

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 505 269**

51 Int. Cl.:

C07K 16/28 (2006.01)

C07K 16/30 (2006.01)

C07K 16/18 (2006.01)

C07K 16/40 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **27.09.2010 E 10757604 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **13.08.2014 EP 2483310**

54 Título: **Anticuerpos biespecíficos agonistas del receptor de muerte**

30 Prioridad:

29.09.2009 EP 09171659

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

09.10.2014

73 Titular/es:

**ROCHE GLYCART AG (100.0%)
Wagistrasse 18
8952 Schlieren-Zuerich, CH**

72 Inventor/es:

**BRUENKER, PETER;
FERRARA KOLLER, CLAUDIA;
GRAU, SANDRA;
HERTER, SYLVIA;
LAMPERT, CHRISTOPH;
MOESSNER, EKKEHARD;
UMANA, PABLO y
WALDHAUER, INJA**

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

ES 2 505 269 T3

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

DESCRIPCIÓN

Anticuerpos biespecíficos agonistas del receptor de muerte

5 La presente invención se refiere a anticuerpos biespecíficos que comprenden un primer sitio de unión al antígeno específico para un receptor de muerte y un segundo sitio de unión al antígeno específico para un segundo antígeno, los métodos para su producción, composiciones farmacéuticas que contienen dichos anticuerpos, y usos de los mismos.

10 Se ha probado que los anticuerpos monoclonales son agentes terapéuticos potentes en el tratamiento del cáncer debido a la dirección selectiva contra antígenos que se expresan diferencialmente en las células cancerosas. Las estrategias terapéuticas de la mayoría de los anticuerpos monoclonales desarrollados actualmente incluyen la dirección hacia antígenos asociados a tumores para modificar la biología celular tumoral, inhibición de los receptores de factores de crecimiento, inhibición de la angiogénesis, inducción de apoptosis y citotoxicidad por medio de
 15 citotoxicidad celular por fijación del complemento, o dependiente de anticuerpo. Algunos anticuerpos se dirigen a los receptores del factor de crecimiento que son cruciales para la supervivencia de las células cancerosas, tales como el trastuzumab (Herceptin®) y cetuximab (Erbix®). La dirección de anticuerpos monoclonales agonistas hacia los receptores de muerte TRAIL de las células cancerosas representa una nueva generación de terapia con anticuerpos monoclonales, ya que son capaces de inducir directamente apoptosis en las células diana. El uso de un anticuerpo monoclonal en vez de TRAIL contra los receptores de muerte puede ser ventajoso: TRAIL se dirige a múltiples receptores diana que incluyen receptores de muerte y receptores señuelo, por lo tanto hay un problema con la selectividad. Además, TRAIL tiene una semivida en la sangre mucho más corta comparada con la de los anticuerpos monoclonales, un factor que afecta la dosis y los parámetros de frecuencia de la dosificación. La semivida en la sangre tan corta de TRAIL necesitaría dosis grandes y frecuentes en comparación con los anticuerpos
 20 monoclonales. Además es muy difícil y tedioso de producir un TRAIL recombinante.

Michaelson J.S. y col. (mAbs, Vol 1, Punto 2, p: 128 - 141; Marzo/Abril 2009) describen anticuerpos biespecíficos similares a IgG modificados dirigidos contra dos miembros de la familia del receptor TNF, a saber el TRAIL-R2 (Ligando del receptor que induce apoptosis relacionado con el TNF-2) y LTβR (Receptor beta-linfotoxina).
 30

Herrmann T. y col. (Cancer Res 2008; 68: (4); p: 1221 - 1227) describen moléculas Fab combinadas químicamente monovalentes biespecíficas dirigidas contra el receptor celular de superficie CD95/Fas/Apo-1 y tres antígenos de células de glioblastoma: NG2, EGFR y CD40.

35 El documento WO2005/092927 A1 desvela un anticuerpo biespecífico que se dirige contra TRAIL-R2 (DR5) y LTβR un miembro de la familia del TNF. El documento US 5.965.710 desvela anticuerpos monoclonales que se dirigen al epítipo PR1A3 del antígeno carcino-embriionario (CEA).

40 La presente invención se refiere a anticuerpos que combinan un sitio de unión al antígeno que se dirige al receptor de muerte con un segundo sitio de unión al antígeno que se dirige a un segundo antígeno. Por lo que los receptores de muerte se entrecruzan y se induce apoptosis de la célula diana. La ventaja de estos anticuerpos biespecíficos agonistas del receptor de muerte sobre los anticuerpos convencionales que se dirigen al receptor de muerte es la especificidad de inducción de apoptosis solamente en el sitio donde se expresa el segundo antígeno.

45 En un primer objetivo, la presente invención se refiere a un anticuerpo biespecífico que comprende un primer sitio de unión al antígeno específico para DR5 y un segundo sitio de unión al antígeno específico para FAP.

En una realización preferida del anticuerpo biespecífico, el receptor de muerte es el receptor de muerte polipéptido 5 (DR5), preferentemente el polipéptido DR5 humano (Sec. Id. N° 2).

50 La presente divulgación se refiere también a un anticuerpo biespecífico, en el que el segundo antígeno se selecciona de entre, polipéptido antígeno carcinoembriionario (CEA), proteína CRIPTO, polipéptido homólogo de rotonda mágica 4 (ROBO4), polipéptido proteoglicano de sulfato de condroitina asociado al melanoma (MCSP), polipéptido tenascina C y polipéptido de la proteína de activación del fibroblasto (FAP), preferentemente el polipéptido CEA humano (Sec. Id. N° 4), polipéptido CRIPTO humano (Sec. Id. N° 5), polipéptido ROBO4 humano (Sec. Id. N° 6), polipéptido MCSP humano (Sec. Id. N° 7), polipéptido tenascina C humano (Sec. Id. N° 8) y polipéptido FAP humano (Sec. Id. N° 9).
 55

En una realización preferida más del anticuerpo biespecífico, el anticuerpo biespecífico es una molécula dimérica que comprende un primer anticuerpo que comprende el primer sitio de unión al antígeno y un segundo anticuerpo que comprende un segundo sitio de unión al antígeno.
 60

En una realización preferida del anticuerpo biespecífico dimérico de la presente invención, el primer y segundo anticuerpos comprenden una parte Fc de una cadena pesada de anticuerpo, en el que la parte Fc del primer anticuerpo comprende un primer módulo de dimerización y la parte Fc del segundo anticuerpo comprende un segundo módulo de dimerización que permiten la heterodimerización de los dos anticuerpos.
 65

En una realización preferida más del anticuerpo biespecífico dimérico, el primer módulo de dimerización comprende protuberancias y el segundo módulo de dimerización comprende huecos según la estrategia botón en ojal (véase Carter P.; Ridgway J.B.B.; Presta L.G.: Immunotechnology, Volumen 2, Número 1, Febrero 1996, pp. 73-73(1)).

5 En una realización más del anticuerpo biespecífico dimérico, el primer anticuerpo es una molécula de inmunoglobulina (Ig) que comprende una cadena ligera y una cadena pesada y el segundo anticuerpo se selecciona de entre el grupo que consiste en scFv, scFab, Fab o Fv.

10 En una realización preferida más el anticuerpo biespecífico comprende una parte Fc modificada que tiene una afinidad de unión reducida para los receptores Fc γ comparada con la parte Fc de tipo silvestre, por ejemplo una modificación LALA.

15 En una realización preferida aún más del anticuerpo biespecífico dimérico, la molécula de Ig comprende el primer sitio de unión al antígeno específico para DR5 y el segundo anticuerpo comprende el segundo sitio de unión al antígeno específico para FAP.

En una realización preferida más del anticuerpo biespecífico, la molécula de Ig comprende el segundo sitio de unión al antígeno específico para y el segundo anticuerpo comprende el sitio de unión al antígeno específico para DR5.

20 En una realización preferida más del anticuerpo biespecífico dimérico, el segundo anticuerpo se fusiona en el extremo N o C de la cadena pesada de la molécula de Ig.

En una realización preferida más del anticuerpo biespecífico dimérico, el segundo anticuerpo se fusiona en el extremo N o C de la cadena ligera de la molécula de Ig.

25 En otra realización preferida del anticuerpo biespecífico dimérico, la molécula de Ig es una IgG. En una realización preferida más del anticuerpo biespecífico dimérico, la segunda molécula se fusiona a la molécula de Ig por un péptido enlazador, preferentemente un péptido enlazador que tiene una longitud de aproximadamente 10 – 30 aminoácidos.

30 En una realización preferida más del anticuerpo biespecífico dimérico, el segundo anticuerpo comprende restos adicionales de cisteína para formar enlaces disulfuro.

35 Los anticuerpos biespecíficos de acuerdo con la invención son al menos bivalentes y pueden ser trivalentes o multivalentes, por ejemplo, tetravalentes o hexavalentes.

En un segundo objetivo, la presente invención se refiere a una composición farmacéutica que comprende un anticuerpo biespecífico de la presente invención.

40 En un tercer objetivo, la presente invención se refiere a un anticuerpo biespecífico de la presente invención para el tratamiento del cáncer.

45 En más objetivos, la presente divulgación se refiere a una secuencia de ácido nucleico que comprende una secuencia que codifica una cadena pesada de un anticuerpo biespecífico de la presente invención, un vector de expresión que comprende dicha secuencia de ácido nucleico y una célula huésped procariota o eucariota que comprende dicho vector.

Descripción detallada de la invención

50 El término “polipéptido” se utiliza en el presente documento para referirse a secuencias nativas de aminoácidos y variantes de la secuencia de los polipéptidos de la presente invención es decir, DR4, DR5, FAS, CEA, CRIPTO, ROBO4, MCSP, Tenascina C y FAP de cualquier animal, por ejemplo especies de mamíferos, incluyendo seres humanos.

55 “Polipéptido nativo” se refiere a un polipéptido que tiene la misma secuencia de aminoácidos que un polipéptido de origen natural independientemente de su modo de preparación. La expresión “polipéptido nativo” engloba específicamente formas truncadas o segregadas de origen natural, formas variantes de origen natural (por ejemplo formas empalmadas alternativamente), y variantes alélicas de origen natural de los polipéptidos de la presente invención. Las secuencias de aminoácidos del Listado de Secuencias (Sec. Id. N° 1-9) se refieren a secuencias nativas humanas de las proteínas de la presente invención.

60 La expresión “variante de polipéptido” se refiere a variantes de la secuencia de aminoácidos de una secuencia nativa que contiene una o más sustituciones y/o eliminaciones y/o inserciones de aminoácidos de la secuencia nativa. Las variantes de la secuencia de aminoácidos generalmente tiene una identidad de secuencia de al menos aproximadamente un 75%, preferentemente al menos aproximadamente un 80%, más preferentemente al menos aproximadamente un 85%, aún más preferentemente al menos aproximadamente un 90%, más preferentemente al

menos aproximadamente un 95% con la secuencia de aminoácidos de una secuencia nativa de un polipéptido de la presente invención.

5 El término "anticuerpo" engloba varias formas de estructuras de anticuerpo incluyendo pero sin limitarse a estos, anticuerpo completos y fragmentos de anticuerpo. El anticuerpo de acuerdo con la invención es preferentemente un anticuerpo completo humano, un anticuerpo humanizado, un anticuerpo quimérico, o un anticuerpo modificado genéticamente siempre y cuando mantenga las propiedades características de acuerdo con la invención.

10 "Fragmentos de anticuerpo" comprende una parte de un anticuerpo de longitud completa, preferentemente el dominio variable del mismo, o al menos el sitio de unión al antígeno del mismo. Ejemplos de fragmentos de anticuerpo incluyen, moléculas de anticuerpo monocatenario, y anticuerpo multiespecífico formadas a partir de fragmentos de anticuerpo. Los anticuerpos scFv están descritos, por ejemplo, en Houston, J.S., *Methods in Enzymol.* 203 (1991) 46-96). Además, los fragmentos de anticuerpo comprenden polipéptidos de una cadena que tienen características de un dominio VH, concretamente que es capaz de ensamblarse junto con un dominio VL, o de un dominio VL, concretamente que es capaz de ensamblarse junto con un dominio VH a un sitio de unión al antígeno funcional y que por lo tanto proporciona la propiedad de unión al antígeno de los anticuerpos de longitud completa.

15 Las expresiones "anticuerpo monoclonal" o "composición de anticuerpo monoclonal" como se utiliza en el presente documento se refiere a una preparación de moléculas de anticuerpo de una sola composición de aminoácidos.

20 La expresión "anticuerpo quimérico" se refiere a un anticuerpo que comprende una región variable, es decir, una región de unión, de una fuente o especie y al menos una parte de una región constante derivada de una fuente o especie diferente, normalmente preparado por técnicas de ADN recombinante. Se prefieren los anticuerpos quiméricos que comprenden una región variable murina y una región constante humana. Otras formas preferidas de "anticuerpos quiméricos" englobadas por la presente invención son aquellas en las que se ha modificado o se ha cambiado la región constante del anticuerpo original para generar propiedades de acuerdo con la invención, especialmente respecto a la unión a C1q y/o la unión al receptor Fc (FcR). Tales anticuerpos quiméricos también se refieren a "anticuerpos con cambio de clase". Los anticuerpos quiméricos son el producto de genes inmunoglobulina expresados que comprenden segmentos de ADN que codifican regiones variables de inmunoglobulinas y segmentos de ADN que codifican regiones constantes de inmunoglobulinas. Los métodos para producir anticuerpos quiméricos implican técnicas convencionales de ADN recombinante y transfección genética que son bien conocidas en la técnica. Véase por ejemplo, Morrison, S.L., y col., *Proc. Natl. Acad. Sci. EE. UU.* 81 (1984) 6851-6855; Patente de EE. UU. N^{os} 5.202.238 y 5.204.244.

35 La expresión "anticuerpo humanizado" se refiere a anticuerpos en los que el armazón, o las "regiones determinantes de complementariedad" (CDR) se han modificado para comprender la CDR de una inmunoglobulina de especificidad diferente en comparación con la de la inmunoglobulina parental. En una realización preferida, se injerta una CDR murina en una región de armazón de un anticuerpo humano para preparar un "anticuerpo humanizado". Véase por ejemplo, Riechmann, L., y col., *Nature* 332 (1988) 323-327; y Neuberger, M.S., y col., *Nature* 314 (1985) 268-270. Las CDR particularmente preferidas son las que se corresponden con las secuencias representativas que reconocen los antígenos señalados anteriormente para los anticuerpos quiméricos. Otras formas de "anticuerpos humanizados" englobados por la presente invención son en los que la región constante del anticuerpo original se ha modificado o cambiado adicionalmente para generar las propiedades de acuerdo con la invención, especialmente respecto a la unión con C1q y/o la unión con el receptor Fc (FcR).

45 La expresión "anticuerpo humano", como se utiliza en el presente documento, se pretende que incluya anticuerpos que tienen regiones variables y constantes derivadas de secuencias de inmunoglobulinas de la línea germinal humana. Los anticuerpos humanos se conocen bien en el estado de la técnica (van Dijk, M.A., y van de Winkel, J.G., *Curr. Opin. Chem. Biol.* 5 (2001) 368-374). Los anticuerpos humanos también se pueden producir en animales transgénicos (por ejemplo, ratones) que son capaces, en la inmunización de producir un repertorio completo de una selección de anticuerpos humanos en ausencia de producción de inmunoglobulinas endógenas. La transferencia de la matriz genética de la línea germinal de inmunoglobulina humana en tal línea germinal de ratones mutantes dará como resultado la producción de anticuerpos humanos frente al desafío antigénico (véase, por ejemplo, Jakobovits, A., y col., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90 (1993) 2551-2555; Jakobovits, A., y col., *Nature* 362 (1993) 255-258; Bruggemann, M., y col., *Year Immunol.* 7 (1993) 33-40). Los anticuerpos humanos también se pueden producir en bibliotecas de fagos de presentación (Hoogenboom, H.R., y Winter, G., *J. Mol. Biol.* 227 (1992) 381-388; Marks, J.D., y col., *J. Mol. Biol.* 222 (1991) 581-597). Las técnicas de Cole y col. y Boerner y col. también están disponibles para la preparación de anticuerpos monoclonales humanos (Cole y col., *Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy*, Alan R. Liss, p. 77 (1985); y Boerner, P., y col., *J. Immunol.* 147 (1991) 86-95). Como se ha mencionado ya para los anticuerpos quiméricos y humanizados de acuerdo con la presente invención, la expresión "anticuerpo humano" como se usa en el presente documento también comprende tales anticuerpos que se han modificado en la región constante para generar las propiedades de acuerdo con la invención, especialmente con respecto a la unión con C1q y/o la unión con FcR, por ejemplo, por "cambio de clase", es decir por cambio o mutación de partes Fc (por ejemplo de IgG1 a IgG4 y/o mutación IgG1/IgG4).

La expresión "anticuerpo recombinante humano", como se utiliza en el presente documento, se pretende que incluya todos los anticuerpos humanos que se preparan, se expresan, se crean o se aíslan por medios recombinantes, tales como los anticuerpos aislados de una célula huésped tal como las células NS0 o CHO o de un animal (por ejemplo, un ratón) que es transgénico para genes de inmunoglobulina humana o anticuerpos expresados utilizando un vector de expresión recombinante transfectedo en una célula huésped. Tales anticuerpos recombinantes humanos tienen regiones variables y constantes de forma reorganizada. Los anticuerpos recombinantes humanos de acuerdo con la invención se han sometido a hipermutación somática in vivo. Por lo tanto, las secuencias de aminoácidos de las regiones VH y VL de los anticuerpos recombinantes son secuencias, que aunque derivan y están relacionadas con las secuencias de la línea germinal de VH y VL, pueden no existir naturalmente en el repertorio de la línea germinal de anticuerpos humanos in vivo.

El "dominio variable" (dominio variable de cadena ligera (VL), dominio variable de cadena pesada (VH)) como se utiliza en el presente documento denota cada una de las parejas de dominios de cadena ligera y pesada que están implicados directamente en la unión del anticuerpo al antígeno. Los dominios variables de cadena ligera y cadena pesada tienen la misma estructura general y cada dominio comprende cuatro regiones marco conservadas (FR) cuyas secuencias están conservadas ampliamente, se conectan por medio de tres "regiones hipervariables" (o regiones determinantes de complementariedad, CDR). Las regiones marco conservadas adoptan una conformación de hojas β y las CDR pueden formar bucles que conectan la estructura en hojas β . Las CDR de cada cadena mantienen su estructura tridimensional por las regiones marco conservadas y forman junto con las CDR de la otra cadena el sitio de unión al antígeno. Las regiones CDR3 de cadena ligera y cadena pesada del anticuerpo tienen un papel particularmente importante en la especificidad/afinidad de unión de los anticuerpos de acuerdo con la invención y por lo tanto proporcionan un objetivo más de la invención.

La expresión "sitio de unión al antígeno de un anticuerpo" cuando se utiliza en el presente documento se refiere a los restos de aminoácido de un anticuerpo que son responsables de la unión al antígeno. La parte de unión al antígeno de un anticuerpo comprende restos de aminoácidos de las "regiones determinantes de complementariedad" o "CDR". Regiones "marco conservadas" o "FR" son las regiones del dominio variable distintas de los restos de la región hipervariable como se han definido en el presente documento. Por lo tanto los dominios variables de cadena ligera y pesada de un anticuerpo comprenden del extremo N al C los dominios FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, y FR4. Especialmente la CDR3 de la cadena pesada es la región que contribuye más a la unión al antígeno y define las propiedades del anticuerpo. Las regiones CDR y FR se determinan de acuerdo con la definición de referencia de Kabat y col., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5ª ed., Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (1991) y/o los restos de un "bucle hipervariable".

La especificidad de anticuerpos se refiere al reconocimiento selectivo por el anticuerpo de un epítipo particular de un antígeno. Los anticuerpos naturales, por ejemplo, son monoespecíficos. "Anticuerpos biespecíficos" de acuerdo con la invención son anticuerpos que tienen dos especificidades de unión al antígeno. Los anticuerpos de la presente invención son específicos de dos antígenos, es decir el antígeno receptor de muerte y un segundo antígeno.

El término anticuerpo "mono específico" como se utiliza en el presente documento denota un anticuerpo que tiene uno o más sitios de unión cada uno de los cuales se une al mismo epítipo del mismo antígeno.

El término anticuerpo "biespecífico" como se utiliza en el presente documento denota un anticuerpo que tiene al menos dos sitios de unión cada uno de los cuales se une al diferentes epítopos del mismo antígeno o de un antígeno diferente.

El sufijo "valente" como se utiliza con la presente solicitud denota la presencia de un número específico de sitios de unión en una molécula de anticuerpo. Como tales, los términos "bivalente", "tetra valente" y "hexavalente" denotan la presencia de dos sitios de unión, cuatro sitios de unión, y seis sitios de unión, respectivamente, en una molécula de anticuerpo. Los anticuerpos biespecíficos de acuerdo con la invención son al menos "bivalentes" y pueden ser "trivalentes" o "multivalentes" (por ejemplo, "tetra valente" o "hexavalente").

Los anticuerpos de la presente invención tienen dos o más sitios de unión y son biespecíficos. Es decir, los anticuerpos pueden ser biespecíficos incluso en los casos en los que tienen más de dos sitios de unión (es decir, que el anticuerpo es trivalente o multivalente). Los anticuerpos biespecíficos de la invención incluyen, por ejemplo, anticuerpos de cadena simple multivalentes, diacuerpos o triacuerpos, así como anticuerpos que tienen la estructura del dominio constante de los anticuerpos de longitud completa a la que se unen los sitios de unión al antígeno (por ejemplo, Fv de cadena sencilla, un dominio VH y/o un dominio VL, Fab, o F(ab)₂) por medio de uno o más péptidos enlazadores. Los anticuerpos pueden ser de longitud completa de una especie, o pueden ser quimerizados o humanizados.

Un "fragmento Fab de cadena sencilla" es un polipéptido que consiste en un dominio variable de cadena pesada de anticuerpo (VH), un dominio constante 1 (CH1) de anticuerpo, un dominio variable de cadena ligera de anticuerpo (VL), un dominio constante de cadena ligera (CL) y un enlazador, en el que dichos dominios de anticuerpo y dicho enlazador están ordenados en una de las siguientes maneras en dirección del extremo N al extremo C:

a) VH-CH1-enlazador-VL-CL, b) VL-CL-enlazador-VH-CH1, c) VH-CL-enlazador-VL-CH1 o d) VL-CH1-enlazador-VH-CL; donde dicho enlazador es un polipéptido de al menos 30 aminoácidos, preferentemente entre 32 y 50 aminoácidos. Dichos fragmentos Fab de cadena sencilla a) VH-CH1-enlazador-VL-CL, b) VL-CL-enlazador-VH-CH1, c) VH-CL-enlazador-VL-CH1 y d) VL-CH1-enlazador-VH-CL. se estabilizan por medio de enlaces disulfuro entre el dominio CL y el dominio CH1. Además estas moléculas Fab de cadena sencilla pueden estabilizarse más por la generación de enlaces disulfuro intercatenarios por medio de inserción de restos de cisteína (por ejemplo, en la posición 44 en la cadena pesada variable y en la posición 100 en la cadena ligera variable según la numeración de Kabat). La expresión "extremo N" denota el último aminoácido del extremo N. La expresión "extremo C" denota el último aminoácido del extremo C.

Las expresiones "ácido nucleico" o "molécula de ácido nucleico", como se utilizan en el presente documento, se pretende que incluya moléculas de ADN y moléculas de ARN. Una molécula de ácido nucleico puede ser de cadena sencilla o de doble cadena, pero preferentemente es un ADN de doble cadena.

El término "aminoácido" como se utiliza en esta solicitud denota el grupo de carboxi α -aminoácidos que comprende alanina (código e tres letras: ala, código de una letra: A), arginina (arg, R), asparagina (asn, N), ácido aspártico (asp, D), cisteína (cys, C), glutamina (gln, Q), ácido glutámico (glu, E), glicina (gly, G), histidina (his, H), isoleucina (ile, I), leucina (leu, L), lisina (lys, K), metionina (met, N), fenilalanina (phe, F), prolina (pro, P), serina (ser, S), treonina (thr, T), triptófano (trp, W), tirosina (tyr, Y), y valina (val, V).

Un ácido nucleico está "unido operativamente" cuando se sitúa en relación funcional con otro ácido nucleico. Por ejemplo, el ADN de una pre-secuencia o director secretor está unido operativamente al ADN de un polipéptido si se expresa como una pre-proteína que participa en la secreción del polipéptido; un promotor o potenciador está unido operativamente a una secuencia codificante si afecta la transcripción de la secuencia; o un sitio de unión al ribosoma está unido operativamente a una secuencia codificante si se posiciona de forma que facilita la traducción. Generalmente, "unido operativamente" significa que las secuencias de ADN que se unen son co-lineales, y, en el caso de un director secretor, contiguas en la fase de lectura. Sin embargo los potenciadores no tienen que estar contiguos. La unión se consigue por unión en los sitios de restricción convenientes. Si tales sitios no existen, se utilizan adaptadores sintéticos oligonucleótidos o enlazadores según la práctica convencional.

Como se utiliza en el presente documento, las expresiones "célula", "línea celular", y "cultivo celular" se utilizan de manera intercambiable y todas tales denominaciones incluyen la progenie. Por lo tanto, las palabras "transfectantes" y "células transfectantes" incluyen el sujeto celular primario y los cultivos derivados del mismo independientemente del número de transferencias. También se entiende que toda la progenie no tendrá precisamente el mismo contenido de ADN, debido a mutaciones deliberadas o inadvertidas. Se incluyen las variantes de la progenie que pueden tener la misma función o actividad biológica que la seleccionada en la célula transfectada originalmente.

Como se utiliza en el presente documento, el término "unión" o "unido específicamente" se refiere a la unión del anticuerpo con un epítipo del antígeno en un ensayo in vitro, preferentemente un ensayo de resonancia de plasmones superficiales (SPR, BIAcore, GE-Healthcare Uppsala, Suecia). La afinidad de unión se define en términos de k_a (tasa constante de asociación del anticuerpo a partir del complejo antígeno/anticuerpo), k_D (constante de disociación, y KD (k_D/k_a). Unión o unión específica significa una afinidad de unión (KD) de 10^{-8} mol/l o menos, preferentemente 10^{-9} a 10^{-13} mol/l.

La unión del anticuerpo al receptor de muerte se puede investigar por el ensayo BIAcore (GE-Healthcare Uppsala, Suecia). La afinidad de unión se define por los términos k_a (tasa de constante de asociación del anticuerpo a partir del complejo antígeno/anticuerpo), k_D (constante de disociación), y KD (k_D/k_a).

El término "epítipo" incluye cualquier polipéptido determinante capaz de unión específica a un anticuerpo. En ciertas realizaciones, epítipo determinante incluye agrupamientos de moléculas de superficie químicamente activas tales como aminoácidos, cadenas laterales de azúcares, fosforilo, o sulfonilo, y, en ciertas realizaciones, puede tener características estructurales tridimensionales específicas, y/o características de carga específicas. Un epítipo es una región de un antígeno que se une a un anticuerpo.

La "parte Fc" de un anticuerpo no está implicada directamente en la unión de un anticuerpo a un antígeno, pero desempeña varias funciones efectoras. Una "parte Fc de un anticuerpo" es una expresión bien conocida por los expertos en la técnica y se define basándose en la escisión de los anticuerpos por la papaína. Dependiendo de la secuencia de aminoácidos de la región constante de sus cadenas pesadas, los anticuerpos o inmunoglobulinas se dividen en las clases: IgA, IgD, IgE, IgG e IgM, y varias de estas se pueden dividir a su vez en subclases (isotipos), por ejemplo, IgG1, IgG2, IgG3, e IgG4, IgA1, e IgA2. De acuerdo con las regiones constantes de cadena pesada las clases diferentes de inmunoglobulinas se llaman α , β , ϵ , γ , y μ respectivamente. La parte Fc de un anticuerpo está directamente implicada en la ADCC (citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpos) y CDC (citotoxicidad dependiente de complemento) que se basa en la activación del complemento, la unión con C1q y la unión al receptor Fc. La activación del complemento (CDC) se inicia por la unión del factor complemento C1q a la parte Fc de la mayoría de las subclases de anticuerpo IgG. Aunque la influencia de un anticuerpo en el sistema del complemento depende de ciertas condiciones, la unión a C1q se produce por sitios definidos de unión en la parte Fc.

- 5 Tales sitios de unión se conocen en el estado de la técnica y están descritos por ejemplo, en Boakle y col., *Nature* 282 (1975) 742-743, Lukas y col., *J. Immunol.* 127 (1981) 2555-2560, Brunhouse y Cebra, *Mol. Immunol.* 16 (1979) 907-917, Burton y col., *Nature* 288 (1980) 338-344, Thommesen y col., *Mol. Immunol.* 37 (2000) 995-1004, Idusogie y col., *J. Immunol.* 164 (2000) 4178-4184, Hezareh y col., *J. Virology* 75 (2001) 12161-12168, Morgan y col., *Immunology* 86 (1995) 319-324, EP 0307434. Tales sitios de unión son por ejemplo, L234, L235, D270, N297, E318, K320, K322, P331 y P329 (numerados de acuerdo con el índice EU de Kabat, véase posteriormente). Los anticuerpos de las subclases IgG1, IgG2 e IgG3 muestran normalmente activación del complemento y unión con C1q y C3, mientras que IgG4 no activa el sistema de complemento y no se une a C1q y C3.
- 10 Los anticuerpos de acuerdo con la invención se producen por medios recombinantes. Por lo tanto, un aspecto de la presente invención es un ácido nucleico que codifica el anticuerpo de acuerdo con la invención y un aspecto más es una célula que comprende dicho ácido nucleico que codifica un anticuerpo de acuerdo con la invención. Los métodos para la producción recombinante son ampliamente conocidos en el estado de la técnica y comprenden la expresión de proteínas en células procariontas y eucariotas con el posterior aislamiento del anticuerpo y normalmente
- 15 la purificación a una pureza farmacéuticamente aceptable. Para la expresión de anticuerpos como se ha mencionado anteriormente en una célula huésped, los ácidos nucleicos que codifican las respectivas cadenas pesada y ligera se insertan en vectores de expresión por métodos de referencia. La expresión se lleva a cabo en células huésped procariontas o eucariotas como las células CHO, células NS0, células SP2/0, células HEK293 (incluyendo las HEK293 EBNA), células COS, células PER.C6, levaduras, o células *E. coli*, y el anticuerpo se recupera de las células (sobrenadante o células después de su lisis). Los métodos generales para la producción recombinante de anticuerpos son bien conocidos en el estado de la técnica y se han descrito, por ejemplo, en los artículos de revisión de Makrides, S.C., *Protein Expr. Purif.* 17 (1999) 183-202; Geisse, S., y col., *Protein Expr. Purif.* 8 (1996) 271-282; Kaufman, R.J., *Mol. Biotechnol.* 16 (2000) 151-161; Werner, R.G., *Drug Res.* 48 (1998) 870-880.
- 20 Los anticuerpos de acuerdo con la invención se separan adecuadamente del medio de cultivo por procedimientos de purificación de inmunoglobulinas convencionales tales como, por ejemplo, proteína A-Sepharosa, cromatografía en hidroxapatita, electroforesis en gel, diálisis, o cromatografía de afinidad. El ADN y ARN que codifican los anticuerpos monoclonales se aíslan y se secuencian fácilmente utilizando procedimientos convencionales. Las células de hibridoma pueden servir como una fuente de tales ADN y ARN. Una vez que se aísla, el ADN se puede insertar en vectores de expresión, que entonces se transfectan en células huésped tales como células HEK293, células CHO, o células de mieloma que no producen proteínas inmunoglobulinas de otra manera, para obtener la síntesis de anticuerpos monoclonales en las células huésped.
- 25 Las variantes de secuencias de aminoácidos (o mutantes) del anticuerpo de acuerdo con la invención se preparan introduciendo cambios de nucleótidos apropiados en el ADN del anticuerpo, o por síntesis de nucleótidos. Tales modificaciones se pueden llevar a cabo, sin embargo, solamente en un intervalo muy limitado, por ejemplo, como se ha descrito anteriormente. Por ejemplo, las modificaciones no alteran las características del anticuerpo mencionadas anteriormente tales como el isotipo de IgG y la unión al antígeno, pero puede mejorar el rendimiento de la producción recombinante, la estabilidad proteica o facilitar la purificación.
- 30 La expresión "célula huésped" como se utiliza en la presente solicitud denota cualquier clase de sistema celular que se puede modificar para generar anticuerpos de acuerdo con la presente invención. En una realización se utilizan células HEK293 y células CHO como células huésped. Como se utiliza en el presente documento, las expresiones "célula", "línea celular", y "cultivo celular" se utilizan de manera intercambiable y todas tales denominaciones incluyen la progenie. Por lo tanto, las palabras "transfectantes" y "células transfectantes" incluyen el sujeto celular primario y los cultivos derivados del mismo independientemente del número de transferencias. También se entiende que toda la progenie no tendrá precisamente el mismo contenido de ADN, debido a mutaciones deliberadas o inadvertidas. Se incluyen las variantes de la progenie que pueden tener la misma función o actividad biológica que la seleccionada en la célula transfectada originalmente.
- 35 La expresión en las células NS0 se describe, por ejemplo, en Barnes, L.M., y col., *Cytotechnology* 32 (2000) 109-123; Barnes, L.M., y col., *Biotech. Bioeng.* 73 (2001) 261-270. La expresión transitoria se describe, por ejemplo, en Durocher, Y., y col., *Nucl. Acids. Res.* 30 (2002) E9. La clonación de dominios variables se describe en Orlandi, R., y col., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86 (1989) 3833-3837; Carter, P., y col., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89 (1992) 4285-4289; y Norderhaug, L., y col., *J. Immunol. Methods* 204 (1997) 77-87. Un sistema de expresión transitoria preferido (HEK293) se describe en Schlaeger, E.-J., y Christensen, K., in *Cytotechnology* 30 (1999) 71-83 y en Schlaeger, E.-J., in *J. Immunol. Methods* 194 (1996) 191-199.
- 40 Las secuencias de elementos reguladores que son adecuadas para procariontas, por ejemplo, incluyen un promotor, opcionalmente una secuencia operadora, y un sitio de unión al ribosoma. Se sabe que las células eucariotas utilizan promotores, potenciadores y señales de poliadenilación.
- 45 La purificación de anticuerpos se lleva a cabo con el fin de eliminar componentes celulares u otros contaminantes, por ejemplo, otros ácidos nucleicos celulares o proteínas, por técnicas de referencia, incluyendo el tratamiento alcalino/SDS, bandedo CsCl, cromatografía en columna, electroforesis en gel de agarosa, y otras bien conocidas en la técnica. Véase Ausubel, F., y col., ed. *Current Protocols in Molecular Biology*, Greene Publishing and Wiley
- 50
- 55
- 60
- 65

Interscience, New York (1987). Se han establecido diferentes métodos y se han utilizado ampliamente para purificación proteica, tales como cromatografía de afinidad con proteínas microbianas (por ejemplo cromatografía de afinidad de proteína A o proteína G), cromatografía de intercambio iónico (por ejemplo de intercambio catiónico (resinas carboximetilo), intercambio aniónico (resinas aminoetilo) y de intercambio en modo mixto), adsorción tiofílica (por ejemplo, con beta-mercaptoetanol y otros ligandos SH), cromatografía de interacción hidrofóbica o adsorción aromática (por ejemplo, con fenil-sepharosa, resinas aza-arenofílicas, o ácido m-aminofenilborónico), cromatografía de afinidad de metales quelados (por ejemplo, con material de afinidad Ni(II) y Cu(II)), cromatografía de exclusión por tamaño, y métodos electroforéticos (tales como electroforesis en gel, electroforesis capilar) (Vijayalakshmi, M.A. Appl. Biochem. Biotech. 75 (1998) 93-102).

Como se utiliza en el presente documento, "vehículo farmacéutico" incluye todos y cada uno de los disolventes, medios de dispersión, revestimientos, agentes antibacterianos y antifúngicos, agentes de absorción retardada e isotónicos, y similares que sean fisiológicamente compatibles. Preferentemente, el vehículo es adecuado para administración intravenosa, intramuscular, subcutánea, parenteral, medular, o epidérmica (por ejemplo, por inyección o infusión)

Una composición de la presente invención se puede administrar por una variedad de métodos conocidos en la técnica. Como apreciará un experto, la vía y/o modo de administración variará dependiendo de los resultados deseados. Para administrar un compuesto de la invención por ciertas vías de administración, puede ser necesario revestir el compuesto con, o co-administrar el compuesto con, un material para evitar su inactivación. Por ejemplo, el compuesto se puede administrar a un sujeto en un vehículo apropiado, por ejemplo, liposomas o un diluyente. Los diluyentes farmacéuticamente aceptables incluyen soluciones salinas tampón y acuosas. Los vehículos farmacéuticos incluyen soluciones o dispersiones acuosas estériles y polvos estériles para preparación extemporánea de soluciones o dispersiones inyectables estériles. El uso de tales medios y agentes para sustancias farmacéuticamente activas se conocen en la técnica.

Las frases "administración parenteral" y "administrado por vía parenteral" como se utilizan en el presente documento significan modos de administración distintos de la administración enteral y la administración tópica, normalmente por inyección, e incluyen, sin limitación, la inyección e infusión intravenosa, intramuscular, intra-arterial, intratecal, intracapsular, intraorbital, intracardiaca, intradérmica, intraperitoneal, transtraqueal, subcutánea, subcuticular, intraarticular, subcapsular, subaracnoidea, intramedular, epidural, e intraesternal.

El término cáncer como se utiliza en el presente documento se refiere a enfermedades proliferativas, tales como linfomas, leucemias linfocíticas, cáncer de pulmón, cáncer de pulmón de células no pequeñas (NSCL), cáncer de pulmón de células bronquioalveolares, cáncer de huesos, cáncer pancreático, cáncer de piel, cáncer de cabeza y cuello, melanoma cutáneo o intraocular, cáncer uterino, cáncer ovárico, cáncer rectal, cáncer de la región anal, cáncer de estómago, cáncer gástrico, cáncer de colon, cáncer de mama, cáncer uterino, carcinoma de trompas de Falopio, carcinoma del endometrio, carcinoma del cérvix, carcinoma de la vagina, carcinoma de la vulva, Enfermedad de Hodgkin, cáncer de esófago, cáncer de intestino delgado, cáncer del sistema endocrino, cáncer de la glándula tiroidea, cáncer de la glándula paratiroidea, cáncer de las glándulas adrenales, sarcoma de tejidos blandos, cáncer de uretra, cáncer de pene, cáncer de próstata, cáncer de la vejiga, cáncer de riñón o uréteres, carcinoma celular renal, carcinoma de la pelvis renal, mesotelioma, cáncer hepatocelular, cáncer biliar, neoplasias del sistema nervioso central (SNC), tumor del eje medular, glioma del tallo cerebral, glioblastoma multiforme, astrocitomas, schwannomas, ependimomas, meduloblastomas, meningiomas, carcinomas de células escamosas, adenomas pituitarios y sarcoma de Ewing, incluyendo las versiones refractarias de cualquiera de los cánceres anteriores o una combinación de uno o más de los cánceres anteriores.

Estas composiciones pueden contener también adyuvantes tales como conservantes, agentes humectantes, agentes emulsionantes, y agentes dispersantes. La prevención de la presencia de microorganismos se asegura por los procedimientos de esterilización, mencionados anteriormente, y por la inclusión de varios agentes antibacterianos y antifúngicos, por ejemplo, parabenos, clorobutanol, fenol, ácido sórbico y similares. También puede ser deseable incluir agentes isotónicos, tales como azúcares, cloruro sódico, y similares en las composiciones. Además, se puede conseguir la absorción prolongada de la forma farmacéutica inyectable incluyendo agentes que retrasan la absorción tales como el monoestearato de aluminio y gelatina.

Independientemente de la vía de administración seleccionada, los compuestos de la presente invención, que se pueden utilizar en una forma hidratada adecuada, y/o las composiciones farmacéuticas de la presente invención se formulan en formas de dosificación farmacéuticamente aceptables según los métodos convencionales conocidas por los expertos en la técnica.

Los niveles actuales de dosificación de los principios activos en las composiciones farmacéuticas de la presente invención se pueden variar de forma que se obtenga una cantidad del principio activo que sea eficaz para conseguir la respuesta terapéutica deseada para un paciente, composición y modo de administración particular, sin que sea tóxico para el paciente. El nivel de dosificación seleccionado dependerá de una variedad de factores farmacocinéticos incluyendo la actividad de las composiciones particulares empleadas en la presente invención, la vía de administración, el tiempo de administración, la tasa de excreción del compuesto particular que se va a

emplear, la duración del tratamiento, otros fármacos, compuestos y/o materiales utilizados en combinación con las composiciones particulares empleadas, la edad, el sexo, el peso, el estado físico, el estado general de salud y la historia médica previa del paciente que se va a tratar, y factores similares bien conocidos en la técnica médica.

5 La composición debe estar estéril y fluida para que la composición se pueda suministrar con una jeringa. Además del agua, el vehículo preferentemente es una solución salina tamponada.

Se puede mantener una fluidez adecuada, por ejemplo, por el uso de un revestimiento tal como lecitina, por el mantenimiento del tamaño adecuado de partícula en el caso de una dispersión y por el uso de tensioactivos. En muchos casos, es preferible incluir agentes isotónicos en la composición, por ejemplo, azúcares, polialcoholes tales como manitol o sorbitol, y cloruro sódico.

15 El término "transformación" como se utiliza en el presente documento se refiere al proceso de transferencia de unos vectores/ácido nucleico en una célula huésped. Si se utilizan células sin paredes celulares que representen una barrera importante como células huésped, la transfección se lleva a cabo, por ejemplo, por el método de precipitación en fosfato cálcico como se describe en Graham y Van der Eh, *Virology* 52 (1978) 546 y sig. Sin embargo, se pueden utilizar también otros métodos para introducir ADN en las células tales como inyección nuclear o por fusión de protoplastos. Si se utilizan células procariotas o células que tengan una pared celular importante, un método de transformación es por ejemplo, el tratamiento con calcio utilizando cloruro cálcico como se describe en Cohen, F. N, y col, *PNAS*. 69 (1972) 7110 y sig.

25 Como se utiliza en el presente documento, "expresión" se refiere al proceso por el que se transcribe un ácido nucleico en ARNm y/o el proceso por el que el ARNm transcrito (también designado como transcripción) se traduce posteriormente en péptidos, polipéptidos, o proteínas. Las transcripciones y los polipéptidos codificados se denominan colectivamente productos genéticos. Si el polinucleótido se deriva de ADN genómico, la expresión en células eucariotas pueden incluir el corte y empalme del ARNm.

30 Un "vector" es una molécula de ácido nucleico, en particular auto replicante, que transfiere una molécula de ácido nucleico insertada en y/o entre células huésped. El término incluye vectores que funcionan primariamente por inserción de ADN o ARN en una célula (por ejemplo, por integración cromosómica), replicación de vectores que funcionan primariamente por la replicación del ADN o ARN, y vectores de expresión que funcionan por transcripción y/o traducción de ADN o ARN. También se incluyen vectores que proporcionan más de una de las funciones que se han descrito.

35 Un "vector de expresión" es un polinucleótido que, cuando se introduce en una célula huésped adecuada, puede transcribirse y traducirse en un polipéptido. Un "sistema de expresión" normalmente se refiere a una célula huésped adecuada que comprende un vector de expresión que puede funcionar para producir un producto de expresión deseado.

40 Los siguientes ejemplos, listado de secuencias y figuras se proporcionan para ayudar al entendimiento de la presente invención, cuyo ámbito real se expone en las reivindicaciones adjuntas. Se entiende que se pueden hacer modificaciones en los procedimientos expuestos sin alejarse del espíritu de la invención.

Breve descripción de las figuras

45 Figura 1: Análisis de unión FACS de los niveles de expresión de CEA, DR5, y FAS en diferentes líneas celulares humanas (Lovo, OVCAR-3, AsPC-1, BxPC3, LS174T y MKN-45) utilizando anticuerpos IgG murinos no marcados disponibles comercialmente (CEA: Abcam nº 11330; DR5: R&D nº MAB631; FAS: BD nº 555671) y una IgG común de cabra anti-ratón, marcada con FITC (Serotec Star 105F) para la detección. Como muestras de control se utilizaron solamente células o células y anticuerpo secundario solo. Excepto para las células Lovo todas las líneas celulares ensayadas expresan cantidades significativas de DR5 y FAS en la superficie. Cuando se comparan con CEA la expresión era bastante baja. Cuando las mismas células se ensayaban con toros anticuerpos para los tres antígenos también fueron positivas las células Lovo en el análisis FACS en la expresión de DR5, FAS y CEA (datos no mostrados).

55 Figura 2: Análisis de inducción de apoptosis (ensayo de fragmentación de ADN) de diferentes líneas celulares tras 4 horas de incubación con anticuerpos disponibles comercialmente que son capaces de inducir apoptosis en solución sin entrecruzamiento (DR5: R&D nº MAB631; FAS: Millipore / Upstate: CH11). Para la detección de la apoptosis se utilizó el análisis de fragmentación de ADN asociado con histona con el kit ELISAPLUS de detección de muerte celular. En las células BxPC-3, Lovo y LS174T se podía inducir claramente la apoptosis por medio de DR5 y FAS, mientras que las células ASPC-1 no sufrieron apoptosis. Las células MKN-45 son más resistentes a DR5 en comparación con las otras líneas celulares.

65 Figura 3: Inducción de apoptosis (ensayo de fragmentación de ADN) de las células LS174T tras 4 horas de incubación con moléculas biespecíficas ApomAb (barra blanca), ApomAb entrecruzado con un anticuerpo Fc anti humano (barra gris, sombreada), ApomAb_sm3e_A (barra negra) y ApomAb_sm3e_A1 (barra gris punteada). Se

puede detectar la inducción de apoptosis dependiente de unión con CEA por hiper-entrecruzamiento dirigido por medio de anticuerpos biespecíficos. Este efecto está en el mismo intervalo que la apoptosis inducida por entrecruzamiento de ApomAb y podría abolirse completamente por preincubación con una cantidad en exceso de IgG sm3e. No se observó apoptosis con los controles (solamente células o IgG sm3e) y tampoco se inducía apoptosis con el ApomAb solo a la concentración utilizada (1 µg/ml).

Figura 4: Comparación de la actividad de inducción de apoptosis de diferentes moléculas biespecíficas ApomAb_sm3e con ApomAb solo (barra blanca) o ApomAb entrecruzado con un anticuerpo Fc humano (barra gris sombreada), en un ensayo de fragmentación de ADN con células LS174T incubadas durante 4 horas con agentes inductores de apoptosis. En general las moléculas en las que se fusionaba el scFv sm3e en el extremo C de la cadena pesada de ApomAb (formato A, barra negra) parecían ser más activas que las construcciones en las que se fusionaba el scFv sm3e en el extremo C de la cadena ligera de ApomAb (formato B, barra gris). Además, los anticuerpos biespecíficos que contenían scFv estabilizado por enlaces disulfuro (Formato A1, barra gris moteada y B1, barra cuadrículada) parecen ser ligeramente inferiores a las moléculas con el scFv tipo silvestre.

Figura 5: Análisis de inducción de apoptosis (ensayo de fragmentación de ADN) de las células LS174T tras 4 horas de incubación con o bien ApomAb (barras blancas), ApomAb que estaba entrecruzado con anticuerpo Fc antihumano (barras grises, sombreadas) o la construcción biespecífica ApomAb_PR1A3_A (barras negras). En cada caso la inducción de la apoptosis era dependiente de la concentración de anticuerpo utilizada. El ApomAb solo inducía bajos niveles de apoptosis a altas concentraciones pero aumentaba significativamente con el entrecruzamiento. La molécula biespecífica ApomAb_PR1A3_A era incluso más activa sin un agente de entrecruzamiento secundario de lo que era el ApomAb entrecruzado.

Figura 6: Análisis de inducción de apoptosis (ensayo de fragmentación de ADN) de células Lovo tras 4 horas de incubación con o bien ApomAb (barras blancas), ApomAb que estaba entrecruzado con anticuerpo Fc antihumano o construcción biespecífica ApomAb_PR1A3_A (barras negras). En cada caso la inducción de apoptosis dependía de la concentración del anticuerpo utilizado. El ApomAb solo inducía bajos niveles de apoptosis a altas concentraciones (como se ha descrito) pero aumentaba significativamente con el entrecruzamiento. La molécula biespecífica ApomAb_PR1A3_A era tan activa por sí sola como el ApomAb entrecruzado.

Figura 7: Comparación de la fragmentación de ADN en células LS174T tras 4 horas de incubación con diferentes anticuerpos biespecíficos que inducen apoptosis. Las moléculas utilizadas eran moléculas biespecíficas ApomAb_PR1A3 en las que se ha fusionado scFv PR1A3 (tipo silvestre = A/B o estabilizado con enlaces disulfuro A1/B1) o bien al extremo C de la cadena pesada (A, barra gris sombreada) o a la cadena ligera (B, barra moteada). Aunque la posición de fusión del scFv no parece en este caso tener una diferencia en términos de inducción de apoptosis, el tipo de scFv utilizado es importante: utilizando el scFv estabilizado con enlaces disulfuro casi abolía completamente la inducción de apoptosis al compararse con las construcciones que contenían el scFv tipo silvestre fusionado al ApomAb (barras negra y gris, respectivamente). Debido a la baja afinidad de PR1A3 en comparación con sm3e la inducción de apoptosis total también era más baja con las moléculas biespecíficas que contenían PR1A3.

Figura 8: Análisis de unión FACS de construcciones biespecíficas ApomAb – CEA (PR1A3) en células MKN-45. Comparación de construcciones biespecíficas ApomAb_PR1A3 del tipo silvestre (A) o scFv estabilizado con enlaces disulfuro (A1). Ambas construcciones se unieron de manera dependiente de concentración a las células diana pero la molécula que contenía PR1A3 en el formato scFv tipo silvestre se une con una afinidad mucho más alta al antígeno que el scFv estabilizado con enlaces disulfuro.

Figura 9: Análisis de la expresión de superficie de CRIPTO, FAS y DR5 en células NCCIT y recombinantes, células HEK293 que expresan CRIPTO por experimentos de unión FACS. Las células NCCIT no expresan FAS, solamente pequeñas cantidades de CRIPTO pero expresan cantidades similares de DR5 al compararse con las células recombinantes HEK293-CRIPTO. Estas últimas células mostraban niveles bajos de expresión de FAS, niveles significativos de DR5 y niveles bastante altos de CRIPTO.

Figura 10: Comparación de inducción de apoptosis (fragmentación de ADN en células HEK293-CRIPTO) utilizando FAS (IgG HFE7A), FAS (IgG HFE7A) entrecruzada por medio de anticuerpo Fc antihumano y moléculas biespecíficas FAS-CRIPTO (HFE7A_LC020 H3L2D1, en las que se fusionaba el scFv CRIPTO de tipo silvestre (A) o estabilizado con enlaces disulfuro (A1) con el extremo C de la cadena pesada de HFE7A. La IgG FAS sola, la IgG CRIPTO sola y la molécula biespecífica FAS-MCSP no inducían apoptosis, aunque la FAS entrecruzada y las moléculas biespecíficas HFE7A-CRIPTO mostraban fragmentación de ADN tras 4 horas de incubación lo que también en parte se podía abolir con pre-incubación con un exceso de IgG anti CRIPTO.

Figura 11: Inducción de apoptosis (ensayo de fragmentación de ADN) por moléculas biespecíficas HFE7A-CRIPTO en células recombinantes HEK293-CRIPTO (barras negras) comparada con células HEK293-FAP (proteína activadora de fibroblastos) (barras blancas). En ambas líneas celulares se puede inducir apoptosis

utilizando un anticuerpo disponible comercialmente (CH11) y con IgG HFE7A que estaba entrecruzada por medio de un anticuerpo Fc específico secundario, mientras que HFE7A solo no induce apoptosis bajo las condiciones utilizadas. La inducción de apoptosis con la molécula biespecífica FAS-CRIPTO era más alta que con la IgG HFE7A entrecruzada pero no podía inhibirse completamente por pre-incubación con una IgG CRIPTO en exceso. En las células HEK293-FAP se podía observar una cierta apoptosis de fondo que tampoco se podía sacar de competición con IgG CRIPTO en exceso. Incluso una molécula de control negativo (en la cual se fusionó un scFv específico de MCSP estabilizado con enlaces disulfuro con el extremo C de la cadena pesada de HFE7A) mostraba un bajo grado de apoptosis en células HEK293-FAP.

Figura 12: Análisis de unión FACS para la determinación de niveles de expresión en superficie de MCSP sobre diferentes líneas celulares (MCF7, SkBr3, A431, A549, HCT-116 y U87-MG) utilizando 2 anticuerpos. Con ambos anticuerpos se podían detectar los mismos niveles de expresión de MCSP, indicando que U87-MG mostraba el nivel de expresión de MCSP más alto, HCT-116 tenía una baja expresión de MCSP mientras que las otras líneas celulares ensayadas eran negativas a MCSP (en el intervalo del control negativo tal como células sin teñir).

Figura 13: Evaluación de la capacidad de apoptosis de células U87-MG (A) y HCT-116 (B) que utilizan ApomAb entrecruzado (barras negras) y HFE7A (barras grises) y las moléculas de control relevantes (anti FAS_CH11, anti DR5_R2 y anti IgG-Fc sola). Aunque la apoptosis en células HCT-116 solamente podía inducirse por medio del receptor DR5 después de cuatro horas y no por medio de FAS, era diferente en las células U87-MG. Aquí, solo se podía observar una apoptosis significativa después de 24 horas. Al contrario que en las células HCT-116 la inducción de apoptosis en U87-MG por HFE7A entrecruzado era dos veces más eficaz que por ApomAb entrecruzado. Los anticuerpos de control que conferían apoptosis ya en solución eran incluso más eficaces.

Figura 14: Análisis de inducción de apoptosis en células U87-MG de glioma tras 24 horas de incubación con el anticuerpo biespecífico HFE7A-MCSP (mAb 9.2.27) en el que tanto la forma silvestre (formato A) o el scFv MCSP estabilizado con enlaces disulfuro (formato A1) está fusionado con el extremo C de la cadena pesada de ApomAb. En este caso la construcción que contenía el scFv estabilizado con enlaces disulfuro demostraba una apoptosis significativamente más alta que la molécula que contenía el scFv tipo silvestre (aunque la cantidad medida de apoptosis por fragmentación de ADN era relativamente baja). Sin embargo, en ambos casos la inducción de apoptosis se podía abolir completamente por pre-incubación de las células con un exceso de IgG MCSP en competición.

Figura 15: Análisis de unión FACS de dos líneas celulares diferentes (SW872 y GM05389) de los niveles de expresión de la proteína de activación de los fibroblastos humana (FAP) (A). Se muestra la intensidad de fluorescencia medida con diferentes concentraciones de un anticuerpo anti FAP sobre un intervalo de tres magnitudes (barras negras, grises y sombreadas). Las reacciones del control negativo como solamente anticuerpo secundario y células se muestran como barras punteadas y barras blancas, respectivamente. Aunque las células GM05389 demostraban expresión de FAP en todas las concentraciones de anticuerpo ensayadas, que estaba por encima de la de fondo, con las células SW872 la expresión de FAP solo se podía detectar con la concentración de anticuerpo utilizada más alta (10 µg/ml), indicando que estas células no son adecuadas para experimentos basados en la inducción de apoptosis/unión de FAP. Además se demuestra que esta línea celular difícilmente sufre apoptosis mediada por ApomAb (B). El ApomAb solo u otro anticuerpo anti DR5 disponible comercialmente no inducía una fragmentación relevante de apoptosis. Solamente cuando ApomAb se entrecruzaba con un anticuerpo Fc antihumano se podía observar un bajo nivel detectable de apoptosis.

Figura 16: Análisis de inducción de apoptosis de GM05389 (barras blancas) y MDA-MB-231 (barras grises) solas comparado con la inducción de apoptosis en el co-cultivo de las dos líneas celulares (barras negras). En todas las líneas celulares el ApomAb solo tenía solamente un efecto mínimo, mientras que el ApomAb entrecruzado daba como resultado una inducción de apoptosis significativa en las células MDA-MB-231. La inducción de la fragmentación de ADN con construcciones biespecíficas agonistas del receptor de muerte (ApomAb-FAP) solamente se producía en altos niveles cuando ambas líneas celulares se co-cultivaban. Aquí el entrecruzamiento del ApomAb solo no aumentaba la apoptosis en el mismo intervalo, indicando que para la inducción de apoptosis óptima son necesarias dos líneas celulares: una que expresa el receptor de muerte y una segunda que expresa el antígeno FAP.

Figura 17: Resultados del ensayo de inducción de apoptosis (24 h) en células MKN-45 con moléculas de ApomAb_PR1A3_scFab biespecífico tetravalente en el que el scFab se fusiona con el extremo C de la cadena pesada de ApomAb (formato A). La inducción de apoptosis se compara con ApomAb (+/- entrecruzamiento con un exceso de anticuerpo Fc antihumano de 10 veces) y controles negativos. Todas las construcciones se utilizaron a concentraciones de 0,1 a 1,0 µg/ml. Bajo las condiciones de ensayo utilizadas la construcción biespecífica ApomAb_PR1A3_scFab (barras negras) mostraba claramente una inducción de apoptosis dependiente de la concentración que está en el mismo intervalo que el que se observa con el ApomAb hiperentrecruzado (barras grises) y que es significativamente más alto que con el ApomAb solo (barras sombreadas).

Figura 18: Análisis de inducción de apoptosis de células LS174T por ApomAb (solo, barras sombreadas o hiperentrecruzado, barras grises) comparado con las construcciones biespecíficas trivalentes (ApomAb_sm3e_scFab;

2x1 valencias, barras negras) y controles negativos. El ensayo se llevó a cabo durante 4 horas utilizando las construcciones a concentraciones de 0,1 y 1,0 µg/ml. La construcción biespecífica Apo-mAb_sm3e_scFab es capaz de inducir apoptosis de una manera dependiente de la dosis en el mismo intervalo que lo hacía el ApomAb híper-entrecruzado.

Figura 19: Análisis de la eficacia in vivo de ApomAb y el anticuerpo agonista ApomAb_sm3e_A1 comparado con el vehículo control en un modelo metastático intraesplénico utilizando la línea celular de carcinoma de colon humano LS174T. Se trataron grupos aleatorios de diez ratones bien con PBS (línea negra), con ApomAb (círculos negros) o anticuerpo biespecífico ApomAb_sm3e_A1 (cuadros negros). El porcentaje de supervivencia se representa frente al transcurso de tiempo del experimento.

Ejemplos

Ejemplo 1: Diseño de anticuerpo biespecíficos que reconocen el receptor de muerte 5 humano y CEA humano

A continuación se describen anticuerpos biespecíficos tetravalentes que comprenden un anticuerpo de longitud completa que se une a un primer antígeno (receptor de muerte humano, DR5) combinado con dos fragmentos Fv de cadena sencilla que se unen a un segundo antígeno (antígeno carcinoembrionario humano, CEA) fusionados por medio de un péptido enlazador con el extremo C bien de la cadena pesada o de la cadena ligera del anticuerpo de longitud completa. Los dominios de anticuerpo y el enlazador en dichas cadenas sencillas Fv tienen la siguiente orientación: VH-enlazador-VL.

Se utilizaron como cadenas pesada y ligera variables las secuencias de anticuerpo que reconocen el DR5 del anticuerpo ApomAb descrito por Adams en el documento US2007 / 0031414 A1.

Se utilizaron como secuencias scFv de cadenas pesada y ligera variables que se unen al antígeno CEA, PR1A3 (Bodmer y col., 1999; US5965710) y sm3e (Begent y col., 2003; US7232888 B2).

Por tecnología de síntesis genética y ADN recombinante se unieron las VH y VL de los correspondientes anticuerpos antiCEA por un enlazador glicina – serina (G4S)₄ para generar Fv de cadena sencilla que se fusionaron por un conector (G4S)_n (donde n = 2 o 4) al extremo C de la cadena pesada o ligera de la IgG1 ApomAb.

Además del tipo silvestre de scFv, se produjeron variantes que contenían restos de cisteína en la posición Kabat 44 de la cadena pesada variable y la posición Kabat 100 de la cadena ligera variable para generar puentes disulfuro entre VH y VL. Esto tenía la intención de estabilizar la molécula de scFv para minimizar la tendencia potencial de agregación.

Para prevenir el entrecruzamiento no específico de las moléculas biespecíficas, por ejemplo por medio de receptores F_γ como el Fc_γR1IIIA humano, se cambiaron dos aminoácidos en la región Fc de la parte IgG de las moléculas biespecíficas. Por mutagénesis dirigida al sitio se intercambiaron los dos restos de leucina en las posiciones 234 y 235 de la región Fc por restos alanina. Se ha descrito que esta mutación denominada LALA impide la interacción Fc-FcR (Hessell y col., Nature 449 (2007), 101 y sig.).

Todas estas moléculas se expresaron recombinantemente, se produjeron y purificaron utilizando técnicas de purificación de anticuerpos de referencia incluyendo cromatografía de afinidad de proteína A seguida por cromatografía de exclusión por tamaño. Las moléculas se caracterizaron en términos de rendimiento de expresión, estabilidad y actividad biológica.

Un resumen de las moléculas de anticuerpo biespecífico agonistas del receptor de muerte que consisten en combinaciones de ApomAb – CEA se enumera en la tabla 1. La descripción del diseño de las diferentes moléculas se puede llegar a concebir por los nombres de la molécula, donde la primera parte caracteriza la IgG (por ejemplo el ApomAb) que se dirige al receptor de muerte, el segundo nombre describe la fuente del scFv (por ejemplo, PR1A3 o sm3e) que se dirige al CEA y la combinación de letra y número describe la posición de fusión y la estabilización con enlaces disulfuro propias del scFv.

Tabla 1: Descripción de los diferentes anticuerpos biespecíficos agonistas del receptor de muerte que se dirigen a DR5 humano y CEA humano con sus características relevantes.

Nombre	IgG	scFv (CEA)	Posición de la fusión	Enlazador	Conector	Estabilización con enlaces disulfuro
ApomAb-sm3e-A	ApomAb	sm3e	Extremo C de la cadena pesada	(G ₄ S) ₄	(G ₄ S) ₂	no
ApomAb-sm3e-A1	ApomAb	sm3e	Extremo C de la cadena pesada	(G ₄ S) ₄	(G ₄ S) ₂	Sí

Nombre	IgG	scFv (CEA)	Posición de la fusión	Enlazador	Conector	Estabilización con enlaces disulfuro
ApomAb-sm3e-B	ApomAb	sm3e	Extremo C de la cadena ligera	(G ₄ S) ₄	(G ₄ S) ₂	no
ApomAb-sm3e-B1	ApomAb	sm3e	Extremo C de la cadena ligera	(G ₄ S) ₄	(G ₄ S) ₂	Sí
ApomAb-PR1A3-A	ApomAb	PR1A3	Extremo C de la cadena pesada	(G ₄ S) ₄	(G ₄ S) ₂	no
ApomAb-PR1A3-A1	ApomAb	PR1A3	Extremo C de la cadena pesada	(G ₄ S) ₄	(G ₄ S) ₂	Sí
ApomAb-PR1A3-B	ApomAb	PR1A3	Extremo C de la cadena ligera	(G ₄ S) ₄	(G ₄ S) ₂	no
ApomAb-PR1A3-B1	ApomAb	PR1A3	Extremo C de la cadena ligera	(G ₄ S) ₄	(G ₄ S) ₂	Sí

Ejemplo 2: Expresión y purificación de anticuerpos biespecíficos agonistas del receptor de muerte

- 5 Se construyeron vectores de expresión por separado de las cadenas pesada y ligera de cada anticuerpo biespecífico. Estos vectores contenían un marcador de selección de procarionota, elementos reguladores para la expresión genética en células de mamífero y un origen de replicación, oriP, del virus de Epstein-Barr para la replicación autónoma de los plásmidos en células HEK293 que contenían EBNA. Los plásmidos se propagaron en E. coli, se amplificaron, se purificaron y se cotransfectaron en células HEK293 EBNA para expresión transitoria utilizando precipitación mediada por fosfato Ca. Tras siete días se recolectaron los sobrenadantes del cultivo y se purificaron los anticuerpos por cromatografías de proteína A y exclusión por tamaño. Las moléculas purificadas se analizaron en cuanto a su homogeneidad, estabilidad e integridad por análisis de cromatografía de exclusión por tamaño (antes y después de una etapa de congelación-descongelación) y análisis SDS-PAGE (bajo condiciones de reducción y no reducción).

15

Tabla 2: Sumario de los rendimientos de la purificación y contenido en monómeros de diferentes anticuerpos biespecíficos agonistas del receptor de muerte

Nombre	Rendimiento [mg /l]	Concentración [mg/ml]	Contenido en monómeros [%]	Aumento de agregados tras la congelación
ApomAb-sm3e-A	4,34	0,14	100,00	no
ApomAb-sm3e-A1	4,38	1,25	100,00	no
ApomAb-sm3e-B	3,18	1,27	100,00	no
ApomAb-sm3e-B1	2,19	1,10	100,00	no
ApomAb-PR1A3-A	5,83	0,22	98,48	Sí
ApomAb-PR1A3-A1	5,62	0,20	100,00	no
ApomAb-PR1A3-B	5,00	0,43	98,88	Sí
ApomAb-PR1A3-B1	11,46	1,25	100,00	no

20 Todas las moléculas se podían producir y purificar en cantidades suficientes y con la calidad adecuada para posteriores caracterizaciones y ensayos. Los rendimientos tras la purificación estaban en el intervalo de aproximadamente 5 mg/l con algunas desviaciones en algunas moléculas. Por ejemplo el rendimiento de ApomAb-sm3e-B1 era significativamente menor (2,19 mg/l) mientras que la construcción correspondiente, ApomAb-PR1A3_B1 pudo purificarse en incluso más de 11 mg/l.

25 La determinación de formación de agregados tras la congelación/ descongelación y el aumento de la concentración de anticuerpo revelaba que, dependiendo de la molécula, la estabilización por medio de puentes disulfuro intercatenarios podía tener efectos beneficiosos sobre la tendencia a formar agregados. En general la estabilización

con enlaces disulfuro daba mayores rendimientos en contenido de monómeros de las moléculas al menos a altas concentraciones (tabla 3).

Tabla 3: Formación de agregados de los anticuerpos biespecíficos agonistas del receptor de muerte en correlación con la concentración de proteína

Construcción	Concentración [mg/ml]	Contenido en monómeros [%]
ApomAb-PR1A3-A	0,22	98,48
	1,73	90,90
	3,30	81,50
ApomAb-PR1A3-A1	0,20	100,00
	1,50	100,00
	3,37	100,00
ApomAb-sm3e-A	0,14	100,00
	1,11	95,00
	2,74	94,00
ApomAb-sm3e-A1	1,25	100,00
	0,79	98,60
	2,00	97,10

5 La tendencia a formar agregados no solo depende de la estabilización con enlaces disulfuro del scFv sino también por el antígeno al que se une el scFv. En la tabla 3 se ve que es obvio que las moléculas ApomAb biespecíficas que contienen scFv PR1A3 sufren una agregación significativa con el aumento de concentración de proteína. A concentraciones de más de 3 mg/ml solo el 80% del material aparece como monómeros, mientras que tras la introducción de dos restos adicionales de cisteína (VH44/VL100 según la numeración Kabat) estas moléculas no formaban agregados en la concentración utilizada.

10 El grado de formación de agregados con moléculas de ApomAb biespecíficas que contenían scFv sm3e no es tan pronunciado ya que aquí el contenido de monómeros es aún alrededor del 94% sin y el 97% con la estabilización con enlaces disulfuro, respectivamente.

15 Ejemplo 3: Inducción de apoptosis por moléculas de anticuerpo biespecíficas DR5-CEA del receptor de muerte

20 El anticuerpo ApomAb agonista del receptor de muerte DR5 humano induce apoptosis de las células tumorales que expresan DR5 tales como las líneas celulares de cáncer de colon LS180 o Colo-205. In vitro, el ApomAb por sí mismo interviene en una apoptosis significativa que puede aumentar drásticamente por entrecruzamiento del ApomAb unido a DR5 con anticuerpos que se unen a la región Fc humana del ApomAb. Esta inducción de apoptosis también se traduce in vivo como se puede demostrar en diferentes modelos tumorales en los que el ApomAb muestra una eficacia significativa (Jin y col., 2008; Adams y col., 2008), más probablemente por acontecimientos de entrecruzamiento a través de los receptores Fc humanos. Para evaluar el potencial del entrecruzamiento en los anticuerpos biespecíficos DR5-CEA para dirigirlos al sitio tumoral con DR5 y la posterior inducción de apoptosis se analizó in vitro la actividad de moléculas de ApomAb biespecíficas CEA en términos de mediación de apoptosis.

25 Con el fin de determinar si las moléculas de anticuerpo biespecíficas DR5-CEA eran capaces de inducir apoptosis tumoral dependiente de unión al antígeno en las células diana, se analizó la fragmentación de ADN en las células tumorales tras la incubación con anticuerpos biespecíficos agonistas del receptor de muerte como medida de la apoptosis, utilizando un ensayo ELISA de detección de muerte celular.

30 Para hacerse una idea de las líneas celulares que serían adecuadas para medir el cruzamiento de DR5 dependiente de la unión al antígeno que dé lugar a la inducción de apoptosis se analizaron varias líneas celulares tumorales en cuanto a la expresión de superficie de DR5, FAS y CEA.

35 Todas las líneas celulares diana se analizaron en cuanto a los niveles de expresión de antígenos relacionados con tumores y receptores de muerte FAS o DR5 antes de que se llevaran a cabo los ensayos de apoptosis de la siguiente manera.

40

Se determinó el número y viabilidad de las células. Para ello, se separaron las células en crecimiento adherente con un tampón de disociación celular (Gibco - Invitrogen nº 13151-014). Las células se recolectaron por centrifugación (4 min, 400 x g), se lavaron con tampón FACS (PBS/0,1% BSA) y se ajustó el número de células a $1,111 \times 10^6$ células/ml en tampón FACS. Se utilizaron 180 μ l de esta suspensión celular por pocillo de una placa de 96 pocillos de fondo redondo, que daba como resultado 2×10^5 células por pocillo. Las células se incubaron durante 30 min a 4 °C con el primer anticuerpo a una dilución adecuada. Luego se recolectaron las células por centrifugación (4 min, 400 x g), se retiró completamente el sobrenadante y las células se lavaron una vez con 150 μ l de tampón FACS. Las células se resuspendieron en 150 μ l de tampón FACS y se incubaron con el anticuerpo secundario (en el caso de que se usara un anticuerpo primario sin marcar) durante 30 min a 4 °C en oscuridad. Tras dos etapas de lavado con tampón FACS se resuspendieron las células en 200 μ l de tampón FACS y se analizaron en un HTS FACSCanto II (BD, Software FACS Diva). De manera alternativa las células se pueden fijar con 200 μ l de PFA (paraformaldehído) al 2% en tampón FACS durante 20 min a 4 °C y se analiza más tarde. Todos los ensayos se llevaron a cabo por triplicado.

En la figura 1 se muestran los resultados del análisis de unión FACS de diferentes líneas celulares con tres anticuerpos específicos que reconocen CEA, DR5 o FAS. Excepto en las células Lovo todas las otras líneas celulares expresan los antígenos ensayados a diferentes niveles. La expresión de CEA más alta se observaba en las células MKN-45 y más o menos similar en OVCAR-3, AsPC-1, BxPC-3 y LS174T. En términos de expresión de DR5 las células AsPC-1 y BxPC.3 expresaban el receptor más en comparación con las otras líneas celulares seguidas por OVCAR-3 y MKN-45 mientras que LS174T era la de menor expresión de DR5. Con respecto a la expresión de FAS las líneas celulares diferían pero todas mostraban una expresión significativa de FAS. Cuando las células Lovo eran negativas en este ensayo se analizaron más tarde con diferentes anticuerpos contra CEA, DR5 y FAS y también mostraron expresión significativa de los antígenos ensayados (datos no mostrados).

Para la determinación de la apoptosis inducida se utilizó el kit de Detección de Muerte Celular ELISA PLUS de Roche. En resumen, se sembraron 10^4 células por pocillo en una placa de 96 pocillos (después de separarlas, y de la determinación del número de células y la viabilidad) en 200 μ l de medio apropiado y se incubaron una noche a 37 °C en una atmósfera con el 5% de CO₂. Al día siguiente el medio se reemplazó con medio recién preparado que contenía los anticuerpos que inducen apoptosis, los anticuerpos control y otros controles en concentraciones apropiadas:

Los anticuerpos biespecíficos se utilizaron en una concentración final de 0,01 – 10 μ g/ml; los anticuerpos control se utilizaron a 0,5 μ g/ml y se utilizaron anticuerpos entrecruzados a 100 μ g/ml. Los anticuerpos de competición se utilizaron a 100 veces de exceso.

Se incubaron las células de 4 – 24 horas a 37 °C, 5% de CO₂ para permitir la inducción de apoptosis. Las células se recolectaron por centrifugación (10 min, 200 x g) y se incubaron durante 1 h a temperatura ambiente en 200 μ l de tampón de lisis (suministrado en el kit). Las células intactas se sedimentaron por centrifugación (10 min, 200 x g) y se analizaron 20 μ l de sobrenadante según las recomendaciones del fabricante para la inducción de apoptosis.

Un grupo de líneas celulares se analizó también en cuanto a su capacidad de sufrir apoptosis por la incubación con anticuerpos ya en solución contra DR5 o FAS disponibles comercialmente que se sabía que se entrecruzaban con receptores de muerte (figura 2).

Se observaron aquí diferencias significativas entre las líneas celulares en términos de inducción de apoptosis como se muestra en la figura 2. Mientras que la inducción de apoptosis en MKN-45 y BxPC-3 por medio de DR5 y FAS era similar (aunque en MKN-45 el valor de fragmentación de ADN alcanzaba solamente el 50% que en BxPC-3), en células LS174T y Lovo la apoptosis podía inducirse mucho mejor con entrecruzamiento del anticuerpo con DR5 que con unión del anticuerpo a FAS. En las células LS174T la inducción de apoptosis por entrecruzamiento por medio de DR5 era aproximadamente dos veces más eficaz que con el entrecruzamiento por medio de FAS. En las células Lovo esta diferencia en la inducción de apoptosis era incluso de cuatro veces. Las células ASPC-1 eran muy resistentes a la inducción de apoptosis por medio de entrecruzamiento con el receptor de muerte. Basándose en estos resultados las dos líneas celulares Lovo y LS174T se eligieron para analizar la inducción de apoptosis por entrecruzamiento de antígenos tumorales diana DR5.

Los resultados de inducción de apoptosis en células LS174T con el tratamiento con moléculas biespecíficas DR5-CEA (ApomAb-sm3e) en comparación con el efecto de ApomAb o ApomAb entrecruzado se ilustra en la figura 3. Bajo las condiciones utilizadas en el ensayo (4 horas de incubación a una concentración de 1 μ g/ml) el ApomAb solo o el sm3e en formato IgG1 no mostraba fragmentación de ADN detectable (valor normalizado a 'solamente células'), mientras que las moléculas biespecíficas ApomAb-sm3e (sea con el Fcv tipo silvestre (formato A) o estabilizado con enlaces disulfuro (formato A1) mostraban una inducción de apoptosis significativa que era comparable al máximo teórico de ApomAb hiper-entrecruzado. Las dos moléculas biespecíficas mostraban una actividad muy similar, demostrando que la estabilización de la molécula por la inserción de enlaces disulfuro intercatenarios no afecta a la actividad biológica. Cuando las células se pre-incubaron con un exceso de IgG sm3e (a una concentración 100 veces mayor comparada con las construcciones biespecíficas) no se indujo más ninguna apoptosis, indicando que la

IgG sm3e bloquea todo el antígeno CEA en la superficie celular y evita la unión adicional de la molécula biespecífica agonista del receptor de muerte. Esto demuestra que la apoptosis inducida depende específicamente del entrecruzamiento del receptor de muerte DR5 por medio del antígeno tumoral.

5 En la figura 4 se resumen los resultados de una comparación entre diferentes formatos de molécula de las construcciones biespecíficas ApomAb – sm3e sobre la inducción de apoptosis en células LS174T. La inducción de apoptosis se llevó a cabo durante 4 horas a una concentración de 1 µg/ml. De nuevo, las moléculas biespecíficas ApomAb- sm3e en las que el scFv sm3e está fusionado al extremo C de la cadena pesada de ApomAb (formatos A y A1) demostraron una inducción de apoptosis significativa que era, en este caso, incluso superior a la del ApomAb hiper-entrecruzado. El ApomAb solo no inducía fragmentación de ADN detectable bajo las condiciones utilizadas.
10 Dos construcciones biespecíficas adicionales (scFv sm3e fusionado al extremo C de la cadena ligera de ApomAb, sea de tipo silvestre = formato B, o estabilizado con enlaces disulfuro = formato B1) también exhibía altos niveles de inducción de apoptosis que eran, al menos para el formato B, en un intervalo similar al del ApomAb entrecruzado, lo que indica que ambos formatos son básicamente funcionales. La fusión de scFv al extremo C de la cadena pesada de ApomAb parece que es ligeramente ventajoso sobre la cadena ligera. Comparando los resultados que se muestran en la figura 4, puede ser también que las moléculas estabilizadas con enlaces disulfuro muestren una actividad ligeramente reducida comparada con las moléculas scFv tipo silvestre.

20 Las construcciones ApomAb – sm3e descritas anteriormente funcionan muy bien en términos de inducción de apoptosis específica dependiente de antígenos como se muestra en las figuras 3 y 4. Este anticuerpo contra CEA, el sm3e, muestra una afinidad muy alta hacia su antígeno (a intervalos bajos picomolares). Con el fin de evaluar si el efecto de la inducción de apoptosis con construcciones biespecíficas DR5-CEA también se pueden mediar con moléculas con una afinidad de unión más baja a los antígenos tumorales se generaron construcciones adicionales, análogas a las formadoras. El scFv que se dirige a CEA se modificó utilizando la secuencia del anticuerpo PR1A3 contra CEA que tiene una afinidad bastante baja para CEA que se encuentra en un intervalo micromolar. Para la evaluación de este anticuerpo se generaron construcciones biespecíficas en las que el scFv PR1A3 (tipo silvestre o estabilizado con enlaces disulfuro) se fusionaba o bien al extremo C de la cadena pesada o al de la cadena ligera de la IgG ApomAb. La nomenclatura de las moléculas resultantes es análoga a la descrita anteriormente:
25 ApomAb_PR1A3_A/A1/B/B1 donde A y A1 describe la fusión al extremo C de la cadena pesada y B y B1 muestran la fusión el extremo C de la cadena ligera. A y B contienen el scFv tipo silvestre, mientras que A1 y B1 indican el scFv estabilizado con enlaces disulfuro.

35 En la figura 5 se muestra la inducción de apoptosis en células LS174T por ApomAb, ApomAb entrecruzado y anticuerpo biespecífico ApoAb_PR1A3 (scFv PR1A3 tipo silvestre fusionado en el extremo C de la cadena pesada) sobre un rango de concentración de 0,01 a 10, 0 µg/ml. El ApomAb por sí mismo mostraba un cierto grado de inducción de la apoptosis dependiente de la concentración que podía aumentarse significativamente por entrecruzamiento del ApomAb con un anticuerpo Fc antihumano. La molécula biespecífica ApomAb-PR1A3 también demostró inducción de apoptosis dependiente de la concentración, que a una concentración de 10,0 µg/ml, era incluso mayor que con el ApomAb entrecruzado a la misma concentración indicando que no es absolutamente necesario usar enlazadores de antígeno tumoral de alta afinidad en este formato de anticuerpos biespecíficos agonistas de receptor de muerte para conseguir una buena eficacia in vitro en términos de inducción de apoptosis.
40

45 Para investigar si el efecto de inducción de apoptosis observado en la incubación con moléculas biespecíficas DR5-CEA se puede aplicar a otras líneas celulares, se llevó a cabo un experimento similar al que se muestra en la figura 6 utilizando células Lovo, otra línea celular de cáncer de colon.

50 Los resultados de la inducción de apoptosis en las células Lovo utilizando la molécula biespecífica agonista del receptor de muerte ApomAb_R1A3_A (DR5-CEA) se comparó con la inducción de apoptosis por medio de ApomAb y ApomAb entrecruzado se muestran en la figura 6. Para todas las construcciones se observó una inducción de apoptosis dependiente de la dosis. Aquí el ApomAb solo conseguía aproximadamente el 20% de la actividad del ApomAb entrecruzado cuando se utilizaba a una concentración de 10 µg/ml. Por debajo de esta concentración la inducción de apoptosis era mucho menor al compararse con el ApomAb entrecruzado. El anticuerpo biespecífico ApomAb_PR1A3 en ausencia de cualquier molécula entrecruzada mostraba la misma inducción de fragmentación de ADN que el anticuerpo ApomAb hiper-entrecruzado demostrando que el efecto de inducción de apoptosis utilizando anticuerpos agonistas del receptor de muerte es un fenómeno general que se puede aplicar a la apoptosis de todas las líneas celulares competentes.
55

60 En la figura 7 se muestran los resultados de una comparación entre las diferentes construcciones ApomAb PR1A3 y ApomAb – sm3e. Aquí se resume la inducción de apoptosis en células LS174T tras 4 h de incubación con una concentración de 1 µg/ml. De estos resultados es bastante obvio que la afinidad para el antígeno CEA además puede tener un papel en la mediación de la apoptosis por medio del entrecruzamiento con el receptor de muerte. Hay una clara diferencia en la inducción de apoptosis con construcciones que contienen la alta afinidad del enlazador CEA comparado con el enlazador de baja afinidad. El ApomAb – PR1A3 muestra solamente aproximadamente un tercio de la inducción de apoptosis en células LS174T en comparación con el ApomAb – sm3e.
65 Además parece que existen diferencias intrínsecas en las diferentes moléculas que se refleja también en la

capacidad de inducción de apoptosis. Por el contrario, las construcciones que contienen el scFv sm3e se comportaban de manera diferente. Aquí, la fusión del scFv al extremo C de la cadena pesada es superior a la fusión al extremo C de la cadena ligera.

5 Una diferencia adicional entre las dos series de construcciones es el hecho de que hay un diferente efecto de la estabilización con enlaces disulfuro de scFv. Aunque las construcciones que contienen scFv sm3e estabilizado con enlaces disulfuro no se afectan con respecto a la inducción de apoptosis pasa lo contrario con los scFv PR1A3. Estos no muestran más inducción de apoptosis significativa si se utiliza la forma estabilizada con enlaces disulfuro.

10 Ejemplo 4: Generación de anticuerpos biespecíficos agonistas del receptor de muerte que se dirigen contra FAS (CD95) y CRIPTO como antígeno tumoral y evaluación de estas moléculas in vitro:

15 CRIPTO es un factor de crecimiento anclado a GPI del que se ha informado que está sobre-expresado en las células cancerosas, pero está bajo o ausente en las células normales. Se encuentra CRIPTO regulado positivamente en tumores de colon y metástasis hepáticas. Como miembro de la familia EGF, se considera que es un factor de crecimiento autocrino que tiene un papel en la proliferación, metástasis, y/o supervivencia de las células tumorales. Este factor de crecimiento activa varias rutas de señalización a través de varios receptores potenciales o correceptores.

20 Para averiguar si CRIPTO sería una diana adecuada para una estrategia con el anticuerpo biespecífico agonista del receptor de muerte, se generaron anticuerpos biespecíficos tetraivalentes dirigidos al FAS como receptor de muerte y CRIPTO como antígeno tumoral. Estas moléculas consistían en un anticuerpo IgG1 de longitud completa (que reconoce FAS) al que se fusiona un scFv en el extremo C de la cadena pesada que se dirige contra CRIPTO.

25 Para las cadenas pesada y ligera de la parte de la molécula de IgG que se dirige a FAS se utilizaron las secuencias del anticuerpo HFE7A (Haruyama y col., 2002), que es un anticuerpo humano/ratón con reacción cruzada contra CD95. El scFv CRIPTO se generó a partir de secuencias de un anticuerpo anti-CRIPTO humanizado que se generó por inmunización (LC020_H3L2D1). El scFv se generó utilizando técnicas de ADN recombinante de referencia y se fusionó con un corto péptido enlazador al extremo C de la cadena pesada de la IgG1 FAS. El orden de los dominios sencillos en el scFv es VH – (G4S)₄ enlazador VL.

35 Desafortunadamente no hay muchas líneas celulares adecuadas disponibles que puedan utilizarse para la dirección a CRIPTO. Por lo tanto se evaluaron dos líneas celulares para ver su potencial para utilizarse como línea celular diana para la inducción de apoptosis mediada por entrecruzamiento con FAS por anticuerpos biespecíficos FAS/CRIPTO. En la figura 9 se muestran los resultados de la evaluación de la expresión de superficie de FAS, DR5 y CRIPTO en células NCCIT y HEK que expresaban CRIPTO humano recombinante (de aquí en adelante denominadas HEK-CRIPTO). Al contrario que en las células HEK-CRIPTO las células NCCIT apenas expresaban FAS en la superficie y solo muy bajos niveles de CRIPTO, mientras que la expresión de DR5 parecía ser normal. Por el contrario, las células HEK-CRIPTO expresaban altos niveles de CRIPTO, niveles significativos de DR5 y niveles adecuados de FAS, por lo que se eligieron estas células para los análisis in vitro de inducción de apoptosis con anticuerpos biespecíficos FAS-CRIPTO.

45 La figura 10 resume los resultados de los experimentos in vitro de inducción de apoptosis en células HEK-CRIPTO utilizando tanto HFE7A, HFE7A entrecruzado o las construcciones biespecíficas HFE7A-CRIPTO. No hay inducción de apoptosis significativa con HFE7A o CRIPTO (LC020) solos. El HFE7A entrecruzado con un anticuerpo Fc antihumano da lugar a altos niveles de fragmentación de ADN al igual que las moléculas biespecíficas HFE7A-CRIPTO. En este caso las moléculas biespecíficas que contenían tanto el tipo silvestre de scFv CRIPTO (HFE7A_LC020_A) como el scFv (HFE7A_LC020_A1) estabilizado por enlaces disulfuro fusionados al extremo C de la cadena pesada de HFE7A. Podía observarse que casi no había diferencia en la inducción de apoptosis entre estas dos moléculas.

50 En ambos casos, la preincubación con un exceso de IgG CRIPTO reducía significativamente la inducción de apoptosis pero esta reducción no era completa. La razón para esto no está clara y es necesario evaluarla. Una construcción análoga en la que un scFv que se dirige a MCSP se fusiona al extremo C de la cadena pesada de HFE7A (HFE7A_LC007_A1) no inducía ninguna apoptosis en las células HEK-CRIPTO indicando que la apoptosis observada con las moléculas biespecíficas HFE7A – CRIPTO es específica del antígeno tumoral.

60 Los resultados de una comparación de la inducción de apoptosis entre HEK-CRIPTO y las células HEK que expresan FAP (proteína activadora de fibroblastos) recombinante humana (HEK-FAP) con el tratamiento con anticuerpos biespecíficos HFE7A – CRIPTO se muestran en la figura 11. Ambas líneas celulares sufren apoptosis si se incuban con un anticuerpo control positivo ya en solución confiriendo apoptosis o cuando se tratan con HFE7A entrecruzado. El anticuerpo HFE7A anti FAS por sí mismo no mediaba apoptosis en estas líneas celulares. La molécula HFE7A – CRIPTO inducía apoptosis solo en las células HEK-FAP pero se trata de una actividad basal no específica lo que se puede observar también con una molécula de control HFE7A – MCSP no relacionada e incluso con el anticuerpo anti CRIPTO y anti Fc solos. Como se observa en los experimentos descritos en la figura 10

65

también en este caso la inhibición de la apoptosis por pre-incubación con un exceso de IgG CRIPTO no era completa.

5 Ejemplo 5: Generación de anticuerpos biespecíficos agonistas del receptor de muerte y evaluación de su potencial de inducción de apoptosis.

Entre los antígenos que se expresan directamente y se presentan en la superficie celular del tumor también se consideran otros antígenos para entrecruzamiento dirigido de receptores de muerte para inducir apoptosis. En particular estos son antígenos del estroma o neovasculares. Un ejemplo de este último es el proteoglicano sulfato de condroitina asociado al melanoma (MCSP). El MCSP se expresa en la mayoría de las células de melanoma pero también en las células de glioma y en la neovascularización. Se han descrito varios anticuerpos monoclonales que se dirigen al MCSP humano pero ninguno de ellos era adecuado para utilizarlo en terapia contra el cáncer debido a su ausencia de eficacia (por ejemplo, falta de ADCC). Por lo tanto los anticuerpos MCSP pueden ganar valor si se utilizan en un formato biespecífico que es capaz de mediar en la apoptosis dirigida al sitio tumoral.

15 Con el fin de evaluar la dirección simultánea tumoral/neovascular con respecto a la inducción de apoptosis se generaron anticuerpos biespecíficos agonistas del receptor de muerte en los que el scFv específico de MCSP (tipo silvestre o estabilizado con enlaces disulfuro) se fusiona al extremo C del anticuerpo HFE7A anti FAS. Estos scFv se fusionaban por medio de un corto péptido enlazador con el HFE7A. Las secuencias de las cadenas ligera y pesada variables para generar el scFv dirigido a MCSP se tomaron del anticuerpo MCSP 9.2.27 (Beavers y col., 1996; US5580774).

20 Con el fin de definir una línea celular que sea adecuada para el análisis in vitro de la inducción de apoptosis se ensayaron varias líneas celulares en cuanto a su expresión de MCSP por análisis de unión FACS (figura 12). Entre las líneas celulares ensayadas solo HCT-116 y U-87MG mostraban una expresión significativa de MCSP como se detectaba con dos anticuerpos anti MCSP (9.2.27 y LC007). Todas las otras líneas celulares ensayadas mostraron solo una expresión muy baja o no expresaban MCSP. Por esta razón se analizaron estas dos líneas celulares para ver si desarrollaban apoptosis cuando se trataban por entrecruzamiento con anticuerpos agonistas del receptor de muerte o con anticuerpos ya en solución de control que confieren apoptosis. En las células U-87MG la apoptosis podía inducirse tanto por, anticuerpos anti FAS y anti DR5 (figura 13 A) mientras que era diferente para las células HCT-116. Aquí la apoptosis solo se podía inducir con anticuerpos anti DR5 (figura 13 B). Por lo tanto, se eligieron las células U-87MG para utilizarse como células diana para experimentos posteriores de inducción de apoptosis.

35 La figura 14 muestra los resultados obtenidos por los experimentos de inducción de apoptosis con la línea celular de glioma U-87MG tras el tratamiento con anticuerpos biespecíficos agonistas de FAS (con una concentración de 1 µg/ml) que consistía en la IgG HFE7A dirigida a FAS que se combina con scFv (9.2.27) que se une a MCSP. Tanto el tipo silvestre (formato A) como el scFv estabilizado con enlaces disulfuro H44/L100 (formato A1) se compararon con HFE7A solo o con HFE7A entrecruzado con un anticuerpo secundario Fc antihumano. Aunque, en general, la inducción de apoptosis en estas células U-87MG es bastante baja (incluso tras 24 horas de incubación) se podía observar una fragmentación de ADN significativa cuando se utilizaban los anticuerpos biespecíficos agonistas de FAS. En este caso la construcción que contenía scFv estabilizado con enlaces disulfuro parecía ser superior con el que contenía el scFv tipo silvestre, y ambos mostraban una capacidad de inducción de apoptosis mucho más alta que la molécula de IgG HFE7A entrecruzada. La incubación de las células con un exceso de inmunoglobulina MCSP (9.2.27) de 100 veces inhibía completamente la inducción de apoptosis de las construcciones biespecíficas, indicando que la fragmentación de ADN/apoptosis en ausencia de anticuerpo competidor es específica y dependiente del entrecruzamiento de FAS por medio del antígeno MCSP.

50 Ejemplo 6: Un anticuerpo biespecífico agonista del receptor de muerte DR5-FAP es capaz de mediar apoptosis de una línea celular por medio de entrecruzamiento con una segunda línea celular.

Otra estrategia de inducción de apoptosis por entrecruzamiento de receptores de muerte como DR5 (aparte del entrecruzamiento con un antígeno expresado por la célula tumoral), es dirigirse al estroma que rodea el tumor. En ese caso el antígeno no lo presentan directamente las células tumorales sino un segundo tipo celular diferente. Un ejemplo de este tipo de antígeno sería el FAP (proteína de activación de fibroblastos). Esta proteína se expresa en los fibroblastos activados y se encuentra en el estroma tumoral.

60 Para investigar las posibilidades de inducción de apoptosis en el tumor diana utilizando anticuerpos biespecíficos agonistas del receptor de muerte que se dirigen al DR5 humano y un antígeno del estroma tumoral, se generaron moléculas biespecíficas que consistían en una parte de IgG1 que reconoce el DR5 y un scFv que se une a FAP que está fusionado en el extremo C de la cadena pesada del anticuerpo. La secuencia de la IgG que se dirige a DR5 se tomó de la secuencia de ApomAb como se describe en el documento US2007 / 0031414 A1. La secuencia de las cadenas variables pesada y ligera del scFv que se une a FAP se tomó de la molécula Fab anti FAP aislada por el fago de presentación que se muestra en las secuencias n^{os} 1 y 2. El scFv FAP se fusiona por un conector (G4S)₂ al extremo C de la cadena pesada de la IgG anti DR5.

65

En este tipo de agrupamiento se van a utilizar dos líneas celulares para los ensayos de actividad in vitro: una línea celular (la línea celular diana) debería expresar DR5 humano, tiene que ser competente de apoptosis pero no necesariamente tiene que expresar FAP. La segunda línea celular (línea celular efectora) tiene que ser negativa a apoptosis (sea por resistencia a apoptosis o por que no exprese DR5) pero tiene que expresar FAP en su superficie.

5 Una posible línea celular efectora que cumple los criterios deseados es la línea celular de fibroblastos humanos GM05389. Como se muestra en la figura 15A esta línea celular expresa niveles significativos de FAP en comparación con la línea celular SW872 que solo mostraba expresión de FAP con la concentración de anticuerpos más alta (10 µg/ml) pero que no sufre apoptosis con ApomAb no entrecruzado como se ve en la figura 15B. Por lo tanto esta línea celular parece que es una línea celular efectora potencial en un ensayo de apoptosis en el que la fragmentación de ADN de una línea celular está inducida por entrecruzamiento por medio de un antígeno expresado en una segunda línea celular.

Como línea celular diana se utilizó la línea celular de adenocarcinoma de mama MDA-MB-231 que expresa bajos niveles de DR5 y es sensible a la inducción de apoptosis mediada por DR5. En la figura 16 se resumen los resultados de inducción de fragmentación de ADN de células GM05389 y células MDA-MB-231 comparados con la de la combinación de ambas células por entrecruzamiento de DR5 dirigido al tumor por medio de FAP. Tras la incubación se puede observar una inducción de apoptosis significativa con los anticuerpos agonistas del receptor de muerte solamente cuando se co-cultivan las dos líneas celulares (barras negras) mientras que se puede detectar apoptosis en un bajo grado por entrecruzamiento de DR5 con un ApomAb dirigido a Fc antihumano en ambas líneas celulares por separado (barras blancas y grises, respectivamente). Los inventores interpretan estos resultados de manera que los receptores DR5 en las células MDA-MB-231 estaban entrecruzados con la unión del antígeno FAP expresado por la línea celular de fibroblastos GM05389.

25 Ejemplo 7: Fusión de moléculas Fab de cadena simple (scFab) CEA al ApomAb para la generación de anticuerpos biespecíficos agonistas DR5-CEA

Además de la estabilización de los anticuerpos biespecíficos por la inserción definida de restos de cisteína interna en la cadena variable pesada y la cadena variable ligera de scFv para prevenir la formación de agregados, el uso de Fab de cadena sencilla (scFab) es otra posible estrategia para estabilizar el anticuerpo biespecífico entero para evitar el entrecruzamiento no específico.

Para evaluar si este formato (scFab fusionado al anticuerpo agonista de DR5) mostraba una actividad de inducción de apoptosis similar a las moléculas correspondientes que contienen scFv, se generaron diferentes anticuerpos biespecíficos en los que el scFab CEA se fusionaba al extremo C de tanto la cadena pesada o la cadena ligera de ApomAb, por tecnología de ADN recombinante.

La orientación de los diferentes dominios de scFab es la siguiente: VL-CL-VH-CH1. El extremo C de la cadena ligera constante (CL) se conecta al extremo N de la cadena pesada variable (VH) por medio de un péptido enlazador 34mérico. La fusión del scFab se produce por un conector G4S (sea 2mérico o 4mérico)

El Fab de cadena sencilla contenido en los anticuerpos biespecíficos se generaron en dos formatos básicamente diferentes: en un formato dos scFab se fusionaban el extremo C de la cadena pesada o la cadena ligera de ApomAb (moléculas biespecíficas tetravalentes homodiméricas). Por otra parte se construyó una molécula en la que un scFab se fusionaba al extremo C de solo una cadena pesada de ApomAb (biespecífico, molécula trivalente heterodimérica). Esta heterodimerización se conseguía utilizando la tecnología denominada botón en ojal que utiliza mutaciones de Fc que solamente permiten la formación de moléculas de IgG heterodiméricas.

En la figura 17 se muestran los resultados de los experimentos de inducción de apoptosis en los que se compara el ApomAb_PR1A3_scFab con el ApomAb o el ApomAb entrecruzado. En este ensayo se utilizó la línea celular de cáncer gástrico MKN-45 y se midió la apoptosis tras 24 h utilizando un ensayo de fragmentación de ADN. Claramente, la construcción biespecífica mostraba actividad de inducción a la apoptosis que estaba en el mismo intervalo que la que se puede observar con ApomAb que estaba entrecruzado por medio de un anticuerpo anti Fc, y que es significativamente más alta que con ApomAb solo. Sin embargo, la inducción de la apoptosis con ApomAb por sí mismo es bastante alta, lo que probablemente es debido al tiempo de incubación dilatado de 24 h que es el necesario para demostrar el máximo de inducción de apoptosis en la línea celular MKN-45 utilizada (al contrario que en las células LS174T en las que el ensayo solo se ejecuta durante cuatro horas).

Para evaluar si los anticuerpos biespecíficos agonistas de DR5 trivalentes (monovalentes para la diana tumoral, CEA, y bivalentes para DR5) eran capaces de inducir apoptosis dirigida al tumor, se generó una molécula en la que un scFab CEA (con especificidad sm3e) se fusionó al extremo C de la cadena pesada de ApomAb (que contenía la mutación protuberante). Esta cadena pesada se co-expresó con la correspondiente cadena pesada de ApomAb que contenía las mutaciones de 'hueco' y la cadena ligera de ApomAb. Los resultados del ensayo de inducción de apoptosis a las 4 horas en las que la molécula biespecífica trivalente se analizó en células LS174T (en concentraciones de 0,1 y 1,0 µg/ml) se resumen en la figura 18. A partir de estos resultados es obvio que también el formato trivalente descrito es capaz de inducir apoptosis dirigida en el mismo intervalo que lo hace el ApomAb hiper-

entrecruzado. A una concentración más baja el formato biespecífico parece ser incluso ligeramente más activo que el ApomAb con entrecruzamiento.

Ejemplo 8: Anticuerpo biespecífico agonista DR5-CEA con eficacia in vivo superior en comparación con ApomAb

Para la evaluación de si la actividad apoptótica de los anticuerpos agonistas del receptor de muerte que se había demostrado in vitro también se traduce en una eficacia superior in vivo, se puso en marcha un experimento in vivo utilizando la línea celular LS174T de carcinoma de colon como modelo.

En resumen, el día uno del experimento se trataron ratones hembras SCID gris con una inyección intraesplénica de 3×10^6 células tumorales. El día siete se ensayó un animal de exploración respecto al injerto tumoral como criterio para comenzar con el tratamiento con anticuerpos un día más tarde. El tratamiento consistía en una serie de tres inyecciones (cada una de 10 mg/kg i.v. a intervalos de siete días). Cada día los animales se analizaban para demostrar los criterios de terminación.

La figura 19 resume los resultados obtenidos en este experimento in vivo. Aquí, se compara la duración de la supervivencia de tres grupos de ratones (cada uno consistía inicialmente en diez animales y se trataron con diferentes moléculas). Mientras que el grupo de control (PBS, línea negra) se terminó completamente a los 37 días tras la inyección del tumor, el grupo tratado con ApomAb (círculos llenos) mostraban una supervivencia prolongada (máximo de 44 días). El grupo tratado con el anticuerpo biespecífico (ApomAb_sm3e_A1, cuadrados negros) mostraban una supervivencia incluso más larga (52 días) que el grupo que había obtenido el ApomAb solo. El análisis matemático de los datos obtenidos demostraba que estos resultados eran estadísticamente significativos (con valores de p por debajo de 0,05) lo que significa que el ApomAb mostraba una eficacia in vivo comparada con el control PBS y que el ApomAb_sm3e_A1 biespecífico demostraba una eficacia in vivo superior incluso comparada con ApomAb.

Material y métodos:

Transfección de células HEK293 EBNA

Todos los anticuerpos (biespecíficos) que se utilizan en el presente experimento se produjeron transitoriamente en células HEK293 EBNA utilizando un procedimiento de co-transfección dependiente de fosfato- Ca^{2+} para los vectores de cadena pesada y ligera como se describe posteriormente.

Las células se cultivaron en medio de referencia DMEM (Invitrogen) que contenía un 10% de FCS (Gibco, nº 16000) a 37 °C en incubadoras humidificadas con una atmósfera de un 5% de CO_2 . 48 h antes de la transfección se inocularon 3×10^7 células en 200 ml de DMEM/ 10% de FCS en botellas giratorias (Falcon nº 353069, 1400 cm^2) y se incubaron a 37 °C en una incubadora de botellas giratorias (0,3 rpm). Para la transfección, se llevaron 880 μg de ADN total (440 μg de cada uno, vector de cadena pesada y ligera) + 4,4 ml de CaCl_2 hasta un volumen total de 8,8 ml con H_2O . La solución se mezcló un poco. Después del mezclado, se añadieron 8,8 ml de tampón fosfato 1,5 mM (50 mM HEPES, 280 mM NaCl, 1,5 mM NaH_2PO_4 ; pH 7,05) para la precipitación del ADN. Tras un mezclado adicional durante diez segundos y una corta incubación a temperatura ambiente (20 segundos) se añadieron 200 ml de DMEM/2% FCS a la solución de ADN. Se utilizó el medio/solución ADN para reemplazar el medio original en las botellas giratorias para transfectar las células. Tras 48 horas de incubación a 37 °C se reemplazó el medio de transfección por 200 ml de DMEM / 10% FCS y se continuó con la producción de anticuerpos durante 7 días.

Tras la producción, se recolectaron los sobrenadantes y los sobrenadantes que contenían anticuerpos se filtraron a través de filtros estériles de 0,22 μm y se almacenaron a 4 °C hasta su purificación.

Purificación

Las proteínas se produjeron por expresión transitoria en células HEK293 EBNA. Todas las moléculas biespecíficas descritas aquí se purificaron en dos etapas utilizando procedimientos de referencia, tales como purificación de afinidad A (Åkta Explorer) y cromatografía de exclusión por tamaño.

Los sobrenadantes se ajustaron a un pH de 8,0 (utilizando 2 M TRIS pH 8,0) y se aplicó a una resina Mabselect Sure (GE Healthcare) envasada en una columna Tricorn™ 5/50 (GE Healthcare, volumen de columna (vc) = 1 ml) equilibrada con tampón A (50 mM de fosfato sódico, pH 7,0, 250 mM NaCl). Tras lavar con 10 volúmenes de columna (vc) de tampón A, 20 vc de tampón B (50 mM de fosfato sódico, pH 7,0, 1 M NaCl) y otra vez con 10 vc de tampón A, la proteína se eluyó utilizando etapas de gradiente de pH con el tampón B (50 mM fosfato sódico, 50 mM citrato sódico pH 3,0, 250 mM de NaCl) sobre 20 vc. Las fracciones que contenían la proteína se agruparon y se ajustó con cuidado el pH de la solución a pH 6,0 (utilizando 2 M TRIS pH 8,0). Las muestras se concentraron a 2 ml utilizando ultra-concentradores (Vivaspin 15R 30.000 MWCO HY, Sartorius) y posteriormente se aplicaron a un HiLoad™ 16/60 Superdex™ 200 de calidad preparatoria (GE Healthcare) equilibrado con 20 mM de Histidina, pH 6,0, 150 mM NaCl. El contenido aglomerado de las fracciones eluidas se analizaron por cromatografía de exclusión por tamaño analítica. De esta forma, se cargaron 50 μl de cada fracción en una columna Superdex™200 10/300 GL

(GE Healthcare) equilibrada con 2 mM de MOPS, pH 7,4, 150 mM NaCl, 0,02% p/v de NaN₃. Las fracciones que contenían menos de un 2% de oligómeros se agruparon y se concentraron a una concentración final de 1 – 1,5 mg/ml utilizando ultra concentradores (Vivaspin 15R 30.000 MWCO HY, Sartorius). Las proteínas se congelaron en N₂ líquido y se almacenaron a -80 °C.

5 *Análisis de unión FACS*

Todas las líneas celulares utilizadas se analizaron con respecto a los niveles de expresión relativos de antígenos relacionados con el tumor y receptores de muerte FAS o DR5 antes de llevarse a cabo los ensayos de apoptosis.

10 Se determinó el número y viabilidad de células. Para esto, las células que crecían adherentemente se separaron con un tampón de disociación celular (Gibco - Invitrogen nº 13151-014). Se recolectaron las células por centrifugación (4 min, 400 x g), se lavaron en tampón FACS (PBS / 0,1% BSA) y el número de células se ajustó a 1.111 x 10⁶ células / ml en tampón FACS. Se utilizaron 180 µl de esta suspensión celular por pocillo de una placa de 96 pocillos de fondo redondo, dando como resultado 2 x 10⁵ células por pocillo. Las células se incubaron durante 30 min a 4 °C con el primer anticuerpo en una dilución apropiada. Luego se recolectaron las células por centrifugación (4 min, 400 x g), se retiró completamente el sobrenadante y se lavaron las células una vez con 150 µl de tampón FACS. Se resuspendieron las células en 150 µl de tampón FACS y se incubaron con un anticuerpo secundario (en el caso de que se utilizara un primer anticuerpo sin marcar) durante 30 min a 4 °C en oscuridad. Tras dos etapas de lavado con
15
20 tampón FACS se resuspendieron las células en 200 µl de tampón FACS y se analizaron en un HTS FACSCanto II (BD, Software FACS Diva). De manera alternativa, las células se podían fijar con 200 µl de PFA (paraformaldehído) al 2% en tampón FACS durante 20 min a 4 °C y se analizaron más tarde. Todos los ensayos se llevaron a cabo por triplicado.

25 Anticuerpos utilizados y concentraciones:

Anticuerpo	Fuente	Descripción	Conc. [µg / ml]	Conc. en el ensayo [µg / ml]
<i>1. Anticuerpos primarios</i>				
anti hu CD95 (FAS)	BD nº 555671	mu IgG 1, kappa	0,5	5-10
anti hu DR5 (TRAIL R2)	R&D nº MAB631	mu IgG1, clon 71903	0,5	5-10
anti hu CEA	Abcam nº ab11330	mu IgG1, clon C6G9	9,0	30
Isotipo control	BD nº 554121	mu IgG1 clon MOPC1		
anti hu MCSP	en el laboratorio (por ejemplo M9.2.27, LC007)	IgG1 human(izada) / quimérica	dif.	30.
anti hu CRIPTO	en el laboratorio (por ejemplo LC020, H3L2D1)	IgG1 human(izada) / quimérica	dif.	30.
anti hu ROBO4-PE	R&D nº FAB2454P	mu IgG2a	0,05	0,005
Isotipo control	BD nº 555574	mu IgG2a-PE	0,05	0,005
<i>2. Anticuerpos secundarios:</i>				
IgG-PE de cabra anti ratón	Serotec nº STAR105PE		0,1	
Fc-PE (Fab') ₂ de cabra anti humano	Jackson Immunoresearch nº 109-116-170			

Análisis Biacore (Resonancia de plasmones superficiales, SPR)

30 Los experimentos SPR se llevaron a cabo en un Biacore T100 con HBS-EP (0,01 M HEPES pH 7,4, 0,15 M NaCl, 3 mM EDTA, 0,005 % Tensioactivo P20, GE Healthcare) como tampón de operación. Se llevó a cabo el acoplamiento directo de 1220, 740 y 300 unidades de resonancia (UR), respectivamente de antígeno biotinilado en un chip de Estreptavidina utilizando el método de referencia (GE Healthcare). Se pasaron diferentes concentraciones de los anticuerpos biespecíficos agonistas del receptor de muerte con un flujo de 40 µl/min a través de las cámaras de flujo
35 a 278 K durante 9 s para registrar la fase de asociación. La fase de disociación se controló durante 300 s y se desencadenó cambiando de la solución de muestra a HBS-EP. Las diferencias de los índices de refracción se

5 corrigieron restando la respuesta obtenida a partir de una superficie de Estreptavidina vacía. Se derivaron las constantes cinéticas utilizando el software de evaluación del Biacore T100 (vAA, Biacore, Friburgo/Alemania), para fijar las ecuaciones de tasa para la unión de Langmuir 1:1 por integración numérica. Aunque el antígeno estaba inmovilizado las constantes cinéticas obtenidas utilizando la unión de Langmuir 1:1 por integración numérica daban simplemente el valor KD aparente o la avidéz.

Inducción de apoptosis

10 Para la determinación de la inducción de apoptosis se utilizó el kit de detección de muerte celular ELISA PLUS de Roche. En breve, se sembraron 10^4 células por pocillo en una placa de 96 pocillos (después de separarlas, y de la determinación del número celular y la viabilidad) en 200 μ l de medio apropiado y se incubaron una noche a 37 °C en una atmósfera con un 5% de CO₂. Al día siguiente se reemplazó el medio por medio nuevo que contenía los anticuerpos inductores de apoptosis, los anticuerpos de control y otros controles a concentraciones apropiadas.

15 Se utilizaron los anticuerpos biespecíficos a una concentración final de 0,01 – 10 μ g/ml; los anticuerpos de control se utilizaron a 0,5 μ g/ml y los anticuerpos entrecruzados se utilizaron a 100 μ g/ml. Los anticuerpos competitivos se utilizaron con un exceso de 100 veces.

20 Las células se incubaron durante 4 – 24 horas a 37 °C, 5% de CO₂ para permitir la inducción de apoptosis. Las células se recolectaron por centrifugación (10 min, 200 x g) y se incubaron durante 1 h a temperatura ambiente en 200 μ l de tampón de lisis (suministrado por el kit). Las células intactas se sedimentaron por centrifugación (10 min, 200 x g) y se analizaron 20 μ l de sobrenadante según las recomendaciones del fabricante para la inducción de apoptosis.

25 Aunque se acaban de mostrar y describir las realizaciones preferidas de la invención, se entenderá sin lugar a dudas que la invención no se limita a estas sino que se puede realizar y practicar de formas distintas en el ámbito de las siguientes reivindicaciones.

LISTADO DE SECUENCIAS

- 30 <110> GlycArt Biotechnology AG
- <120> Anticuerpos biespecíficos agonistas del receptor de muerte
- 35 <130> 25917 WO
- <150> EP09171659.7
- <151> 29-09-2009
- 40 <160> 9
- <170> PatentIn versión 3.5
- 45 <210> 1
- <211> 468
- <212> PRT
- <213> *Homo sapiens*
- 50 <400> 1

ES 2 505 269 T3

Met Ala Pro Pro Pro Ala Arg Val His Leu Gly Ala Phe Leu Ala Val
 1 5 10 15
 Thr Pro Asn Pro Gly Ser Ala Ala Ser Gly Thr Glu Ala Ala Ala Ala
 20 25 30
 Thr Pro Ser Lys Val Trp Gly Ser Ser Ala Gly Arg Ile Glu Pro Arg
 35 40 45
 Gly Gly Gly Arg Gly Ala Leu Pro Thr Ser Met Gly Gln His Gly Pro
 50 55 60
 Ser Ala Arg Ala Arg Ala Gly Arg Ala Pro Gly Pro Arg Pro Ala Arg
 65 70 75 80
 Glu Ala Ser Pro Arg Leu Arg Val His Lys Thr Phe Lys Phe Val Val
 85 90 95
 Val Gly Val Leu Leu Gln Val Val Pro Ser Ser Ala Ala Thr Ile Lys
 100 105 110
 Leu His Asp Gln Ser Ile Gly Thr Gln Gln Trp Glu His Ser Pro Leu
 115 120 125
 Gly Glu Leu Cys Pro Pro Gly Ser His Arg Ser Glu His Pro Gly Ala
 130 135 140
 Cys Asn Arg Cys Thr Glu Gly Val Gly Tyr Thr Asn Ala Ser Asn Asn
 145 150 155 160
 Leu Phe Ala Cys Leu Pro Cys Thr Ala Cys Lys Ser Asp Glu Glu Glu
 165 170 175
 Arg Ser Pro Cys Thr Thr Thr Arg Asn Thr Ala Cys Gln Cys Lys Pro
 180 185 190

ES 2 505 269 T3

Gly Thr Phe Arg Asn Asp Asn Ser Ala Glu Met Cys Arg Lys Cys Ser
 195 200 205
 Arg Gly Cys Pro Arg Gly Met Val Lys Val Lys Asp Cys Thr Pro Trp
 210 215 220
 Ser Asp Ile Glu Cys Val His Lys Glu Ser Gly Asn Gly His Asn Ile
 225 230 235 240
 Trp Val Ile Leu Val Val Thr Leu Val Val Pro Leu Leu Leu Val Ala
 245 250 255
 Val Leu Ile Val Cys Cys Cys Ile Gly Ser Gly Cys Gly Gly Asp Pro
 260 265 270
 Lys Cys Met Asp Arg Val Cys Phe Trp Arg Leu Gly Leu Leu Arg Gly
 275 280 285
 Pro Gly Ala Glu Asp Asn Ala His Asn Glu Ile Leu Ser Asn Ala Asp
 290 295 300
 Ser Leu Ser Thr Phe Val Ser Glu Gln Gln Met Glu Ser Gln Glu Pro
 305 310 315 320
 Ala Asp Leu Thr Gly Val Thr Val Gln Ser Pro Gly Glu Ala Gln Cys
 325 330 335
 Leu Leu Gly Pro Ala Glu Ala Glu Gly Ser Gln Arg Arg Arg Leu Leu
 340 345 350
 Val Pro Ala Asn Gly Ala Asp Pro Thr Glu Thr Leu Met Leu Phe Phe
 355 360 365
 Asp Lys Phe Ala Asn Ile Val Pro Phe Asp Ser Trp Asp Gln Leu Met
 370 375 380
 Arg Gln Leu Asp Leu Thr Lys Asn Glu Ile Asp Val Val Arg Ala Gly
 385 390 395 400
 Thr Ala Gly Pro Gly Asp Ala Leu Tyr Ala Met Leu Met Lys Trp Val
 405 410 415
 Asn Lys Thr Gly Arg Asn Ala Ser Ile His Thr Leu Leu Asp Ala Leu
 420 425 430
 Glu Arg Met Glu Glu Arg His Ala Lys Glu Lys Ile Gln Asp Leu Leu
 435 440 445
 Val Asp Ser Gly Lys Phe Ile Tyr Leu Glu Asp Gly Thr Gly Ser Ala
 450 455 460

Val Ser Leu Glu
465

5
<210> 2
<211> 440
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 2

Met Glu Gln Arg Gly Gln Asn Ala Pro Ala Ala Ser Gly Ala Arg Lys
1 5 10 15

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

Arg Val Pro Lys Thr Leu Val Leu Val Val Ala Ala Val Leu Leu Leu
35 40 45

Val Ser Ala Glu Ser Ala Leu Ile Thr Gln Gln Asp Leu Ala Pro Gln
50 55 60

Gln Arg Ala Ala Pro Gln Gln Lys Arg Ser Ser Pro Ser Glu Gly Leu
65 70 75 80

Cys Pro Pro Gly His His Ile Ser Glu Asp Gly Arg Asp Cys Ile Ser
85 90 95

Cys Lys Tyr Gly Gln Asp Tyr Ser Thr His Trp Asn Asp Leu Leu Phe
100 105 110

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

Cys Thr Thr Thr Arg Asn Thr Val Cys Gln Cys Glu Glu Gly Thr Phe
130 135 140

Arg Glu Glu Asp Ser Pro Glu Met Cys Arg Lys Cys Arg Thr Gly Cys
145 150 155 160

Pro Arg Gly Met Val Lys Val Gly Asp Cys Thr Pro Trp Ser Asp Ile
165 170 175

Glu Cys Val His Lys Glu Ser Gly Thr Lys His Ser Gly Glu Ala Pro
180 185 190

Ala Val Glu Glu Thr Val Thr Ser Ser Pro Gly Thr Pro Ala Ser Pro
195 200 205

Cys Ser Leu Ser Gly Ile Ile Ile Gly Val Thr Val Ala Ala Val Val
210 215 220

Leu Ile Val Ala Val Phe Val Cys Lys Ser Leu Leu Trp Lys Lys Val
225 230 235 240

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

<210> 3
 <211> 335
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

5

<400> 3

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

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

10

Lys Gly Leu Glu Leu Arg Lys Thr Val Thr Thr Val Glu Thr Gln Asn
 35 40 45
 Leu Glu Gly Leu His His Asp Gly Gln Phe Cys His Lys Pro Cys Pro
 50 55 60
 Pro Gly Glu Arg Lys Ala Arg Asp Cys Thr Val Asn Gly Asp Glu Pro
 65 70 75 80
 Asp Cys Val Pro Cys Gln Glu Gly Lys Glu Tyr Thr Asp Lys Ala His
 85 90 95
 Phe Ser Ser Lys Cys Arg Arg Cys Arg Leu Cys Asp Glu Gly His Gly
 100 105 110
 Leu Glu Val Glu Ile Asn Cys Thr Arg Thr Gln Asn Thr Lys Cys Arg
 115 120 125
 Cys Lys Pro Asn Phe Phe Cys Asn Ser Thr Val Cys Glu His Cys Asp
 130 135 140
 Pro Cys Thr Lys Cys Glu His Gly Ile Ile Lys Glu Cys Thr Leu Thr
 145 150 155 160
 Ser Asn Thr Lys Cys Lys Glu Glu Gly Ser Arg Ser Asn Leu Gly Trp
 165 170 175
 Leu Cys Leu Leu Leu Leu Pro Ile Pro Leu Ile Val Trp Val Lys Arg
 180 185 190
 Lys Glu Val Gln Lys Thr Cys Arg Lys His Arg Lys Glu Asn Gln Gly
 195 200 205
 Ser His Glu Ser Pro Thr Leu Asn Pro Glu Thr Val Ala Ile Asn Leu
 210 215 220
 Ser Asp Val Asp Leu Ser Lys Tyr Ile Thr Thr Ile Ala Gly Val Met
 225 230 235 240
 Thr Leu Ser Gln Val Lys Gly Phe Val Arg Lys Asn Gly Val Asn Glu
 245 250 255
 Ala Lys Ile Asp Glu Ile Lys Asn Asp Asn Val Gln Asp Thr Ala Glu
 260 265 270
 Gln Lys Val Gln Leu Leu Arg Asn Trp His Gln Leu His Gly Lys Lys
 275 280 285
 Glu Ala Tyr Asp Thr Leu Ile Lys Asp Leu Lys Lys Ala Asn Leu Cys
 290 295 300
 Thr Leu Ala Glu Lys Ile Gln Thr Ile Ile Leu Lys Asp Ile Thr Ser

ES 2 505 269 T3

Arg Ser Asp Ser Val Ile Leu Asn Val Leu Tyr Gly Pro Asp Ala Pro
 225 230 235 240
 Thr Ile Ser Pro Leu Asn Thr Ser Tyr Arg Ser Gly Glu Asn Leu Asn
 245 250 255
 Leu Ser Cys His Ala Ala Ser Asn Pro Pro Ala Gln Tyr Ser Trp Phe
 260 265 270
 Val Asn Gly Thr Phe Gln Gln Ser Thr Gln Glu Leu Phe Ile Pro Asn
 275 280 285
 Ile Thr Val Asn Asn Ser Gly Ser Tyr Thr Cys Gln Ala His Asn Ser
 290 295 300
 Asp Thr Gly Leu Asn Arg Thr Thr Val Thr Thr Ile Thr Val Tyr Ala
 305 310 315 320
 Glu Pro Pro Lys Pro Phe Ile Thr Ser Asn Asn Ser Asn Pro Val Glu
 325 330 335
 Asp Glu Asp Ala Val Ala Leu Thr Cys Glu Pro Glu Ile Gln Asn Thr
 340 345 350
 Thr Tyr Leu Trp Trp Val Asn Asn Gln Ser Leu Pro Val Ser Pro Arg
 355 360 365
 Leu Gln Leu Ser Asn Asp Asn Arg Thr Leu Thr Leu Leu Ser Val Thr
 370 375 380
 Arg Asn Asp Val Gly Pro Tyr Glu Cys Gly Ile Gln Asn Glu Leu Ser
 385 390 395 400
 Val Asp His Ser Asp Pro Val Ile Leu Asn Val Leu Tyr Gly Pro Asp
 405 410 415
 Asp Pro Thr Ile Ser Pro Ser Tyr Thr Tyr Tyr Arg Pro Gly Val Asn
 420 425 430
 Leu Ser Leu Ser Cys His Ala Ala Ser Asn Pro Pro Ala Gln Tyr Ser
 435 440 445
 Trp Leu Ile Asp Gly Asn Ile Gln Gln His Thr Gln Glu Leu Phe Ile
 450 455 460
 Ser Asn Ile Thr Glu Lys Asn Ser Gly Leu Tyr Thr Cys Gln Ala Asn
 465 470 475 480
 Asn Ser Ala Ser Gly His Ser Arg Thr Thr Val Lys Thr Ile Thr Val
 485 490 495

ES 2 505 269 T3

Ser Ala Glu Leu Pro Lys Pro Ser Ile Ser Ser Asn Asn Ser Lys Pro
500 505 510

Val Glu Asp Lys Asp Ala Val Ala Phe Thr Cys Glu Pro Glu Ala Gln
515 520 525

Asn Thr Thr Tyr Leu Trp Trp Val Asn Gly Gln Ser Leu Pro Val Ser
530 535 540

Pro Arg Leu Gln Leu Ser Asn Gly Asn Arg Thr Leu Thr Leu Phe Asn
545 550 555 560

Val Thr Arg Asn Asp Ala Arg Ala Tyr Val Cys Gly Ile Gln Asn Ser
565 570 575

Val Ser Ala Asn Arg Ser Asp Pro Val Thr Leu Asp Val Leu Tyr Gly
580 585 590

Pro Asp Thr Pro Ile Ile Ser Pro Pro Asp Ser Ser Tyr Leu Ser Gly
595 600 605

Ala Asn Leu Asn Leu Ser Cys His Ser Ala Ser Asn Pro Ser Pro Gln
610 615 620

Tyr Ser Trp Arg Ile Asn Gly Ile Pro Gln Gln His Thr Gln Val Leu
625 630 635 640

Phe Ile Ala Lys Ile Thr Pro Asn Asn Asn Gly Thr Tyr Ala Cys Phe
645 650 655

Val Ser Asn Leu Ala Thr Gly Arg Asn Asn Ser Ile Val Lys Ser Ile
660 665 670

Thr Val Ser Ala Ser Gly Thr Ser Pro Gly Leu Ser Ala Gly Ala Thr
675 680 685

Val Gly Ile Met Ile Gly Val Leu Val Gly Val Ala Leu Ile
690 695 700

<210> 5
<211> 188
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

5

<400> 5

ES 2 505 269 T3

Met Asp Cys Arg Lys Met Ala Arg Phe Ser Tyr Ser Val Ile Trp Ile
 1 5 10 15

Met Ala Ile Ser Lys Val Phe Glu Leu Gly Leu Val Ala Gly Leu Gly
 20 25 30

His Gln Glu Phe Ala Arg Pro Ser Arg Gly Tyr Leu Ala Phe Arg Asp
 35 40 45

Asp Ser Ile Trp Pro Gln Glu Glu Pro Ala Ile Arg Pro Arg Ser Ser
 50 55 60

Gln Arg Val Pro Pro Met Gly Ile Gln His Ser Lys Glu Leu Asn Arg
 65 70 75 80

Thr Cys Cys Leu Asn Gly Gly Thr Cys Met Leu Gly Ser Phe Cys Ala
 85 90 95

Cys Pro Pro Ser Phe Tyr Gly Arg Asn Cys Glu His Asp Val Arg Lys
 100 105 110

Glu Asn Cys Gly Ser Val Pro His Asp Thr Trp Leu Pro Lys Lys Cys
 115 120 125

Ser Leu Cys Lys Cys Trp His Gly Gln Leu Arg Cys Phe Pro Gln Ala
 130 135 140

Phe Leu Pro Gly Cys Asp Gly Leu Val Met Asp Glu His Leu Val Ala
 145 150 155 160

Ser Arg Thr Pro Glu Leu Pro Pro Ser Ala Arg Thr Thr Thr Phe Met
 165 170 175

Leu Val Gly Ile Cys Leu Ser Ile Gln Ser Tyr Tyr
 180 185

- <210> 6
- <211> 1007
- <212> PRT
- <213> *Homo sapiens*
- <400> 6

ES 2 505 269 T3

Met Gly Ser Gly Gly Asp Ser Leu Leu Gly Gly Arg Gly Ser Leu Pro
 1 5 10 15

Leu Leu Leu Leu Leu Ile Met Gly Gly Met Ala Gln Asp Ser Pro Pro
 20 25 30

Gln Ile Leu Val His Pro Gln Asp Gln Leu Phe Gln Gly Pro Gly Pro
 35 40 45

Ala Arg Met Ser Cys Gln Ala Ser Gly Gln Pro Pro Pro Thr Ile Arg
 50 55 60

Trp Leu Leu Asn Gly Gln Pro Leu Ser Met Val Pro Pro Asp Pro His
 65 70 75 80

His Leu Leu Pro Asp Gly Thr Leu Leu Leu Leu Gln Pro Pro Ala Arg
 85 90 95

ES 2 505 269 T3

Gly His Ala His Asp Gly Gln Ala Leu Ser Thr Asp Leu Gly Val Tyr
 100 105 110

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

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

Asp Met Val Ala Val Val Gly Glu Gln Phe Thr Leu Glu Cys Gly Pro
 145 150 155 160

Pro Trp Gly His Pro Glu Pro Thr Val Ser Trp Trp Lys Asp Gly Lys
 165 170 175

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

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

Ala Thr Asn Ser Ala Gly His Arg Glu Ser Arg Ala Ala Arg Val Ser
 210 215 220

Ile Gln Glu Pro Gln Asp Tyr Thr Glu Pro Val Glu Leu Leu Ala Val
 225 230 235 240

Arg Ile Gln Leu Glu Asn Val Thr Leu Leu Asn Pro Asp Pro Ala Glu
 245 250 255

Gly Pro Lys Pro Arg Pro Ala Val Trp Leu Ser Trp Lys Val Ser Gly
 260 265 270

Pro Ala Ala Pro Ala Gln Ser Tyr Thr Ala Leu Phe Arg Thr Gln Thr
 275 280 285

Ala Pro Gly Gly Gln Gly Ala Pro Trp Ala Glu Glu Leu Leu Ala Gly
 290 295 300

Trp Gln Ser Ala Glu Leu Gly Gly Leu His Trp Gly Gln Asp Tyr Glu
 305 310 315 320

Phe Lys Val Arg Pro Ser Ser Gly Arg Ala Arg Gly Pro Asp Ser Asn
 325 330 335

Val Leu Leu Leu Arg Leu Pro Glu Lys Val Pro Ser Ala Pro Pro Gln
 340 345 350

Glu Val Thr Leu Lys Pro Gly Asn Gly Thr Val Phe Val Ser Trp Val
 355 360 365

Pro Pro Pro Ala Glu Asn His Asn Gly Ile Ile Arg Gly Tyr Gln Val

Ser Pro Leu Leu Arg Gly Ser His Ser Leu Glu Leu Arg Ala Cys Glu
 660 665 670

Leu Gly Asn Arg Gly Ser Lys Asn Leu Ser Gln Ser Pro Gly Ala Val
 675 680 685

Pro Gln Ala Leu Val Ala Trp Arg Ala Leu Gly Pro Lys Leu Leu Ser
 690 695 700

Ser Ser Asn Glu Leu Val Thr Arg His Leu Pro Pro Ala Pro Leu Phe
 705 710 715 720

Pro His Glu Thr Pro Pro Thr Gln Ser Gln Gln Thr Gln Pro Pro Val
 725 730 735

Ala Pro Gln Ala Pro Ser Ser Ile Leu Leu Pro Ala Ala Pro Ile Pro
 740 745 750

Ile Leu Ser Pro Cys Ser Pro Pro Ser Pro Gln Ala Ser Ser Leu Ser
 755 760 765

Gly Pro Ser Pro Ala Ser Ser Arg Leu Ser Ser Ser Ser Leu Ser Ser
 770 775 780

Leu Gly Glu Asp Gln Asp Ser Val Leu Thr Pro Glu Glu Val Ala Leu
 785 790 800

Cys Leu Glu Leu Ser Glu Gly Glu Glu Thr Pro Arg Asn Ser Val Ser
 805 810 815

Pro Met Pro Arg Ala Pro Ser Pro Pro Thr Thr Tyr Gly Tyr Ile Ser
 820 825 830

Val Pro Thr Ala Ser Glu Phe Thr Asp Met Gly Arg Thr Gly Gly Gly
 835 840 845

Val Gly Pro Lys Gly Gly Val Leu Leu Cys Pro Pro Arg Pro Cys Leu
 850 855 860

Thr Pro Thr Pro Ser Glu Gly Ser Leu Ala Asn Gly Trp Gly Ser Ala
 865 870 875 880

Ser Glu Asp Asn Ala Ala Ser Ala Arg Ala Ser Leu Val Ser Ser Ser
 885 890 895

Asp Gly Ser Phe Leu Ala Asp Ala His Phe Ala Arg Ala Leu Ala Val
 900 905 910

Ala Val Asp Ser Phe Gly Phe Gly Leu Glu Pro Arg Glu Ala Asp Cys
 915 920 925

ES 2 505 269 T3

Val Phe Ile Asp Ala Ser Ser Pro Pro Ser Pro Arg Asp Glu Ile Phe
930 935 940

Leu Thr Pro Asn Leu Ser Leu Pro Leu Trp Glu Trp Arg Pro Asp Trp
945 950 955 960

Leu Glu Asp Met Glu Val Ser His Thr Gln Arg Leu Gly Arg Gly Met
965 970 975

Pro Pro Trp Pro Pro Asp Ser Gln Ile Ser Ser Gln Arg Ser Gln Leu
980 985 990

His Cys Arg Met Pro Lys Ala Gly Ala Ser Pro Val Asp Tyr Ser
995 1000 1005

- <210> 7
- <211> 2322
- <212> PRT
- <213> *Homo sapiens*
- <400> 7

ES 2 505 269 T3

Met Gln Ser Gly Pro Arg Pro Pro Leu Pro Ala Pro Gly Leu Ala Leu
 1 5 10 15
 Ala Leu Thr Leu Thr Met Leu Ala Arg Leu Ala Ser Ala Ala Ser Phe
 20 25 30
 Phe Gly Glu Asn His Leu Glu Val Pro Val Ala Thr Ala Leu Thr Asp
 35 40 45
 Ile Asp Leu Gln Leu Gln Phe Ser Thr Ser Gln Pro Glu Ala Leu Leu
 50 55 60
 Leu Leu Ala Ala Gly Pro Ala Asp His Leu Leu Leu Gln Leu Tyr Ser
 65 70 75 80
 Gly Arg Leu Gln Val Arg Leu Val Leu Gly Gln Glu Glu Leu Arg Leu
 85 90 95
 Gln Thr Pro Ala Glu Thr Leu Leu Ser Asp Ser Ile Pro His Thr Val
 100 105 110
 Val Leu Thr Val Val Glu Gly Trp Ala Thr Leu Ser Val Asp Gly Phe
 115 120 125
 Leu Asn Ala Ser Ser Ala Val Pro Gly Ala Pro Leu Glu Val Pro Tyr
 130 135 140
 Gly Leu Phe Val Gly Gly Thr Gly Thr Leu Gly Leu Pro Tyr Leu Arg
 145 150 155 160
 Gly Thr Ser Arg Pro Leu Arg Gly Cys Leu His Ala Ala Thr Leu Asn

ES 2 505 269 T3

				165						170				175			
Gly	Arg	Ser	Leu 180	Leu	Arg	Pro	Leu	Thr 185	Pro	Asp	Val	His	Glu 190	Gly	Cys		
Ala	Glu	Glu 195	Phe	Ser	Ala	Ser	Asp 200	Asp	Val	Ala	Leu	Gly 205	Phe	Ser	Gly		
Pro	His 210	Ser	Leu	Ala	Ala	Phe 215	Pro	Ala	Trp	Gly	Thr 220	Gln	Asp	Glu	Gly		
Thr 225	Leu	Glu	Phe	Thr	Leu 230	Thr	Thr	Gln	Ser	Arg 235	Gln	Ala	Pro	Leu	Ala 240		
Phe	Gln	Ala	Gly	Gly 245	Arg	Arg	Gly	Asp	Phe 250	Ile	Tyr	Val	Asp	Ile 255	Phe		
Glu	Gly	His	Leu 260	Arg	Ala	Val	Val	Glu 265	Lys	Gly	Gln	Gly	Thr 270	Val	Leu		
Leu	His	Asn 275	Ser	Val	Pro	Val	Ala 280	Asp	Gly	Gln	Pro	His 285	Glu	Val	Ser		
Val	His 290	Ile	Asn	Ala	His	Arg 295	Leu	Glu	Ile	Ser	Val 300	Asp	Gln	Tyr	Pro		
Thr 305	His	Thr	Ser	Asn	Arg 310	Gly	Val	Leu	Ser	Tyr 315	Leu	Glu	Pro	Arg	Gly 320		
Ser	Leu	Leu	Leu	Gly 325	Gly	Leu	Asp	Ala	Glu 330	Ala	Ser	Arg	His	Leu 335	Gln		
Glu	His	Arg	Leu 340	Gly	Leu	Thr	Pro	Glu 345	Ala	Thr	Asn	Ala	Ser 350	Leu	Leu		
Gly	Cys	Met 355	Glu	Asp	Leu	Ser	Val 360	Asn	Gly	Gln	Arg	Arg 365	Gly	Leu	Arg		
Glu	Ala 370	Leu	Leu	Thr	Arg	Asn	Met 375	Ala	Ala	Gly	Cys 380	Arg	Leu	Glu	Glu		
Glu 385	Glu	Tyr	Glu	Asp	Asp 390	Ala	Tyr	Gly	His	Tyr 395	Glu	Ala	Phe	Ser	Thr 400		
Leu	Ala	Pro	Glu	Ala 405	Trp	Pro	Ala	Met	Glu 410	Leu	Pro	Glu	Pro	Cys 415	Val		
Pro	Glu	Pro	Gly 420	Leu	Pro	Pro	Val	Phe 425	Ala	Asn	Phe	Thr	Gln 430	Leu	Leu		
Thr	Ile	Ser 435	Pro	Leu	Val	Val	Ala 440	Glu	Gly	Gly	Thr	Ala 445	Trp	Leu	Glu		

ES 2 505 269 T3

Trp Arg His Val Gln Pro Thr Leu Asp Leu Met Glu Ala Glu Leu Arg
 450 455 460

Lys Ser Gln Val Leu Phe Ser Val Thr Arg Gly Ala Arg His Gly Glu
 465 470 475 480

Leu Glu Leu Asp Ile Pro Gly Ala Gln Ala Arg Lys Met Phe Thr Leu
 485 490 495

Leu Asp Val Val Asn Arg Lys Ala Arg Phe Ile His Asp Gly Ser Glu
 500 505 510

Asp Thr Ser Asp Gln Leu Val Leu Glu Val Ser Val Thr Ala Arg Val
 515 520 525

Pro Met Pro Ser Cys Leu Arg Arg Gly Gln Thr Tyr Leu Leu Pro Ile
 530 535 540

Gln Val Asn Pro Val Asn Asp Pro Pro His Ile Ile Phe Pro His Gly
 545 550 555 560

Ser Leu Met Val Ile Leu Glu His Thr Gln Lys Pro Leu Gly Pro Glu
 565 570 575

Val Phe Gln Ala Tyr Asp Pro Asp Ser Ala Cys Glu Gly Leu Thr Phe
 580 585 590

Gln Val Leu Gly Thr Ser Ser Gly Leu Pro Val Glu Arg Arg Asp Gln
 595 600 605

Pro Gly Glu Pro Ala Thr Glu Phe Ser Cys Arg Glu Leu Glu Ala Gly
 610 615 620

Ser Leu Val Tyr Val His Arg Gly Gly Pro Ala Gln Asp Leu Thr Phe
 625 630 635 640

Arg Val Ser Asp Gly Leu Gln Ala Ser Pro Pro Ala Thr Leu Lys Val
 645 650 655

Val Ala Ile Arg Pro Ala Ile Gln Ile His Arg Ser Thr Gly Leu Arg
 660 665 670

Leu Ala Gln Gly Ser Ala Met Pro Ile Leu Pro Ala Asn Leu Ser Val
 675 680 685

Glu Thr Asn Ala Val Gly Gln Asp Val Ser Val Leu Phe Arg Val Thr
 690 695 700

Gly Ala Leu Gln Phe Gly Glu Leu Gln Lys Gln Gly Ala Gly Gly Val
 705 710 715 720

ES 2 505 269 T3

Glu Gly Ala Glu Trp Trp Ala Thr Gln Ala Phe His Gln Arg Asp Val
 725 730 735
 Glu Gln Gly Arg Val Arg Tyr Leu Ser Thr Asp Pro Gln His His Ala
 740 745 750
 Tyr Asp Thr Val Glu Asn Leu Ala Leu Glu Val Gln Val Gly Gln Glu
 755 760 765
 Ile Leu Ser Asn Leu Ser Phe Pro Val Thr Ile Gln Arg Ala Thr Val
 770 775 780
 Trp Met Leu Arg Leu Glu Pro Leu His Thr Gln Asn Thr Gln Gln Glu
 785 790 795 800
 Thr Leu Thr Thr Ala His Leu Glu Ala Thr Leu Glu Glu Ala Gly Pro
 805 810 815
 Ser Pro Pro Thr Phe His Tyr Glu Val Val Gln Ala Pro Arg Lys Gly
 820 825 830
 Asn Leu Gln Leu Gln Gly Thr Arg Leu Ser Asp Gly Gln Gly Phe Thr
 835 840 845
 Gln Asp Asp Ile Gln Ala Gly Arg Val Thr Tyr Gly Ala Thr Ala Arg
 850 855 860
 Ala Ser Glu Ala Val Glu Asp Thr Phe Arg Phe Arg Val Thr Ala Pro
 865 870 875 880
 Pro Tyr Phe Ser Pro Leu Tyr Thr Phe Pro Ile His Ile Gly Gly Asp
 885 890 895
 Pro Asp Ala Pro Val Leu Thr Asn Val Leu Leu Val Val Pro Glu Gly
 900 905 910
 Gly Glu Gly Val Leu Ser Ala Asp His Leu Phe Val Lys Ser Leu Asn
 915 920 925
 Ser Ala Ser Tyr Leu Tyr Glu Val Met Glu Arg Pro Arg His Gly Arg
 930 935 940
 Leu Ala Trp Arg Gly Thr Gln Asp Lys Thr Thr Met Val Thr Ser Phe
 945 950 955 960
 Thr Asn Glu Asp Leu Leu Arg Gly Arg Leu Val Tyr Gln His Asp Asp
 965 970 975
 Ser Glu Thr Thr Glu Asp Asp Ile Pro Phe Val Ala Thr Arg Gln Gly
 980 985 990

Glu Ser Ser Gly Asp Met Ala Trp Glu Glu Val Arg Gly Val Phe Ar
 995 1000 1005
 Val Ala Ile Gln Pro Val Asn Asp His Ala Pro Val Gln Thr Ile
 1010 1015 1020
 Ser Arg Ile Phe His Val Ala Arg Gly Gly Arg Arg Leu Leu Thr
 1025 1030 1035
 Thr Asp Asp Val Ala Phe Ser Asp Ala Asp Ser Gly Phe Ala Asp
 1040 1045 1050
 Ala Gln Leu Val Leu Thr Arg Lys Asp Leu Leu Phe Gly Ser Ile
 1055 1060 1065
 Val Ala Val Asp Glu Pro Thr Arg Pro Ile Tyr Arg Phe Thr Gln
 1070 1075 1080
 Glu Asp Leu Arg Lys Arg Arg Val Leu Phe Val His Ser Gly Ala
 1085 1090 1095
 Asp Arg Gly Trp Ile Gln Leu Gln Val Ser Asp Gly Gln His Gln
 1100 1105 1110
 Ala Thr Ala Leu Leu Glu Val Gln Ala Ser Glu Pro Tyr Leu Arg
 1115 1120 1125
 Val Ala Asn Gly Ser Ser Leu Val Val Pro Gln Gly Gly Gln Gly
 1130 1135 1140
 Thr Ile Asp Thr Ala Val Leu His Leu Asp Thr Asn Leu Asp Ile
 1145 1150 1155
 Arg Ser Gly Asp Glu Val His Tyr His Val Thr Ala Gly Pro Arg
 1160 1165 1170
 Trp Gly Gln Leu Val Arg Ala Gly Gln Pro Ala Thr Ala Phe Ser
 1175 1180 1185
 Gln Gln Asp Leu Leu Asp Gly Ala Val Leu Tyr Ser His Asn Gly
 1190 1195 1200
 Ser Leu Ser Pro Arg Asp Thr Met Ala Phe Ser Val Glu Ala Gly
 1205 1210 1215
 Pro Val His Thr Asp Ala Thr Leu Gln Val Thr Ile Ala Leu Glu
 1220 1225 1230
 Gly Pro Leu Ala Pro Leu Lys Leu Val Arg His Lys Lys Ile Tyr
 1235 1240 1245
 Val Phe Gln Gly Glu Ala Ala Glu Ile Arg Arg Asp Gln Leu Glu

ES 2 505 269 T3

1250						1255						1260		
Ala	Ala	Gln	Glu	Ala	Val	Pro	Pro	Ala	Asp	Ile	Val	Phe	Ser	Val
	1265					1270					1275			
Lys	Ser	Pro	Pro	Ser	Ala	Gly	Tyr	Leu	Val	Met	Val	Ser	Arg	Gly
	1280					1285					1290			
Ala	Leu	Ala	Asp	Glu	Pro	Pro	Ser	Leu	Asp	Pro	Val	Gln	Ser	Phe
	1295					1300					1305			
Ser	Gln	Glu	Ala	Val	Asp	Thr	Gly	Arg	Val	Leu	Tyr	Leu	His	Ser
	1310					1315					1320			
Arg	Pro	Glu	Ala	Trp	Ser	Asp	Ala	Phe	Ser	Leu	Asp	Val	Ala	Ser
	1325					1330					1335			
Gly	Leu	Gly	Ala	Pro	Leu	Glu	Gly	Val	Leu	Val	Glu	Leu	Glu	Val
	1340					1345					1350			
Leu	Pro	Ala	Ala	Ile	Pro	Leu	Glu	Ala	Gln	Asn	Phe	Ser	Val	Pro
	1355					1360					1365			
Glu	Gly	Gly	Ser	Leu	Thr	Leu	Ala	Pro	Pro	Leu	Leu	Arg	Val	Ser
	1370					1375					1380			
Gly	Pro	Tyr	Phe	Pro	Thr	Leu	Leu	Gly	Leu	Ser	Leu	Gln	Val	Leu
	1385					1390					1395			
Glu	Pro	Pro	Gln	His	Gly	Ala	Leu	Gln	Lys	Glu	Asp	Gly	Pro	Gln
	1400					1405					1410			
Ala	Arg	Thr	Leu	Ser	Ala	Phe	Ser	Trp	Arg	Met	Val	Glu	Glu	Gln
	1415					1420					1425			
Leu	Ile	Arg	Tyr	Val	His	Asp	Gly	Ser	Glu	Thr	Leu	Thr	Asp	Ser
	1430					1435					1440			
Phe	Val	Leu	Met	Ala	Asn	Ala	Ser	Glu	Met	Asp	Arg	Gln	Ser	His
	1445					1450					1455			
Pro	Val	Ala	Phe	Thr	Val	Thr	Val	Leu	Pro	Val	Asn	Asp	Gln	Pro
	1460					1465					1470			
Pro	Ile	Leu	Thr	Thr	Asn	Thr	Gly	Leu	Gln	Met	Trp	Glu	Gly	Ala
	1475					1480					1485			
Thr	Ala	Pro	Ile	Pro	Ala	Glu	Ala	Leu	Arg	Ser	Thr	Asp	Gly	Asp
	1490					1495					1500			
Ser	Gly	Ser	Glu	Asp	Leu	Val	Tyr	Thr	Ile	Glu	Gln	Pro	Ser	Asn
	1505					1510					1515			

Gly Arg Val Val Leu Arg Gly Ala Pro Gly Thr Glu Val Arg Ser
 1520 1525 1530
 Phe Thr Gln Ala Gln Leu Asp Gly Gly Leu Val Leu Phe Ser His
 1535 1540 1545
 Arg Gly Thr Leu Asp Gly Gly Phe Arg Phe Arg Leu Ser Asp Gly
 1550 1555 1560
 Glu His Thr Ser Pro Gly His Phe Phe Arg Val Thr Ala Gln Lys
 1565 1570
 Gln Val Leu Leu Ser Leu Lys Gly Ser Gln Thr Leu Thr Val Cys
 1580 1585 1590
 Pro Gly Ser Val Gln Pro Leu Ser Ser Gln Thr Leu Arg Ala Ser
 1595 1600 1605
 Ser Ser Ala Gly Thr Asp Pro Gln Leu Leu Leu Tyr Arg Val Val
 1610 1615 1620
 Arg Gly Pro Gln Leu Gly Arg Leu Phe His Ala Gln Gln Asp Ser
 1625 1630 1635
 Thr Gly Glu Ala Leu Val Asn Phe Thr Gln Ala Glu Val Tyr Ala
 1640 1645 1650
 Gly Asn Ile Leu Tyr Glu His Glu Met Pro Pro Glu Pro Phe Trp
 1655 1660 1665
 Glu Ala His Asp Thr Leu Glu Leu Gln Leu Ser Ser Pro Pro Ala
 1670 1675 1680
 Arg Asp Val Ala Ala Thr Leu Ala Val Ala Val Ser Phe Glu Ala
 1685 1690 1695
 Ala Cys Pro Gln His Pro Ser His Leu Trp Lys Asn Lys Gly Leu
 1700 1705 1710
 Trp Val Pro Glu Gly Gln Arg Ala Arg Ile Thr Val Ala Ala Leu
 1715 1720 1725
 Asp Ala Ser Asn Leu Leu Ala Ser Val Pro Ser Pro Gln Arg Ser
 1730 1735 1740
 Glu His Asp Val Leu Phe Gln Val Thr Gln Phe Pro Ser Arg Gly
 1745 1750 1755
 Gln Leu Leu Val Ser Glu Glu Pro Leu His Ala Gly Gln Pro His
 1760 1765 1770

Phe Leu Gln Ser Gln Leu Ala Ala Gly Gln Leu Val Tyr Ala His
 1775 1780 1785
 Gly Gly Gly Gly Thr Gln Gln Asp Gly Phe His Phe Arg Ala His
 1790 1795 1800
 Leu Gln Gly Pro Ala Gly Ala Ser Val Ala Gly Pro Gln Thr Ser
 1805 1810 1815
 Glu Ala Phe Ala Ile Thr Val Arg Asp Val Asn Glu Arg Pro Pro
 1820 1825 1830
 Gln Pro Gln Ala Ser Val Pro Leu Arg Leu Thr Arg Gly Ser Arg
 1835 1840 1845
 Ala Pro Ile Ser Arg Ala Gln Leu Ser Val Val Asp Pro Asp Ser
 1850 1855 1860
 Ala Pro Gly Glu Ile Glu Tyr Glu Val Gln Arg Ala Pro His Asn
 1865 1870 1875
 Gly Phe Leu Ser Leu Val Gly Gly Gly Leu Gly Pro Val Thr Arg
 1880 1885 1890
 Phe Thr Gln Ala Asp Val Asp Ser Gly Arg Leu Ala Phe Val Ala
 1895 1900 1905
 Asn Gly Ser Ser Val Ala Gly Ile Phe Gln Leu Ser Met Ser Asp
 1910 1915 1920
 Gly Ala Ser Pro Pro Leu Pro Met Ser Leu Ala Val Asp Ile Leu
 1925 1930 1935
 Pro Ser Ala Ile Glu Val Gln Leu Arg Ala Pro Leu Glu Val Pro
 1940 1945 1950
 Gln Ala Leu Gly Arg Ser Ser Leu Ser Gln Gln Gln Leu Arg Val
 1955 1960 1965
 Val Ser Asp Arg Glu Glu Pro Glu Ala Ala Tyr Arg Leu Ile Gln
 1970 1975 1980
 Gly Pro Gln Tyr Gly His Leu Leu Val Gly Gly Arg Pro Thr Ser
 1985 1990 1995
 Ala Phe Ser Gln Phe Gln Ile Asp Gln Gly Glu Val Val Phe Ala
 2000 2005 2010
 Phe Thr Asn Phe Ser Ser Ser His Asp His Phe Arg Val Leu Ala
 2015 2020 2025

ES 2 505 269 T3

Leu Ala Arg Gly Val Asn Ala Ser Ala Val Val Asn Val Thr Val
 2030 2035 2040
 Arg Ala Leu Leu His Val Trp Ala Gly Gly Pro Trp Pro Gln Gly
 2045 2050 2055
 Ala Thr Leu Arg Leu Asp Pro Thr Val Leu Asp Ala Gly Glu Leu
 2060 2065 2070
 Ala Asn Arg Thr Gly Ser Val Pro Arg Phe Arg Leu Leu Glu Gly
 2075 2080 2085
 Pro Arg His Gly Arg Val Val Arg Val Pro Arg Ala Arg Thr Glu
 2090 2095 2100
 Pro Gly Gly Ser Gln Leu Val Glu Gln Phe Thr Gln Gln Asp Leu
 2105 2110 2115
 Glu Asp Gly Arg Leu Gly Leu Glu Val Gly Arg Pro Glu Gly Arg
 2120 2125 2130
 Ala Pro Gly Pro Ala Gly Asp Ser Leu Thr Leu Glu Leu Trp Ala
 2135 2140 2145
 Gln Gly Val Pro Pro Ala Val Ala Ser Leu Asp Phe Ala Thr Glu
 2150 2155 2160
 Pro Tyr Asn Ala Ala Arg Pro Tyr Ser Val Ala Leu Leu Ser Val
 2165 2170 2175
 Pro Glu Ala Ala Arg Thr Glu Ala Gly Lys Pro Glu Ser Ser Thr
 2180 2185 2190
 Pro Thr Gly Glu Pro Gly Pro Met Ala Ser Ser Pro Glu Pro Ala
 2195 2200 2205
 Val Ala Lys Gly Gly Phe Leu Ser Phe Leu Glu Ala Asn Met Phe
 2210 2215 2220
 Ser Val Ile Ile Pro Met Cys Leu Val Leu Leu Leu Leu Ala Leu
 2225 2230 2235
 Ile Leu Pro Leu Leu Phe Tyr Leu Arg Lys Arg Asn Lys Thr Gly
 2240 2245 2250
 Lys His Asp Val Gln Val Leu Thr Ala Lys Pro Arg Asn Gly Leu
 2255 2260 2265
 Ala Gly Asp Thr Glu Thr Phe Arg Lys Val Glu Pro Gly Gln Ala
 2270 2275 2280
 Ile Pro Leu Thr Ala Val Pro Gly Gln Gly Pro Pro Pro Gly Gly

2285

2290

2295

Gln Pro Asp Pro Glu Leu Leu Gln Phe Cys Arg Thr Pro Asn Pro
2300 2305 2310

Ala Leu Lys Asn Gly Gln Tyr Trp Val
2315 2320

<210> 8
<211> 2201
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

5

<400> 8

Met Gly Ala Met Thr Gln Leu Leu Ala Gly Val Phe Leu Ala Phe Leu
1 5 10 15

Ala Leu Ala Thr Glu Gly Gly Val Leu Lys Lys Val Ile Arg His Lys
20 25 30

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

Val Phe Asn His Val Tyr Asn Ile Lys Leu Pro Val Gly Ser Gln Cys
50 55 60

Ser Val Asp Leu Glu Ser Ala Ser Gly Glu Lys Asp Leu Ala Pro Pro
65 70 75 80

Ser Glu Pro Ser Glu Ser Phe Gln Glu His Thr Val Asp Gly Glu Asn
85 90 95

Gln Ile Val Phe Thr His Arg Ile Asn Ile Pro Arg Arg Ala Cys Gly
100 105 110

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

Leu Glu Asn Leu Val Ser Ser Leu Arg Glu Gln Cys Thr Ala Gly Ala
130 135 140

Gly Cys Cys Leu Gln Pro Ala Thr Gly Arg Leu Asp Thr Arg Pro Phe
145 150 155 160

Cys Ser Gly Arg Gly Asn Phe Ser Thr Glu Gly Cys Gly Cys Val Cys
165 170 175

Glu Pro Gly Trp Lys Gly Pro Asn Cys Ser Glu Pro Glu Cys Pro Gly
180 185 190

Asn Cys His Leu Arg Gly Arg Cys Ile Asp Gly Gln Cys Ile Cys Asp
195 200 205

10

ES 2 505 269 T3

Asp Gly Phe Thr Gly Glu Asp Cys Ser Gln Leu Ala Cys Pro Ser Asp
 210 215 220

Cys Asn Asp Gln Gly Lys Cys Val Asn Gly Val Cys Ile Cys Phe Glu
 225 230 235 240

Gly Tyr Ala Gly Ala Asp Cys Ser Arg Glu Ile Cys Pro Val Pro Cys
 245 250 255

Ser Glu Glu His Gly Thr Cys Val Asp Gly Leu Cys Val Cys His Asp
 260 265 270

Gly Phe Ala Gly Asp Asp Cys Asn Lys Pro Leu Cys Leu Asn Asn Cys
 275 280 285

Tyr Asn Arg Gly Arg Cys Val Glu Asn Glu Cys Val Cys Asp Glu Gly
 290 295 300

Phe Thr Gly Glu Asp Cys Ser Glu Leu Ile Cys Pro Asn Asp Cys Phe
 305 310 315 320

Asp Arg Gly Arg Cys Ile Asn Gly Thr Cys Tyr Cys Glu Glu Gly Phe
 325 330 335

Thr Gly Glu Asp Cys Gly Lys Pro Thr Cys Pro His Ala Cys His Thr
 340 345 350

Gln Gly Arg Cys Glu Glu Gly Gln Cys Val Cys Asp Glu Gly Phe Ala
 355 360 365

Gly Leu Asp Cys Ser Glu Lys Arg Cys Pro Ala Asp Cys His Asn Arg
 370 375 380

Gly Arg Cys Val Asp Gly Arg Cys Glu Cys Asp Asp Gly Phe Thr Gly
 385 390 395 400

Ala Asp Cys Gly Glu Leu Lys Cys Pro Asn Gly Cys Ser Gly His Gly
 405 410 415

Arg Cys Val Asn Gly Gln Cys Val Cys Asp Glu Gly Tyr Thr Gly Glu
 420 425 430

Asp Cys Ser Gln Leu Arg Cys Pro Asn Asp Cys His Ser Arg Gly Arg
 435 440 445

Cys Val Glu Gly Lys Cys Val Cys Glu Gln Gly Phe Lys Gly Tyr Asp
 450 455 460

Cys Ser Asp Met Ser Cys Pro Asn Asp Cys His Gln His Gly Arg Cys
 465 470 475 480

Val Asn Gly Met Cys Val Cys Asp Asp Gly Tyr Thr Gly Glu Asp Cys
 485 490 495
 Arg Asp Arg Gln Cys Pro Arg Asp Cys Ser Asn Arg Gly Leu Cys Val
 500 505 510
 Asp Gly Gln Cys Val Cys Glu Asp Gly Phe Thr Gly Pro Asp Cys Ala
 515 520 525
 Glu Leu Ser Cys Pro Asn Asp Cys His Gly Gln Gly Arg Cys Val Asn
 530 535 540
 Gly Gln Cys Val Cys His Glu Gly Phe Met Gly Lys Asp Cys Lys Glu
 545 550 555 560
 Gln Arg Cys Pro Ser Asp Cys His Gly Gln Gly Arg Cys Val Asp Gly
 565 570 575
 Gln Cys Ile Cys His Glu Gly Phe Thr Gly Leu Asp Cys Gly Gln His
 580 585 590
 Ser Cys Pro Ser Asp Cys Asn Asn Leu Gly Gln Cys Val Ser Gly Arg
 595 600 605
 Cys Ile Cys Asn Glu Gly Tyr Ser Gly Glu Asp Cys Ser Glu Val Ser
 610 615 620
 Pro Pro Lys Asp Leu Val Val Thr Glu Val Thr Glu Glu Thr Val Asn
 625 630 635 640
 Leu Ala Trp Asp Asn Glu Met Arg Val Thr Glu Tyr Leu Val Val Tyr
 645 650 655
 Thr Pro Thr His Glu Gly Gly Leu Glu Met Gln Phe Arg Val Pro Gly
 660 665 670
 Asp Gln Thr Ser Thr Ile Ile Gln Glu Leu Glu Pro Gly Val Glu Tyr
 675 680 685
 Phe Ile Arg Val Phe Ala Ile Leu Glu Asn Lys Lys Ser Ile Pro Val
 690 695 700
 Ser Ala Arg Val Ala Thr Tyr Leu Pro Ala Pro Glu Gly Leu Lys Phe
 705 710 715 720
 Lys Ser Ile Lys Glu Thr Ser Val Glu Val Glu Trp Asp Pro Leu Asp
 725 730 735
 Ile Ala Phe Glu Thr Trp Glu Ile Ile Phe Arg Asn Met Asn Lys Glu
 740 745 750
 Asp Glu Gly Glu Ile Thr Lys Ser Leu Arg Arg Pro Glu Thr Ser Tyr

ES 2 505 269 T3

Val Leu Arg Gly Leu Glu Pro Gly Gln Glu Tyr Asn Val Leu Leu
 1040 1045 1050
 Thr Ala Glu Lys Gly Arg His Lys Ser Lys Pro Ala Arg Val Lys
 1055 1060 1065
 Ala Ser Thr Glu Gln Ala Pro Glu Leu Glu Asn Leu Thr Val Thr
 1070 1075 1080
 Glu Val Gly Trp Asp Gly Leu Arg Leu Asn Trp Thr Ala Ala Asp
 1085 1090 1095
 Gln Ala Tyr Glu His Phe Ile Ile Gln Val Gln Glu Ala Asn Lys
 1100 1105 1110
 Val Glu Ala Ala Arg Asn Leu Thr Val Pro Gly Ser Leu Arg Ala
 1115 1120 1125
 Val Asp Ile Pro Gly Leu Lys Ala Ala Thr Pro Tyr Thr Val Ser
 1130 1135 1140
 Ile Tyr Gly Val Ile Gln Gly Tyr Arg Thr Pro Val Leu Ser Ala
 1145 1150 1155
 Glu Ala Ser Thr Gly Glu Thr Pro Asn Leu Gly Glu Val Val Val
 1160 1165 1170
 Ala Glu Val Gly Trp Asp Ala Leu Lys Leu Asn Trp Thr Ala Pro
 1175 1180 1185
 Glu Gly Ala Tyr Glu Tyr Phe Phe Ile Gln Val Gln Glu Ala Asp
 1190 1195 1200
 Thr Val Glu Ala Ala Gln Asn Leu Thr Val Pro Gly Gly Leu Arg
 1205 1210 1215
 Ser Thr Asp Leu Pro Gly Leu Lys Ala Ala Thr His Tyr Thr Ile
 1220 1225 1230
 Thr Ile Arg Gly Val Thr Gln Asp Phe Ser Thr Thr Pro Leu Ser
 1235 1240 1245
 Val Glu Val Leu Thr Glu Glu Val Pro Asp Met Gly Asn Leu Thr
 1250 1255 1260
 Val Thr Glu Val Ser Trp Asp Ala Leu Arg Leu Asn Trp Thr Thr
 1265 1270 1275
 Pro Asp Gly Thr Tyr Asp Gln Phe Thr Ile Gln Val Gln Glu Ala
 1280 1285 1290

Asp Gln Val Glu Glu Ala His Asn Leu Thr Val Pro Gly Ser Leu
 1295 1300 1305
 Arg Ser Met Glu Ile Pro Gly Leu Arg Ala Gly Thr Pro Tyr Thr
 1310 1315 1320
 Val Thr Leu His Gly Glu Val Arg Gly His Ser Thr Arg Pro Leu
 1325 1330 1335
 Ala Val Glu Val Val Thr Glu Asp Leu Pro Gln Leu Gly Asp Leu
 1340 1345 1350
 Ala Val Ser Glu Val Gly Trp Asp Gly Leu Arg Leu Asn Trp Thr
 1355 1360 1365
 Ala Ala Asp Asn Ala Tyr Glu His Phe Val Ile Gln Val Gln Glu
 1370 1375 1380
 Val Asn Lys Val Glu Ala Ala Gln Asn Leu Thr Leu Pro Gly Ser
 1385 1390 1395
 Leu Arg Ala Val Asp Ile Pro Gly Leu Glu Ala Ala Thr Pro Tyr
 1400 1405 1410
 Arg Val Ser Ile Tyr Gly Val Ile Arg Gly Tyr Arg Thr Pro Val
 1415 1420 1425
 Leu Ser Ala Glu Ala Ser Thr Ala Lys Glu Pro Glu Ile Gly Asn
 1430 1435 1440 1445
 Leu Asn Val Ser Asp Ile Thr Pro Glu Ser Phe Asn Leu Ser Trp
 1445 1450 1455
 Met Ala Thr Asp Gly Ile Phe Glu Thr Phe Thr Ile Glu Ile Ile
 1460 1465 1470
 Asp Ser Asn Arg Leu Leu Glu Thr Val Glu Tyr Asn Ile Ser Gly
 1475 1480 1485
 Ala Glu Arg Thr Ala His Ile Ser Gly Leu Pro Pro Ser Thr Asp
 1490 1495 1500
 Phe Ile Val Tyr Leu Ser Gly Leu Ala Pro Ser Ile Arg Thr Lys
 1505 1510 1515
 Thr Ile Ser Ala Thr Ala Thr Thr Glu Ala Leu Pro Leu Leu Glu
 1520 1525 1530
 Asn Leu Thr Ile Ser Asp Ile Asn Pro Tyr Gly Phe Thr Val Ser
 1535 1540 1545

Trp Met Ala Ser Glu Asn Ala Phe Asp Ser Phe Leu Val Thr Val
 1550 1555 1560
 Val Asp Ser Gly Lys Leu Leu Asp Pro Gln Glu Phe Thr Leu Ser
 1565 1570 1575
 Gly Thr Gln Arg Lys Leu Glu Leu Arg Gly Leu Ile Thr Gly Ile
 1580 1585 1590
 Gly Tyr Glu Val Met Val Ser Gly Phe Thr Gln Gly His Gln Thr
 1595 1600 1605
 Lys Pro Leu Arg Ala Glu Ile Val Thr Glu Ala Glu Pro Glu Val
 1610 1615 1620
 Asp Asn Leu Leu Val Ser Asp Ala Thr Pro Asp Gly Phe Arg Leu
 1625 1630 1635
 Ser Trp Thr Ala Asp Glu Gly Val Phe Asp Asn Phe Val Leu Lys
 1640 1645 1650
 Ile Arg Asp Thr Lys Lys Gln Ser Glu Pro Leu Glu Ile Thr Leu
 1655 1660 1665
 Leu Ala Pro Glu Arg Thr Arg Asp Leu Thr Gly Leu Arg Glu Ala
 1670 1675 1680
 Thr Glu Tyr Glu Ile Glu Leu Tyr Gly Ile Ser Lys Gly Arg Arg
 1685 1690 1695
 Ser Gln Thr Val Ser Ala Ile Ala Thr Thr Ala Met Gly Ser Pro
 1700 1705 1710
 Lys Glu Val Ile Phe Ser Asp Ile Thr Glu Asn Ser Ala Thr Val
 1715 1720 1725
 Ser Trp Arg Ala Pro Thr Ala Gln Val Glu Ser Phe Arg Ile Thr
 1730 1735 1740
 Tyr Val Pro Ile Thr Gly Gly Thr Pro Ser Met Val Thr Val Asp
 1745 1750 1755
 Gly Thr Lys Thr Gln Thr Arg Leu Val Lys Leu Ile Pro Gly Val
 1760 1765 1770
 Glu Tyr Leu Val Ser Ile Ile Ala Met Lys Gly Phe Glu Glu Ser
 1775 1780 1785
 Glu Pro Val Ser Gly Ser Phe Thr Thr Ala Leu Asp Gly Pro Ser
 1790 1795 1800
 Gly Leu Val Thr Ala Asn Ile Thr Asp Ser Glu Ala Leu Ala Arg

ES 2 505 269 T3

	1805		1810		1815									
Trp	Gln 1820	Pro	Ala	Ile	Ala	Thr	Val	Asp	Ser	Tyr	Val 1830	Ile	Ser	Tyr
Thr	Gly 1835	Glu	Lys	Val	Pro	Glu 1840	Ile	Thr	Arg	Thr	Val 1845	Ser	Gly	Asn
Thr	Val 1850	Glu	Tyr	Ala	Leu	Thr 1855	Asp	Leu	Glu	Pro	Ala 1860	Thr	Glu	Tyr
Thr	Leu 1865	Arg	Ile	Phe	Ala	Glu 1870	Lys	Gly	Pro	Gln	Lys 1875	Ser	Ser	Thr
Ile	Thr 1880	Ala	Lys	Phe	Thr	Thr 1885	Asp	Leu	Asp	Ser	Pro 1890	Arg	Asp	Leu
Thr	Ala 1895	Thr	Glu	Val	Gln	Ser 1900	Glu	Thr	Ala	Leu	Leu 1905	Thr	Trp	Arg
Pro	Pro 1910	Arg	Ala	Ser	Val	Thr 1915	Gly	Tyr	Leu	Leu	Val 1920	Tyr	Glu	Ser
Val	Asp 1925	Gly	Thr	Val	Lys	Glu 1930	Val	Ile	Val	Gly	Pro 1935	Asp	Thr	Thr
Ser	Tyr 1940	Ser	Leu	Ala	Asp	Leu 1945	Ser	Pro	Ser	Thr	His 1950	Tyr	Thr	Ala
Lys	Ile 1955	Gln	Ala	Leu	Asn	Gly 1960	Pro	Leu	Arg	Ser	Asn 1965	Met	Ile	Gln
Thr	Ile 1970	Phe	Thr	Thr	Ile	Gly 1975	Leu	Leu	Tyr	Pro	Phe 1980	Pro	Lys	Asp
Cys	Ser 1985	Gln	Ala	Met	Leu	Asn 1990	Gly	Asp	Thr	Thr	Ser 1995	Gly	Leu	Tyr
Thr	Ile 2000	Tyr	Leu	Asn	Gly	Asp 2005	Lys	Ala	Gln	Ala	Leu 2010	Glu	Val	Phe
Cys	Asp 2015	Met	Thr	Ser	Asp	Gly 2020	Gly	Gly	Trp	Ile	Val 2025	Phe	Leu	Arg
Arg	Lys 2030	Asn	Gly	Arg	Glu	Asn 2035	Phe	Tyr	Gln	Asn	Trp 2040	Lys	Ala	Tyr
Ala	Ala 2045	Gly	Phe	Gly	Asp	Arg 2050	Arg	Glu	Glu	Phe	Trp 2055	Leu	Gly	Leu
Asp	Asn 2060	Leu	Asn	Lys	Ile	Thr 2065	Ala	Gln	Gly	Gln	Tyr 2070	Glu	Leu	Arg

Val Asp Leu Arg Asp His Gly Glu Thr Ala Phe Ala Val Tyr Asp
 2075 2080 2085

Lys Phe Ser Val Gly Asp Ala Lys Thr Arg Tyr Lys Leu Lys Val
 2090 2095 2100

Glu Gly Tyr Ser Gly Thr Ala Gly Asp Ser Met Ala Tyr His Asn
 2105 2110 2115

Gly Arg Ser Phe Ser Thr Phe Asp Lys Asp Thr Asp Ser Ala Ile
 2120 2125 2130

Thr Asn Cys Ala Leu Ser Tyr Lys Gly Ala Phe Trp Tyr Arg Asn
 2135 2140 2145

Cys His Arg Val Asn Leu Met Gly Arg Tyr Gly Asp Asn Asn His
 2150 2155 2160

Ser Gln Gly Val Asn Trp Phe His Trp Lys Gly His Glu His Ser
 2165 2170 2175

Ile Gln Phe Ala Glu Met Lys Leu Arg Pro Ser Asn Phe Arg Asn
 2180 2185 2190

Leu Glu Gly Arg Arg Lys Arg Ala
 2195 2200

<210> 9
 <211> 760
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

5

<400> 9

Met Lys Thr Trp Val Lys Ile Val Phe Gly Val Ala Thr Ser Ala Val
 1 5 10 15

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

Asn Ser Glu Glu Asn Thr Met Arg Ala Leu Thr Leu Lys Asp Ile Leu
 35 40 45

Asn Gly Thr Phe Ser Tyr Lys Thr Phe Phe Pro Asn Trp Ile Ser Gly
 50 55 60

Gln Glu Tyr Leu His Gln Ser Ala Asp Asn Asn Ile Val Leu Tyr Asn
 65 70 75 80

Ile Glu Thr Gly Gln Ser Tyr Thr Ile Leu Ser Asn Arg Thr Met Lys
 85 90 95

10

ES 2 505 269 T3

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

Tyr Leu Glu Ser Asp Tyr Ser Lys Leu Trp Arg Tyr Ser Tyr Thr Ala
115 120 125

Thr Tyr Tyr Ile Tyr Asp Leu Ser Asn Gly Glu Phe Val Arg Gly Asn
130 135 140

Glu Leu Pro Arg Pro Ile Gln Tyr Leu Cys Trp Ser Pro Val Gly Ser
145 150 155 160

Lys Leu Ala Tyr Val Tyr Gln Asn Asn Ile Tyr Leu Lys Gln Arg Pro
165 170 175

Gly Asp Pro Pro Phe Gln Ile Thr Phe Asn Gly Arg Glu Asn Lys Ile
180 185 190

Phe Asn Gly Ile Pro Asp Trp Val Tyr Glu Glu Glu Met Leu Ala Thr
195 200 205

Lys Tyr Ala Leu Trp Trp Ser Pro Asn Gly Lys Phe Leu Ala Tyr Ala
210 215 220

Glu Phe Asn Asp Thr Asp Ile Pro Val Ile Ala Tyr Ser Tyr Tyr Gly
225 230 235 240

Asp Glu Gln Tyr Pro Arg Thr Ile Asn Ile Pro Tyr Pro Lys Ala Gly
245 250 255

Ala Lys Asn Pro Val Val Arg Ile Phe Ile Ile Asp Thr Thr Tyr Pro
260 265 270

Ala Tyr Val Gly Pro Gln Glu Val Pro Val Pro Ala Met Ile Ala Ser
275 280 285

Ser Asp Tyr Tyr Phe Ser Trp Leu Thr Trp Val Thr Asp Glu Arg Val
290 295 300

Cys Leu Gln Trp Leu Lys Arg Val Gln Asn Val Ser Val Leu Ser Ile
305 310 315 320

Cys Asp Phe Arg Glu Asp Trp Gln Thr Trp Asp Cys Pro Lys Thr Gln
325 330 335

Glu His Ile Glu Glu Ser Arg Thr Gly Trp Ala Gly Gly Phe Phe Val
340 345 350

Ser Thr Pro Val Phe Ser Tyr Asp Ala Ile Ser Tyr Tyr Lys Ile Phe
355 360 365

Ser Asp Lys Asp Gly Tyr Lys His Ile His Tyr Ile Lys Asp Thr Val

ES 2 505 269 T3

370						375						380			
Glu 385	Asn	Ala	Ile	Gln	Ile 390	Thr	Ser	Gly	Lys	Trp 395	Glu	Ala	Ile	Asn	Ile 400
Phe	Arg	Val	Thr	Gln 405	Asp	Ser	Leu	Phe	Tyr 410	Ser	Ser	Asn	Glu	Phe 415	Glu
Glu	Tyr	Pro	Gly 420	Arg	Arg	Asn	Ile	Tyr 425	Arg	Ile	Ser	Ile	Gly 430	Ser	Tyr
Pro	Pro	Ser 435	Lys	Lys	Cys	Val	Thr 440	Cys	His	Leu	Arg	Lys 445	Glu	Arg	Cys
Gln	Tyr 450	Tyr	Thr	Ala	Ser	Phe 455	Ser	Asp	Tyr	Ala	Lys 460	Tyr	Tyr	Ala	Leu
Val 465	Cys	Tyr	Gly	Pro	Gly 470	Ile	Pro	Ile	Ser	Thr 475	Leu	His	Asp	Gly	Arg 480
Thr	Asp	Gln	Glu	Ile 485	Lys	Ile	Leu	Glu	Glu 490	Asn	Lys	Glu	Leu	Glu 495	Asn
Ala	Leu	Lys	Asn 500	Ile	Gln	Leu	Pro	Lys 505	Glu	Glu	Ile	Lys	Lys 510	Leu	Glu
Val	Asp	Glu 515	Ile	Thr	Leu	Trp	Tyr 520	Lys	Met	Ile	Leu	Pro 525	Pro	Gln	Phe
Asp	Arg 530	Ser	Lys	Lys	Tyr	Pro 535	Leu	Leu	Ile	Gln	Val 540	Tyr	Gly	Gly	Pro
Cys 545	Ser	Gln	Ser	Val	Arg 550	Ser	Val	Phe	Ala	Val 555	Asn	Trp	Ile	Ser	Tyr 560
Leu	Ala	Ser	Lys	Glu 565	Gly	Met	Val	Ile	Ala 570	Leu	Val	Asp	Gly	Arg 575	Gly
Thr	Ala	Phe	Gln 580	Gly	Asp	Lys	Leu	Leu 585	Tyr	Ala	Val	Tyr	Arg 590	Lys	Leu
Gly	Val	Tyr 595	Glu	Val	Glu	Asp	Gln 600	Ile	Thr	Ala	Val	Arg 605	Lys	Phe	Ile
Glu 610	Met	Gly	Phe	Ile	Asp	Glu 615	Lys	Arg	Ile	Ala	Ile 620	Trp	Gly	Trp	Ser
Tyr 625	Gly	Gly	Tyr	Val	Ser 630	Ser	Leu	Ala	Leu	Ala 635	Ser	Gly	Thr	Gly	Leu 640
Phe	Lys	Cys	Gly	Ile 645	Ala	Val	Ala	Pro	Val 650	Ser	Ser	Trp	Glu	Tyr 655	Tyr

ES 2 505 269 T3

Ala Ser Val Tyr Thr Glu Arg Phe Met Gly Leu Pro Thr Lys Asp Asp
660 665 670

Asn Leu Glu His Tyr Lys Asn Ser Thr Val Met Ala Arg Ala Glu Tyr
675 680 685

Phe Arg Asn Val Asp Tyr Leu Leu Ile His Gly Thr Ala Asp Asp Asn
690 695 700

Val His Phe Gln Asn Ser Ala Gln Ile Ala Lys Ala Leu Val Asn Ala
705 710 715 720

Gln Val Asp Phe Gln Ala Met Trp Tyr Ser Asp Gln Asn His Gly Leu
725 730 735

Ser Gly Leu Ser Thr Asn His Leu Tyr Thr His Met Thr His Phe Leu
740 745 750

Lys Gln Cys Phe Ser Leu Ser Asp
755 760

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un anticuerpo biespecífico que comprende un primer sitio de unión al antígeno específico para DR5 y un segundo sitio de unión al antígeno específico para FAP.
2. El anticuerpo biespecífico de la reivindicación 1, donde el anticuerpo biespecífico es una molécula dimérica que comprende un primer anticuerpo que comprende el primer sitio de unión al antígeno específico para DR5 y un segundo anticuerpo que comprende el segundo sitio de unión al antígeno específico para FAP.
- 10 3. El anticuerpos biespecífico de la reivindicación 2, en donde el primer y segundo anticuerpos comprenden una parte Fc de cadena pesada de anticuerpo, donde la parte Fc del primer anticuerpo comprende un primer módulo de dimerización y la parte Fc del segundo anticuerpo comprende un segundo módulo de dimerización permitiendo una heterodimerización de los dos anticuerpos.
- 15 4. El anticuerpo biespecífico de la reivindicación 3, en donde el primer módulo de dimerización comprende protuberancias y el segundo módulo de dimerización comprende huecos de acuerdo con una estrategia botón en ojal.
- 20 5 El anticuerpo biespecífico de la reivindicación 2, en donde el primer anticuerpo es una molécula de inmunoglobulina (Ig) que comprende una cadena ligera y una cadena pesada y el segundo anticuerpo se selecciona de entre el grupo que consiste en scFv, scFab, Fab o Fv.
- 25 6. El anticuerpo biespecífico de la reivindicación 5 en donde el segundo anticuerpo se fusiona en el extremo N o C de la cadena pesada de la molécula de Ig.
7. El anticuerpo biespecífico de la reivindicación 5, en donde el segundo anticuerpo se fusiona en el extremo N o C de la cadena ligera de la molécula de Ig.
- 30 8. El anticuerpo biespecífico de cualquiera de las reivindicaciones 5-7, en donde la molécula de Ig es una IgG.
9. El anticuerpo biespecífico de cualquiera de las reivindicaciones 5-8, en donde la segunda molécula se fusiona a la molécula de Ig por un péptido enlazador, preferentemente un péptido enlazador de aproximadamente 10 – 30 aminoácidos.
- 35 10. El anticuerpo biespecífico de cualquiera de las reivindicaciones 5-9, en donde la segunda moléculas comprende restos de cisteína adicionales para formar enlaces disulfuro.
- 40 11. El anticuerpo biespecífico de cualquiera de las reivindicaciones 5-10, en donde la molécula de Ig comprende una variante de Fc que tiene una afinidad reducida para los receptores Fc γ en comparación con la región Fc de tipo silvestre.
12. Una composición farmacéutica que comprende un anticuerpo biespecífico de las reivindicaciones 1 a 11.
- 45 13. El anticuerpo biespecífico de las reivindicaciones 1 a 11 para su uso en el tratamiento del cáncer.

Fig. 1

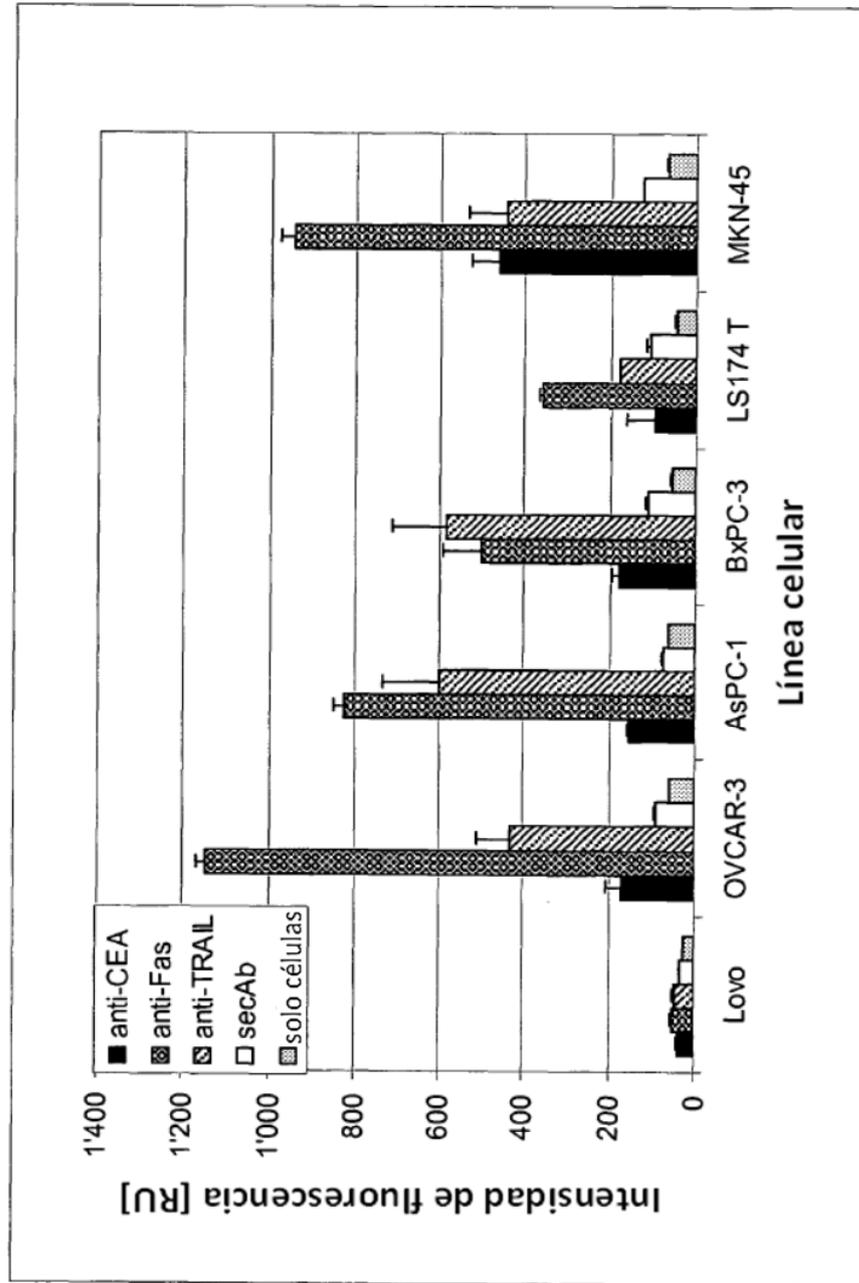


Fig. 2

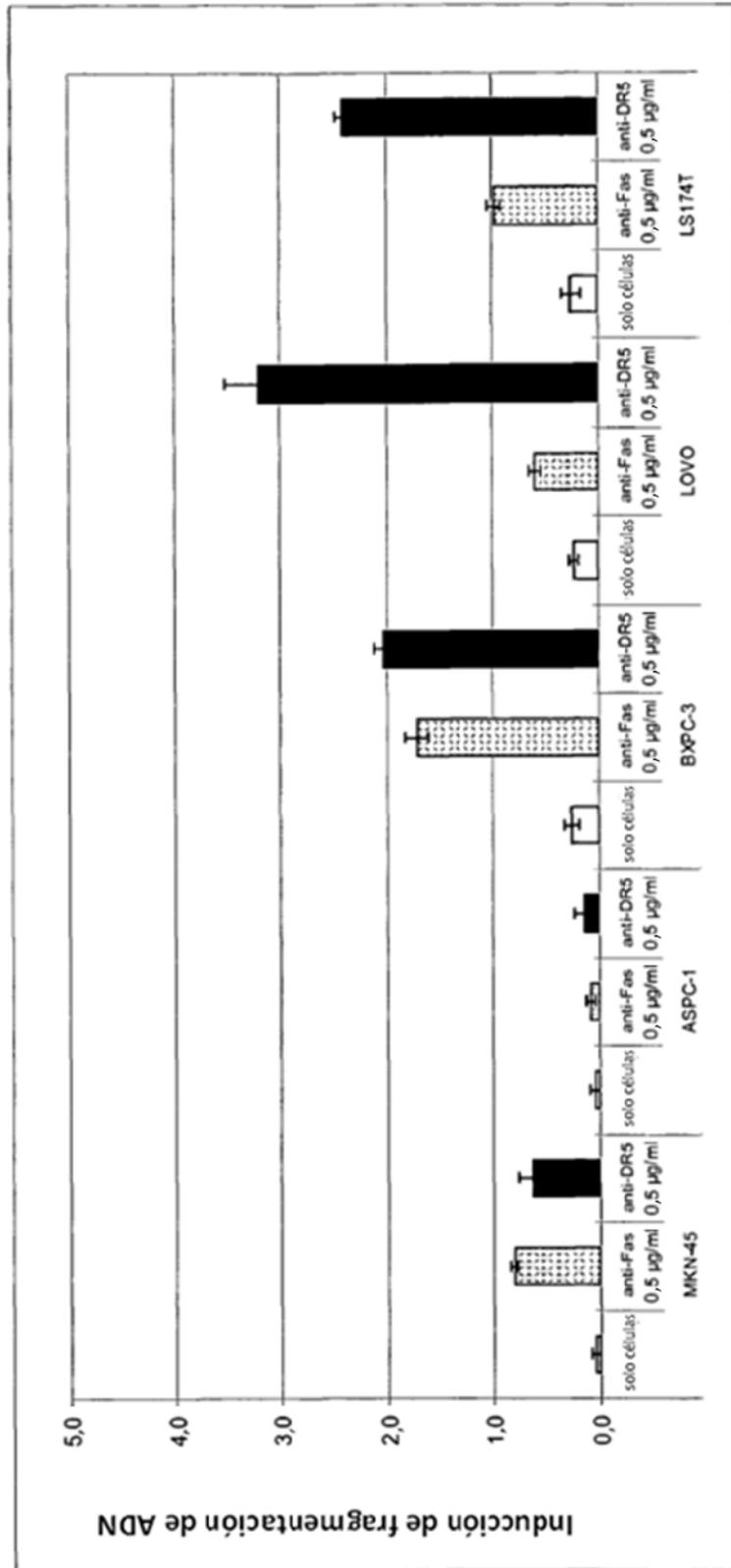


Fig. 3

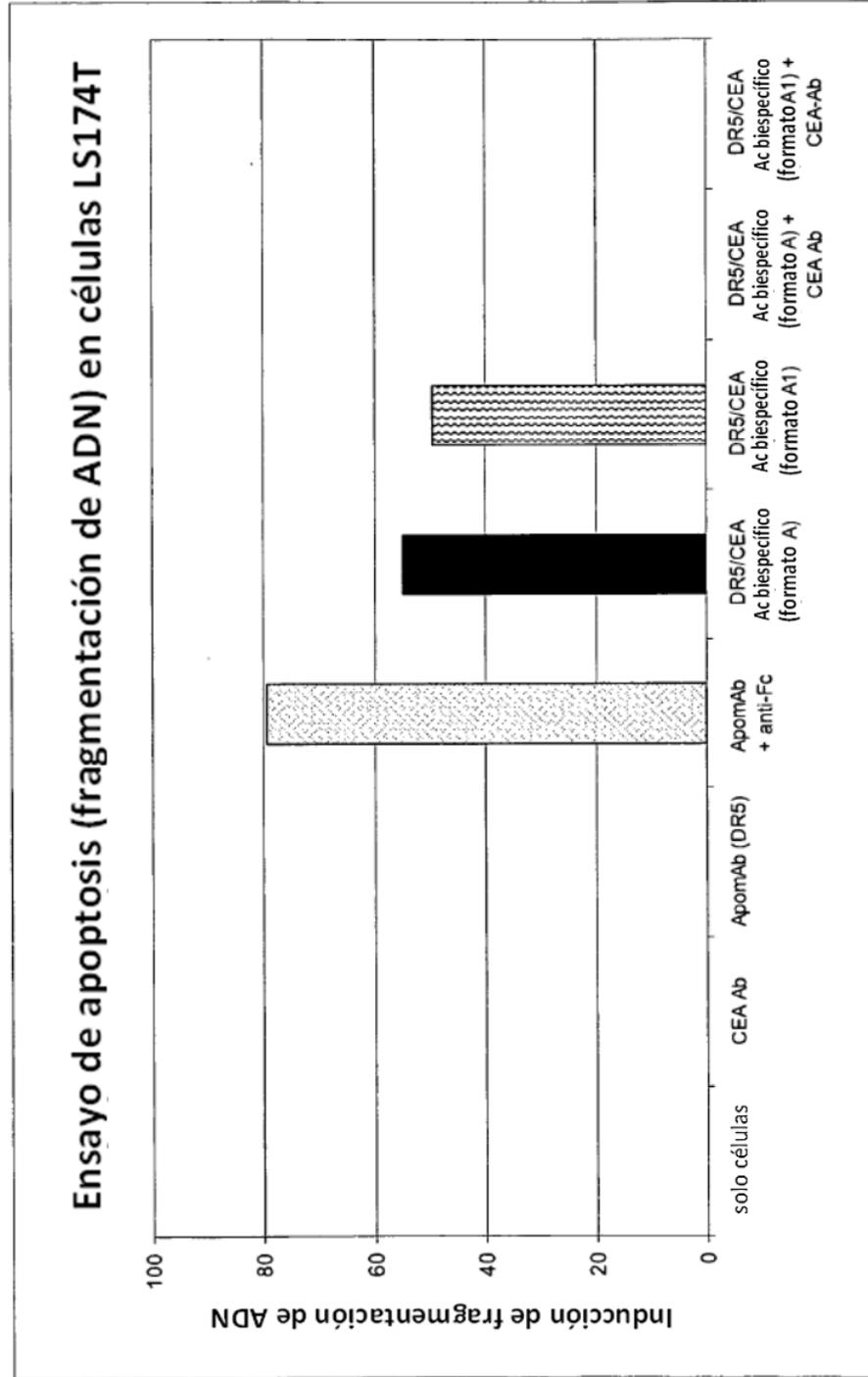
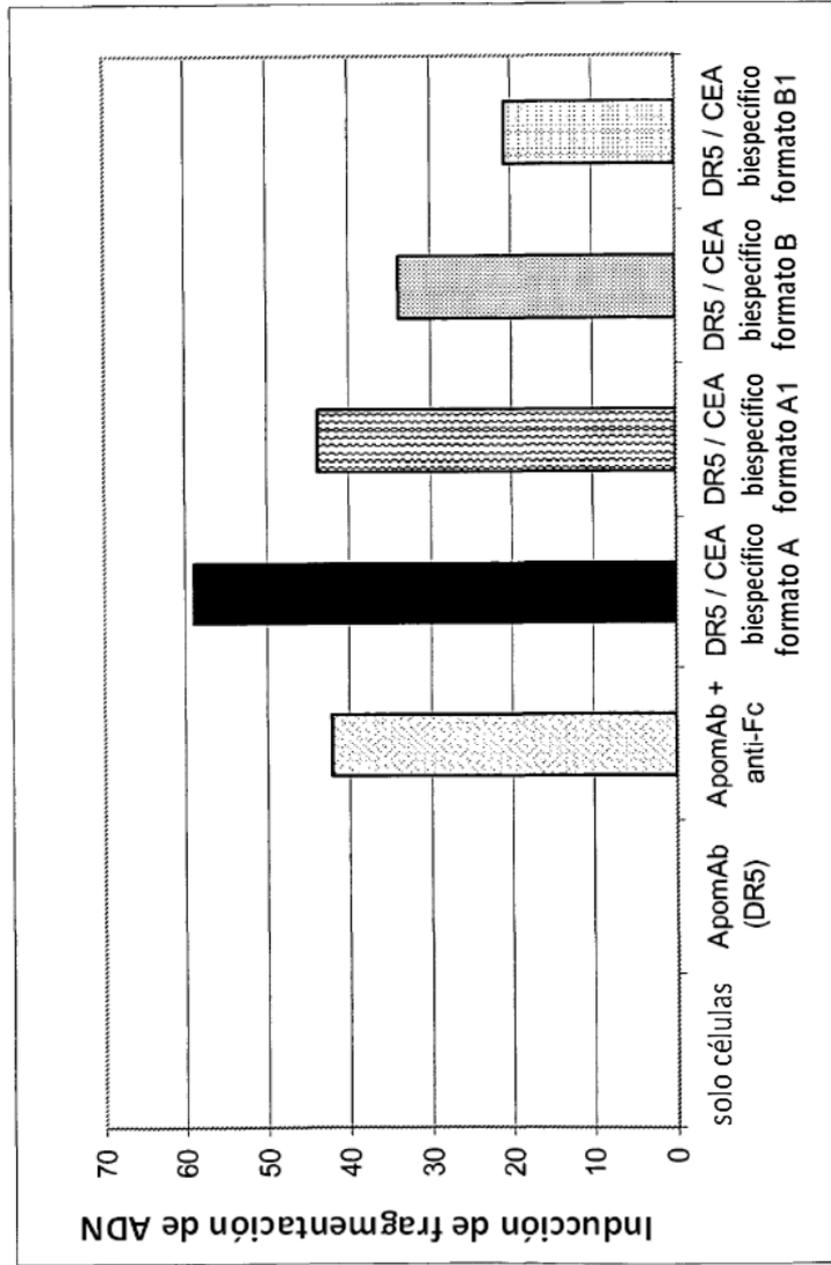


Fig. 4



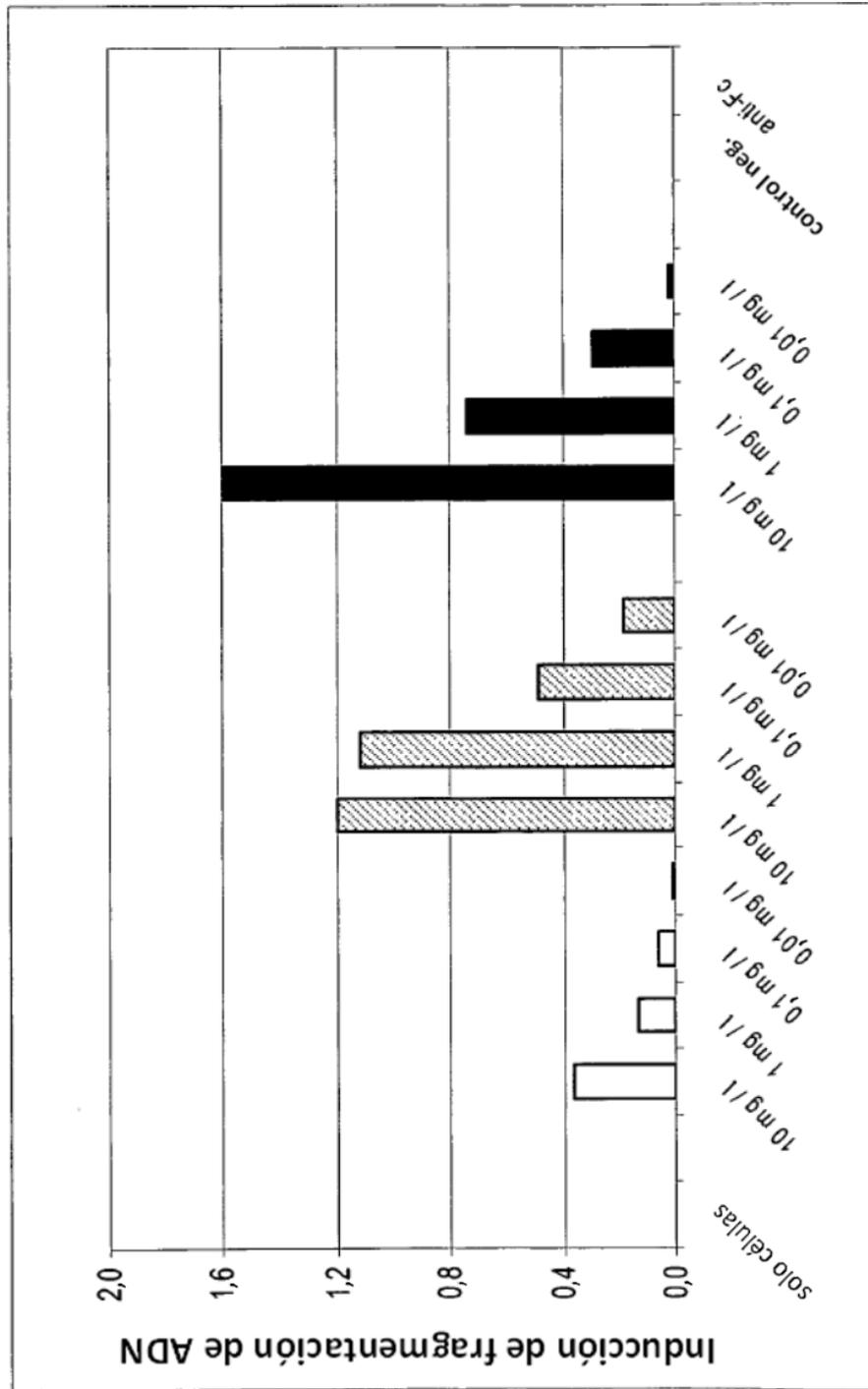


Fig. 5

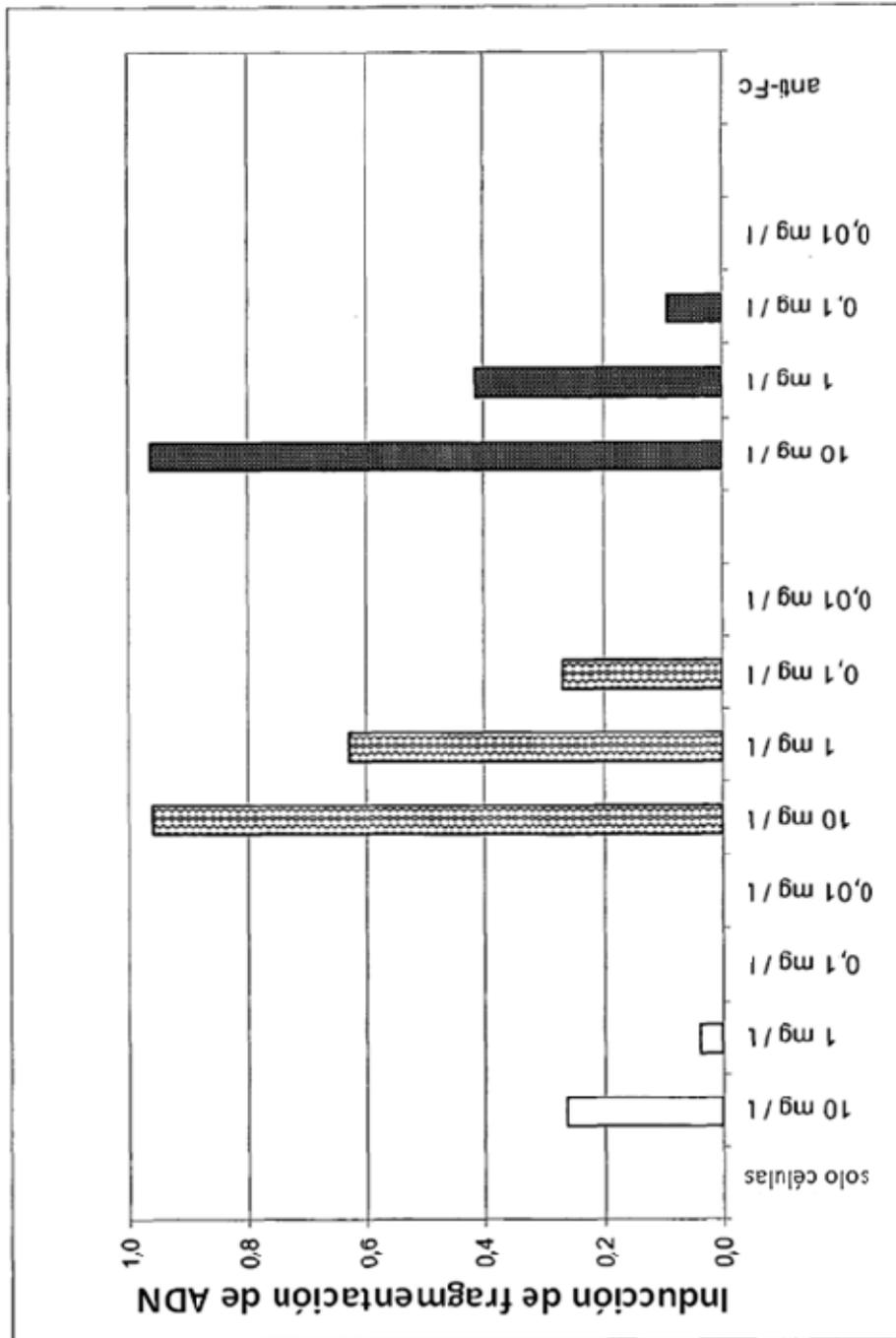


Fig. 6

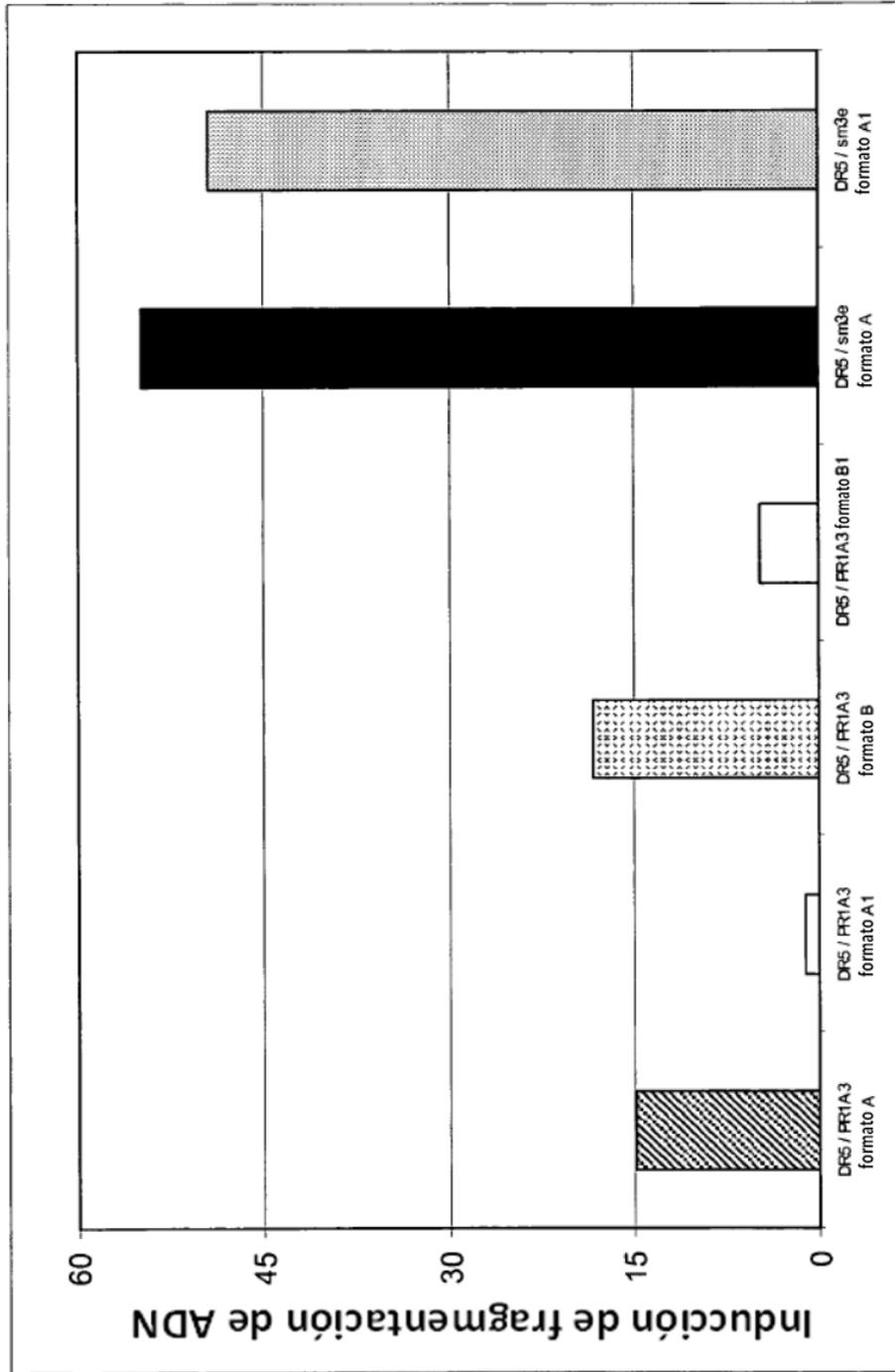


Fig. 7

Fig. 8

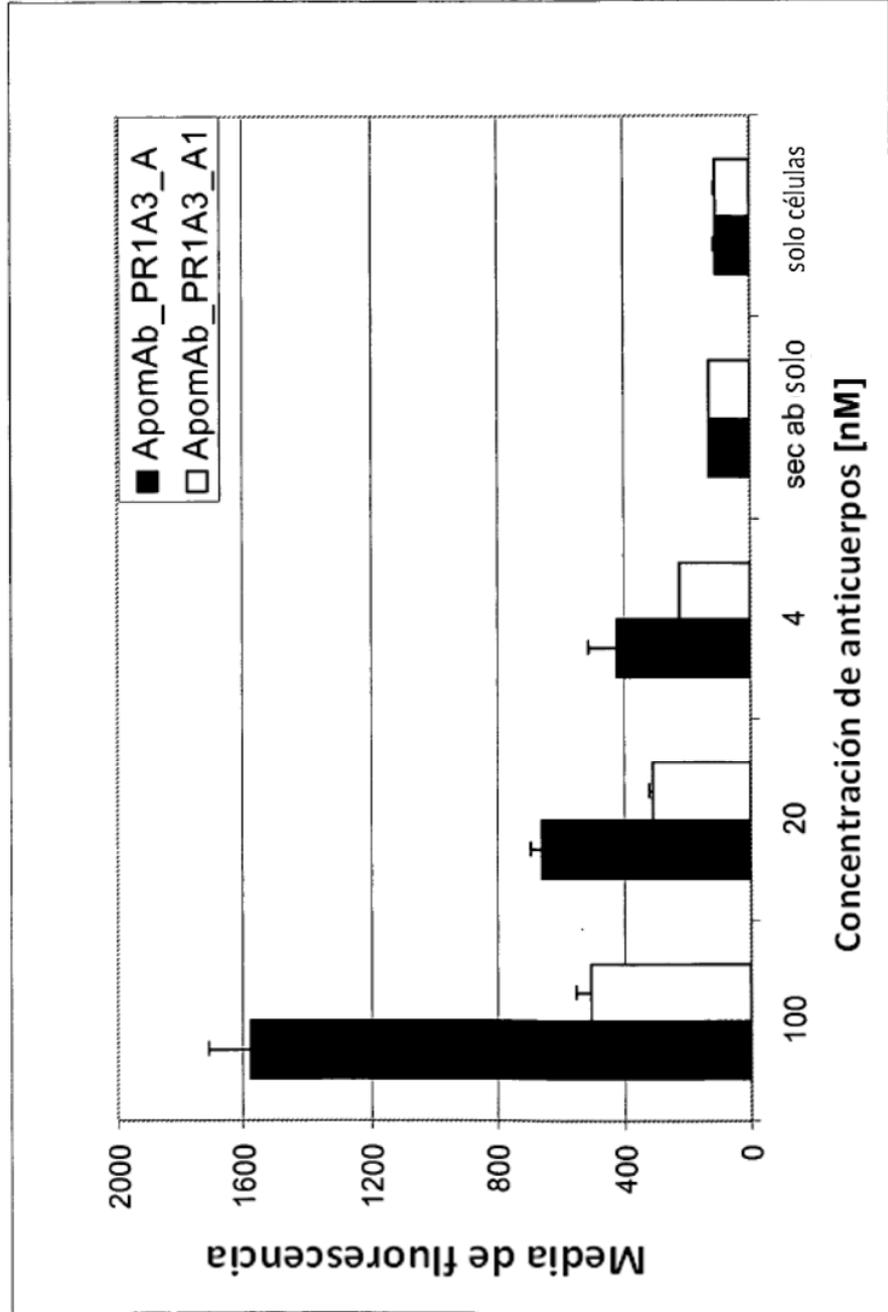


Fig. 9

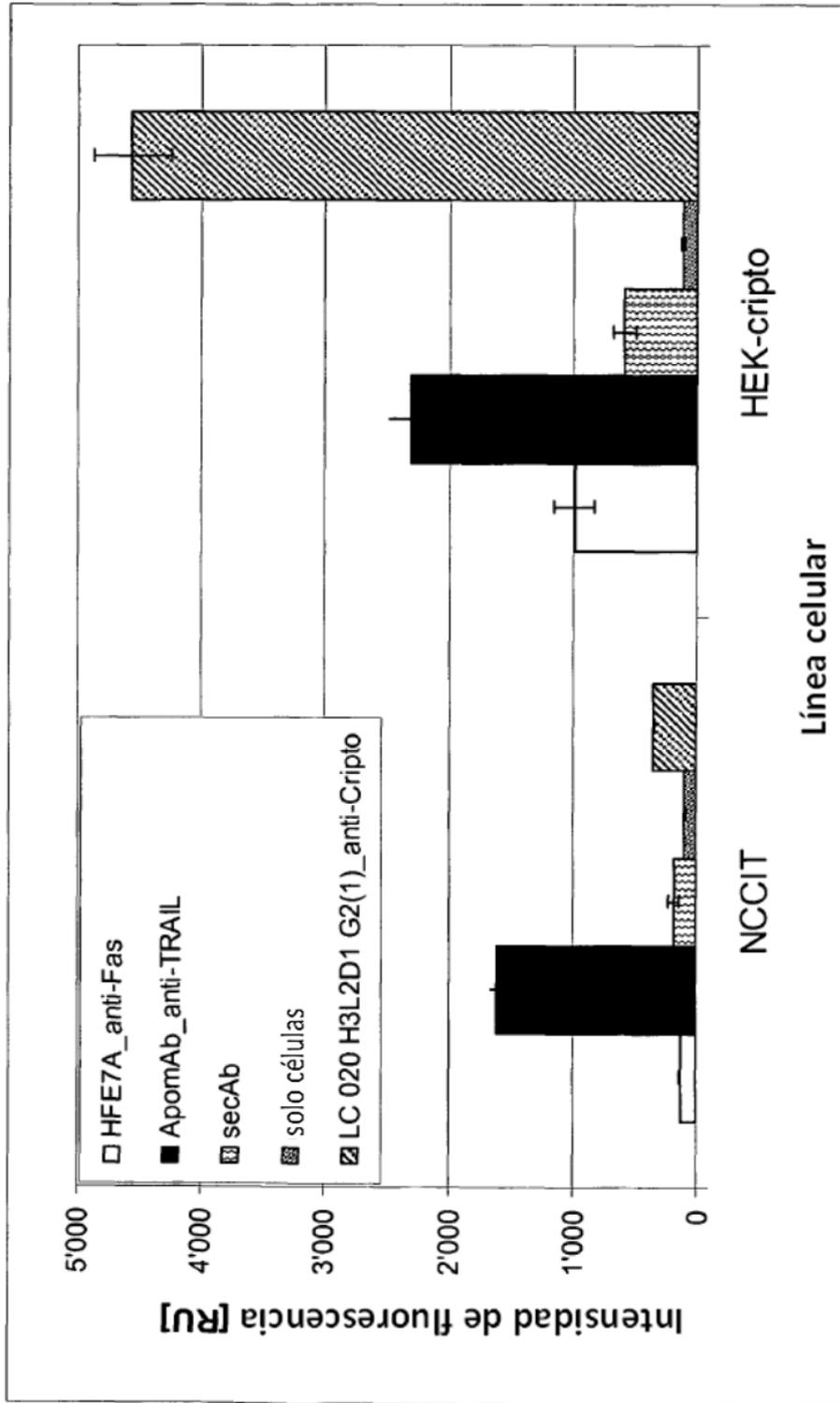


Fig. 10

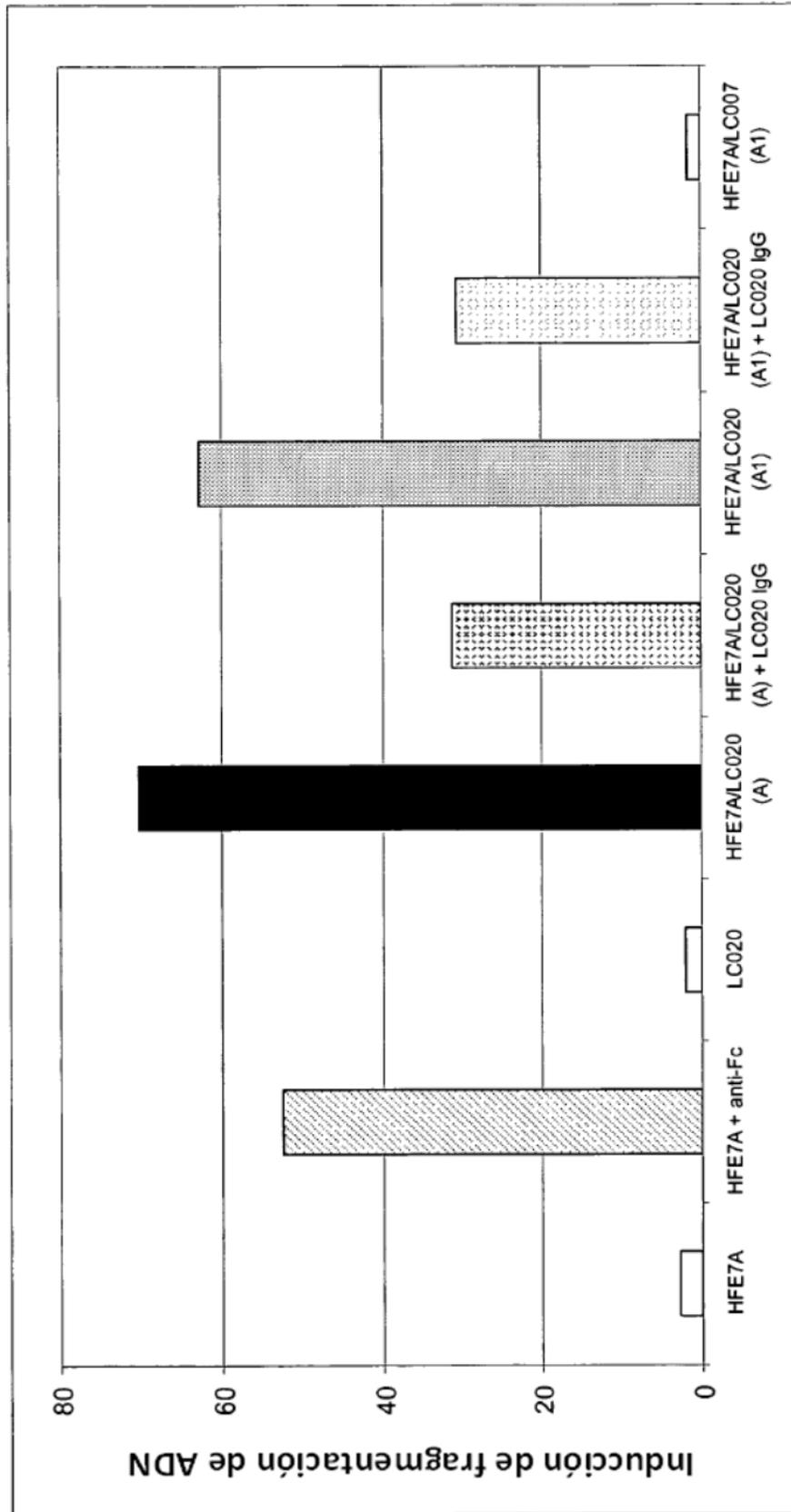


Fig. 11

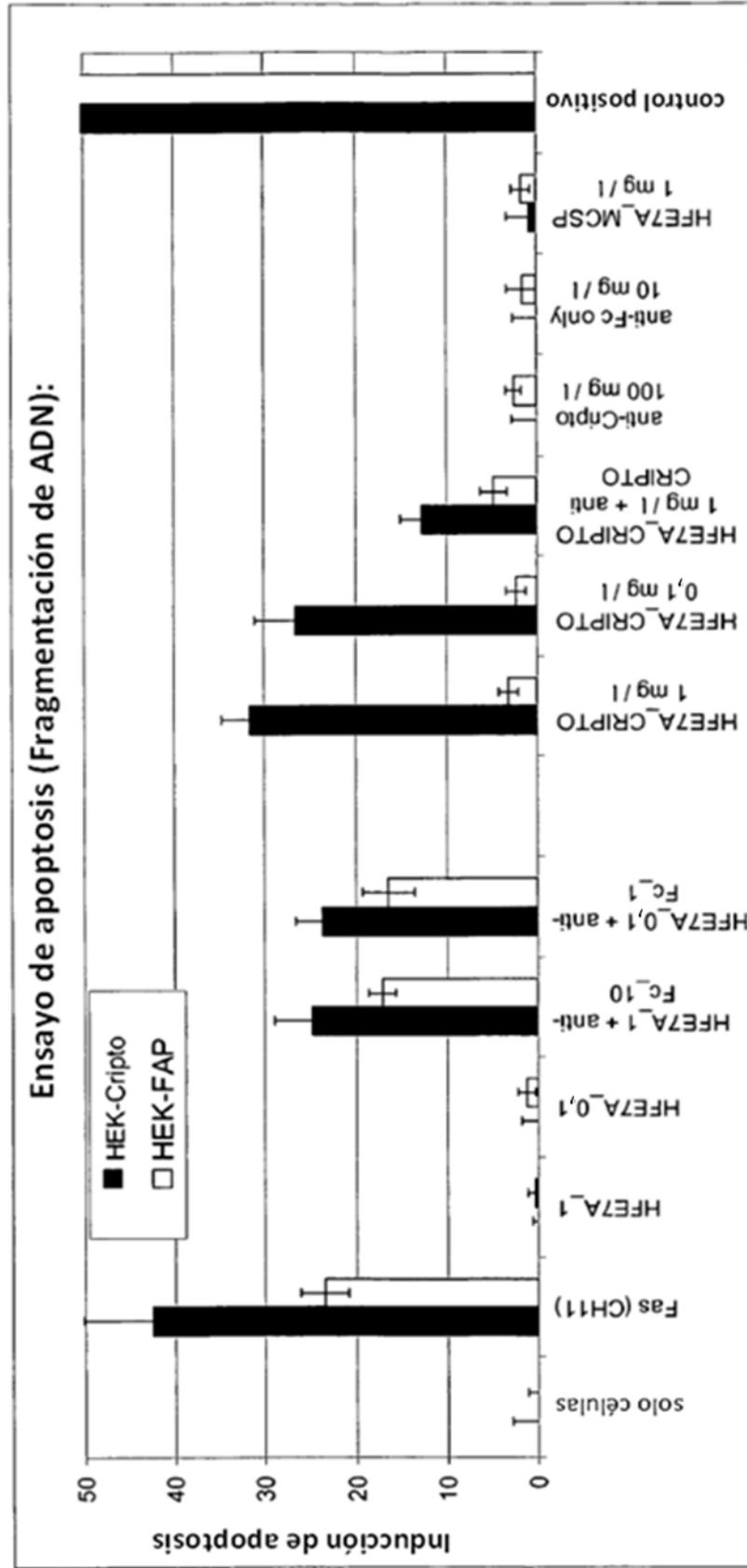


Fig. 12

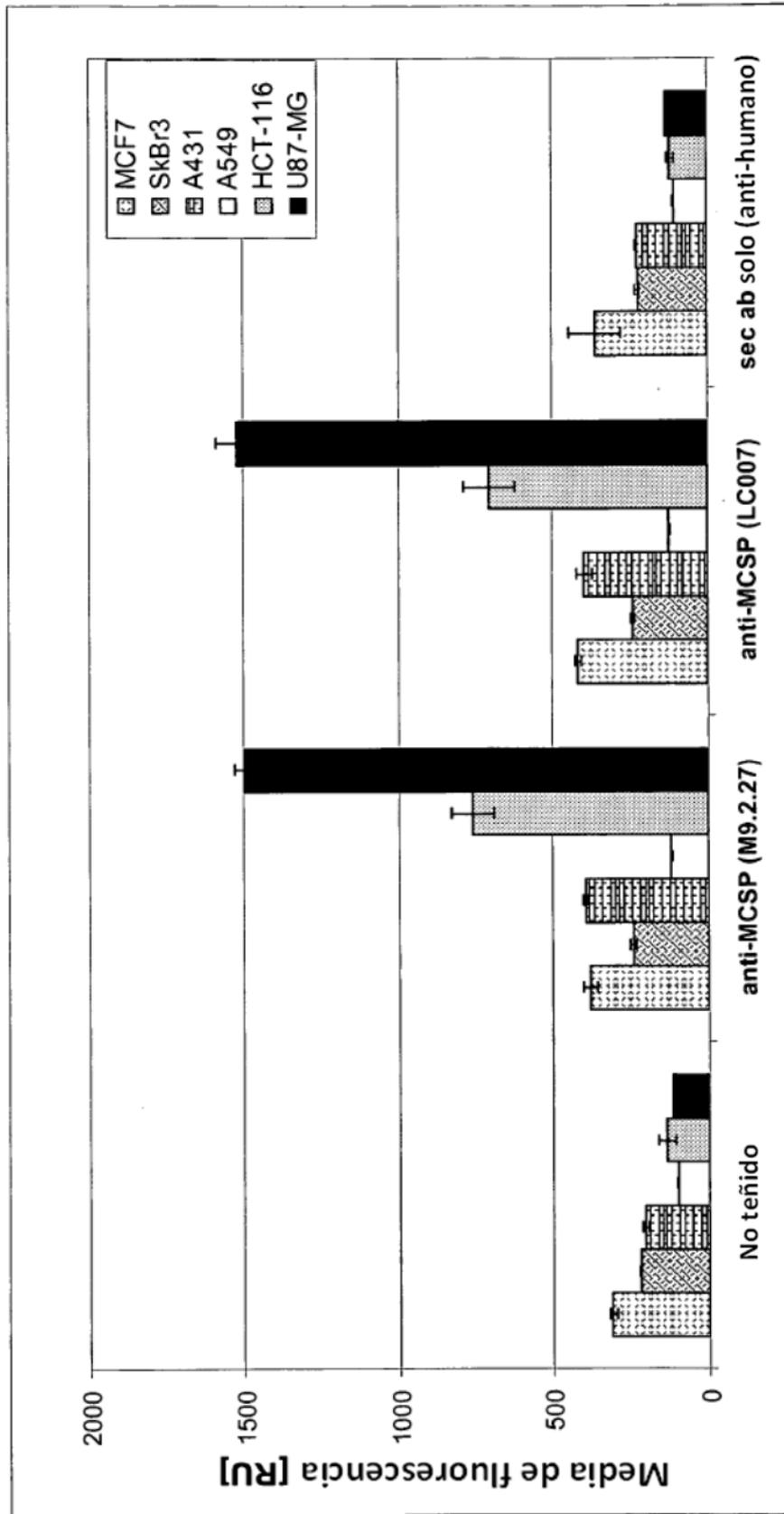


Fig. 13 A

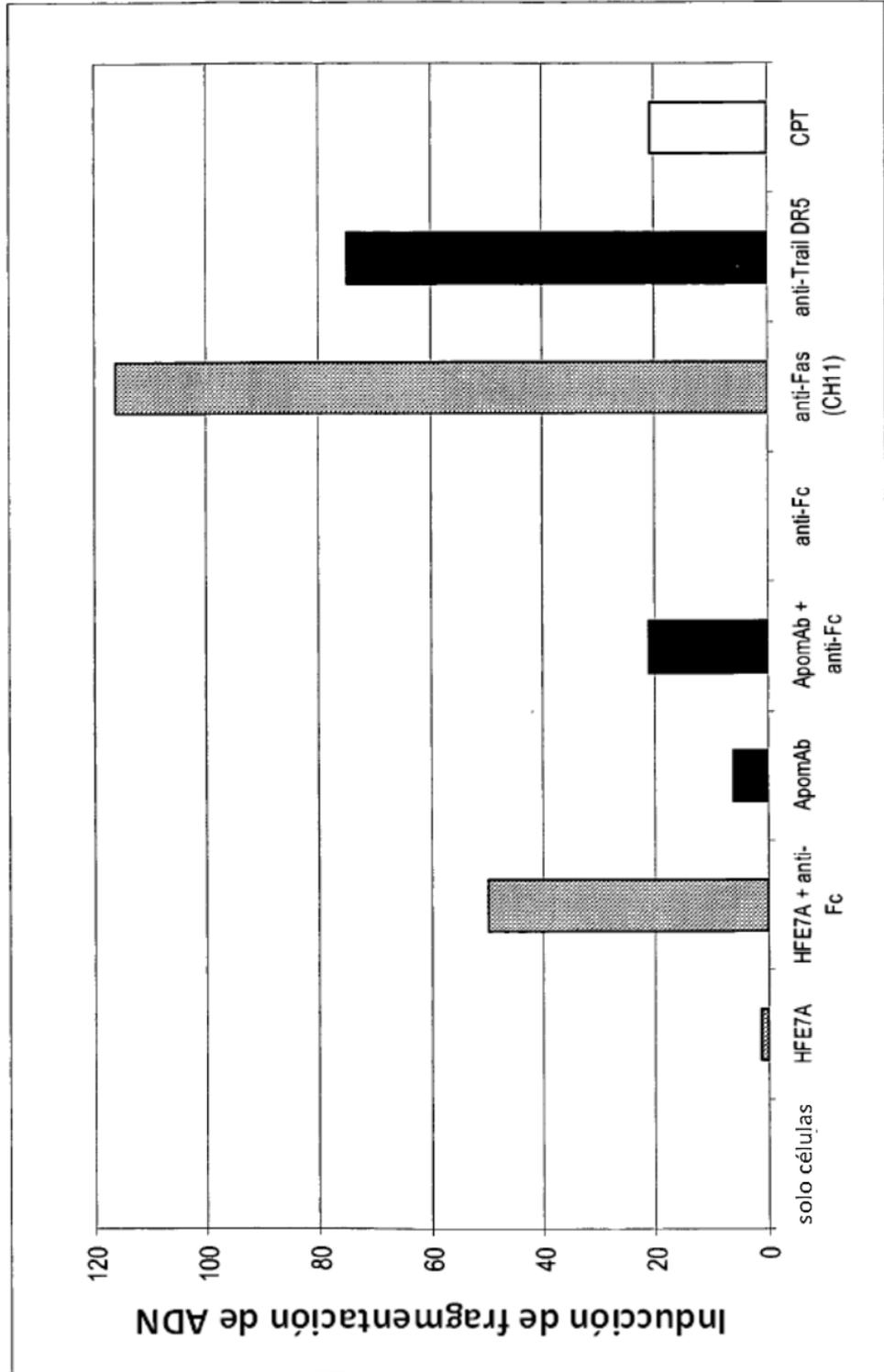


Fig. 13 B

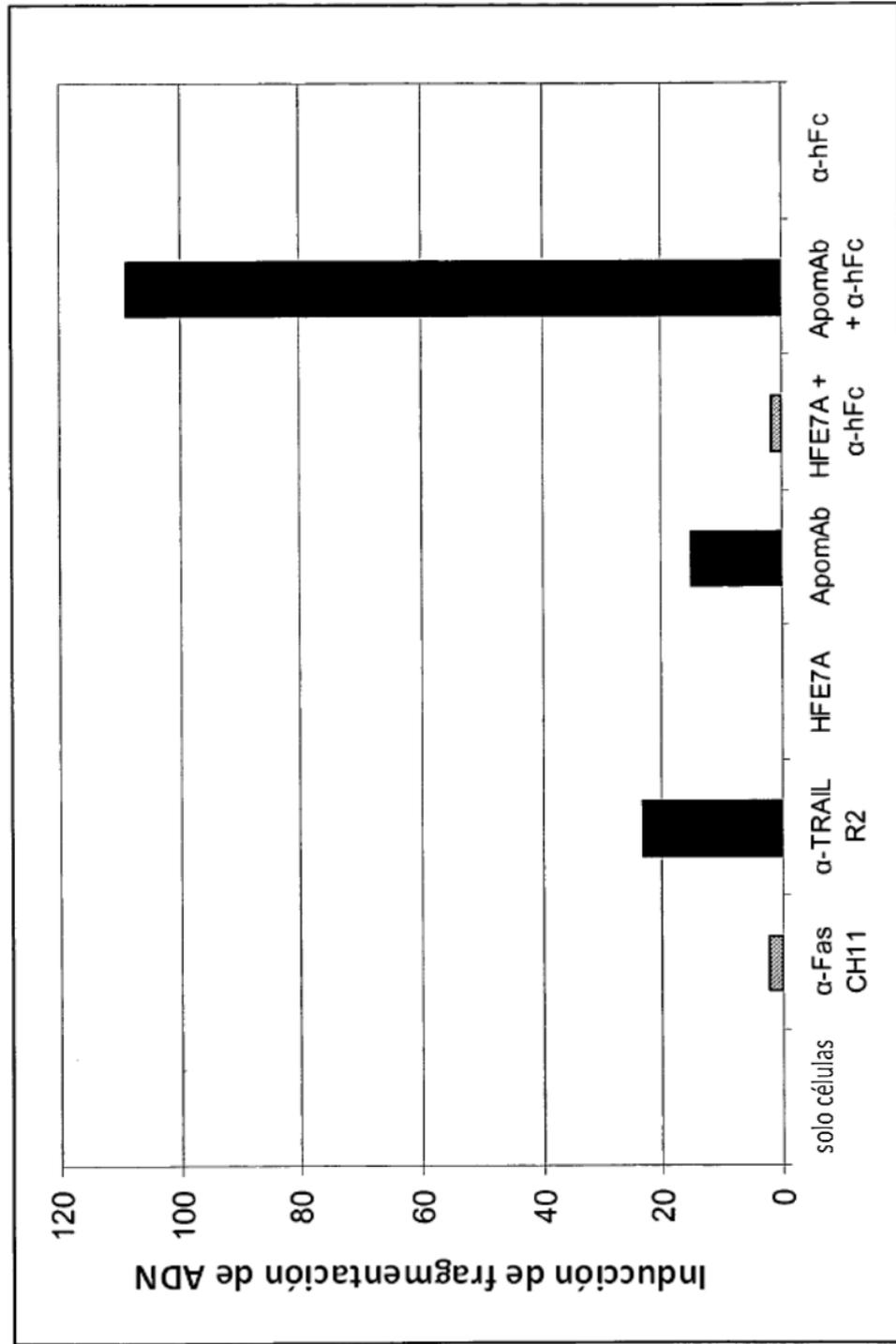


Fig. 14

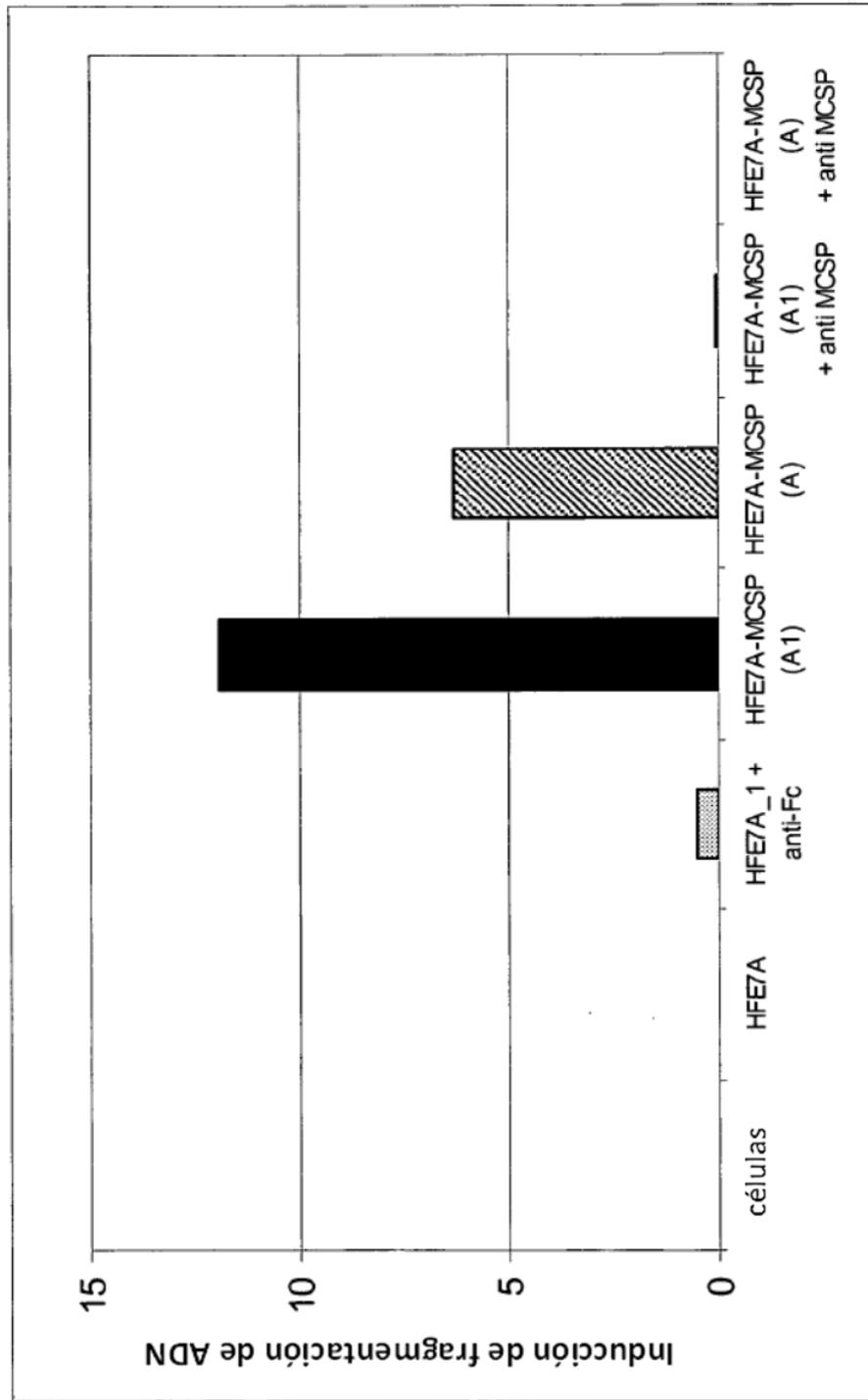


Fig. 15 A

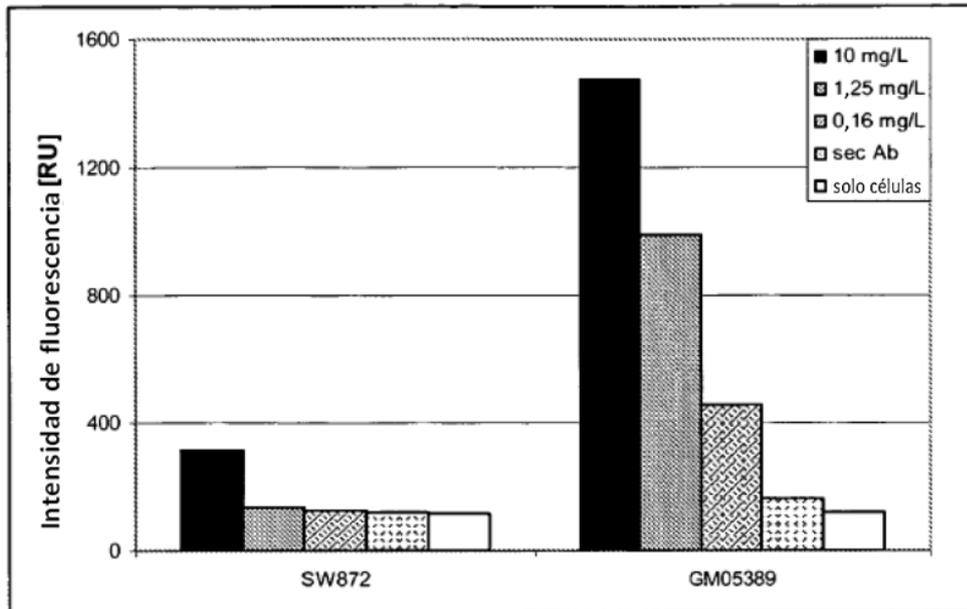


Fig. 15 B

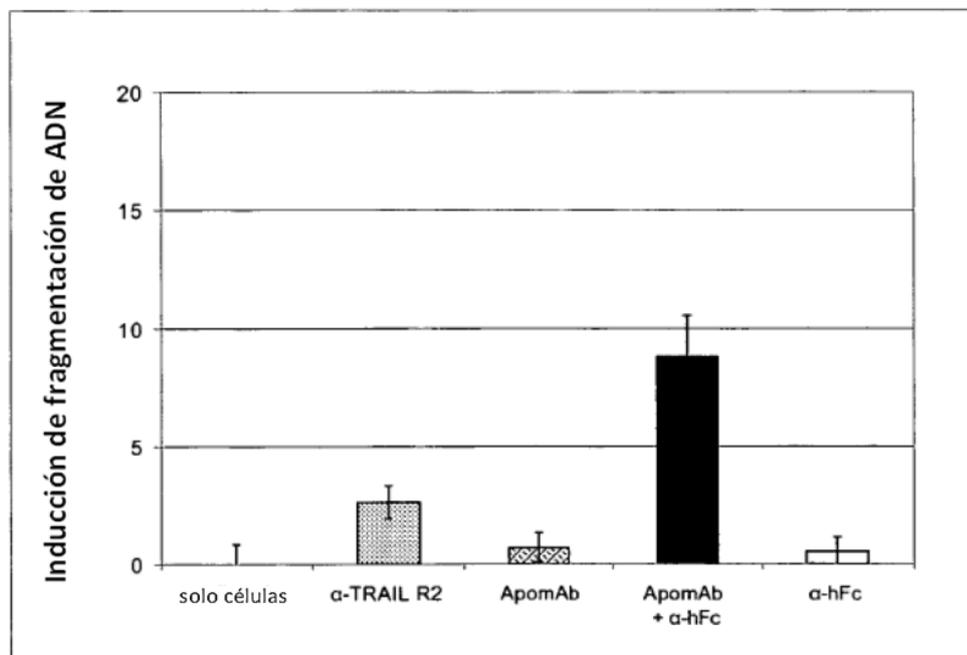
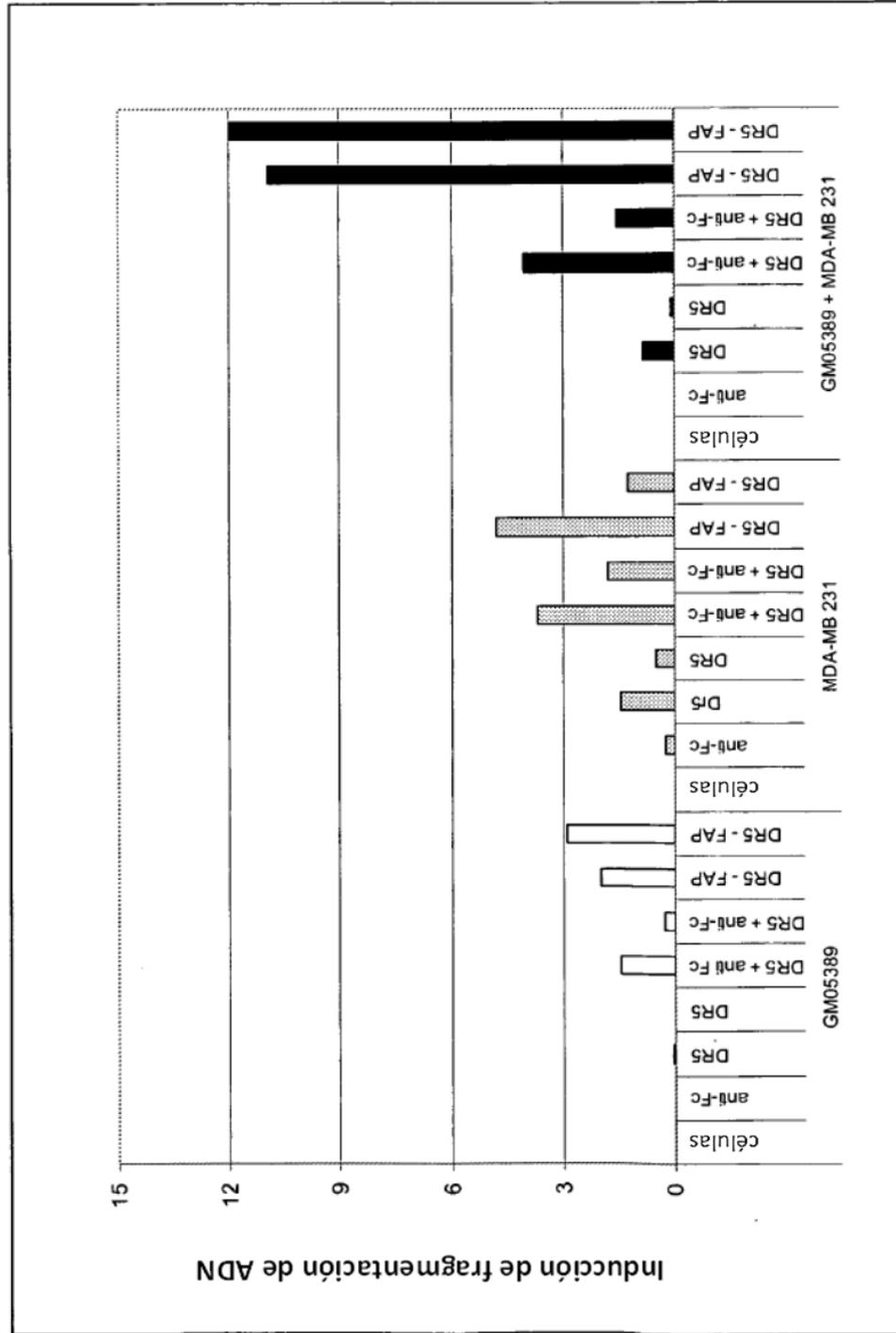


Fig. 16



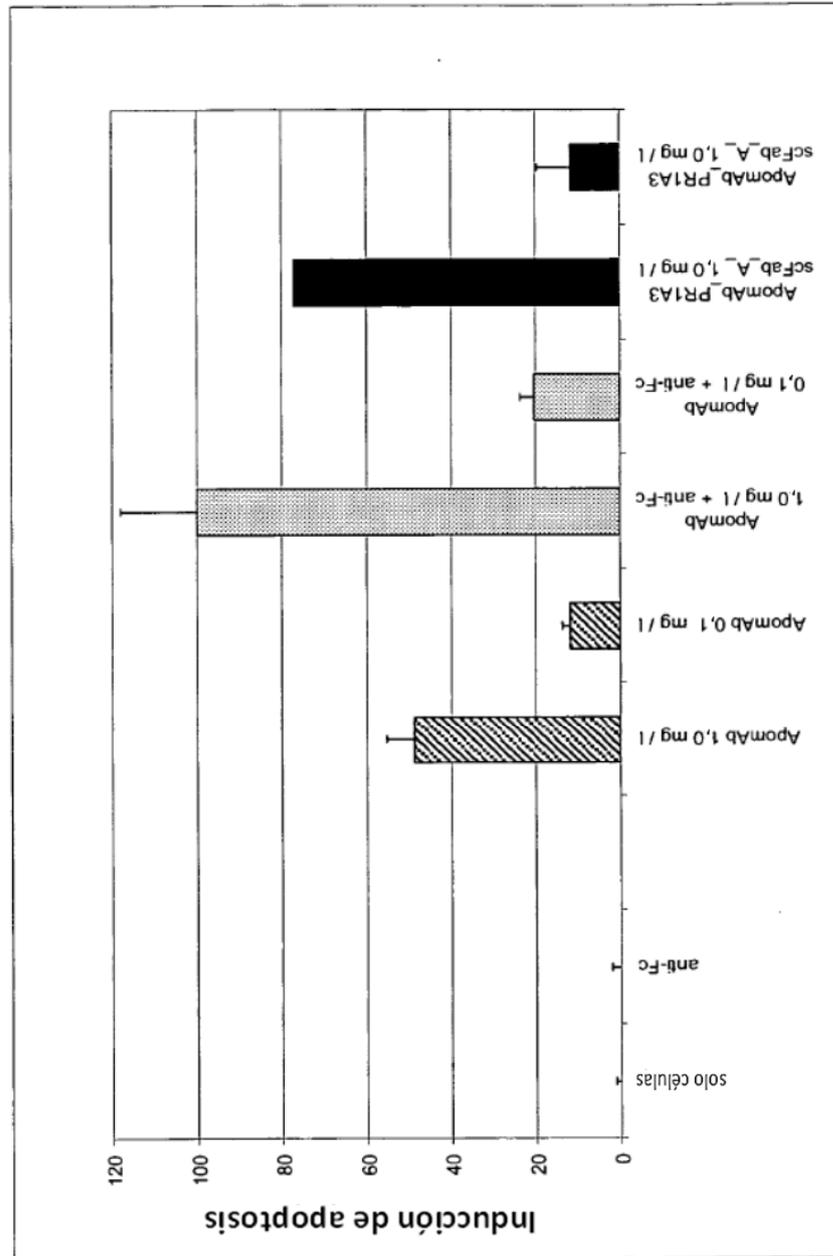


Fig. 17

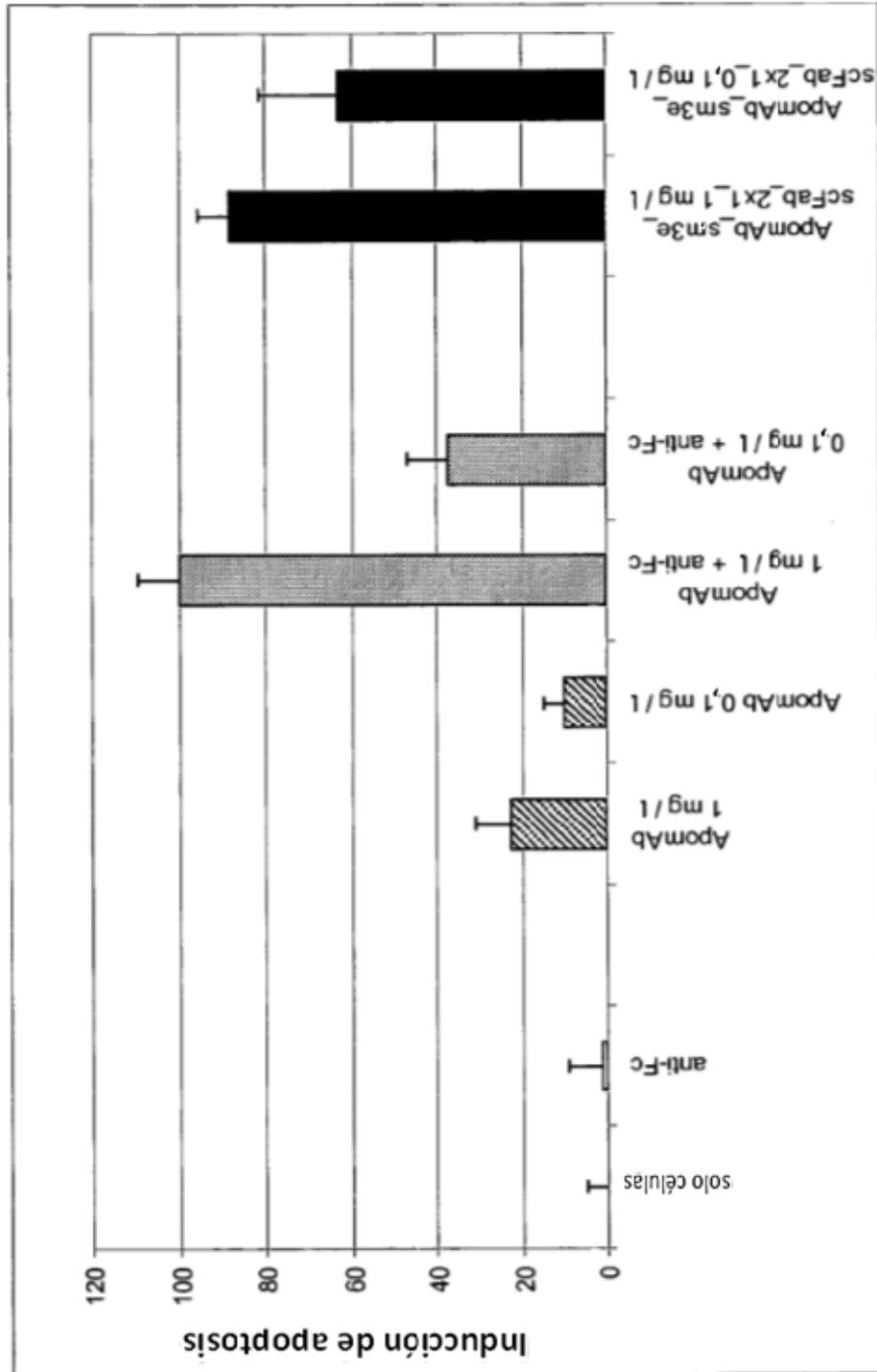


Fig. 18

Fig. 19

