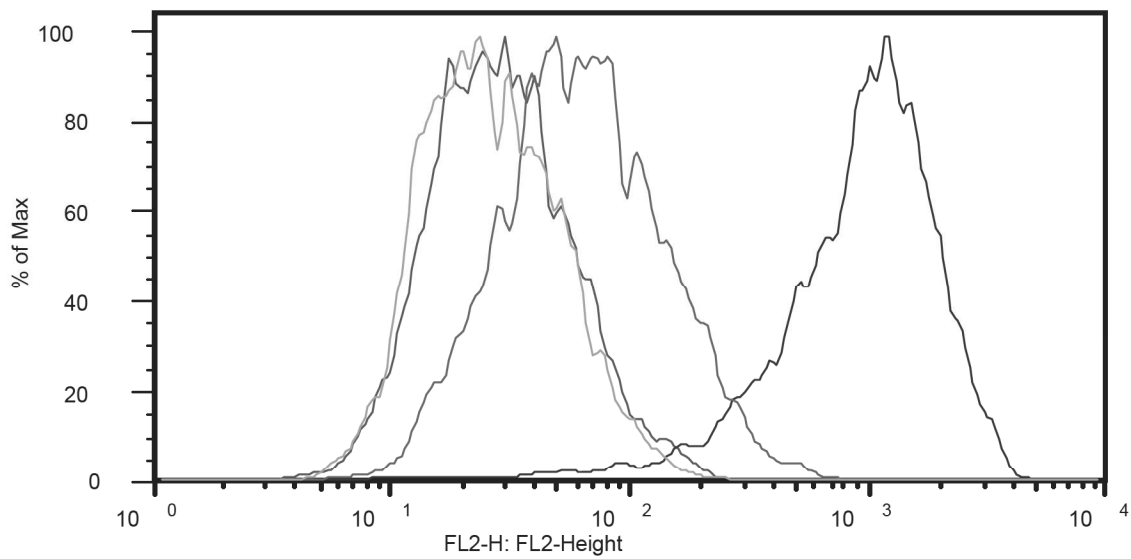


Figure 13



50 ug/ml



25 ug/ml

Figure 14

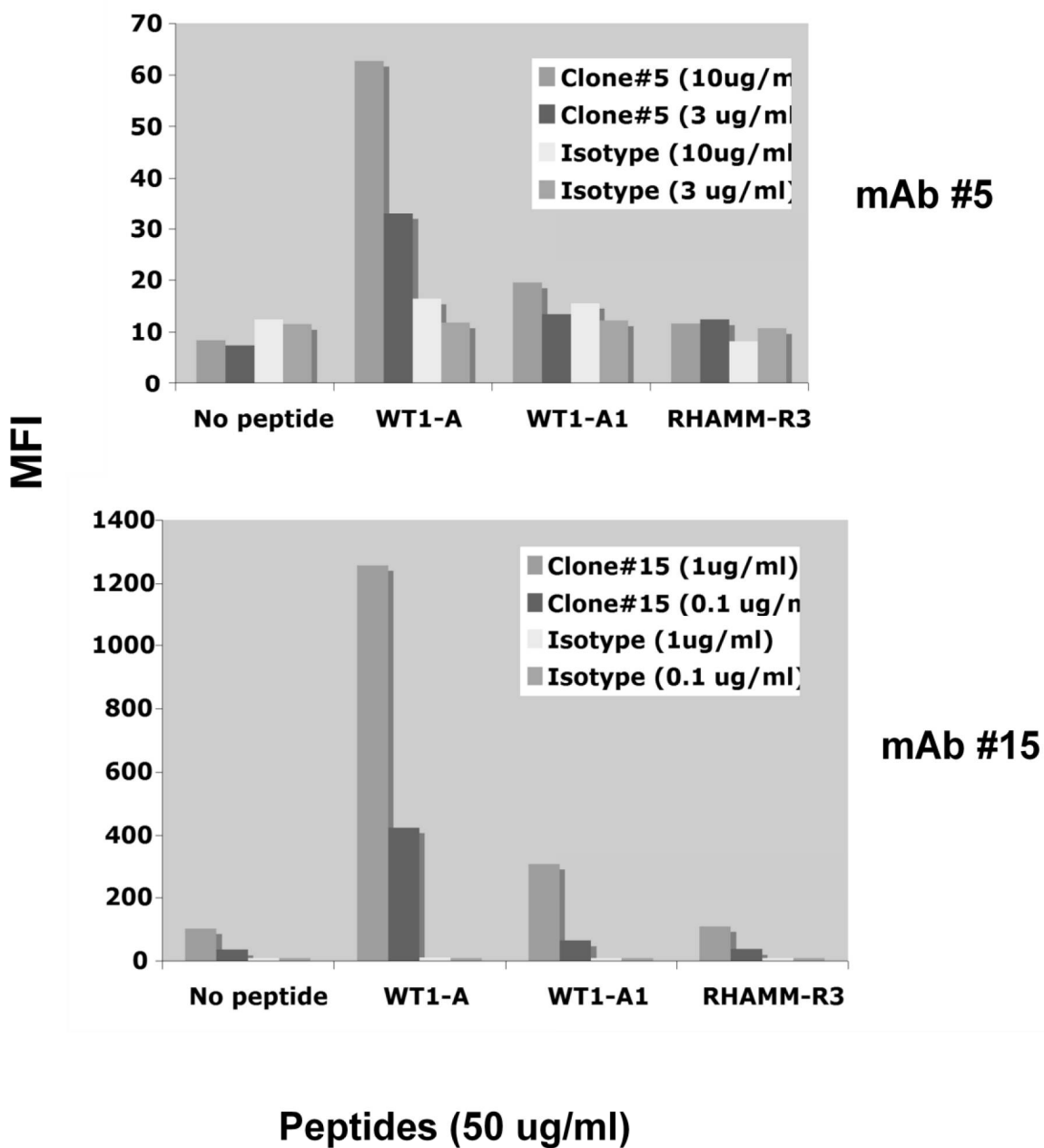
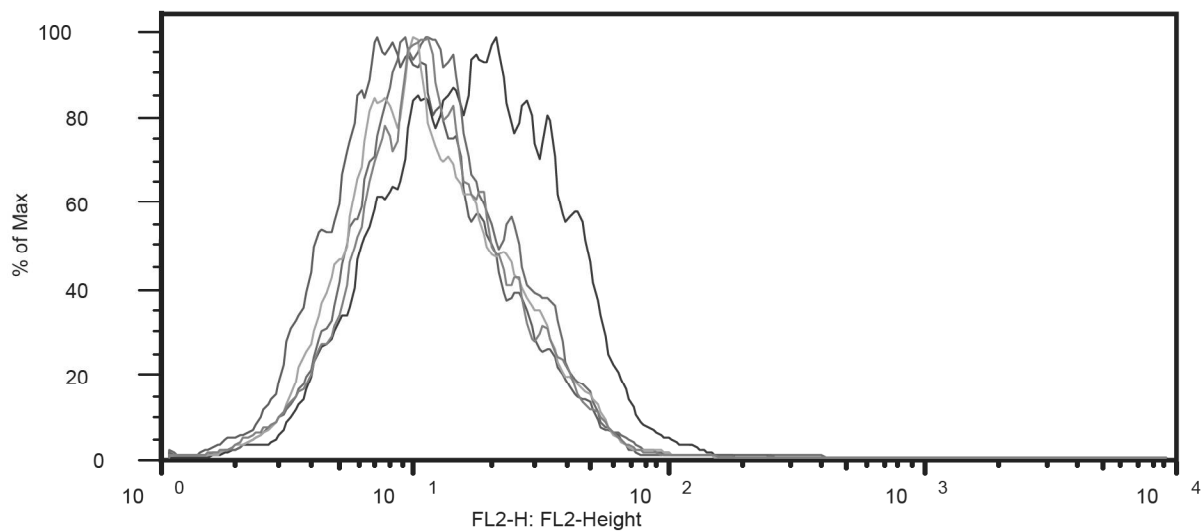


Figure 15

mAb #5



mAb #15

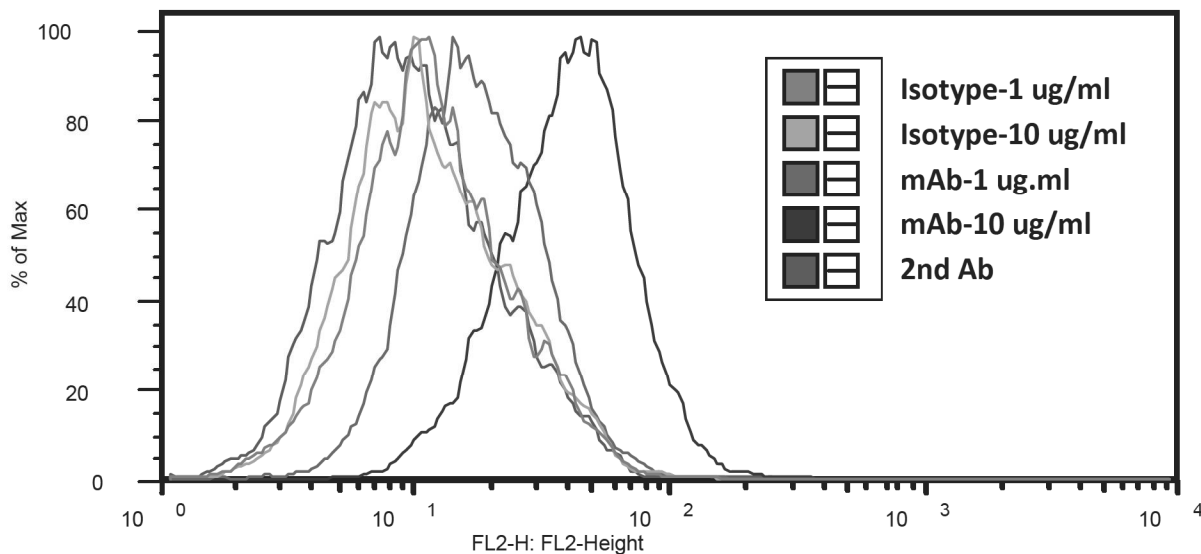


Figure 16

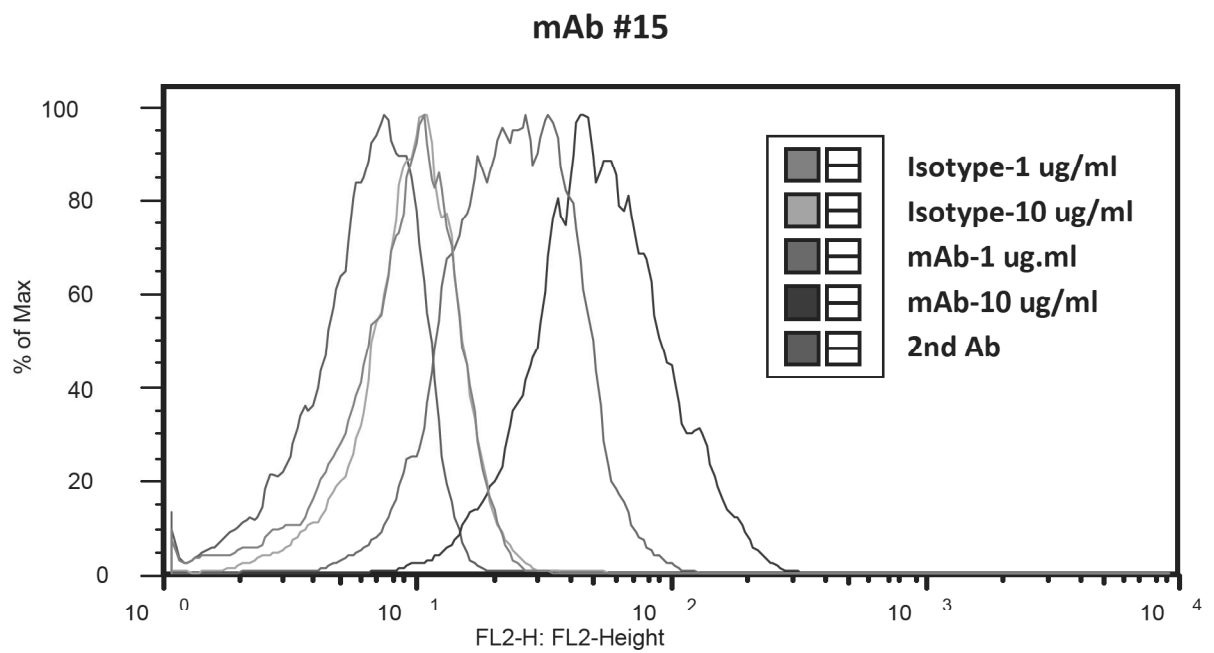


Figure 17

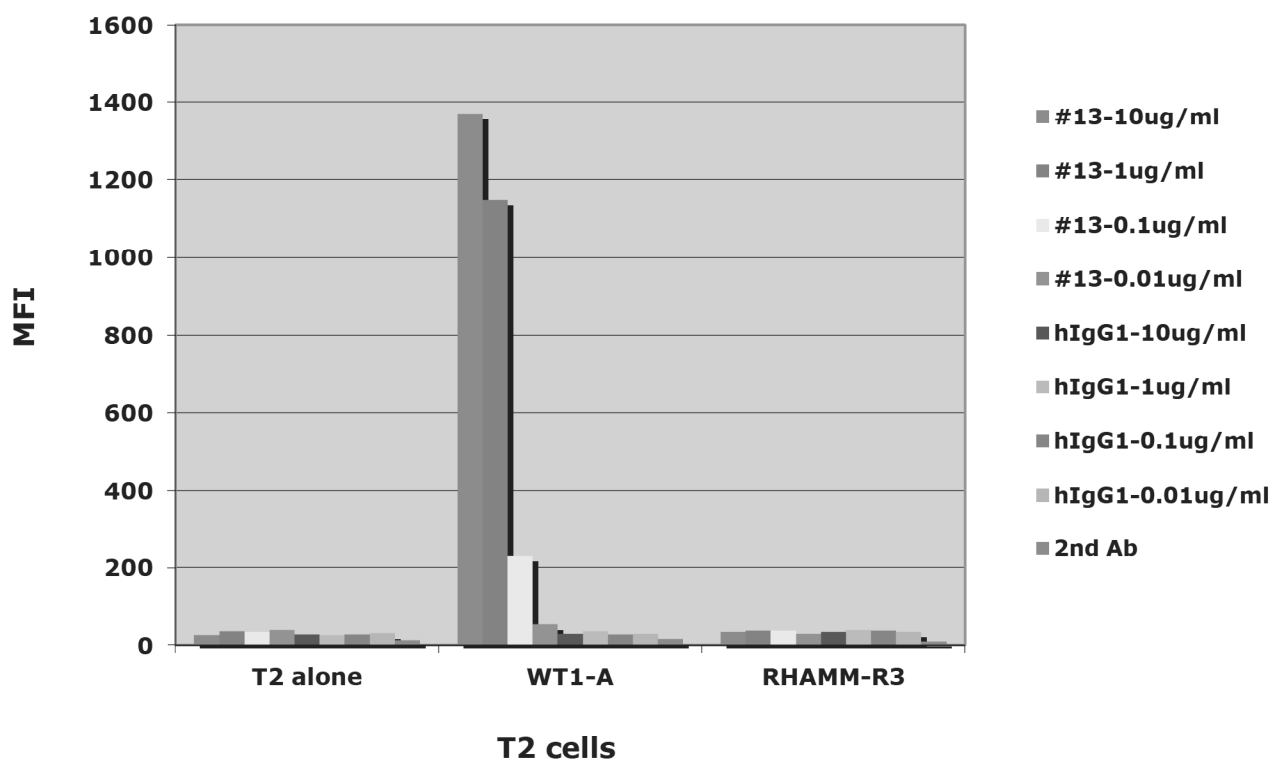


Figure 18

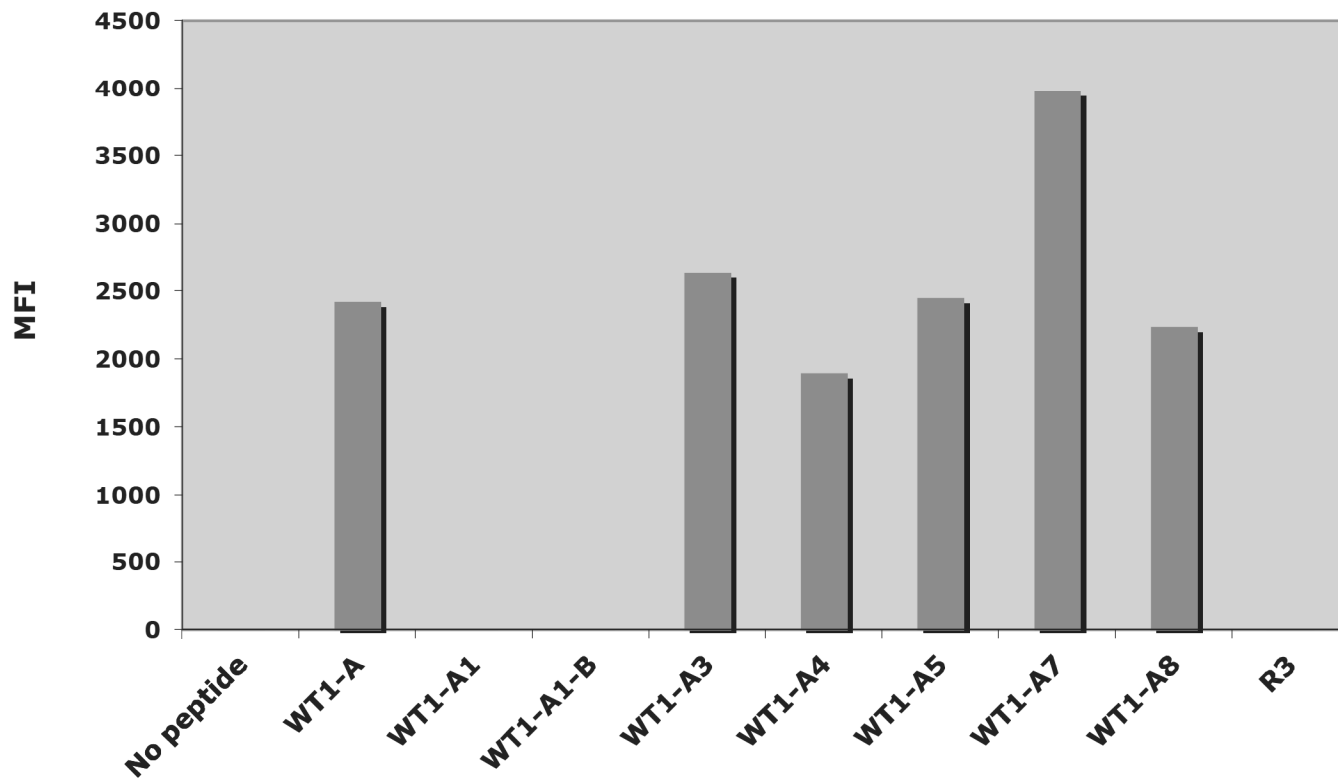


Figure 19

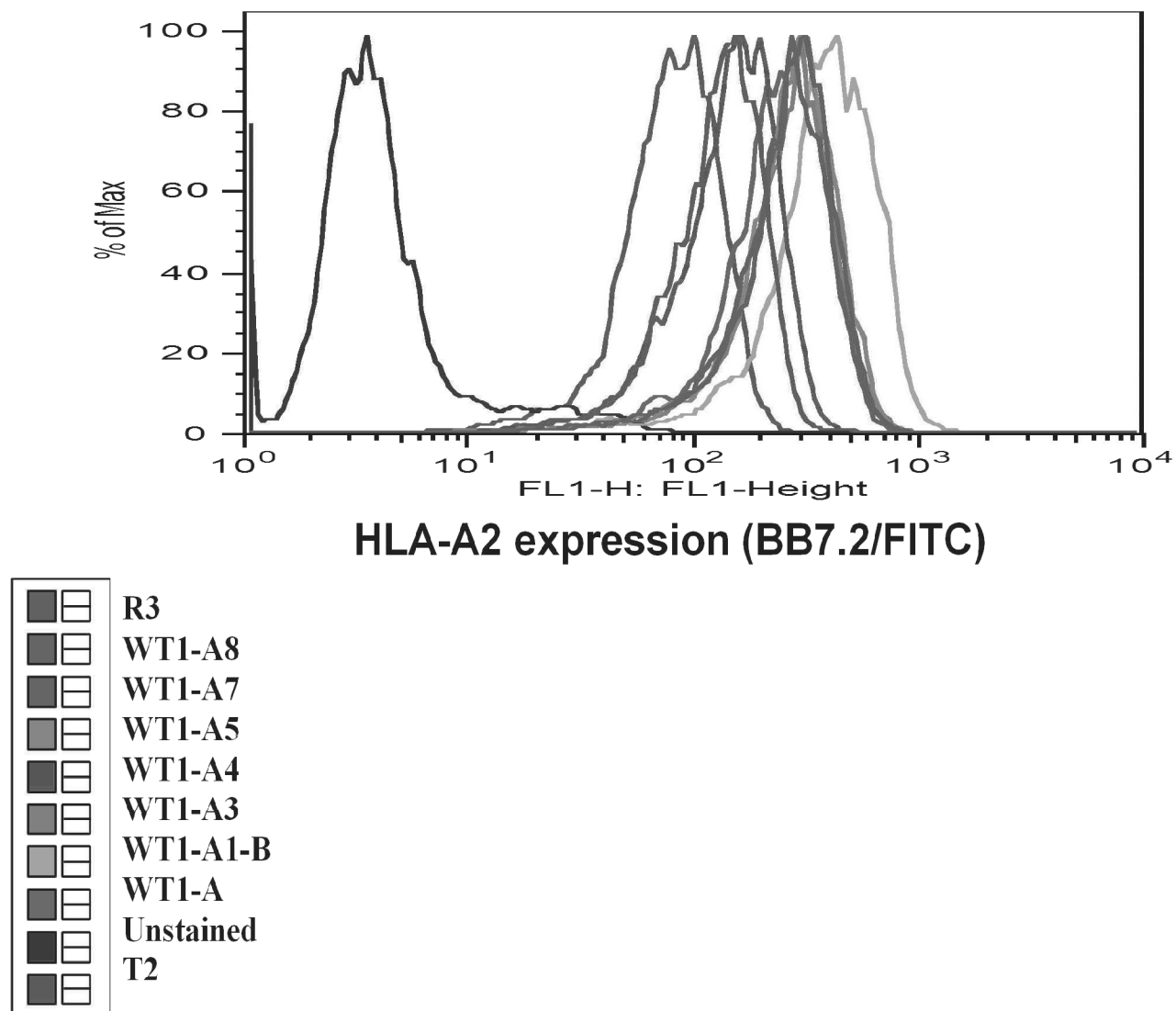


Figure 20

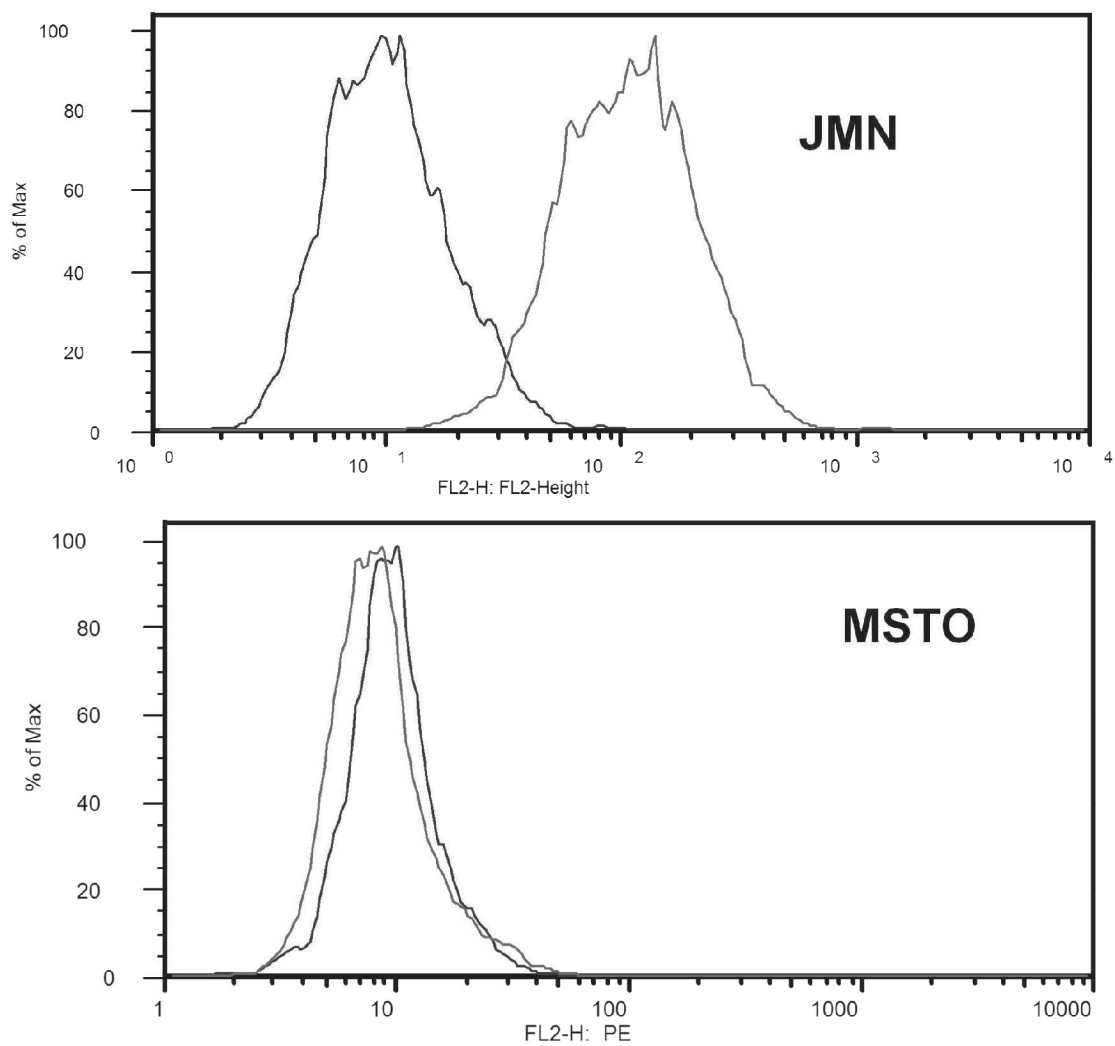


Figure 21

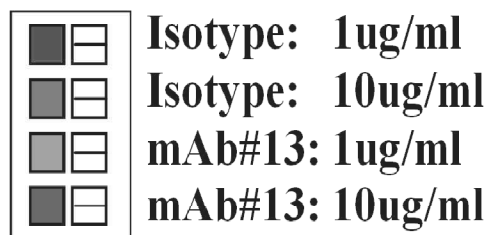
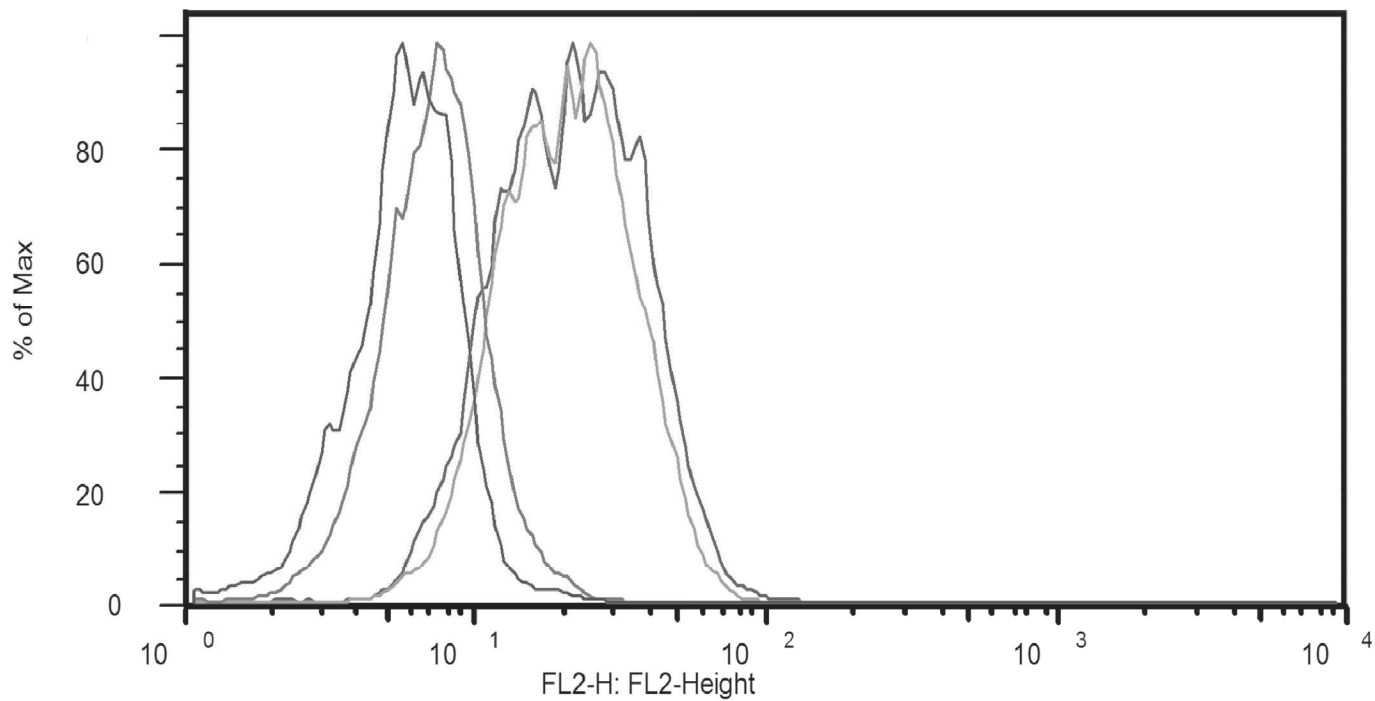


Figure 22

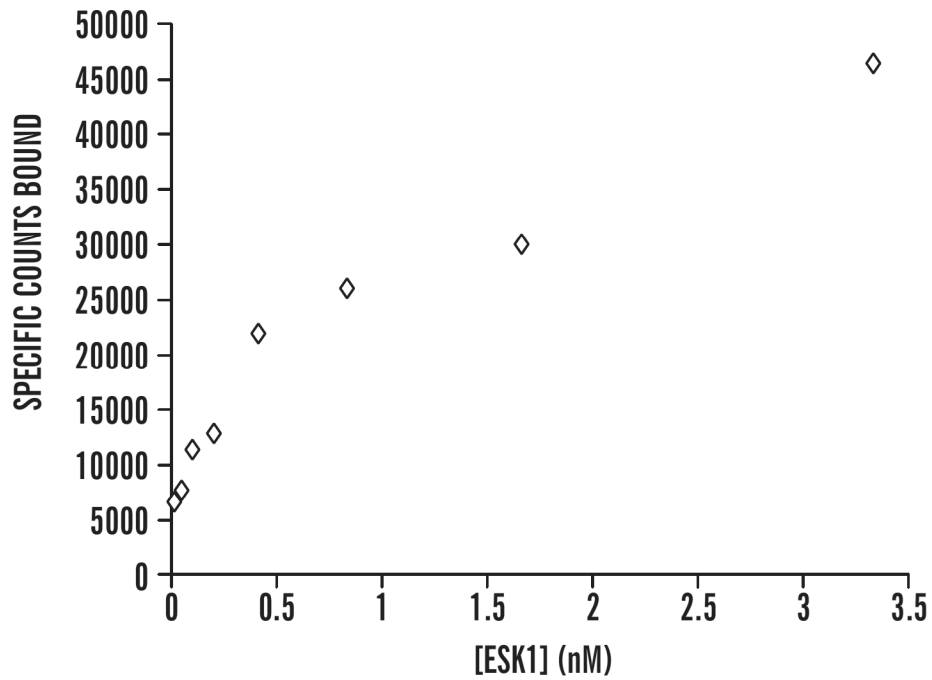


Figure 23

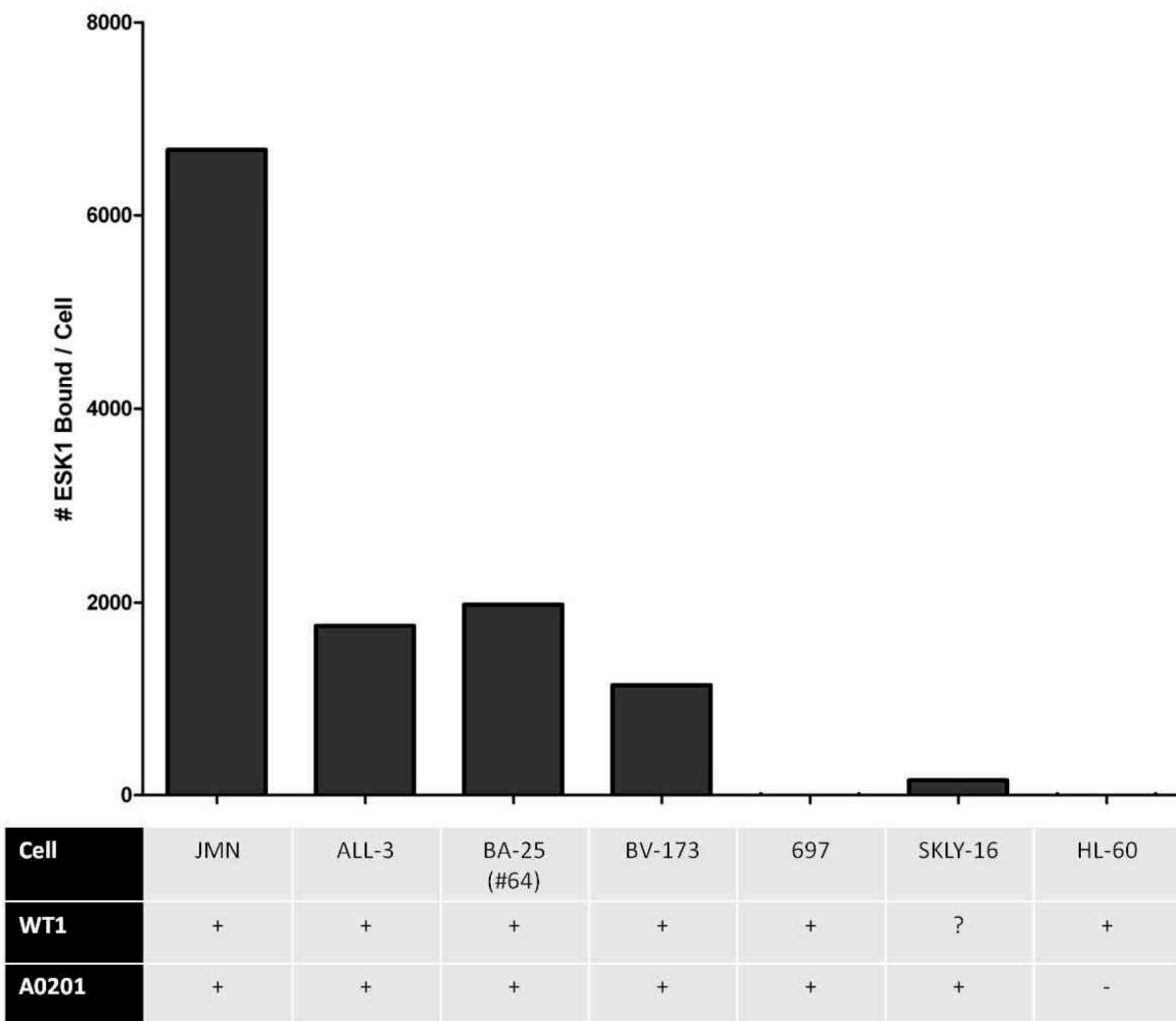


Figure 24

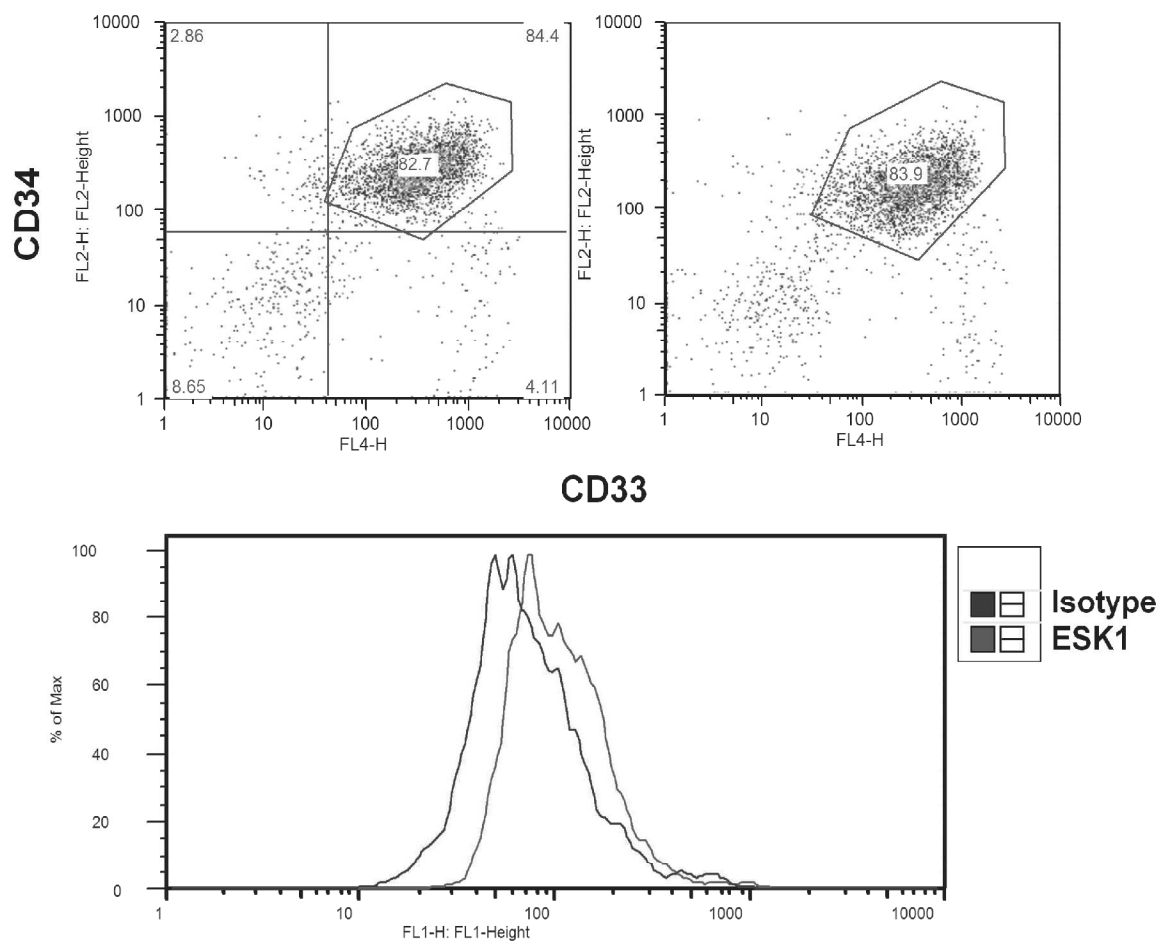


Figure 25

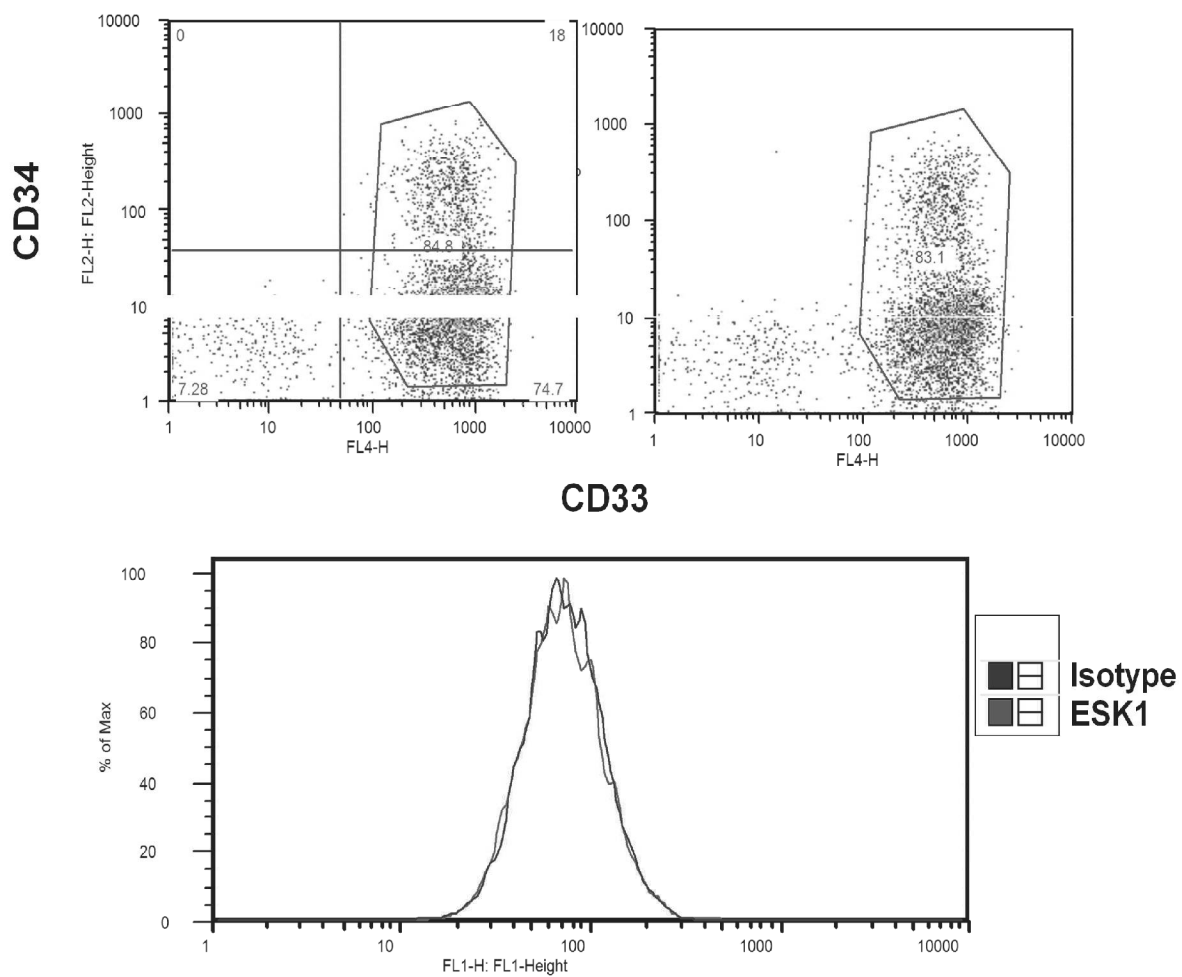


Figure 26

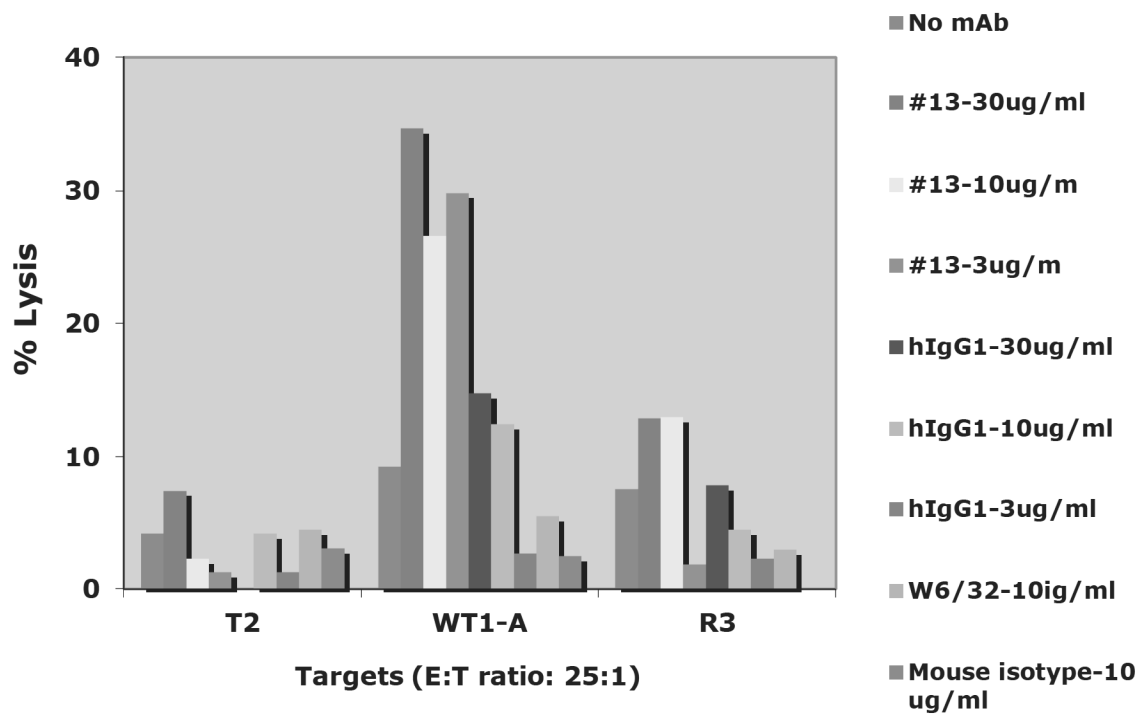


Figure 27

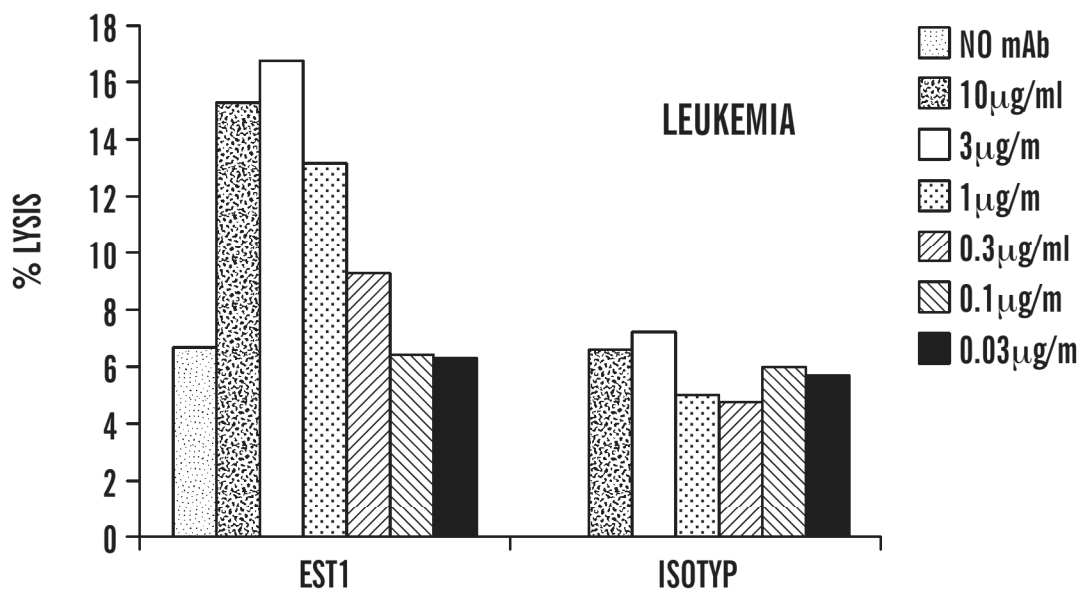
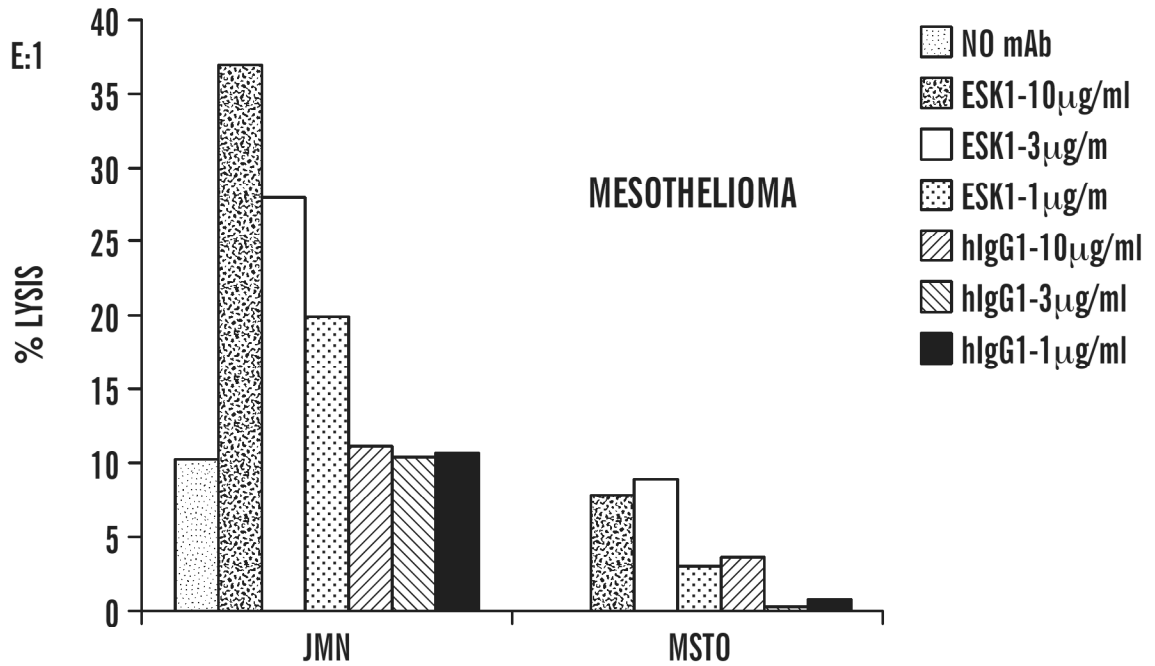


Figure 28

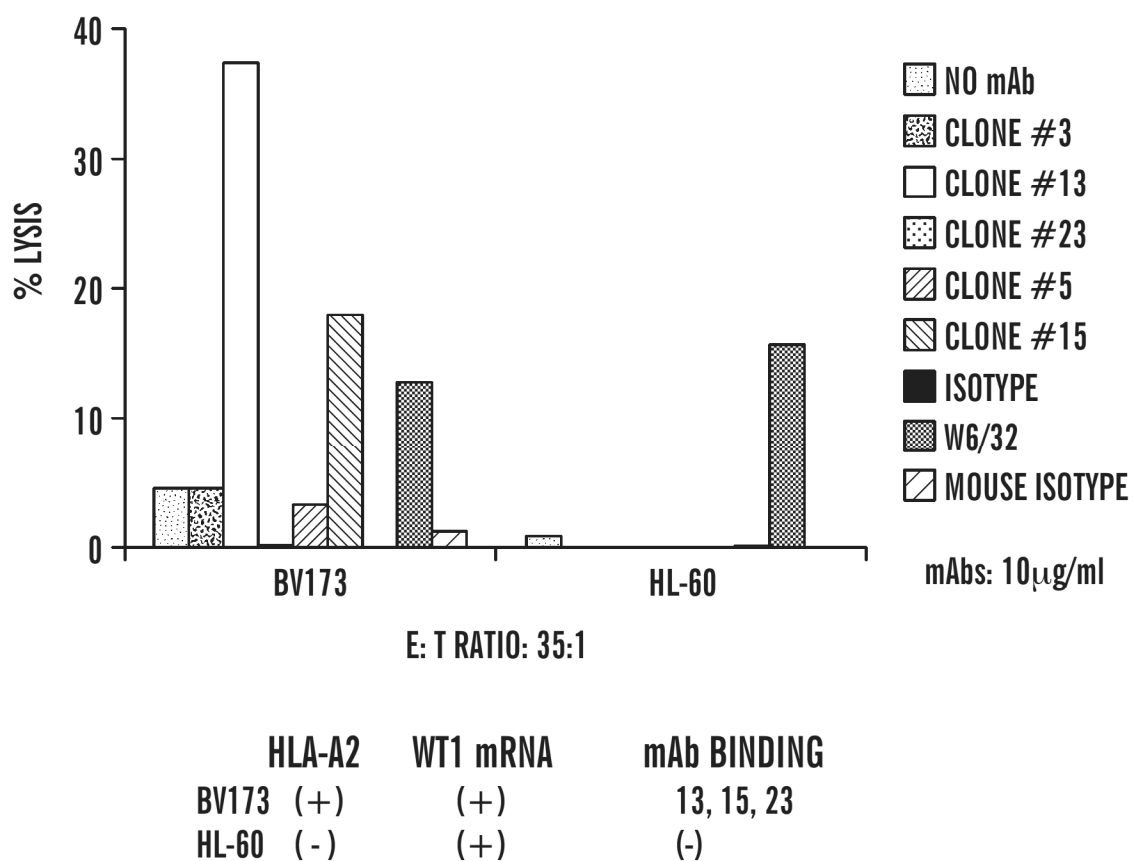


Figure 29

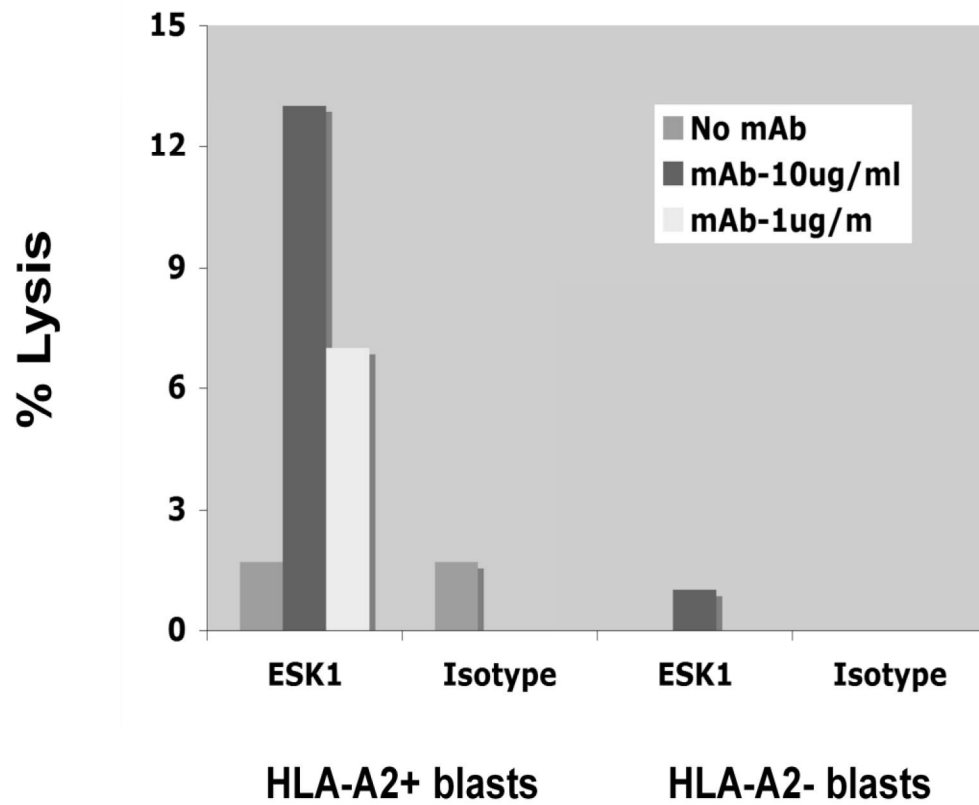


Figure 30

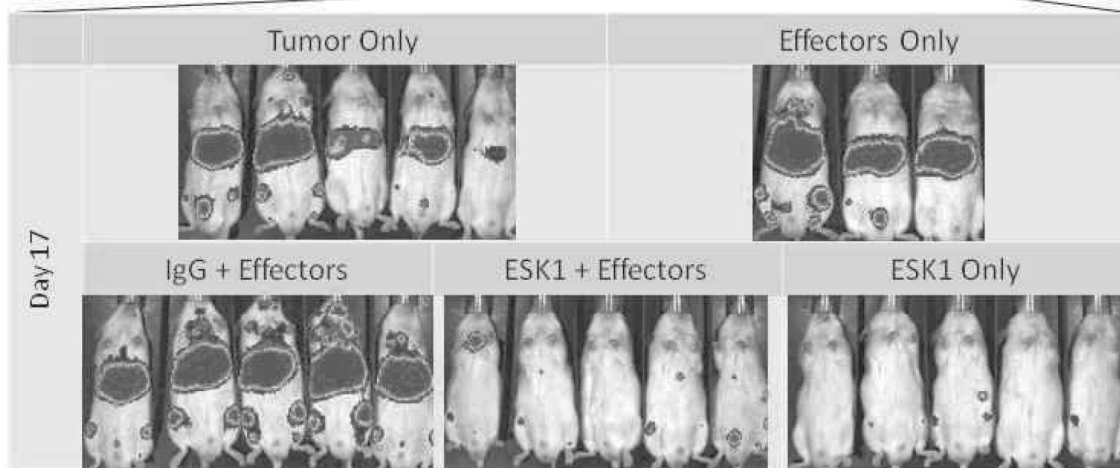
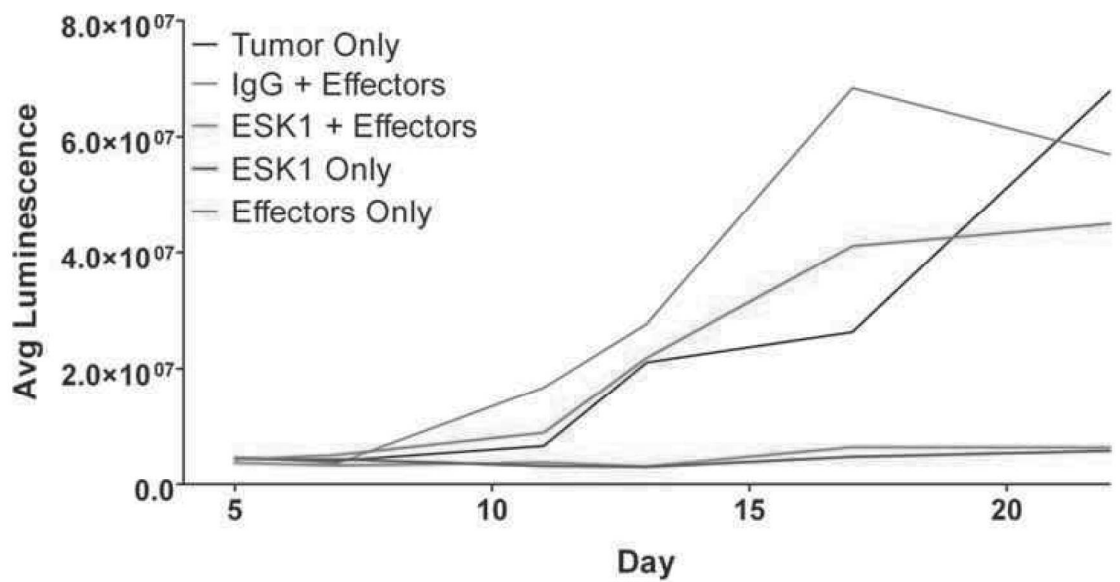


Figure 31

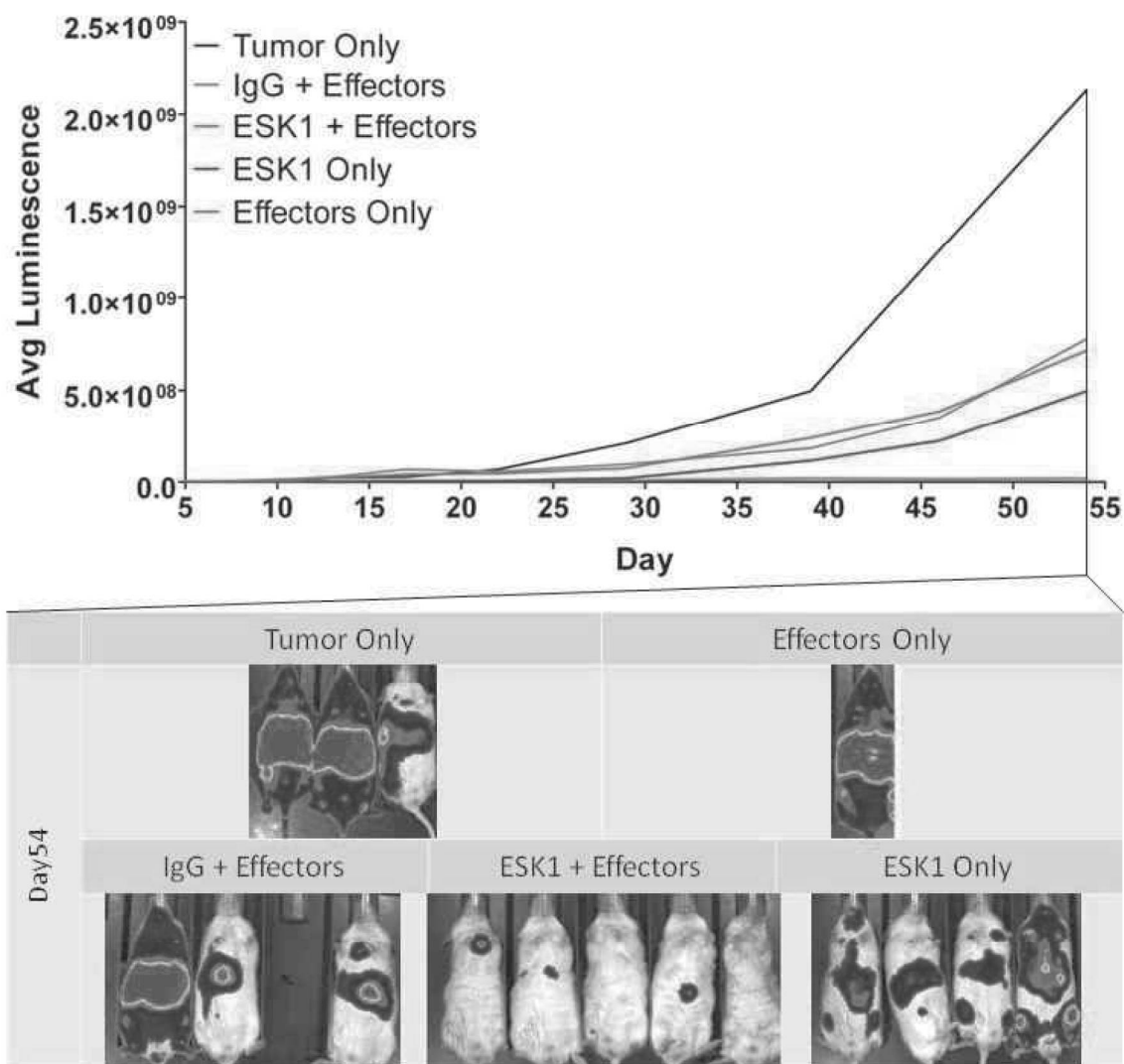


Figure 32

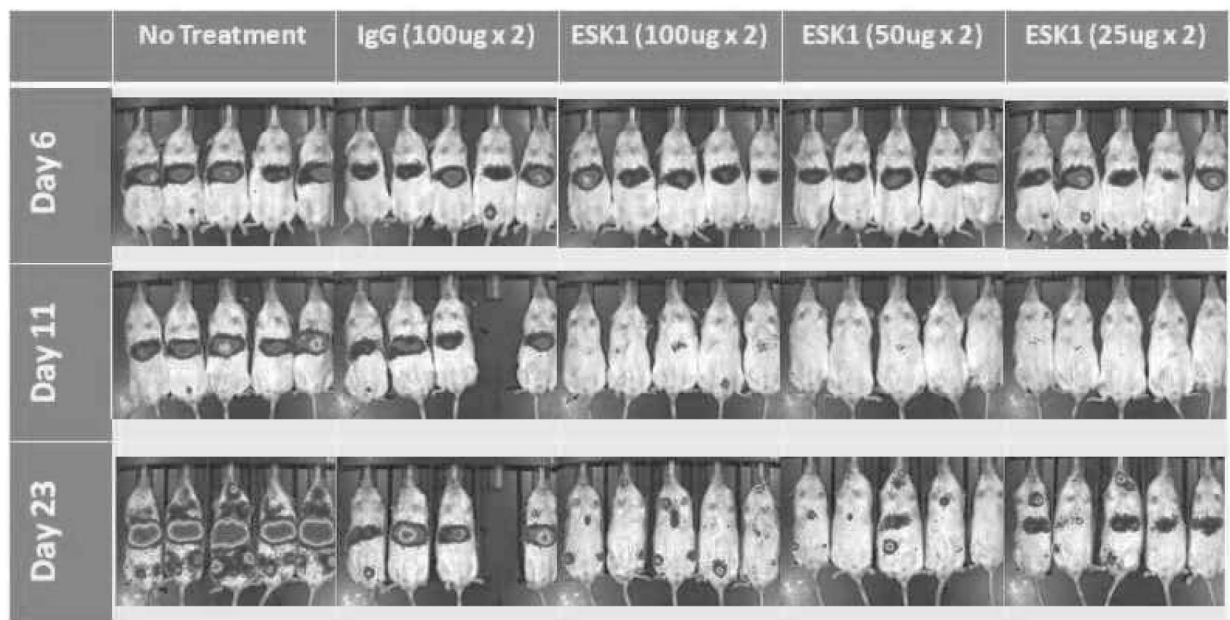


Figure 33

	HEK297-mAbs	CHO-mAbs	Cho-MAGE
No mAb	1	1	1
#13-10ug/ml	1	13	11
#13-3ug/m	8	8	15
#13-1ug/m	3	2	12
#13-0.3ug/ml	0		14
#13-0.1ug/m	3		5
#13-0.03ug/m	0		0
hIgG1-10ug/ml		0	0
hIgG1-3ug/ml		0	0
hIgG1-1ug/ml		0	0
hIgG1-0.3ug/ml			0
hIgG1-0.1ug/ml			2
hIgG1-0.03ug/ml			0

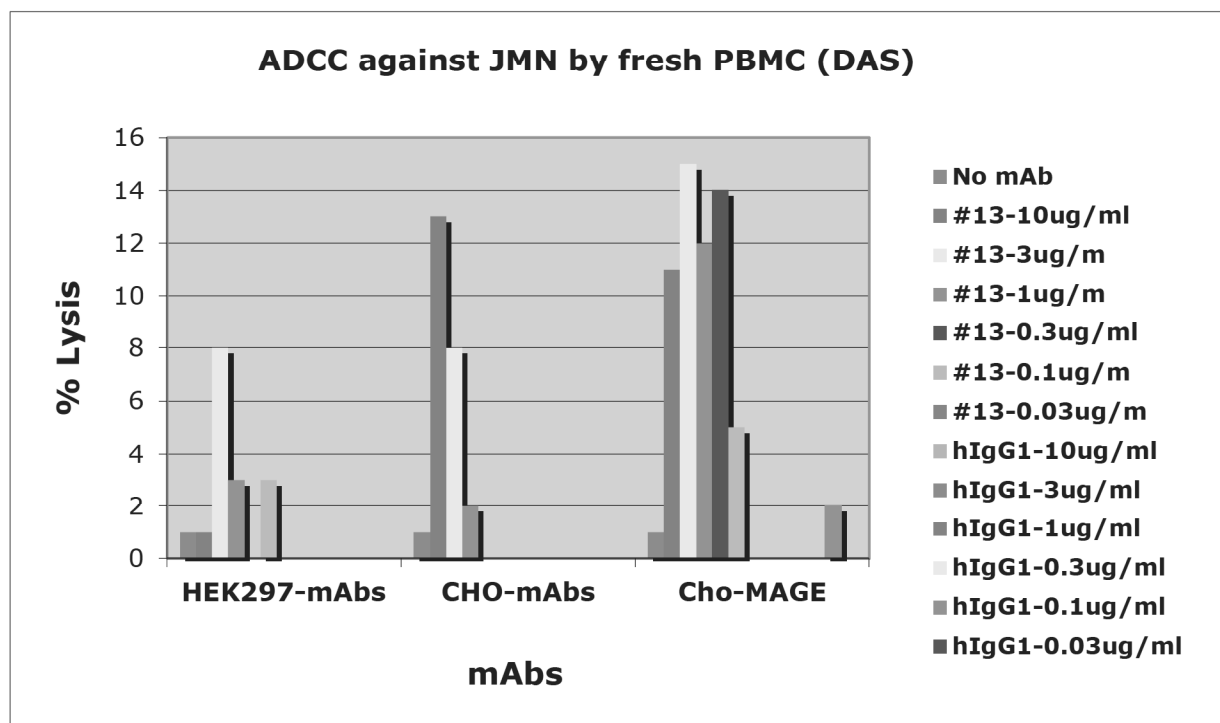


Figure 34

3314.013A-130926-Sequence Listing
SEQUENCE LISTING

<110> Memorial Sloan-Kettering Cancer Center
SCHEINBERG, David A.
DAO, Tao
LIU, Cheng
YAN, Su

<120> ANTIBODIES TO CYTOSOLIC PEPTIDES

<130> 3314.013AWO

<150> 61/470,635

<151> 2011-04-01

<150> 61/491,392

<151> 2011-05-31

<160> 238

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 1

Arg Met Phe Pro Asn Ala Pro Tyr Leu
1 5

<210> 2

<211> 10

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 2

Gly Gly Thr Phe Ser Ser Tyr Ala Ile Ser
1 5 10

<210> 3

<211> 17

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 3

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

Gly

<210> 4

<211> 10

<212> PRT

<213> Homo sapiens

3314.013A-130926-Sequence Listing

<400> 4

Arg Ile Pro Pro Tyr Tyr Gly Met Asp Val
1 5 10

<210> 5
<211> 30
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 5
ggaggcacct tcagcagcta tgctatcagc 30

<210> 6
<211> 51
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 6
gggatcatcc ctatctttgg tacagcaaac tacgcacaga agttccaggg c 51

<210> 7
<211> 30
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 7
cggattcccc cgtactacgg tatggacgtc 30

<210> 8
<211> 13
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 8
Ser Gly Ser Ser Ser Asn Ile Gly Ser Asn Tyr Val Tyr
1 5 10

<210> 9
<211> 7
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 9
Arg Ser Asn Gln Arg Pro Ser
1 5

<210> 10
<211> 11
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 10

3314.013A-130926-Sequence Listing

Ala Ala Trp Asp Asp Ser Leu Asn Gly Val Val
1 5 10

<210> 11
<211> 39
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 11
tctggaagca gctccaacat cggaagtaat tatgtatac 39

<210> 12
<211> 21
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 12
aggagtaatc agcggccctc a 21

<210> 13
<211> 33
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 13
gcagcatggg atgacagcct gaatggtgtg gta 33

<210> 14
<211> 119
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 14
Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ser
1 5 10 15
Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Gly Thr Phe Ser Ser Tyr
20 25 30
Ala Ile Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
35 40 45
Gly Gly Ile Ile Pro Ile Phe Gly Thr Ala Asn Tyr Ala Gln Lys Phe
50 55 60
Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Glu Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80
Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95
Ala Arg Arg Ile Pro Pro Tyr Tyr Gly Met Asp Val Trp Gly Gln Gly

Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 15
<211> 357
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 15
caggtgcagc tgggtgcagtc tggggctgag gtgaagaagc ctgggtcctc ggtgaaggtc 60
tcctgcaagg cttctggagg caccttcagc agctatgcta tcagctgggt gcgacaggcc 120
cctggacaag ggcttgagtg gatgggaggg atcatcccta tctttggtac agcaaaactac 180
gcacagaagt tccagggcag agtcacgatt accgcggacg aatccacgag cacagcctac 240
atggagctga gcagcctgag atctgaggac acggccgtgt attactgtgc gagacggatt 300
ccccgtact acggtatgga cgtctggggc caagggacca cggtcaccgt ctcctca 357

<210> 16
<211> 111
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 16
Gln Thr Val Val Thr Gln Pro Pro Ser Ala Ser Gly Thr Pro Gly Gln
1 5 10 15
Arg Val Thr Ile Ser Cys Ser Gly Ser Ser Ser Asn Ile Gly Ser Asn
20 25 30
Tyr Val Tyr Trp Tyr Gln Gln Leu Pro Gly Thr Ala Pro Lys Leu Leu
35 40 45
Ile Tyr Arg Ser Asn Gln Arg Pro Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser
50 55 60
Gly Ser Lys Ser Gly Thr Ser Ala Ser Leu Ala Ile Ser Gly Pro Arg
65 70 75 80
Ser Val Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ala Ala Trp Asp Asp Ser Leu
85 90 95
Asn Gly Val Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly
100 105 110

<210> 17
<211> 333

3314.013A-130926-Sequence Listing

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 17

```

cagactgtgg tgactcagcc accctcagcg tctgggaccc ccgggcagag ggtcaccatc      60
tcttgttctg gaagcagctc caacatcgga agtaattatg tatactggta ccaacagctc      120
ccaggaacgg cccccaaact cctcatctat aggagtaatc agcggccctc aggggtccct      180
gaccgattct ctggctcaa gtctggcacc tcagcctccc tggccatcag tgggccccgg      240
tccgtggatg aggctgatta ttactgtgca gcatgggatg acagcctgaa tgggtgtgga      300
ttcggcggag ggaccaagct gaccgtccta ggt                                     333

```

<210> 18

<211> 250

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 18

```

Gln Thr Val Val Thr Gln Pro Pro Ser Ala Ser Gly Thr Pro Gly Gln
1          5          10          15

```

```

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

```

```

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

```

```

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

```

```

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

```

```

Ser Val Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ala Ala Trp Asp Asp Ser Leu
85          90          95

```

```

Asn Gly Val Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly Ser
100         105         110

```

```

Arg Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Leu
115         120         125

```

```

Glu Met Ala Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys
130         135         140

```

```

Pro Gly Ser Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Gly Thr Phe
145         150         155         160

```

3314.013A-130926-Sequence Listing

Ser Ser Tyr Ala Ile Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu
165 170 175

Glu Trp Met Gly Gly Ile Ile Pro Ile Phe Gly Thr Ala Asn Tyr Ala
180 185 190

Gln Lys Phe Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Glu Ser Thr Ser
195 200 205

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

Tyr Tyr Cys Ala Arg Arg Ile Pro Pro Tyr Tyr Gly Met Asp Val Trp
225 230 235 240

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

<210> 19
<211> 750
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 19	
cagactgtgg tgactcagcc accctcagcg tctgggaccc ccgggcagag ggtcaccatc	60
tcttgttctg gaagcagctc caacatcgga agtaattatg tatactggta ccaacagctc	120
ccaggaacgg cccccaaact cctcatctat aggagtaatc agcggccctc aggggtccct	180
gaccgattct ctggctcaa gtctggcacc tcagcctccc tggccatcag tgggccccgg	240
tccgtggatg aggctgatta ttactgtgca gcatgggatg acagcctgaa tgggtgtgga	300
ttcggcggag ggaccaagct gaccgtccta ggttctagag gtggtggtgg tagcggcggc	360
ggcggctctg gtggtggatc cctcgagatg gccaggtgc agctggtgca gtctggggct	420
gaggatgaaga agcctgggtc ctcggtgaag gtctcctgca aggcttctgg aggcaccttc	480
agcagctatg ctatcagctg ggtgcgacag gccctggac aagggttga gtggatggga	540
gggatcatcc ctatctttgg tacagcaaac tacgcacaga agttccaggg cagagtcacg	600
attaccgcgg acgaatccac gagcacagcc tacatggagc tgagcagcct gagatctgag	660
gacacggccg tgtattactg tgcgagacgg attccccgt actacggtat ggacgtctgg	720
ggccaaggga ccacggtcac cgtctcctca	750

<210> 20
<211> 12
<212> PRT
<213> Homo sapiens

3314.013A-130926-Sequence Listing

<400> 20

Gly Asp Ser Val Ser Ser Asn Ser Ala Ala Trp Asn
1 5 10

<210> 21

<211> 18

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 21

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

Lys Ser

<210> 22

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 22

Gly Arg Leu Gly Asp Ala Phe Asp Ile
1 5

<210> 23

<211> 36

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 23

ggggacagtg tctctagcaa cagtgctgct tggaac

36

<210> 24

<211> 54

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 24

aggacatact acgggtccaa gtggtataat gattatgcag tatctgtgaa aagt

54

<210> 25

<211> 27

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 25

ggtcgcttag gggatgcttt tgatatc

27

<210> 26

<211> 11

<212> PRT

<213> Homo sapiens

3314.013A-130926-Sequence Listing

<400> 26

Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser Ser Tyr Leu Asn
1 5 10

<210> 27

<211> 7

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 27

Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser
1 5

<210> 28

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 28

Gln Gln Ser Tyr Ser Thr Pro Leu Thr
1 5

<210> 29

<211> 33

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 29

cgggcaagtc agagcattag cagctattta aat

33

<210> 30

<211> 21

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 30

gctgcatcca gtttgcaaag t

21

<210> 31

<211> 27

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 31

caacagagtt acagtacccc tctcact

27

<210> 32

<211> 121

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 32

3314.013A-130926-Sequence Listing

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

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

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

Trp Leu Gly Arg Thr Tyr Tyr Gly Ser Lys Trp Tyr Asn Asp Tyr Ala
50 55 60

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

Gln Phe Ser Leu Gln Leu Asn Ser Val Thr Pro Glu Asp Thr Ala Val
85 90 95

Tyr Tyr Cys Ala Arg Gly Arg Leu Gly Asp Ala Phe Asp Ile Trp Gly
100 105 110

Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 33
<211> 363
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 33
cagggtacagc tgcagcagtc aggtccagga ctggtgaagc cctcgagac cctctcactc 60
acctgtgcca tctccgggga cagtgtctct agcaacagtg ctgcttggaa ctggatcagg 120
cagtcccat cgagaggcct tgagtggctg ggaaggacat actacgggtc caagtggat 180
aatgattatg cagtatctgt gaaaagtcga ataaccatca acccagacac atccaagaac 240
cagttctccc tgcagctgaa ctctgtgact cccgaggaca cggctgtgta ttactgtgca 300
agaggtcgct taggggatgc ttttgatatc tggggccaag ggacaatggt caccgtctct 360
tca 363

<210> 34
<211> 108
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 34
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

3314.013A-130926-Sequence Listing

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

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

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

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

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

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

<210> 35
<211> 324
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 35
gacatccaga tgacccagtc tccatcctcc ctgtctgcat ctgtaggaga cagagtcacc 60
atcacttgcc gggcaagtca gagcattagc agctatttaa attggtatca gcagaaacca 120
gggaaagccc ctaagctcct gatctatgct gcatccagtt tgcaaagtgg ggtcccatca 180
aggttcagtg gcagtggatc tgggacagat ttactctca ccatcagcag tctgcaacct 240
gaagattttg caacttacta ctgtcaacag agttacagta cccctctcac tttcggcgga 300
gggaccaaag tggatatcaa acgt 324

<210> 36
<211> 250
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 36
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

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

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

3314.013A-130926-Sequence Listing

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

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

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

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Asp Ile Lys Arg Ser Arg Gly Gly
100 105 110

Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Leu Glu Met
115 120 125

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

Gln Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ala Ile Ser Gly Asp Ser Val Ser Ser
145 150 155 160

Asn Ser Ala Ala Trp Asn Trp Ile Arg Gln Ser Pro Ser Arg Gly Leu
165 170 175

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

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

Asn Gln Phe Ser Leu Gln Leu Asn Ser Val Thr Pro Glu Asp Thr Ala
210 215 220

Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Gly Arg Leu Gly Asp Ala Phe Asp Ile Trp
225 230 235 240

Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser
245 250

<210> 37
<211> 750
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 37
gacatccaga tgacccagtc tccatcctcc ctgtctgcat ctgtaggaga cagagtcacc 60
atcacttgcc gggcaagtca gagcattagc agctatttaa attggtatca gcagaaacca 120
gggaaagccc ctaagtcct gatctatgct gcatccagtt tgcaaagtgg ggtcccatca 180

3314.013A-130926-Sequence Listing

```

aggttcagtg gcagtggtatc tgggacagat ttcactctca ccatcagcag tctgcaacct      240
gaagatTTTTT caacttacta ctgtcaacag agttacagta CCCCTctcac tttcggcgga      300
gggaccaaag tggatatcaa acgttctaga ggtgggtggtg gtagcggcgg cggcggctct      360
ggtgggtggtg gatccctcga gatggcccag gtacagctgc agcagtcagg tccaggactg      420
gtgaagccct cgcagaccct ctactcacc tgtgccatct ccgggggacag tgtctctagc      480
aacagtgctg cttggaactg gatcaggcag tccccatcga gaggccttga gtggctggga      540
aggacatact acgggtccaa gtggtataat gattatgcag tatctgtgaa aagtcgaata      600
accatcaacc cagacacatc caagaaccag ttctccctgc agctgaactc tgtgactccc      660
gaggacacgg ctgtgtatta ctgtgcaaga ggtcgcttag gggatgcttt tgatatctgg      720
ggccaaggga caatggtcac cgtctcttca      750

```

```

<210> 38
<211> 10
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 38

```

```

Gly Tyr Ser Phe Thr Asn Phe Trp Ile Ser
1           5           10

```

```

<210> 39
<211> 17
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 39

```

```

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

```

Gly

```

<210> 40
<211> 12
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 40

```

```

Val Gln Tyr Ser Gly Tyr Tyr Asp Trp Phe Asp Pro
1           5           10

```

```

<210> 41
<211> 30
<212> DNA
<213> Homo sapiens

```

3314.013A-130926-Sequence Listing

<400> 41
ggatacagct tcaccaactt ctggatcagc 30

<210> 42
<211> 51
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 42
agggttgatc ctggctactc ttatagcacc tacagcccg t ccttccaagg c 51

<210> 43
<211> 36
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 43
gtacaatata gtggctacta tgactgggtc gacccc 36

<210> 44
<211> 13
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 44
Ser Gly Ser Ser Ser Asn Ile Gly Ser Asn Thr Val Asn
1 5 10

<210> 45
<211> 7
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 45
Ser Asn Asn Gln Arg Pro Ser
1 5

<210> 46
<211> 11
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 46
Ala Ala Trp Asp Asp Ser Leu Asn Gly Trp Val
1 5 10

<210> 47
<211> 39
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 47
tctggaagca gctccaacat cggaagtaat actgtaaac 39

3314.013A-130926-Sequence Listing

<210> 48
<211> 21
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 48
agtaataatc agcggccctc a 21

<210> 49
<211> 33
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 49
gcagcatggg atgacagcct gaatgggttg gtg 33

<210> 50
<211> 121
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 50
Gln Met Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Glu Pro Gly Glu
1 5 10 15

Ser Leu Arg Ile Ser Cys Lys Gly Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Asn Phe
20 25 30

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

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

Gln Gly His Val Thr Ile Ser Ala Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

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

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

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 51
<211> 363
<212> DNA
<213> Homo sapiens

3314.013A-130926-Sequence Listing

<400> 51
cagatgcagc tgggtgcagtc cggagcagag gtgaaagagc ccgggggagtc tctgaggatc 60
tcctgtaagg gttctggata cagcttcacc aacttctgga tcagctgggt gcgccagatg 120
cccgggaaaag gcctggagtg gatggggagg gttgacctg gctactctta tagcacctac 180
agcccgtcct tccaaggcca cgtcaccatc tcagctgaca agtctaccag cactgcctac 240
ctgcagtgga acagcctgaa ggcctcggac accgccatgt attactgtgc gagagtacaa 300
tatagtggct actatgactg gttcgacccc tggggccagg gaaccctggt caccgtctcc 360
tca 363

<210> 52
<211> 111
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 52
Gln Ala Val Val Thr Gln Pro Pro Ser Ala Ser Gly Thr Pro Gly Gln
1 5 10 15
Arg Val Thr Ile Ser Cys Ser Gly Ser Ser Ser Asn Ile Gly Ser Asn
20 25 30
Thr Val Asn Trp Tyr Gln Gln Val Pro Gly Thr Ala Pro Lys Leu Leu
35 40 45
Ile Tyr Ser Asn Asn Gln Arg Pro Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser
50 55 60
Gly Ser Lys Ser Gly Thr Ser Ala Ser Leu Ala Ile Ser Gly Leu Gln
65 70 75 80
Ser Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ala Ala Trp Asp Asp Ser Leu
85 90 95
Asn Gly Trp Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly
100 105 110

<210> 53
<211> 333
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 53
caggctgtgg tgactcagcc accctcagcg tctgggaccc ccgggcagag ggtcaccatc 60
tcttgttctg gaagcagctc caacatcgga agtaatactg taaactggta ccagcaggtc 120
ccaggaacgg cccccaaaact cctcatctat agtaataatc agcgggccctc aggggtccct 180

3314.013A-130926-Sequence Listing

gaccgattct ctggctccaa gtctggcacc tcagcctccc tggccatcag tgggctccag 240
tctgaggatg aggctgatta ttactgtgca gcatgggatg acagcctgaa tggttgggtg 300
ttcggcggag ggaccaagct gaccgtccta ggt 333

<210> 54
<211> 253
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 54

Gln Ala Val Val Thr Gln Pro Pro Ser Ala Ser Gly Thr Pro Gly Gln
1 5 10 15

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

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

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

Gly Ser Lys Ser Gly Thr Ser Ala Ser Leu Ala Ile Ser Gly Leu Gln
65 70 75 80

Ser Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ala Ala Trp Asp Asp Ser Leu
85 90 95

Asn Gly Trp Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly Ser
100 105 110

Arg Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser
115 120 125

Leu Glu Met Ala Gln Met Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys
130 135 140

Glu Pro Gly Glu Ser Leu Arg Ile Ser Cys Lys Gly Ser Gly Tyr Ser
145 150 155 160

Phe Thr Asn Phe Trp Ile Ser Trp Val Arg Gln Met Pro Gly Lys Gly
165 170 175

Leu Glu Trp Met Gly Arg Val Asp Pro Gly Tyr Ser Tyr Ser Thr Tyr
180 185 190

3314.013A-130926-Sequence Listing

Ser Pro Ser Phe Gln Gly His Val Thr Ile Ser Ala Asp Lys Ser Thr
195 200 205

Ser Thr Ala Tyr Leu Gln Trp Asn Ser Leu Lys Ala Ser Asp Thr Ala
210 215 220

Met Tyr Tyr Cys Ala Arg Val Gln Tyr Ser Gly Tyr Tyr Asp Trp Phe
225 230 235 240

Asp Pro Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
245 250

<210> 55
<211> 759
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 55
caggctgtgg tgactcagcc accctcagcg tctgggaccc ccgggcagag ggtcaccatc 60
tcttgttctg gaagcagctc caacatcgga agtaatactg taaactggta ccagcaggtc 120
ccaggaacgg cccccaaact cctcatctat agtaataatc agcggccctc aggggtccct 180
gaccgattct ctggctcaa gtctggcacc tcagcctccc tggccatcag tgggctccag 240
tctgaggatg aggctgatta ttactgtgca gcatgggatg acagcctgaa tggttgggtg 300
ttcggcggag ggaccaagct gaccgtccta ggttctagag gtggtggtgg tagcggcggc 360
ggcggctctg gtggtggtgg atccctcgag atggcccaga tgcagctggt gcagtccgga 420
gcagaggtga aagagcccgg ggagtctctg aggatctcct gtaagggttc tggatacagc 480
ttcaccaact tctggatcag ctgggtgcg cagatgcccg ggaaaggcct ggagtggatg 540
gggaggggtg atcctggcta ctcttatagc acctacagcc cgtccttcca aggccacgtc 600
accatctcag ctgacaagtc taccagcact gcctacctgc agtggaacag cctgaaggcc 660
tcggacaccg ccatgtatta ctgtgcgaga gtacaatata gtggctacta tgactgggtc 720
gaccctggg gccagggaac cctggtcacc gtctcctca 759

<210> 56
<211> 10
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 56

Gly Tyr Asn Phe Ser Asn Lys Trp Ile Gly
1 5 10

<210> 57
<211> 17
<212> PRT

3314.013A-130926-Sequence Listing

<213> Homo sapiens

<400> 57

Ile Ile Tyr Pro Gly Tyr Ser Asp Ile Thr Tyr Ser Pro Ser Phe Gln
1 5 10 15

Gly

<210> 58

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 58

His Thr Ala Leu Ala Gly Phe Asp Tyr
1 5

<210> 59

<211> 30

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 59

ggctacaact ttagcaacaa gtggatcggc 30

<210> 60

<211> 51

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 60

atcatctatc ccggttactc ggacatcacc tacagcccggt ccttccaagg c 51

<210> 61

<211> 27

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 61

cacacagctt tggccggctt tgactac 27

<210> 62

<211> 11

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 62

Arg Ala Ser Gln Asn Ile Asn Lys Trp Leu Ala
1 5 10

<210> 63

<211> 7

3314.013A-130926-Sequence Listing

<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 63

Lys Ala Ser Ser Leu Glu Ser
1 5

<210> 64
<211> 8
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 64

Gln Gln Tyr Asn Ser Tyr Ala Thr
1 5

<210> 65
<211> 33
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 65
cgggccagtc agaatatcaa taagtggctg gcc 33

<210> 66
<211> 21
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 66
aaggcgtcta gtttagaaaag t 21

<210> 67
<211> 24
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 67
caacaatata atagttatgc gacg 24

<210> 68
<211> 118
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 68

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

Ser Leu Lys Ile Ser Cys Lys Gly Ser Gly Tyr Asn Phe Ser Asn Lys
20 25 30

Trp Ile Gly Trp Val Arg Gln Leu Pro Gly Arg Gly Leu Glu Trp Ile
Página 19

3314.013A-130926-Sequence Listing

35

40

45

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

Gln Gly Arg Val Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser Ile Asn Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Leu His Trp His Ser Leu Lys Ala Ser Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys
85 90 95

Val Arg His Thr Ala Leu Ala Gly Phe Asp Tyr Trp Gly Leu Gly Thr
100 105 110

Leu Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 69
<211> 354
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 69
cagggtgcagc tgggtgcagtc tggagcagag gtgaaaaagc ccggagagtc tctgaagatc 60
tcctgtaagg gttctggcta caactttagc aacaagtgga tcggctgggt gcgccaattg 120
cccgggagag gcctggagtg gatagcaatc atctatcccg gttactcgga catcacctac 180
agccccgtcct tccaaggccg cgtcaccatc tccgccgaca cgtccattaa caccgcctac 240
ctgcactggc acagcctgaa ggcctcggac accgccatgt attattgtgt gcgacacaca 300
gctttggccg gctttgacta ctggggcctg ggcaccctgg tcaccgtctc ctca 354

<210> 70
<211> 107
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 70

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

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

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

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

3314.013A-130926-Sequence Listing

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

Asp Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Asn Ser Tyr Ala Thr
85 90 95

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

<210> 71
<211> 321
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 71
gacatccaga tgacccagtc tccttcacc ctgtctgcat ctgtaggaga cagagtcaca 60
atcacttgcc gggccagtca gaatatcaat aagtggctgg cctggtatca gcagagacca 120
gggaaagccc ctcagctcct gatctataag gcgtctagtt tagaaagtgg ggtcccatct 180
aggttcagcg gcagtggatc tgggacagaa tacactctca ccatcagcag cctgcagcct 240
gatgattttg caacttatta ctgccaacaa tataatagtt atgcgacggt cgccaaggg 300
accaaggtgg aaatcaaacg t 321

<210> 72
<211> 246
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 72
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Thr Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

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

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

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

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

Asp Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Asn Ser Tyr Ala Thr
85 90 95

3314.013A-130926-Sequence Listing

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

Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Leu Glu Met Ala
115 120 125

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Glu
130 135 140

Ser Leu Lys Ile Ser Cys Lys Gly Ser Gly Tyr Asn Phe Ser Asn Lys
145 150 155 160

Trp Ile Gly Trp Val Arg Gln Leu Pro Gly Arg Gly Leu Glu Trp Ile
165 170 175

Ala Ile Ile Tyr Pro Gly Tyr Ser Asp Ile Thr Tyr Ser Pro Ser Phe
180 185 190

Gln Gly Arg Val Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser Ile Asn Thr Ala Tyr
195 200 205

Leu His Trp His Ser Leu Lys Ala Ser Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys
210 215 220

Val Arg His Thr Ala Leu Ala Gly Phe Asp Tyr Trp Gly Leu Gly Thr
225 230 235 240

Leu Val Thr Val Ser Ser
245

<210> 73
<211> 738
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 73
gacatccaga tgacccagtc tccttccacc ctgtctgcat ctgtaggaga cagagtcaca 60
atcacttgcc gggccagtca gaatatcaat aagtggctgg cctggatatca gcagagacca 120
gggaaagccc ctgagctcct gatctataag gcgtctagtt tagaaagtgg ggtcccatct 180
aggttcagcg gcagtggatc tgggacagaa tacactctca ccatcagcag cctgcagcct 240
gatgattttg caacttatta ctgccaacaa tataatagtt atgcgacggt cgccaaggg 300
accaaggtgg aaatcaaacg ttctagaggt ggtggtggta gcggcggcgg cggtcttggt 360
ggtggtggat ccctcgagat ggcccaggtg cagctggtgc agtctggagc agaggtgaaa 420
aagcccggag agtctctgaa gatctcctgt aagggttctg gctacaactt tagcaacaag 480

3314.013A-130926-Sequence Listing

tggatcggct ggggtgcgcca attgcccggg agaggcctgg agtggatagc aatcatctat 540
cccgggttact cggacatcac ctacagcccg tccttccaag gccgcgtcac catctccgcc 600
gacacgtcca ttaacaccgc ctacctgcac tggcacagcc tgaaggcctc ggacaccgcc 660
atgtattatt gtgtgcgaca cacagctttg gccggctttg actactgggg cctggggcacc 720
ctgggtcaccg tctcctca 738

<210> 74
<211> 10
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 74

Gly Phe Thr Phe Asp Asp Tyr Gly Met Ser
1 5 10

<210> 75
<211> 17
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 75

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

Gly

<210> 76
<211> 12
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 76

Glu Arg Gly Tyr Gly Tyr His Asp Pro His Asp Tyr
1 5 10

<210> 77
<211> 30
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 77
gggttcacct ttgatgatta tggcatgagc 30

<210> 78
<211> 51
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 78

3314.013A-130926-Sequence Listing
 ggtattaatt ggaatggtgg tagcacaggt tatgcagact ctgtgagggg c 51

<210> 79
 <211> 36
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<400> 79
 gagcgtggct acgggtacca tgatcccat gactac 36

<210> 80
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 80
 Gly Arg Asn Asn Ile Gly Ser Lys Ser Val His
 1 5 10

<210> 81
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 81
 Asp Asp Ser Asp Arg Pro Ser
 1 5

<210> 82
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 82
 Gln Val Trp Asp Ser Ser Ser Asp His Val Val
 1 5 10

<210> 83
 <211> 33
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<400> 83
 gggagaaaca acattggaag taaaagtgtg cac 33

<210> 84
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<400> 84
 gatgatagcg accggccctc a 21

3314.013A-130926-Sequence Listing

<210> 85
<211> 33
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 85
caggtgtggg atagtagtag tgatcatgtg gta

33

<210> 86
<211> 121
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 86

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

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

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

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

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

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

Ala Arg Glu Arg Gly Tyr Gly Tyr His Asp Pro His Asp Tyr Trp Gly
100 105 110

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 87
<211> 363
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 87
gaagtgcagc tgggtgcagtc tgggggaggt gtggtacggc ctgggggggtc cctgagactc 60
tcctgtgcag cctctggggtt cacctttgat gattatggca tgagctgggt ccgccaagct 120
ccagggaagg ggctggagtg ggtctctggt attaattgga atgggtggtag cacagggttat 180
gcagactctg tgagggggccg attcaccatc tccagagaca acgccaagaa ctccctgtat 240
ctgcaaatga acagtctgag agccgaggac acggccttgt attactgtgc gagagagcgt 300

3314.013A-130926-Sequence Listing

ggctacgggt accatgatcc ccatgactac tggggccaag gcaccctggt gaccgtctcc 360
tca 363

<210> 88
<211> 109
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 88

Gln Ser Val Val Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Val Ala Pro Gly Lys
1 5 10 15

Thr Ala Arg Ile Thr Cys Gly Arg Asn Asn Ile Gly Ser Lys Ser Val
20 25 30

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

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

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

Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Val Trp Asp Ser Ser Ser Asp His
85 90 95

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

<210> 89
<211> 327
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 89
cagtctgtcg tgacgcagcc gccctcgggtg tcagtggccc caggaaaagac ggccaggatt 60
acctgtggga gaaacaacat tggaagtaaa agtgtgcact ggtaccagca gaagccaggc 120
cagggcccctg tgctggtcgt ctatgatgat agcgaccggc cctcagggat ccctgagcga 180
ttctctggct ccaactctgg gaacacggcc accctgacca tcagcagggt cgaagccggg 240
gatgaggccg actattactg tcagggtgtgg gatagtagta gtgatcatgt ggtattcggc 300
ggagggacca agctgaccgt cctaggt 327

<210> 90
<211> 249
<212> PRT

3314.013A-130926-Sequence Listing

<213> Homo sapiens

<400> 90

Gln Ser Val Val Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Val Ala Pro Gly Lys
1 5 10 15

Thr Ala Arg Ile Thr Cys Gly Arg Asn Asn Ile Gly Ser Lys Ser Val
20 25 30

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

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

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

Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Val Trp Asp Ser Ser Ser Asp His
85 90 95

Val Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly Ser Arg Gly
100 105 110

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Ser Leu Glu Met Ala
115 120 125

Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Gly Gly Val Val Arg Pro Gly Gly
130 135 140

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Asp Asp Tyr
145 150 155 160

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

Ser Gly Ile Asn Trp Asn Gly Gly Ser Thr Gly Tyr Ala Asp Ser Val
180 185 190

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

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Leu Tyr Tyr Cys
210 215 220

Ala Arg Glu Arg Gly Tyr Gly Tyr His Asp Pro His Asp Tyr Trp Gly
225 230 235 240

3314.013A-130926-Sequence Listing

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
245

<210> 91
<211> 747
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 91
cagtctgtcg tgacgcagcc gccctcgggtg tcagtggccc caggaaagac ggccaggatt 60
acctgtggga gaaacaacat tggaagtaaa agtgtgcact ggtaccagca gaagccaggc 120
cagggcccctg tgctgggtcgt ctatgatgat agcgaccggc cctcagggat ccctgagcga 180
ttctctgggt ccaactctgg gaacacggcc accctgacca tcagcaggggt cgaagccggg 240
gatgaggccg actattactg tcagggtgtgg gatagtagta gtgatcatgt ggtattcggc 300
ggaggggacca agctgaccgt cctaggttct agaggtggtg gtggtagcgg cggcggcggc 360
tctggtggat ccctcgagat ggccgaagtg cagctggtgc agtctggggg aggtgtggta 420
cggcctgggg ggtccctgag actctcctgt gcagcctctg ggttcacctt tgatgattat 480
ggcatgagct ggggtccgcca agctccaggg aaggggctgg agtgggtctc tgggtattaat 540
tggaatggtg gtagcacagg ttatgcagac tctgtgaggg gccgattcac catctccaga 600
gacaacgcca agaactccct gtatctgcaa atgaacagtc tgagagccga ggacacggcc 660
ttgtattact gtgcgagaga gcgtgggtac ggggtaccatg atcccatga ctactggggc 720
caaggcaccc tgggtgaccgt ctcctca 747

<210> 92
<211> 10
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 92

Gly Phe Ser Val Ser Gly Thr Tyr Met Gly
1 5 10

<210> 93
<211> 16
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 93

Leu Leu Tyr Ser Gly Gly Gly Thr Tyr His Pro Ala Ser Leu Gln Gly
1 5 10 15

<210> 94
<211> 10
<212> PRT

3314.013A-130926-Sequence Listing

<213> Homo sapiens

<400> 94

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

<210> 95

<211> 30

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 95

gggttctccg tcagtggcac ctacatgggc 30

<210> 96

<211> 48

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 96

cttctttata gtggtggcgg cacataccac ccagcgtccc tgcagggc 48

<210> 97

<211> 30

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 97

ggaggggcag gaggtggcca ctttgactcc 30

<210> 98

<211> 14

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 98

Thr Gly Ser Ser Ser Asn Ile Gly Ala Gly Tyr Asp Val His
1 5 10

<210> 99

<211> 7

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 99

Gly Asn Ser Asn Arg Pro Ser
1 5

<210> 100

<211> 11

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 100

3314.013A-130926-Sequence Listing

Ala Ala Trp Asp Asp Ser Leu Asn Gly Tyr Val
1 5 10

<210> 101
<211> 42
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 101
actgggagca gctccaacat cggggcaggt tatgatgtac ac 42

<210> 102
<211> 21
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 102
ggtaacagca atcggccctc a 21

<210> 103
<211> 33
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 103
gcagcatggg atgacagcct gaatggttat gtc 33

<210> 104
<211> 118
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 104
Glu Val Gln Leu Val Glu Thr Gly Gly Gly Leu Leu Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

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

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

Ala Leu Leu Tyr Ser Gly Gly Gly Thr Tyr His Pro Ala Ser Leu Gln
50 55 60

Gly Arg Phe Ile Val Ser Arg Asp Ser Ser Lys Asn Met Val Tyr Leu
65 70 75 80

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

3314.013A-130926-Sequence Listing

Lys Gly Gly Ala Gly Gly Gly His Phe Asp Ser Trp Gly Gln Gly Thr
100 105 110

Leu Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 105
<211> 354
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 105
gaggtgcagc tgggtggagac cggaggaggc ttgctccagc cggggggggtc cctcagactc 60
tcctgtgcag cctctggggt ctccgtcagt ggcacctaca tgggctgggt ccgccaggct 120
ccagggaagg gactggagtg ggtcgcactt ctttatagtg gtggcggcac ataccaccca 180
gcgtccctgc agggccgatt catcgtctcc agagacagct ccaagaatat ggtctatctt 240
caaataaata gcctgaaagc cgaggacacg gccgtctatt actgtgcgaa aggagggggca 300
ggaggtggcc actttgactc ctggggccaa ggcaccctgg tgaccgtctc ctca 354

<210> 106
<211> 112
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 106

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

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

Tyr Asp Val His Trp Tyr Gln Gln Leu Pro Gly Thr Ala Pro Lys Leu
35 40 45

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

Ser Gly Ser Lys Ser Gly Thr Ser Ala Ser Leu Ala Ile Ser Gly Leu
65 70 75 80

Gln Ser Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ala Ala Trp Asp Asp Ser
85 90 95

Leu Asn Gly Tyr Val Phe Gly Thr Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly
100 105 110

<210> 107

3314.013A-130926-Sequence Listing

<211> 336
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 107
cagtctgtgt tgacgcagcc gccctcagtg tctggggccc cagggcagag ggtcaccatc 60
tcctgcactg ggagcagctc caacatcggg gcagggttatg atgtacactg gtaccagcag 120
cttccaggaa cagcccccaa actcctcatc tatggtaaca gcaatcggcc ctcagggggtc 180
cctgaccgat tctctggctc caagtctggc acctcagcct ccctggccat cagtgggctc 240
cagtctgagg atgaggctga ttattactgt gcagcatggg atgacagcct gaatgggtat 300
gtcttcggaa ctgggaccaa gctgaccgtc ctaggt 336

<210> 108
<211> 251
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 108
Gln Ser Val Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Gly Ala Pro Gly Gln
1 5 10 15
Arg Val Thr Ile Ser Cys Thr Gly Ser Ser Ser Asn Ile Gly Ala Gly
20 25 30
Tyr Asp Val His Trp Tyr Gln Gln Leu Pro Gly Thr Ala Pro Lys Leu
35 40 45
Leu Ile Tyr Gly Asn Ser Asn Arg Pro Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe
50 55 60
Ser Gly Ser Lys Ser Gly Thr Ser Ala Ser Leu Ala Ile Ser Gly Leu
65 70 75 80
Gln Ser Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ala Ala Trp Asp Asp Ser
85 90 95
Leu Asn Gly Tyr Val Phe Gly Thr Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly
100 105 110
Ser Arg Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly
115 120 125
Ser Leu Glu Met Ala Glu Val Gln Leu Val Glu Thr Gly Gly Gly Leu
130 135 140
Leu Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe
145 150 155 160

3314.013A-130926-Sequence Listing

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

Gly Leu Glu Trp Val Ala Leu Leu Tyr Ser Gly Gly Gly Thr Tyr His
180 185 190

Pro Ala Ser Leu Gln Gly Arg Phe Ile Val Ser Arg Asp Ser Ser Lys
195 200 205

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

Val Tyr Tyr Cys Ala Lys Gly Gly Ala Gly Gly Gly His Phe Asp Ser
225 230 235 240

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

<210> 109
<211> 753
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 109
cagtctgtgt tgacgcagcc gccctcagtg tctggggccc cagggcagag ggtcaccatc 60
tcctgcactg ggagcagctc caacatcggg gcaggttatg atgtacactg gtaccagcag 120
cttccaggaa cagcccccaa actcctcatc tatggtaaca gcaatcggcc ctcaggggctc 180
cctgaccgat tctctggctc caagtctggc acctcagcct ccctggccat cagtgggctc 240
cagtctgagg atgaggctga ttattactgt gcagcatggg atgacagcct gaatggttat 300
gtcttcggaa ctgggaccaa gctgaccgtc ctaggttcta gaggtggtgg tggtagcggc 360
ggcggcggct ctggtggtgg tggatccctc gagatggccg aggtgcagct ggtggagacc 420
ggaggaggct tgctccagcc gggggggtcc ctcagactct cctgtgcagc ctctgggttc 480
tccgtcagtg gcacctacat gggctgggtc cgccaggctc caggggaagg actggagtgg 540
gtcgcacttc ttatagtggt tggcggcaca taccacccag cgccctgca gggccgattc 600
atcgtctcca gagacagctc caagaatatg gtctatcttc aaatgaatag cctgaaagcc 660
gaggacacgg ccgtctatta ctgtgcgaaa ggaggggcag gaggtggcca ctttgactcc 720
tggggccaag gcaccctggt gaccgtctcc tca 753

<210> 110
<211> 9
<212> PRT
<213> Homo sapiens

3314.013A-130926-Sequence Listing

<400> 110

Ala Met Phe Pro Asn Ala Pro Tyr Leu
1 5

<210> 111

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 111

Arg Met Ala Pro Asn Ala Pro Tyr Leu
1 5

<210> 112

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 112

Arg Met Phe Ala Asn Ala Pro Tyr Leu
1 5

<210> 113

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 113

Arg Met Phe Pro Ala Ala Pro Tyr Leu
1 5

<210> 114

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 114

Arg Met Phe Pro Asn Ala Ala Tyr Leu
1 5

<210> 115

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 115

Arg Met Phe Pro Asn Ala Pro Ala Leu
1 5

<210> 116

3314.013A-130926-Sequence Listing

<211> 9
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 116

Ile Leu Ser Leu Glu Leu Met Lys Leu
 1 5

<210> 117
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 117

Gln Leu Gln Asn Pro Ser Tyr Asp Lys
 1 5

<210> 118
 <211> 449
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 118

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

Ser Leu Gly Gly Gly Gly Gly Cys Ala Leu Pro Val Ser Gly Ala Ala
 20 25 30

Gln Trp Ala Pro Val Leu Asp Phe Ala Pro Pro Gly Ala Ser Ala Tyr
 35 40 45

Gly Ser Leu Gly Gly Pro Ala Pro Pro Pro Ala Pro Pro Pro Pro Pro
 50 55 60

Pro Pro Pro Pro His Ser Phe Ile Lys Gln Glu Pro Ser Trp Gly Gly
 65 70 75 80

Ala Glu Pro His Glu Glu Gln Cys Leu Ser Ala Phe Thr Val His Phe
 85 90 95

Ser Gly Gln Phe Thr Gly Thr Ala Gly Ala Cys Arg Tyr Gly Pro Phe
 100 105 110

Gly Pro Pro Pro Pro Ser Gln Ala Ser Ser Gly Gln Ala Arg Met Phe
 115 120 125

Pro Asn Ala Pro Tyr Leu Pro Ser Cys Leu Glu Ser Gln Pro Ala Ile
 130 135 140

3314.013A-130926-Sequence Listing

Arg Asn Gln Gly Tyr Ser Thr Val Thr Phe Asp Gly Thr Pro Ser Tyr
 145 150 155 160
 Gly His Thr Pro Ser His His Ala Ala Gln Phe Pro Asn His Ser Phe
 165 170 175
 Lys His Glu Asp Pro Met Gly Gln Gln Gly Ser Leu Gly Glu Gln Gln
 180 185 190
 Tyr Ser Val Pro Pro Pro Val Tyr Gly Cys His Thr Pro Thr Asp Ser
 195 200 205
 Cys Thr Gly Ser Gln Ala Leu Leu Leu Arg Thr Pro Tyr Ser Ser Asp
 210 215 220
 Asn Leu Tyr Gln Met Thr Ser Gln Leu Glu Cys Met Thr Trp Asn Gln
 225 230 235 240
 Met Asn Leu Gly Ala Thr Leu Lys Gly Val Ala Ala Gly Ser Ser Ser
 245 250 255
 Ser Val Lys Trp Thr Glu Gly Gln Ser Asn His Ser Thr Gly Tyr Glu
 260 265 270
 Ser Asp Asn His Thr Thr Pro Ile Leu Cys Gly Ala Gln Tyr Arg Ile
 275 280 285
 His Thr His Gly Val Phe Arg Gly Ile Gln Asp Val Arg Arg Val Pro
 290 295 300
 Gly Val Ala Pro Thr Leu Val Arg Ser Ala Ser Glu Thr Ser Glu Lys
 305 310 315 320
 Arg Pro Phe Met Cys Ala Tyr Pro Gly Cys Asn Lys Arg Tyr Phe Lys
 325 330 335
 Leu Ser His Leu Gln Met His Ser Arg Lys His Thr Gly Glu Lys Pro
 340 345 350
 Tyr Gln Cys Asp Phe Lys Asp Cys Glu Arg Arg Phe Ser Arg Ser Asp
 355 360 365
 Gln Leu Lys Arg His Gln Arg Arg His Thr Gly Val Lys Pro Phe Gln
 370 375 380
 Cys Lys Thr Cys Gln Arg Lys Phe Ser Arg Ser Asp His Leu Lys Thr
 385 390 395 400

3314.013A-130926-Sequence Listing

His Thr Arg Thr His Thr Gly Lys Thr Ser Glu Lys Pro Phe Ser Cys
405 410 415

Arg Trp Pro Ser Cys Gln Lys Lys Phe Ala Arg Ser Asp Glu Leu Val
420 425 430

Arg His His Asn Met His Gln Arg Asn Met Thr Lys Leu Gln Leu Ala
435 440 445

Leu

<210> 119
<211> 7
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 119

Ser Asn Ala Val Ala Trp Asn
1 5

<210> 120
<211> 13
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 120

Arg Thr Tyr Arg Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Leu Ser Val
1 5 10

<210> 121
<211> 8
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 121

Gly Ser Asn Ser Ala Phe Asp Phe
1 5

<210> 122
<211> 7
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 122

Ser Asn Ser Ala Ala Trp Asn
1 5

<210> 123

3314.013A-130926-Sequence Listing

<211> 16
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 123

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

<210> 124
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 124

Gly Arg Leu Gly Asp Ala Phe Asp Ile
 1 5

<210> 125
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 125

Ser Asp Gly Ala Ala Trp Asn
 1 5

<210> 126
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 126

Arg Thr Tyr Tyr Arg Ser Lys Trp Tyr Asn Asp Tyr Ala Val Ser Val
 1 5 10 15

<210> 127
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 127

Gly Asp Tyr Tyr Tyr Gly Met Asp Val
 1 5

<210> 128
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 128

Ser Asn Ala Ala Ala Trp Asn
 1 5

3314.013A-130926-Sequence Listing

<210> 129
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 129

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

<210> 130
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 130

Gly Ala Phe Asp Ile
 1 5

<210> 131
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 131

Ser Tyr Trp Ile Ser
 1 5

<210> 132
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 132

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

Gly

<210> 133
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 133

Gly Asp Tyr Asp Phe Tyr Leu Asp Pro
 1 5

<210> 134
 <211> 5

3314.013A-130926-Sequence Listing

<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 134

Ser Tyr Gly Ile Ser
1 5

<210> 135
<211> 17
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 135

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

Gly

<210> 136
<211> 17
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 136

Asp Leu Tyr Ser Ser Gly Trp Tyr Glu Ser Tyr Tyr Tyr Gly Met Asp
1 5 10 15

Val

<210> 137
<211> 5
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 137

Ser Tyr Ala Ile Ser
1 5

<210> 138
<211> 17
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 138

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

Gly

3314.013A-130926-Sequence Listing

<210> 139
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 139

Arg Ile Pro Pro Tyr Tyr Gly Met Asp Val
 1 5 10

<210> 140
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 140

Trp Ile Ser Ala His Asn Gly Asn Thr Asn Tyr Ala Gln Lys Leu Gln
 1 5 10 15

Gly

<210> 141
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 141

Asp Arg Val Trp Phe Gly Asp Leu Ser Asp
 1 5 10

<210> 142
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 142

Gly Ile Ile Pro Ile Phe Gly Thr Ala Asn Tyr Ala Gln Lys Glu Gln
 1 5 10 15

Gly

<210> 143
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 143

Asn Tyr Asp Phe Trp Ser Gly Asp Ala Phe Asp Ile
 1 5 10

3314.013A-130926-Sequence Listing

<210> 144
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 144

Ile Pro Gly Thr Asn Tyr Ala Gln Lys Phe Gln Gly
 1 5 10

<210> 145
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 145

Phe Tyr Gly Met Asp Val
 1 5

<210> 146
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 146

Asp Tyr Gly Met Ser
 1 5

<210> 147
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 147

Gly Ile Asn Trp Asn Gly Gly Ser Thr Gly Tyr Ala Asp Ser Val
 1 5 10 15

<210> 148
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 148

Glu Arg Gly Tyr Gly Tyr His Asp Pro His Asp Tyr
 1 5 10

<210> 149
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 149

3314.013A-130926-Sequence Listing

Asn Tyr Thr Met Asn
1 5

<210> 150
<211> 15
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 150

Ser Ile Ser Leu Ser Gly Ala Tyr Ile Tyr Tyr Ala Asp Ser Leu
1 5 10 15

<210> 151
<211> 13
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 151

Glu Gly Tyr Ser Ser Ser Val Tyr Asp Ala Phe Asp Leu
1 5 10

<210> 152
<211> 5
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 152

Ser Tyr Gly Met His
1 5

<210> 153
<211> 15
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 153

Gly Ile Leu Ser Asp Gly Gly Lys Asp Tyr Tyr Val Asp Ser Val
1 5 10 15

<210> 154
<211> 12
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 154

Cys Ser Ser Asn Tyr Gly Asn Asp Ala Phe Asp Ile
1 5 10

<210> 155
<211> 5
<212> PRT

3314.013A-130926-Sequence Listing

<213> Homo sapiens

<400> 155

Thr Tyr Ser Met Asn
1 5

<210> 156

<211> 15

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 156

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

<210> 157

<211> 13

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 157

Asp Gln Tyr Tyr Gly Asp Lys Trp Asp Ala Phe Asp Ile
1 5 10

<210> 158

<211> 5

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 158

Ser Tyr Gly Met Asn
1 5

<210> 159

<211> 14

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 159

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

<210> 160

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 160

Glu Tyr Tyr Trp Asp Ala Phe Asp Ile
1 5

3314.013A-130926-Sequence Listing

<210> 161
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 161

Cys Ser Gly Ser Ser Ser Asn Ile Gly Ser Asn Thr Val Asn
 1 5 10

<210> 162
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 162

Ser Asn Asn Gln Arg Pro Ser Gly
 1 5

<210> 163
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 163

Ala Ala Trp Asp Asp Ser Leu Asn Gly Trp Val Phe Gly
 1 5 10

<210> 164
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 164

Glu Ala Trp Asp Asp Ser Leu Lys Gly Pro Val Phe Gly
 1 5 10

<210> 165
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 165

Cys Thr Gly Ser Ser Ser Asn Ile Gly Ala Gly Tyr Asp Val His
 1 5 10 15

<210> 166
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 166

Gly Asn Ser Asn Arg Pro Ser Gly

3314.013A-130926-Sequence Listing

1

5

<210> 167
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 167

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

<210> 168
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 168

Cys Ser Gly Ser Ser Ser Asn Ile Gly Arg Asn Ile Val Asn
 1 5 10

<210> 169
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 169

Ser Asn Ile Glu Arg Pro Ser Gly
 1 5

<210> 170
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 170

Ala Ser Trp Asp Asp Ser Leu Asn Gly Val Leu Phe Gly
 1 5 10

<210> 171
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 171

Cys Ser Gly Ser Arg Ser Asn Ile Ala Ser Asn Gly Val Gly
 1 5 10

<210> 172
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

3314.013A-130926-Sequence Listing

<400> 172

Lys Asn Asp Gln Arg Pro Ser Gly
1 5

<210> 173

<211> 14

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 173

Ser Ala Trp Asp Asp Ser Leu Asp Gly His Val Val Phe Gly
1 5 10

<210> 174

<211> 13

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 174

Ala Ala Trp Asp Asp Ser Leu Asn Gly Tyr Val Phe Gly
1 5 10

<210> 175

<211> 14

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 175

Cys Ser Gly Ser Ser Ser Asn Ile Gly Ser Ser Thr Val Asn
1 5 10

<210> 176

<211> 8

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 176

Ser Asn Ser Gln Arg Pro Ser Gly
1 5

<210> 177

<211> 13

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 177

Ala Ala Trp Asp Asp Ser Leu Asn Gly Val Val Phe Gly
1 5 10

<210> 178

<211> 14

3314.013A-130926-Sequence Listing

<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 178

Cys Ser Gly Ser Ser Ser Asn Ile Gly Ser Asn Tyr Val Tyr
1 5 10

<210> 179
<211> 8
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 179

Arg Ser Asn Gln Arg Pro Ser Gly
1 5

<210> 180
<211> 14
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 180

Cys Ser Gly Ser Ser Ser Asn Ile Gly Arg Asn Thr Val Asn
1 5 10

<210> 181
<211> 14
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 181

Cys Ser Gly Ser Ser Ser Asn Ile Gly Asn Asp Tyr Val Ser
1 5 10

<210> 182
<211> 8
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 182

Asp Asn Asn Lys Arg Pro Ser Gly
1 5

<210> 183
<211> 13
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 183

Gly Thr Trp Asp Asn Ser Leu Ser Ala Trp Val Phe Gly
1 5 10

3314.013A-130926-Sequence Listing

<210> 184
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 184

Cys Ser Gly Ser Ser Ser Asn Ile Gly Ser Asn Ser Val Tyr
 1 5 10

<210> 185
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 185

Asn Asn Asn Gln Arg Pro Ser Gly
 1 5

<210> 186
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 186

Ala Thr Trp Asp Asp Ser Leu Ser Gly Trp Val Phe Gly
 1 5 10

<210> 187
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 187

Arg Asn Asn Gln Arg Pro Ser Gly
 1 5

<210> 188
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 188

Ala Ala Trp Asp Asp Ser Leu Ser Ala Trp Val Phe Gly
 1 5 10

<210> 189
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 189

3314.013A-130926-Sequence Listing

Cys Ser Gly Ser Thr Ser Asn Ile Gly Ser Tyr Tyr Val Ser
1 5 10

<210> 190
<211> 8
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 190

Asp Asn Asn Asn Arg Pro Ser Gly
1 5

<210> 191
<211> 13
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 191

Gly Thr Trp Asp Ser Ser Leu Ser Ala Trp Val Phe Gly
1 5 10

<210> 192
<211> 14
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 192

Cys Ser Gly Ser Ser Ser Asn Ile Gly Asn Asn Tyr Val Ser
1 5 10

<210> 193
<211> 14
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 193

Cys Ser Gly Ser Asn Ser Asn Ile Gly Thr Asn Thr Val Thr
1 5 10

<210> 194
<211> 8
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 194

Ser Asn Phe Glu Arg Pro Ser Gly
1 5

<210> 195
<211> 13
<212> PRT
<213> Homo sapiens

3314.013A-130926-Sequence Listing

<400> 195

Ser Ala Trp Asp Asp Ser Phe Asn Gly Pro Val Phe Gly
1 5 10

<210> 196

<211> 14

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 196

Cys Ser Gly Ser Ser Ser Asn Ile Gly Ser Asn Tyr Val Ser
1 5 10

<210> 197

<211> 13

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 197

Ala Ala Trp Asp Asp Gly Leu Arg Gly Tyr Val Phe Gly
1 5 10

<210> 198

<211> 11

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 198

Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser Ser Tyr Leu Asn
1 5 10

<210> 199

<211> 7

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 199

Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser
1 5

<210> 200

<211> 8

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 200

Gln Gln Ser Tyr Ser Thr Pro Thr
1 5

<210> 201

3314.013A-130926-Sequence Listing

<211> 11
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 201

Arg Ala Ser Gln Gly Ile Ser Asn Tyr Leu Ala
 1 5 10

<210> 202
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 202

Ala Ala Ser Thr Leu Gln Ser
 1 5

<210> 203
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 203

Gln Lys Tyr Asn Ser Ala Pro Gly Val Thr
 1 5 10

<210> 204
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 204

Arg Ala Ser Gln Ser Ile Asn Gly Trp Leu Ala
 1 5 10

<210> 205
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 205

Arg Ala Ser Thr Leu Gln Ser
 1 5

<210> 206
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 206

Gln Gln Ser Ser Ser Leu Pro Phe Thr
 1 5

3314.013A-130926-Sequence Listing

<210> 207
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 207

Arg Ala Ser Gln Gly Ile Ser Tyr Tyr Leu Ala
 1 5 10

<210> 208
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 208

Ala Ala Ser Thr Leu Lys Ser
 1 5

<210> 209
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 209

Gln Gln Leu Asn Ser Tyr Pro Leu Thr
 1 5

<210> 210
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 210

Gly Gly Asn Asn Ile Gly Ser Lys Ser Val His
 1 5 10

<210> 211
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 211

Asp Asp Ser Asp Arg Pro Ser
 1 5

<210> 212
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 212

3314.013A-130926-Sequence Listing

Gln Val Trp Asp Ser Ser Ser Asp His Pro Val
1 5 10

<210> 213
<211> 11
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 213

Gln Val Trp Asp Ser Ser Gly Asp His Pro Val
1 5 10

<210> 214
<211> 7
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 214

Tyr Asp Ser Asp Arg Pro Ser
1 5

<210> 215
<211> 11
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 215

Gly Gly Thr Asn Ile Gly Ser Arg Phe Val His
1 5 10

<210> 216
<211> 11
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 216

Gly Gly Asn Asn Val Glu Ser Lys Ser Val His
1 5 10

<210> 217
<211> 7
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 217

Tyr Asp Arg Asp Arg Pro Ser
1 5

<210> 218
<211> 11
<212> PRT

3314.013A-130926-Sequence Listing

<213> Homo sapiens

<400> 218

Glu	Val	Trp	Asp	Ser	Gly	Ser	Asp	His	Pro	Val
1				5					10	

<210> 219

<211> 11

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 219

Gly	Gly	Lys	Asn	Ile	Gly	Ser	Lys	Ser	Val	His
1				5					10	

<210> 220

<211> 11

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 220

Gln	Val	Trp	Asp	Ser	Gly	Ser	Asp	His	Tyr	Val
1				5					10	

<210> 221

<211> 11

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 221

Gln	Val	Trp	Ile	Ser	Ser	Gly	Asp	Arg	Val	Ile
1				5					10	

<210> 222

<211> 11

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 222

Gly	Gly	Asp	Asn	Ile	Gly	Ser	Gln	Gly	Val	His
1				5					10	

<210> 223

<211> 7

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 223

Tyr	Asp	Thr	Asp	Arg	Pro	Ser
1				5		

3314.013A-130926-Sequence Listing

<210> 224
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 224

Gln Val Trp Gly Ala Ser Ser Asp His Pro Val
 1 5 10

<210> 225
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 225

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

<210> 226
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 226

Asp Val Ser Lys Arg Pro Ser
 1 5

<210> 227
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 227

Gly Ile Tyr Thr Tyr Ser Asp Ser Trp Val
 1 5 10

<210> 228
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 228

Asp Val Gly Asn Arg Pro Ser
 1 5

<210> 229
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 229

Ser Ser Tyr Thr Ser Ser Ser Thr Arg Val

3314.013A-130926-Sequence Listing
10

1

5

<210> 230
<211> 14
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 230

Thr Gly Thr Arg Ser Asp Val Gly Leu Tyr Asn Tyr Val Ala
1 5 10

<210> 231
<211> 7
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 231

Asp Val Ile Tyr Arg Pro Gly
1 5

<210> 232
<211> 10
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 232

Ser Ser Tyr Thr Asn Thr Gly Thr Val Leu
1 5 10

<210> 233
<211> 14
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 233

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

<210> 234
<211> 7
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 234

Asp Val Ser Asp Arg Pro Ser
1 5

<210> 235
<211> 12
<212> PRT
<213> Homo sapiens

3314.013A-130926-Sequence Listing

<400> 235

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

<210> 236

<211> 330

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 236

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys
1 5 10 15

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

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

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

Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr
65 70 75 80

Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
85 90 95

Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys
100 105 110

Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro
115 120 125

Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys
130 135 140

Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp
145 150 155 160

Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu
165 170 175

Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu
180 185 190

His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn
195 200 205

3314.013A-130926-Sequence Listing

Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly
210 215 220

Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu
225 230 235 240

Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr
245 250 255

Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn
260 265 270

Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe
275 280 285

Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn
290 295 300

Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr
305 310 315 320

Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
325 330

<210> 237
<211> 106
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 237

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

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

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

Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr
50 55 60

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

His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro
85 90 95

3314.013A-130926-Sequence Listing

Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
100 105

<210> 238
<211> 105
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 238

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

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

Tyr Pro Gly Ala Val Thr Val Ala Trp Lys Ala Asp Gly Ser Pro Val
35 40 45

Lys Ala Gly Val Glu Thr Thr Lys Pro Ser Lys Gln Ser Asn Asn Lys
50 55 60

Tyr Ala Ala Ser Ser Tyr Leu Ser Leu Thr Pro Glu Gln Trp Lys Ser
65 70 75 80

His Arg Ser Tyr Ser Cys Gln Val Thr His Glu Gly Ser Thr Val Glu
85 90 95

Lys Thr Val Ala Pro Thr Glu Cys Ser
100 105

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(19) World Intellectual Property
Organization
International Bureau



WIPO | PCT



(10) International Publication Number
WO 2012/135854 A3

(43) International Publication Date
4 October 2012 (04.10.2012)

- (51) International Patent Classification:
C07K 16/28 (2006.01) *G01N 33/574* (2006.01)
A61K 47/48 (2006.01)
- (21) International Application Number:
PCT/US2012/031892
- (22) International Filing Date:
2 April 2012 (02.04.2012)
- (25) Filing Language: English
- (26) Publication Language: English
- (30) Priority Data:
61/470,635 1 April 2011 (01.04.2011) US
61/491,392 31 May 2011 (31.05.2011) US
- (71) Applicant (*for all designated States except US*): **MEMORIAL SLOAN-KETTERING CANCER CENTER** [US/US]; 1275 York Avenue, New York, New York 10065 (US).
- (72) Inventors; and
- (75) Inventors/Applicants (*for US only*): **SCHEINBERG, David A.** [US/US]; 325 Central Park West, New York, New York 10025 (US). **DAO, Tao** [US/US]; 245 East 87 Street, Apt. 14F, New York, New York 10128 (US). **LIU, Cheng** [US/US]; 24 N. Hill Court, Oakland, California 94618 (US). **YAN, Su** [CN/US]; 731 Partidge Lane, State College, Pennsylvania 16803 (US).
- (74) Agent: **DIAS, Kathy Smith**; Heslin Rothenberg Farley & Mesiti P.C., 5 Columbia Circle, Albany, New York 12203 (US).

- (81) Designated States (*unless otherwise indicated, for every kind of national protection available*): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.
- (84) Designated States (*unless otherwise indicated, for every kind of regional protection available*): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Eurasian (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Published:

- *with international search report (Art. 21(3))*
— *with sequence listing part of description (Rule 5.2(a))*

(88) Date of publication of the international search report:
14 March 2013

(54) Title: T CELL RECEPTOR-LIKE ANTIBODIES SPECIFIC FOR A WT1 PEPTIDE PRESENTED BY HLA-A2

(57) Abstract: The present invention provides antigen binding proteins that specifically bind to Wilms' tumor protein (WT1), including humanized, chimeric and fully human antibodies against WT1, antibody fragments, chimeric antigen receptors (CARs), fusion proteins, and conjugates thereof. The antigen binding proteins and antibodies bind to HLA-A0201-restricted WT1 peptide. Such antibodies, fragments, fusion proteins and conjugates thereof are useful for the treatment of WT1 associated cancers, including for example, breast cancer, ovarian cancer, prostate cancer, chronic myelocytic leukemia, multiple myeloma, acute lymphoblastic leukemia (ALL), acute myeloid/myelogenous leukemia (AML) and myelodysplastic syndrome (MDS). In more particular embodiments, the anti-WT1/A antibodies may comprise one or more framework region amino acid substitutions designed to improve protein stability, antibody binding and/or expression levels.



WO 2012/135854 A3

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/US2012/031892

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
 INV. C07K16/28 A61K47/48 G01N33/574
 ADD.

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
 C07K A61K G01N

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

EPO-Internal, BIOSIS, Sequence Search, EMBASE, WPI Data, CHEM ABS Data

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	WO 2005/056595 A2 (IMP COLLEGE INNOVATIONS LTD [GB]; STAUSS HANS JOSEF [GB]; GAO LIQUAN []) 23 June 2005 (2005-06-23) examples 1-2 claims 1.20-24	1-41
Y	----- WO 2009/108372 A2 (RECEPTOR LOGIC INC [US]; WEIDANZ JON A [US]) 3 September 2009 (2009-09-03) paragraph [0120] - paragraph [0122] table I claim 1 sequence 55	1-41
Y	----- WO 03/070752 A2 (DYAX CORP [US]; TECHNION RES & DEV FOUNDATION [IL]; HOOGENBOOM HENRICU) 28 August 2003 (2003-08-28) page 42, line 14 - page 70, line 17 ----- -/--	1-41



Further documents are listed in the continuation of Box C.



See patent family annex.

* Special categories of cited documents :

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

27 November 2012

Date of mailing of the international search report

18/12/2012

Name and mailing address of the ISA/

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
 NL - 2280 HV Rijswijk
 Tel. (+31-70) 340-2040,
 Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Ulbrecht, Matthias

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/US2012/031892

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	WO 03/068201 A2 (TECHNION RES & DEV FOUNDATION [IL]; REITER YORAM [IL]; DENKBERG GALIT) 21 August 2003 (2003-08-21) claims 1-61 -----	1-41
Y	DENKBERG G ET AL: "Recombinant antibodies with T-cell receptor-like specificity: Novel tools to study MHC class I presentation", AUTOIMMUNITY REVIEWS, ELSEVIER, AMSTERDAM, NL, vol. 5, no. 4, 1 April 2006 (2006-04-01), pages 252-257, XP024977451, ISSN: 1568-9972, DOI: 10.1016/J.AUTREV.2005.07.004 [retrieved on 2006-04-01] the whole document -----	1-41
Y	U. KEILHOLZ ET AL: "A clinical and immunologic phase 2 trial of Wilms tumor gene product 1 (WT1) peptide vaccination in patients with AML and MDS", BLOOD, vol. 113, no. 26, 25 June 2009 (2009-06-25), pages 6541-6548, XP55045499, ISSN: 0006-4971, DOI: 10.1182/blood-2009-02-202598 abstract page 6541, left-hand column, paragraph 2 - page 6542, left-hand column, paragraph 2 -----	1-41
Y	OKA Y ET AL: "Development of WT1 Peptide Cancer Vaccine Against Hematopoietic Malignancies and Solid Cancers", CURRENT MEDICINAL CHEMISTRY, BENTHAM SCIENCE PUBLISHERS BV, BE, vol. 13, 1 January 2006 (2006-01-01), pages 2345-2352, XP007906253, ISSN: 0929-8673, DOI: 10.2174/092986706777935104 the whole document -----	1-41
Y	WO 00/18795 A2 (CORIXA CORP [US]; GAIGER ALEXANDER [US]; CHEEVER MARTIN [US]) 6 April 2000 (2000-04-06) example 4 tables III-V claims 39,41,56.58 sequence 185 -----	1-41
A	US 6 225 051 B1 (SUGIYAMA HARUO [JP] ET AL) 1 May 2001 (2001-05-01) the whole document -----	1-41

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/US2012/031892

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2005056595	A2	23-06-2005	EP 1692172 A2 23-08-2006 US 2007191496 A1 16-08-2007 US 2011274675 A1 10-11-2011 WO 2005056595 A2 23-06-2005
WO 2009108372	A2	03-09-2009	EP 2262834 A2 22-12-2010 WO 2009108372 A2 03-09-2009
WO 03070752	A2	28-08-2003	AU 2003216341 A1 09-09-2003 CA 2476625 A1 28-08-2003 EP 1485075 A2 15-12-2004 JP 2005533486 A 10-11-2005 US 2003223994 A1 04-12-2003 US 2007196369 A1 23-08-2007 US 2010228007 A1 09-09-2010 WO 03070752 A2 28-08-2003
WO 03068201	A2	21-08-2003	AT 446745 T 15-11-2009 AU 2003208582 A1 04-09-2003 AU 2010214669 A1 16-09-2010 CA 2474782 A1 21-08-2003 EP 1474120 A2 10-11-2004 EP 2072045 A2 24-06-2009 EP 2329814 A1 08-06-2011 ES 2332175 T3 28-01-2010 HK 1068810 A1 20-05-2010 JP 4272535 B2 03-06-2009 JP 2005521389 A 21-07-2005 US 2005255101 A1 17-11-2005 US 2005287141 A1 29-12-2005 US 2011318369 A1 29-12-2011 WO 03068201 A2 21-08-2003
WO 0018795	A2	06-04-2000	AR 021849 A1 07-08-2002 AT 399179 T 15-07-2008 AU 6407899 A 17-04-2000 BR 9914116 A 15-01-2002 CA 2349442 A1 06-04-2000 CN 1336935 A 20-02-2002 CZ 20011144 A3 12-06-2002 EP 1117687 A2 25-07-2001 ES 2310052 T3 16-12-2008 HK 1039782 A1 14-11-2008 HU 0103598 A2 28-01-2002 IL 142216 A 15-06-2009 JP 4235984 B2 11-03-2009 JP 4243792 B2 25-03-2009 JP 2002525099 A 13-08-2002 JP 2007001984 A 11-01-2007 JP 2008069172 A 27-03-2008 MX PA01003344 A 21-04-2004 MY 139226 A 28-08-2009 NO 20011613 A 29-05-2001 NZ 510600 A 19-12-2003 PL 348595 A1 03-06-2002 RU 2237674 C2 10-10-2004 TR 200101482 T2 21-01-2002 TW 1285648 B 21-08-2007

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/US2012/031892

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
		WO 0018795 A2	06-04-2000
US 6225051	B1	01-05-2001	
		AT 298887 T	15-07-2005
		CA 2224970 A1	23-10-1997
		DE 69733629 D1	04-08-2005
		DE 69733629 T2	18-05-2006
		EP 0846949 A1	10-06-1998
		ES 2242221 T3	01-11-2005
		JP 3122771 B2	09-01-2001
		TW 562928 B	21-11-2003
		US 6225051 B1	01-05-2001
		WO 9739354 A1	23-10-1997

PATENT COOPERATION TREATY

From the
INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY

To:

see form PCT/ISA/220

PCT

WRITTEN OPINION OF THE INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY (PCT Rule 43bis.1)

Date of mailing
(day/month/year) see form PCT/ISA/210 (second sheet)

Applicant's or agent's file reference
see form PCT/ISA/220

FOR FURTHER ACTION
See paragraph 2 below

International application No. PCT/US2012/031892	International filing date (day/month/year) 02.04.2012	Priority date (day/month/year) 01.04.2011
--	--	--

International Patent Classification (IPC) or both national classification and IPC
INV. C07K16/28 A61K47/48 G01N33/574

Applicant
MEMORIAL SLOAN-KETTERING CANCER CENTER

1. This opinion contains indications relating to the following items:
- ☒ Box No. I Basis of the opinion
 - ☐ Box No. II Priority
 - ☐ Box No. III Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability
 - ☐ Box No. IV Lack of unity of invention
 - ☒ Box No. V Reasoned statement under Rule 43bis.1(a)(i) with regard to novelty, inventive step and industrial applicability; citations and explanations supporting such statement
 - ☐ Box No. VI Certain documents cited
 - ☐ Box No. VII Certain defects in the international application
 - ☒ Box No. VIII Certain observations on the international application

2. FURTHER ACTION

If a demand for international preliminary examination is made, this opinion will usually be considered to be a written opinion of the International Preliminary Examining Authority ("IPEA") except that this does not apply where the applicant chooses an Authority other than this one to be the IPEA and the chosen IPEA has notified the International Bureau under Rule 66.1bis(b) that written opinions of this International Searching Authority will not be so considered.

If this opinion is, as provided above, considered to be a written opinion of the IPEA, the applicant is invited to submit to the IPEA a written reply together, where appropriate, with amendments, before the expiration of 3 months from the date of mailing of Form PCT/ISA/220 or before the expiration of 22 months from the priority date, whichever expires later.

For further options, see Form PCT/ISA/220.

Name and mailing address of the ISA:  European Patent Office D-80298 Munich Tel. +49 89 2399 - 0 Fax: +49 89 2399 - 4465	Date of completion of this opinion see form PCT/ISA/210	Authorized Officer Ulbrecht, Matthias Telephone No. +49 89 2399-7710 
---	---	---

Box No. I Basis of the opinion

1. With regard to the **language**, this opinion has been established on the basis of:
- ☒ the international application in the language in which it was filed
 - ☐ a translation of the international application into , which is the language of a translation furnished for the purposes of international search (Rules 12.3(a) and 23.1 (b)).
2. ☐ This opinion has been established taking into account the **rectification of an obvious mistake** authorized by or notified to this Authority under Rule 91 (Rule 43bis.1(a))
3. With regard to any **nucleotide and/or amino acid sequence** disclosed in the international application, this opinion has been established on the basis of a sequence listing filed or furnished:
- a. (means)
- ☐ on paper
 - ☒ in electronic form
- b. (time)
- ☒ in the international application as filed
 - ☐ together with the international application in electronic form
 - ☐ subsequently to this Authority for the purposes of search
4. ☐ In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that in the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.
5. Additional comments:

Box No. V Reasoned statement under Rule 43bis.1(a)(i) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement

1. Statement

Novelty (N)	Yes: Claims	<u>1-41</u>
	No: Claims	
Inventive step (IS)	Yes: Claims	
	No: Claims	<u>1-41</u>
Industrial applicability (IA)	Yes: Claims	<u>1-41</u>
	No: Claims	

2. Citations and explanations

see separate sheet

**WRITTEN OPINION OF THE
INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY**

International application No.
PCT/US2012/031892

Box No. VIII Certain observations on the international application

The following observations on the clarity of the claims, description, and drawings or on the question whether the claims are fully supported by the description, are made:

see separate sheet

Re item V

1 *Cited documents*

- D1 WO 2005/056595 A2 (IMP COLLEGE INNOVATIONS LTD [GB]; STAUSS HANS JOSEF [GB]; GAO LIQUAN []) 23 June 2005 (2005-06-23)
- D2 WO 2009/108372 A2 (RECEPTOR LOGIC INC [US]; WEIDANZ JON A [US]) 3 September 2009 (2009-09-03)
- D3 WO 03/070752 A2 (DYAX CORP [US]; TECHNION RES & DEV FOUNDATION [IL]; HOOGENBOOM HENRICU) 28 August 2003 (2003-08-28)
- D4 WO 03/068201 A2 (TECHNION RES & DEV FOUNDATION [IL]; REITER YORAM [IL]; DENKBERG GALIT) 21 August 2003 (2003-08-21)
- D5 DENKBERG G ET AL: "Recombinant antibodies with T-cell receptor-like specificity: Novel tools to study MHC class I presentation",
AUTOIMMUNITY REVIEWS, ELSEVIER, AMSTERDAM, NL,
vol. 5, no. 4, 1 April 2006 (2006-04-01), pages 252-257,
XP024977451,
ISSN: 1568-9972, DOI: 10.1016/J.AUTREV.2005.07.004
[retrieved on 2006-04-01]

2 *Novelty (Art. 33(2) PCT)*

The prior art does not disclose neither an antibody binding to a WT1 peptide presented by HLA-A2 nor an antibody having any of the structural features referred to in claims 1-4, let alone a nucleic acid encoding such an antibody. Consequently, claims 1-41 are novel.

3 *Inventive step (Art. 33(3) PCT)*

- 3.1 D1 which is considered to represent the closest prior art as it teaches the use of a TCR specific for the WT1 124-136 peptide RMFPNAPYL presented by HLA-A2 for the treatment of cancer including leukemia (Examples 1 and 2; claims 1 and 20-24). Claim 1 is distinguished therefrom in that instead of a

TCR a TCR-like antibody is used. The use of an antibody avoids the introduction of the TCR into a patient's T cell. Thus, the technical problem resides in providing a means for directly targeting the WT1 124-136 peptide RMFP-NAPYL presented by HLA-A2 on cancer cells. D2-D5 disclose the generation of antibodies that behave like TCRs and that can be used in the treatment of cancer. D2 even teaches that a possible TCR epitope to be targeted may be the said WT1 peptide (Tab. I, SEQ ID No. 55). Hence, the skilled person would produce TCR-like antibodies targeting the said WT1 peptide presented by HLA-A2 using the techniques disclosed e.g. D3 (p. 42, l. 14 - p. 70, l. 17) to solve the said problem. It is not discernible that all of the antibodies defined in structural terms covered by claim 1 display a common surprising technical effect i.e. that these antibodies obtainable by routine techniques (*supra*) could be considered purposively selected. Since, said antibodies rather appear to be arbitrarily selected they cannot establish an inventive step.

- 3.2 The foregoing considerations under item 3.1 apply *mutatis mutandis* to claims 3 and 4 as well as to claims 14-19, 28-31, 35 and 38-40.
- 3.3 The additional features suggested by claims 5-12, 20, 23, 32-34, 36, 37 and 41 are either disclosed by at least one of D1-D5 or are a matter of the skilled person's routine and thus unsuitable to establish an inventive step.
- 3.4 Given that the cancer-specific therapy according to D1 is based on the cancer cell's expression of WT1, the use of the TCR-like antibody for detecting WT1 appears to be a further routine application thereof. Hence, the foregoing considerations under items 3.1 - 3.3 apply *mutatis mutandis* to claims 24-27.
- 3.5 Claim 2 proposes antibodies in terms of the sequences of their CDRs without a functional limitation by a binding specificity. The claim covers any combination of the 6 sets of HC-CDR and LC-CDR sequences, respectively, thereby including combinations of HC-CDRs with LC-CDRs which will give antibodies that do not bind to a WT1 peptide presented by HLA-A2. Therefore, the problem in view of the claim's scope as just discussed resides in providing further antibodies in general. The generation of antibodies is a matter of routine and the selection of any specific antibody obtainable by said routine, in the absence of a surprising technical effect associated therewith has to be considered arbitrary and therefore devoid of an inventive activity.
- 3.6 The foregoing under item 3.5 considerations apply *mutatis mutandis* to claim 13, 21, 22, 28, 30 and 39 inasmuch as they refer directly or indirectly to claim 2.

- 3.7 The additional features proposed by claims 5, 6, 10-12 and 23 inasmuch as they refer to claim 2 are also routine embodiments of antibodies or of producing them and thus do not establish an inventive step.
- 3.8 Given that claim 2 covers antibodies that are not specific for WT1 peptides presented by HLA class I molecules, such antibodies do not achieve any therapeutic effect on WT1 expressing cells. Hence, the medical uses according to claims 29 and 31-38 are not enabled inasmuch as they relate to the use of an antibody according to claim 2 or a nucleic acid encoding it according to claim 13 (Art. 5 PCT). Consequently, the problem underlying said claims inasmuch as they refer to claim 2 of providing means to treat WT1 positive diseases is not solved and hence said claims lack an inventive step.

4 *Industrial applicability (Art. 33(4) PCT)*

Industrial applicability of the subject-matter of claims 1-40 is acknowledged.

- 5 Claims 29 and 31-41 relate to methods of treatment of the human/animal body by therapy and thus to subject-matter considered by this Authority to be covered by the provisions of Rule 39.1(iv) / 67.1(iv) PCT. The patentability of said claims can be dependent upon the formulation of the claims. The EPO, for example, does not recognise as patentable claims to the use of a compound in medical treatment, but may allow claims to a product, in particular substances or compositions for use in a first or further medical treatment.

Re item VIII

Claim 10 refers inter alia to claim 4 and proposes that the antibody or antigen-binding fragment is a Fab, Fab', F(ab')₂, Fv or scFv. Claim 4, however, specifies the sequences of scFvs. Thus, the suggestion in claim 10 of other fragments than scFv is inconsistent with the claim's dependency on claim 4 and causes problems in construing the scope of claim 10 (Art. 6 PCT).

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
CONSULTA DE DOCUMENTOS

PAGINA SIN DIGITALIZAR