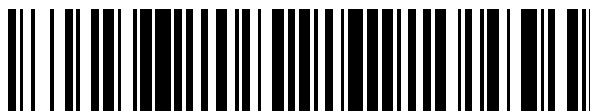


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 547 248**

51 Int. Cl.:

C07K 16/28 (2006.01)

A61K 39/00 (2006.01)

A61P 39/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **27.04.2007** **E 07720099 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **17.06.2015** **EP 2013236**

54 Título: **Anticuerpos que se unen al dominio extracelular del receptor Tirosina cinasa ALK**

30 Prioridad:

28.04.2006 US 795831 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
02.10.2015

73 Titular/es:

DELENEX THERAPEUTICS AG (100.0%)
Wagistrasse 27
8952 Schlieren, CH

72 Inventor/es:

AUF DER MAUR, ADRIAN;
LICHTLEN, PETER y
BARBERIS, ALCIDE

74 Agente/Representante:

DEL VALLE VALIENTE, Sonia

ES 2 547 248 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 que se unen al dominio extracelular del receptor Tirosina cinasa ALK

Campo de la técnica

En la presente memoria se divulga un anticuerpo específico para ALK humana (cinasa de linfoma anaplásico), en particular un scFv, una secuencia de ácido nucleico que lo codifica, su producción y su uso como sustancia farmacéutica o para fines diagnósticos. Dicho anticuerpo es adecuado para el tratamiento local de tumores o cáncer, en particular glioblastoma.

Técnica anterior

ALK (cinasa de linfoma anaplásico; CD246) es un miembro de la familia de receptores tirosina cinasa (RTK). Como miembro típico de esta familia, es una proteína transmembrana de tipo I que esencialmente consiste en tres dominios: el dominio extracelular de unión a ligando (aa 19-1038), que contiene un dominio de clase A del receptor de LDL y dos dominios MAM (MAM: meprina, antígeno A5, proteína tirosina fosfatasa μ), un dominio transmembrana (aa 1039-1059) y un dominio citoplásmico (aa 1060-1620), que contiene el dominio tirosina cinasa. En el extremo N terminal de la proteína naciente (aa 1-18) está presente un péptido de señal que se escinde tras la secreción.

En 1997, dos grupos independientes (Iwahara 1997; Morris 1997) clonaron ALK de longitud completa humana y de ratón. ALK es muy similar a la RTK denominada tirosina cinasa de leucocitos (LTK) y pertenece a la superfamilia de receptores de insulina. ALK exhibe un 57% de identidad de aa y un 71% de similitud de aa con LTK en sus regiones de solapamiento (Morris 2001). ALK está altamente N-glicosilada y contiene 21 sitios posibles de N-glicosilación. Los aminoácidos 687 a 1034 tienen una similitud significativa (identidad de aa del 50%) con LTK. No obstante, la secuencia de 686 aa proximal al extremo N terminal no muestra homología con ninguna proteína conocida, con la excepción de una secuencia muy corta que también se encuentra en el receptor de LDL (Duyster 2001/SWISSPROT). Además, contiene dos dominios MAM en los aa264-427 y los aa478-636 (meprina, antígeno A5, proteína tirosina fosfatasa μ). Se piensa que estos dominios tienen una función de adherencia, ya que están extendidos entre diversas proteínas de adherencia implicadas en la interacción entre células (De Juan 2002). Además, existe un sitio de unión para los posibles ligandos de ALK correspondiente a los aminoácidos 396-406 (Stoica 2001; véase más adelante). La secuencia de aminoácidos del dominio cinasa de ALK murina muestra una identidad de aa del 98% con ALK humana, una identidad del 78% con LTK de ratón, del 52% con ros de ratón, del 47% con el receptor del factor de crecimiento insulínico humano y del 46% con el receptor de insulina humano (Iwahara 1997; Ladanyi 2000). Hasta la fecha no se han descrito variantes de corte y empalme de ALK. No obstante, ALK se asocia a menudo con translocaciones cromosómicas (véase más adelante).

El gen de ALK abarca aproximadamente 315 kb y tiene 26 exones. Gran parte del gen consiste en dos intrones grandes que abarcan aproximadamente 170 kb. El transcrito de ALK tiene una longitud de 6,5 kb (Kutok 2002). De acuerdo con Morris, el ADNc abarca 6.226 pb (Morris 2001).

La expresión de ALK en ratones comienza durante la embriogénesis aproximadamente en la etapa de desarrollo E11 y persiste en los periodos de desarrollo neonatales, en los que se expresa en el sistema nervioso. En adultos, su expresión fisiológica está restringida a determinadas regiones neuronales (células neurales y gliales y, probablemente, células endoteliales) del SNC a niveles bajos (Morris 1997; Duyster 2001; Stoica 2001). En realidad, la abundancia de ALK disminuye en el periodo posnatal (Morris 2001). Basándose en su patrón de expresión, se sugiere un papel para el receptor en el desarrollo del cerebro (Duyster 2001). La expresión restringida neural de ALK sugiere que sirve como receptor de factores neurotróficos (véase más adelante). De manera coherente con esto, su patrón de expresión se solapa con los genes que codifican la familia de TRK de receptores de neurotrofina (Morris 2001). No obstante, los ratones knockout para ALK no muestran ningún fenotipo obvio (datos no publicados), lo que podría deberse a alguna redundancia funcional con los miembros de la familia de TRK u otros receptores de neurotrofina. Notablemente, los tejidos hematopoyéticos no muestran expresión detectable de ALK (véase más adelante) (Morris, 2001).

Recientemente se han descrito dos ligandos potenciales para ALK, "pleiotrofina" (PTN) y "midkina" (MK) (Stoica 2001; Duyster 2001; Stoica 2002). La interacción PTN-ALK se identificó usando la proteína pleiotrofina humana purificada para seleccionar una biblioteca de péptidos de presentación en fagos. Mediante este método se identificó una secuencia de ALK presente en su dominio extracelular (aa 396-406). De manera importante, esta secuencia no se comparte con LTK, la RT más estrechamente relacionada con ALK. Esta región de unión a ligando también está conservada en el homólogo de ALK potencial en *Drosophila* (Loren 2001). ALK se fosforila rápidamente tras la unión a PTN (Bowden 2002). Además, se ha demostrado que ALK está estimulada por pleiotrofina en cultivos celulares. Esto hace que la interacción pleiotrofina/ALK sea particularmente interesante a la luz de las implicaciones patológicas que tiene la pleiotrofina (Stoica 2001). Las líneas celulares que carecen de expresión de ALK tampoco muestran una respuesta de crecimiento a la pleiotrofina y vice versa (Stoica, 2001). In vivo, se han demostrado niveles elevados de pleiotrofina en el suero de pacientes que padecen diversos tumores sólidos y en estudios animales se ha sugerido una contribución de la pleiotrofina al crecimiento tumoral (Stoica, 2001). El papel del PTN

como factor angiogénico limitante de la velocidad en el crecimiento tumoral está bien establecido en modelos animales (Choudhuri 1997). En 1996, Czubyko et al. (Czubyko 1996) demostraron la importancia de PTN en la angiogénesis tumoral, en la prevención de la apoptosis y en la metástasis modulando los niveles de PTN con un abordaje dirigido a las ribozimas. La determinación de los niveles en suero de PTN en ratones demostró una clara correlación con el tamaño del tumor. PTN desempeña un papel importante en algunos de los tipos de cáncer humano más agresivos, tales como el melanoma y el cáncer de páncreas, lo que aporta perspectivas interesantes para posibles aplicaciones futuras de un inhibidor de ALK (Weber 2000; Stoica 2001). En pacientes humanos, se han encontrado niveles de pleiotrofina en suero elevados en pacientes con cáncer de páncreas (n = 41; P<0,0001) y cáncer de colon (n = 65; P = 0,0079). En individuos sanos, la PTN se expresa de un modo estrechamente regulado durante el desarrollo perinatal de órganos y en poblaciones selectivas de neuronas y de glía en el adulto.

La coexpresión de PTN y ALK, tal como se encuentra en varias líneas celulares de cáncer, indica que podrían formar un bucle autocrino de estimulación del crecimiento (Stoica, 2001). A pesar de todos estos datos, la bibliografía indica que todavía no está claro si los efectos de PTN están mediados por ALK sola y/o por otros receptores de PTN no identificados (Duyster 2001). Se han sugerido al menos otros dos posibles receptores de PTN: la tirosina fosfatasa receptora RPTPβ y el heparán sulfato proteoglicano N-sindecán. No obstante, RPTPβ podría actuar como modulador de la señalización de PTN/ALK y N-sindecán como chaperona para el ligando (Bowden 2002).

Recientemente se ha identificado otro factor de crecimiento secretado relacionado con la pleiotrofina denominado midkina (MK) como segundo ligando para ALK. De forma parecida a PTN, las funciones de unión y activación (por ejemplo, la inducción de la formación de colonias en agar blando en cultivos celulares) de MK se pueden bloquear mediante el mismo anticuerpo producido contra ECD de ALK (Stoica 2001). Al igual que la pleiotrofina, la midkina está regulada positivamente en muchos tumores, aunque su expresión fisiológica está muy restringida en los tejidos normales adultos (Stoica, 2002). El análisis de 47 muestras de tumor de vejiga urinaria reveló que la expresión de MK está significativamente potenciada (aproximadamente cuatro veces) en comparación con el tejido de vejiga urinaria normal. Adicionalmente, la sobreexpresión pronunciada se correlaciona con una mala supervivencia de los pacientes (O'Brien 1996).

No obstante, la afinidad de MK por ALK es aproximadamente 5 veces menor que la de la pleiotrofina (Stoica 2002). De manera interesante, al igual que con la pleiotrofina, la inhibición de ALK mediante ribozimas inhibe también los efectos de MK en cultivo celular (Stoica 2002). Los autores de estos estudios también han llegado a la conclusión de que la inhibición de la ruta de PTK/MK/ALK abre posibilidades muy atractivas para el tratamiento de varias enfermedades, de las que algunas tienen opciones de tratamiento muy limitadas hasta ahora, tales como, por ejemplo, el glioblastoma y el cáncer de páncreas. (Stoica 2002).

En individuos sanos, la expresión del ARNm de ALK alcanza su máximo durante el periodo neonatal y persiste en adultos en unas pocas partes determinadas del sistema nervioso. Recientemente, la expresión de la proteína ALK también se detectó en células endoteliales asociadas con células neuronales y gliales. Las pruebas de que al menos parte de las actividades malignas descritas para pleiotrofina están mediadas por ALK procedieron de experimentos en los que la expresión de ALK se eliminó mediante un abordaje dirigido por ribozimas. Dicha eliminación de ALK previno la fosforilación estimulada por pleiotrofina de la proteína antiapoptótica Akt y condujo a una supervivencia prolongada de los ratones que habían recibido xenoinjertos. De hecho, el número de células apoptóticas en los injertos tumorales aumentó significativamente cuando la expresión de ALK se eliminó (Powers 2002).

Las pruebas de que las actividades malignas descritas para MK están mediadas por ALK proceden de experimentos con anticuerpos monoclonales dirigidos contra el ECD de ALK. La adición de una dilución de 1:25 del sobrenadante de células de hibridoma de dos anticuerpos anti-ECD de ALK conduce a una disminución significativa de la formación de colonias de células SW-13 en agar blando (Stoica 2002). El análisis de diez líneas celulares diferentes reveló que la capacidad de una respuesta de crecimiento a PTN se correlacionaba perfectamente con la expresión del ARNm de ALK (las siguientes líneas celulares respondían a PTN y se encontró que expresaban ARNm de ALK: HUVEC, NIH3T3, SW-13, Colo357, ME-180, U87, MD-MB 231; Stoica 2001). De manera interesante, en algunas líneas celulares de cáncer (cáncer de páncreas Colo 357, cáncer de mama Hs578T y glioblastoma U87), PTN y ALK se coexpresan, lo que indica que PTN y ALK forman un bucle autocrino de estimulación del crecimiento (Stoica, 2001).

De manera interesante, se ha demostrado que PTN y MK producen regulación positiva de la transcripción de la proteína antiapoptótica bcl-2 (Stoica, 2002). Además, Akt activada (que es una diana crucial aguas abajo de la señalización aberrante de ALK) fosforila el factor proapoptótico denominado bad, lo que conduce a la disociación de bcl-xl, que, cuando se libera de bad, puede suprimir la apoptosis bloqueando la liberación de citocromo c (véanse Bowden 2002 para referencias).

La expresión aberrante de ALK podría estar implicada en el desarrollo de varios cánceres. No obstante, primero se asoció con un subgrupo de linfomas no Hodgkin (LNH) muy malignos, los denominados linfomas macrocíticos anaplásicos (LMCA). Los linfomas no Hodgkin representan neoplasias clonales que se originan a partir de varias células de origen linfático.

La mayoría de los pacientes con el subtipo clínico sistémico primario de LMCA tienen la translocación t2,5 que expresa una proteína de fusión que une el extremo N terminal de la nucleofosmina (NPM) al extremo C terminal de ALK. La fusión

consta de los aa 1-117 de NPM fusionados a los aa 1058-1620 de ALK y la rotura cromosómica se localiza en un intrón localizado entre los exones que codifican la TM y el dominio yuxtamembrana de ALK (Duyster 2001). NPM-ALK es un transcrito que contiene un ORF de 2.040 pb que codifica una proteína de 680aa (Morris 2001). Esto corresponde a una rotura en el intrón 4 de NPM, que abarca 911 pb y el intrón 16 de ALK que abarca 2.094 pb (Kutok 2002). Muy probablemente, la secuencia de ALK en esta proteína de fusión es la secuencia mínima requerida para que la proteína de lugar al LMCA (Duyster 2001). La fusión inversa (ALK-NPM) no se expresa, al menos no en las células linfoides (Kutok, 2002). La proteína NPM de tipo silvestre demuestra una expresión ubicua y funciona como transportador de proteínas desde el citoplasma al nucleolo. De hecho, NPM es una proteína nuclear de 38 kDa codificada en el cromosoma 5 que contiene un NLS, se une a las proteínas nucleares y participa en el tráfico citoplasma/núcleo (Duyster 2001). NPM es una de las proteínas nucleolares más abundantes y normalmente está presente como un hexámero (Morris 2001). De manera más importante, NPM normalmente sufre autooligomerización (hexámeros), así como heterooligomerización con NPM-ALK (Duyster 2001). La translocación 2,5 sitúa a la porción del gen de ALK que codifica la tirosina cinasa en el cromosoma 2 bajo el control del promotor fuerte de NPM en el cromosoma 5, produciendo la expresión permanente de la proteína NPM-ALK quimérica (p80) (Duyster 2001). Por tanto, ALK cinasa está mal regulada y es ectópica, tanto en términos del tipo celular (linfocito) como de compartimento celular (núcleo/nucleolo y citoplasma) (Ladanyi 2000). La localización (citoplasma o núcleo) de NPM parece no afectar a su efecto sobre la linfomagénesis (Duyster 2001). La actividad de tirosina cinasa aberrante resultante desencadena la transformación maligna mediante la fosforilación constitutiva de las dianas intracelulares. Otras varias proteínas de fusión de ALK menos habituales se asocian con el LMCA. Todas las variantes demuestran unión del dominio de tirosina cinasa de ALK a un promotor alternativo que regula su expresión.

Se ha notificado que ALK de longitud completa también se expresa en aproximadamente el 92% de las células de neuroblastoma primario y en algunos rhabdoidesarcomas (Lamant 2000). No obstante, hasta ahora no se ha demostrado ninguna correlación entre la expresión de ALK y la biología tumoral. Este hecho, junto con la falta de pruebas respecto de los niveles significativos de ALK fosforilada endógenamente en estos tumores, sugiere que la expresión de ALK en neuroblastomas refleja su expresión normal en células neurales inmaduras más que un papel oncogénico primario y ALK en estos tumores no está fosforilada de forma constitutiva, lo que cuestiona un papel importante de ALK en estos tumores (Duyster 2001; Pulford 2001). No obstante, la señalización de ALK podría ser importante en al menos algunos neuroblastomas, como sugieren Miyake et al., que descubrieron sobreexpresión y fosforilación constitutiva de ALK debido a la amplificación génica en líneas celulares derivadas de neuroblastoma (Miyake 2002). No obstante, otras líneas celulares derivadas de neuroblastoma no muestran activación constitutiva de ALK, lo que va en contra de una participación patológica general de ALK (Dirks 2002; Pulford 2004).

Más interesantemente, ALK parece ser importante para el crecimiento del glioblastoma multiforme, un tumor cerebral elevadamente maligno que ofrece opciones terapéuticas muy limitadas (Powers 2002). Se ha demostrado que en estos devastadores tumores se producen múltiples alteraciones genéricas, incluida la pérdida o mutaciones de PTEN, p53 y INK4a-ARF. Además, la señalización de RTK desempeña un papel particularmente importante en el crecimiento y desarrollo de estos tumores, que sobreexpresan varios factores de crecimiento, tales como PDGF, HGF, NGF y VEGF, lo que sugiere bucles de señalización autocrina de RTK. Powers y colaboradores han demostrado expresión de ARNm y proteica de ALK en muestras de tumores de pacientes con glioblastoma, mientras que las señales no eran detectables en el tejido cerebral adyacente normal (Powers 2002). Además, las células humanas U87MG de glioblastoma (que proceden de un paciente y representan un sistema modelo bien caracterizado para estudiar la tumorigénesis y señalización en el glioblastoma) muestran un comportamiento antiapoptótico dependiente de ALK en estudios de xenoinjerto. Cuando se elimina ALK en estas células tumorales mediante el uso de ribozimas, los ratones a los que se inyectaron estas células tumorales sobreviven al menos dos veces más que cuando se les inyectan células tumorales de tipo silvestre y estas células tumorales muestran una apoptosis espectacularmente aumentada. Por tanto, ALK y sus ligandos proporcionan una señal de supervivencia esencial que es limitante de la velocidad para el crecimiento tumoral de células U87MG in vivo (Powers 2002). Estos hallazgos indican que la inhibición de la señalización de ALK podría ser un abordaje prometedor para mejorar la esperanza de vida de los pacientes con glioblastoma.

El glioblastoma multiforme es, con mucho, el tumor glial primario maligno más común, con una incidencia de aproximadamente 2/100.000/a (aproximadamente 15.000 casos en EE. UU. y Europa occidental al año). Afecta principalmente a los hemisferios cerebrales, pero también puede afectar al tronco encefálico (principalmente en niños) o a la médula espinal. Los tumores pueden manifestarse de novo (glioblastoma primario) o pueden desarrollarse a partir de astrocitomas de grado bajo (glioblastoma secundario). Los glioblastomas primarios y secundarios muestran poco solapamiento molecular y constituyen diferentes entidades de enfermedad a nivel molecular. Ambos contienen muchas anomalías genéticas, incluyendo afección de p53, EGFR, MDM2, PDGF, PTEN, p16, RB.

En los últimos 25 años no se ha producido ningún avance significativo del tratamiento. Las terapias son solo paliativas y pueden ampliar la esperanza de vida desde 3 meses hasta 1 año. Los pacientes normalmente presentan un déficit neurológico lentamente progresivo, por ejemplo debilidad motora, síntomas de presión intracraneal, por ejemplo cefalea, náuseas, vómitos, deterioro cognitivo o convulsiones. Los cambios en la personalidad también pueden ser signos tempranos. La etiología del glioblastoma es desconocida, los casos familiares representan menos del 1%. El único factor de riesgo consistente identificado es la exposición a sustancias petroquímicas. El diagnóstico se efectúa principalmente mediante estudios por imagen (TC, RMN) y biopsia. La estadificación completa de la mayoría de los glioblastomas no es ni práctica ni posible, ya que estos tumores no tienen márgenes claramente

definidos. En su lugar, exhiben tendencias bien conocidas para invadir localmente y extenderse a lo largo de vías de la materia blanca compacta. La principal razón por la cual no es posible un tratamiento curativo es porque el tumor está más allá del alcance del control local cuando se diagnostica. Los agentes quimioterapéuticos principales son carmustina (un agente alquilante) y cisplatino, pero solo el 40% de los pacientes muestra alguna respuesta.

Aunque hay bastantes incertidumbres con respecto al papel de ALK en el glioblastoma, esta enfermedad ofrece varios abordajes para los fármacos dirigidos a ALK. De hecho, para esta enfermedad devastadora, incluso una pequeña mejora de las opciones terapéuticas actuales atendería una enorme necesidad médica. Es importante observar que dado que las células de glioblastoma expresan ALK de longitud completa, para tratar este cáncer, ALK podría considerarse como una diana no solo para los inhibidores de cinasa de molécula pequeña sino también para anticuerpos y/o fragmentos de anticuerpos tales como scFv, es decir, para inducir la apoptosis de células tumorales. La estricta localización del glioblastoma en el SNC apoya el uso de scFv, si se pueden administrar de manera eficaz en el SNC (sin un aclaramiento rápido debido a la compartimentalización, pero con mejor penetración tumoral en comparación con las IgG debido a su menor tamaño). Los anticuerpos y/o fragmentos de anticuerpos podrían dirigirse contra la secuencia de unión a ligando de ALK (aa 396-406) o contra otras partes de las partes extracelulares del receptor.

La expresión muy limitada de ALK en tejidos sanos en condiciones fisiológicas indica que los tumores que expresan ALK podrían ser una excelente diana para el tratamiento de la enfermedad usando anticuerpos radioactivos o marcados con toxinas y/o fragmentos de anticuerpos, con independencia de si ALK está implicada en la patogenia de estos tumores o no. Además de las células de glioblastoma, la expresión de ALK se ha encontrado de manera elevadamente significativa en las líneas celulares de melanoma y las líneas celulares de carcinoma de mama (sin que esté fosforilada de forma constitutiva) (Dirks 2002). El hecho de que una gran parte del dominio extracelular de ALK parezca ser bastante única en el proteasoma humano debería hacer que este abordaje sea altamente específico.

Los documentos WO9515331/US5529925 divulgan la clonación y secuenciación de las secuencias de ácido nucleico humano, que están reorganizadas en el evento de translocación cromosómica t(2;5)(p23;q35) que se produce en el linfoma t(2;5) humano. Se descubrió que la reordenación situó secuencias del gen de la fosfoproteína nucleolar (el gen de NPM) en el cromosoma 5q35 en las de un gen de proteína tirosina cinasa no identificada previamente (en lo sucesivo denominado el gen de ALK) en el cromosoma 2p23. También se divulgaron la secuencia del gen de fusión y de la proteína de fusión (gen o proteína de fusión NPM/ALK, respectivamente).

La secuencia de ALK de longitud completa está patentada en el documento US-5770421, titulado "Human ALK Protein Tyrosine Kinase". Además, la patente US-6174674B1 titulada "Method of detecting a chromosomal rearrangement involving a breakpoint in the ALK or NPM gene" divulga cebadores para detectar la secuencia de fusión NPM-ALK en muestras de pacientes. En otra solicitud de patente, US-6696548 titulada "ALK protein tyrosine kinase/receptor and ligands thereof", se divulga el uso de ALK para la detección de ligandos de ALK y anticuerpos que se unen a secuencias específicas de ALK. También se divulga un método de identificación de un agente capaz de unirse al polipéptido ALK aislado. El documento WO0196394/US-20020034768 divulga ALK como receptor de pleiotrofina. El documento US-20040234519 divulga anticuerpos anti-pleiotrofina y el documento WO2006020684 describe la detección de pleiotrofina.

Los anticuerpos policlonales de conejo contra el dominio de unión a ligando de ALK humana se conocen por Stoica et al. (J. of Biological Chemistry, 2001, 16772-16779). Además, Stoica et al (J. of Biological Chemistry, 2002, 35990-35998) describe anticuerpos monoclonales murinos contra el dominio de unión a ligando que eran capaces de inhibir parcialmente la unión de MK a ALK en un ensayo basado en células.

Morris et al (documento US-2001/021505) divulgan la secuencia de ALK y ligandos de esta.

Auf der Maur et al (Methods, 2004, 215-224; J. of Biological Chemistry, 2002, 45075-45085) describen métodos para la selección de regiones marco conservadas estables de anticuerpos intracelulares. Los documentos EP-1479694 y WO03/097697 proporcionan secuencias de ScFv que son estables en un ambiente reductor.

Descripción de la invención

Por tanto, es un objeto general de la invención proporcionar un anticuerpo o derivado de anticuerpo estable y soluble, tal como se define en las reivindicaciones adjuntas, que se une a la proteína ALK humana in vitro e in vivo. Con máxima preferencia, el anticuerpo está específicamente dirigido contra el dominio de unión a ligando de ALK (aminoácidos 396-406) y por lo tanto bloqueará los efectos biológicos de MK, que tiene una Kd por ALK de aproximadamente 170 pM, así como los efectos biológicos de PTN, que tiene una Kd por ALK de aproximadamente 20-30 pM (Stoica 2002; Stoica 2001). Dicho anticuerpo o fragmento de anticuerpo es un anticuerpo scFv. En lo sucesivo, el término anticuerpo comprende anticuerpos de longitud completa, así como otros derivados de anticuerpos.

Dicho anticuerpo tiene una CDR3 de VH de la secuencia SEC ID N.º: 2.

El anticuerpo o parte de unión a antígeno del mismo se une específicamente a un epítipo que comprende, que consiste esencialmente en o un fragmento de la región que abarca los aminoácidos 391-406 (SEC ID N.º: 1) de la proteína ALK (SEC ID N.º 1).

El anticuerpo o parte de unión a antígeno del mismo se puede caracterizar por que se une específicamente a una proteína ALK con una K_D de menos de aproximadamente 10×10^{-6} M. En una realización particular, el anticuerpo o porción de unión a antígeno del mismo se une específicamente a una proteína ALK (o fragmento de la misma) con una K_D de al menos aproximadamente 10×10^{-7} M, al menos aproximadamente 10×10^{-8} M, o al menos aproximadamente 10×10^{-9} M.

En otras determinadas realizaciones, el anticuerpo o parte de unión a antígeno del mismo se une específicamente a un epítipo que se solapa con un epítipo unido por un anticuerpo o derivado de anticuerpo de ESBA521 (SEC ID N.º: 19) y/o compite por la unión a una proteína ALK, o porción de la misma, con un anticuerpo o derivado de anticuerpo de ESBA521. En una realización relacionada, el anticuerpo o parte de unión a antígeno del mismo se une específicamente a un epítipo que comprende los restos 391-406 (SEC ID N.º: 1) de una proteína ALK, o porción de la misma.

Las regiones variables de las cadenas pesada y ligera de los anticuerpos o partes de unión a antígeno de los mismos normalmente incluyen una o más regiones determinantes de la complementariedad (CDR). Estas incluyen las regiones CDR1, CDR2 y CDR3. En realizaciones particulares, las CDR de cadena pesada variable son al menos un 80%, 85%, 90%, 95%, o más preferiblemente un 100% idénticas a una CDR del anticuerpo ESBA521. En otras realizaciones particulares, las CDR de cadena ligera variable son al menos un 80%, 85%, 90%, 95%, o más preferiblemente un 100% idénticas a una CDR de una región variable de cadena ligera del anticuerpo ESBA521.

De acuerdo con lo anterior, los anticuerpos o fragmentos concretos de la invención comprenden una región variable de la cadena pesada que incluye una o más regiones determinantes de la complementariedad (CDR) que son al menos un 80%, 85%, 90%, 95%, o más preferiblemente un 100% idénticas a una CDR de una región variable de la cadena pesada de ESBA521 y una región variable de la cadena ligera que incluye una o más CDR que son al menos un 80%, 85%, 90%, 95% o más preferiblemente un 100% idénticas a una CDR de una región variable de la cadena ligera del anticuerpo ESBA521.

La región variable de la cadena pesada de los anticuerpos o partes de unión a antígeno de los mismos también puede incluir las tres CDR que son al menos un 80%, 85%, 90%, 95%, o más preferiblemente un 100% idénticas a las CDR de la región variable de la cadena pesada del anticuerpo ESBA521 y/o las tres CDR que son al menos un 80%, 85%, 90%, 95% o más preferiblemente 100%, idénticas a las CDR de la región variable de cadena ligera del anticuerpo ESBA521.

En otra realización de la invención, los anticuerpos o partes de unión a antígeno de los mismos (a) incluyen una región variable de la cadena pesada que está codificada por, o procede de (es decir, es el producto de) un gen de VH humana (por ejemplo de tipo H3); y/o (b) incluyen una región variable de la cadena ligera que está codificada por, o procede de, un gen de V kappa o lambda humana (por ejemplo, de tipo lambda 1).

Los anticuerpos también pueden estar unidos a diversos agentes terapéuticos (por ejemplo, agentes anticancerosos, sustancias quimioterapéuticas o toxinas) y/o un marcador (por ejemplo, un radiomarcador).

En otro aspecto, la invención se refiere a ácidos nucleicos aislados que incluyen una secuencia que codifica una región variable de cadena pesada de un anticuerpo de SEC ID N.º: 22. La invención también presenta ácidos nucleicos aislados que incluyen una secuencia que codifica una región variable de cadena ligera de un anticuerpo de SEC ID N.º: 21.

También se presentan vectores de expresión que incluyen cualquiera de los ácidos nucleicos anteriores, solos o en combinación (*por ejemplo*, expresados a partir de uno o más vectores), así como células hospedadoras que comprenden dichos vectores de expresión.

Las células hospedadoras adecuadas para expresar los anticuerpos de la invención incluyen diversas células eucariotas, por ejemplo células de levadura, células de mamífero, *por ejemplo* células de ovario de hámster chino (CHO), células NS0, células de mieloma o células vegetales. Las moléculas divulgadas en la presente memoria también pueden expresarse en células procariotas, por ejemplo *E. coli*.

También se presentan métodos para producir los anticuerpos o partes de unión a antígeno de los mismos expresando ácidos nucleicos que codifican anticuerpos en una célula hospedadora (*por ejemplo*, ácidos nucleicos que codifican la parte de la región de unión a antígeno de un anticuerpo). En otro aspecto más, se presenta un hibridoma o transfectoma que incluye los ácidos nucleicos anteriormente mencionados.

En otra realización, las moléculas de anticuerpo (o regiones de unión VL y VH) son completamente humanas. El tratamiento de seres humanos con anticuerpos monoclonales humanos ofrece varias ventajas. Por ejemplo, es probable que los anticuerpos sean menos inmunogénicos en seres humanos que los anticuerpos no humanos. Asimismo, la terapia es rápida porque se puede producir la inactivación de ALK en cuanto el anticuerpo alcanza un sitio de cáncer (donde se expresa ALK). Por lo tanto, el anticuerpo es un anticuerpo scFv, es decir, ESBA521 o un anticuerpo que comprende una región VL y/o VH (o las CDR de las mismas; por ejemplo, la CDR3 de VL [SEC ID N.º: 3] y/o la CDR3 de VH [SEC ID N.º: 2]) de ESBA521.

Los anticuerpos humanos también localizan sitios adecuados en seres humanos de manera más eficiente que los anticuerpos no humanos. Además, el tratamiento es específico para ALK, es recombinante y está elevadamente purificado y, a diferencia de las terapias tradicionales, evita el potencial de contaminarse con agentes adventicios. Como alternativa, los anticuerpos divulgados en la presente memoria pueden producirse mediante síntesis química.

En otra realización, la invención proporciona composiciones para tratar un cáncer (o la elaboración de un medicamento adecuado) que puedan prevenir la neoplasia en un sujeto mediante la competición con los ligandos de ALK, tales como midkina (MK) y/o pleiotrofina (PTN) y, de este modo, bloquear la señalización de ALK mediada por dichos ligandos. Dicha composición puede administrarse sola o en combinación con los agentes anticancerosos reconocidos en la técnica, por ejemplo metotrexato y similares.

El anticuerpo de la invención y/o la vacuna de ALK pueden usarse solos o en combinación con un agente terapéutico conocido, por ejemplo un agente anticanceroso, por ejemplo metotrexato y similares.

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

Breve descripción de los dibujos

La invención se entenderá mejor cuando se tiene en cuenta la siguiente descripción detallada de la misma. Dicha descripción hace referencia a los dibujos adjuntos, en donde:

La Figura 1 muestra un esquema de la proteína ALK humana usada. Un péptido de 16 aminoácidos del sitio de unión de la PTN (discontinua) se usa como epítipo en una selección de dos híbridos para las sustancias que se unen a scFv.

La Figura 2 muestra la aleatorización escalonada de porciones de CDR3 de VH, CDR3 de VL y CDR2 de VH para obtener ESBA521 como aglutinante secundario y un conjunto de scFv como aglutinantes terciarios (véase la Tabla 1). x representa cualquier resto de aminoácido.

La Fig. 3 muestra un experimento ELISA en donde las características de unión de los scFv mejorados se comparan con las de la región marco conservada a partir de la cual se originan.

La Fig. 4 muestra la inmunotinción de células HeLa transfectadas transitoriamente con ESBA521 (paneles de la izquierda) y con un anticuerpo policlonal específico de ALK (paneles de la derecha). Panel central: las mismas células visualizadas mediante microscopía óptica.

La Figura 5 muestra un experimento de ELISA que compara el ESBA512 con los aglutinantes terciarios mejorados.

Descripción detallada de la invención

Con el fin de que la presente invención pueda entenderse con mayor facilidad, en primer lugar se definen ciertos términos.

Definiciones

El término “ALK” y “Alk-1” incluye la proteína ALK humana codificada por el gen de ALK (cinasa del linfoma anaplásico) que es una proteína tirosina cinasa que transmembrana (PTK)/receptor.

El término “anticuerpo” se refiere a anticuerpos enteros y cualquier fragmento de unión a antígeno (es decir, “porción de unión a antígeno”, “polipéptido de unión a antígeno” o “inmunoaglutinante”) o una cadena sencilla de los mismos. Un “anticuerpo” se refiere a una glucoproteína que comprende al menos dos cadenas pesadas (H) y dos cadenas ligeras (L) interconectadas mediante puentes disulfuro, o una porción de unión a antígeno del mismo. Cada cadena pesada comprende una región variable de cadena pesada (abreviada en la presente memoria como V_H) y una región constante de cadena pesada. La región constante de cadena pesada comprende tres dominios, CH1, CH2 y CH3. Cada cadena ligera comprende una región variable de cadena ligera (abreviada en la presente memoria como V_L) y una región constante de cadena ligera. La región constante de cadena ligera comprende un dominio, CL. Las regiones V_H y V_L pueden subdividirse adicionalmente en regiones de hipervariabilidad denominadas regiones determinantes de la complementariedad (CDR), intercaladas con regiones que están más conservadas, denominadas regiones marco conservadas (FR). Cada V_H y V_L comprende tres CDR y cuatro FR dispuestas desde el extremo amino terminal al extremo carboxilo terminal, en el orden siguiente: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4. Las regiones variables de las cadenas pesada y ligera contienen un dominio de unión que interactúa con un antígeno. Las regiones constantes de los anticuerpos pueden mediar en la unión de la inmunoglobulina a tejidos o factores del hospedador, incluidas varias células del sistema inmunológico (*por ejemplo*, células efectoras) y el primer componente (C1q) del sistema de complemento clásico.

La expresión “parte de unión a antígeno” de un anticuerpo (o simplemente “parte de anticuerpo”) se refiere a uno o más fragmentos de un anticuerpo que conservan la capacidad para unirse específicamente a un antígeno (*por ejemplo*, ALK). Se ha demostrado que la función de unión a antígeno de un anticuerpo se puede realizar mediante

fragmentos de un anticuerpo de longitud completa. Los ejemplos de fragmentos de unión abarcados dentro del término “parte de unión a antígeno” de un anticuerpo incluyen (i) un fragmento Fab, un fragmento monovalente que consiste en los dominios V_L , V_H , CL y $CH1$; (ii) un fragmento $F(ab')_2$, un fragmento bivalente que comprende dos fragmentos Fab unidos por un puente disulfuro en la región bisagra; (iii) un fragmento F_d que consiste en los dominios V_H y $CH1$; (iv) un fragmento F_v que consiste en los dominios V_L y V_H de un único brazo de un anticuerpo; (v) un solo dominio o fragmento dAb (Ward *et al.*, *Nature* 341:544-546) que consiste en un dominio V_H ; y (vi) una región determinante de la complementariedad (CDR) aislada o (vii) una combinación de dos o más CDR aisladas que opcionalmente pueden estar unidas por un enlazador sintético. Además, aunque los dos dominios del fragmento F_v , V_L y V_H , están codificados por genes distintos, pueden unirse, usando métodos recombinantes, mediante un enlazador sintético que permite que se produzcan en forma de una sola cadena de proteína en la que las regiones V_L y V_H se emparejan para formar moléculas monovalentes (conocidas como F_v de cadena sencilla [scFv]; véase, *por ejemplo*, Bird *et al.* [1988] *Science* 242:423-426; y Huston *et al.* [1988] *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85:5879-5883). También se pretende que dichos anticuerpos de cadena sencilla estén abarcados dentro del término “parte de unión a antígeno” de un anticuerpo. Estos fragmentos de anticuerpo se obtienen usando técnicas convencionales conocidas por los expertos en la técnica y los fragmentos se seleccionan según su utilidad del mismo modo que con los anticuerpos intactos. Las partes de unión a antígeno se pueden producir mediante técnicas de ADN recombinante o mediante escisión enzimática o química de inmunoglobulinas intactas. Los anticuerpos pueden ser de diferente isotipo, por ejemplo un anticuerpo IgG (por ejemplo, un subtipo IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4), IgA1, IgA2, IgD, IgE, o IgM.

La expresión “región marco conservada” hace referencia a las partes reconocidas en la técnica de una región variable de un anticuerpo que existen entre las regiones CDR, más divergentes. Dichas regiones marco conservadas normalmente se denominan regiones marco conservadas de 1 a 4 (FR1, FR2, FR3 y FR4) y proporcionan un armazón para sujetar, en espacio tridimensional, las tres CRD halladas en una región variable de la cadena ligera o pesada del anticuerpo, de forma que las CDR pueden formar una superficie de unión a antígeno. Dichas regiones marco conservadas también se pueden denominar armazones, ya que proporcionan soporte para la presentación de las CDR, más divergentes. Otras CDR y regiones marco conservadas de la superfamilia de las inmunoglobulinas, tales como repeticiones de anquirina y fibronectina, se pueden usar como moléculas de unión a antígeno (véanse también por ejemplo, las patentes de US-6.300.064, US-6.815.540 y la publicación de US- 20040132028).

El término “epítipo” o “determinante antigénico” se refiere a un sitio sobre un antígeno al que se une una inmunoglobulina o anticuerpo de forma específica (por ejemplo, ALK; por ejemplo, los restos de aminoácidos 391-406 de ALK-1 humana (véase, por ejemplo, la SEC ID N.º: 1). Un epítipo normalmente incluye al menos 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 o 15 aminoácidos en una conformación espacial única. Véase, *por ejemplo*, *Epitope Mapping Protocols in Methods in Molecular Biology*, Vol. 66, G. E. Morris, Ed. (1996).

Las expresiones “unión específica”, “unión selectiva”, “se une selectivamente” y “se une específicamente” hacen referencia a la unión de un anticuerpo a un epítipo sobre un antígeno predeterminado. Normalmente, el anticuerpo se une con una afinidad (K_D) de aproximadamente menos de 10^{-7} M, tal como aproximadamente menos de 10^{-8} M, 10^{-9} M o 10^{-10} M o incluso menor.

El término “ K_D ” se refiere a la constante de disociación en el equilibrio de una interacción anticuerpo-antígeno concreta. Normalmente, los anticuerpos de la invención se unen a ALK con una constante de disociación en el equilibrio (K_D) de menos de aproximadamente 10^{-7} M, tal como de menos de aproximadamente 10^{-8} M, 10^{-9} M o 10^{-10} M o incluso menor, por ejemplo, según se determina usando tecnología de resonancia de plasmón superficial (SPR) en un instrumento BIAcore.

Las expresiones “neutraliza a ALK”, “inhibe a ALK” y “bloquea a ALK” se usan de forma intercambiable para hacer referencia a la capacidad de un anticuerpo de la invención para evitar la interacción de ALK con uno o más ligandos diana y, por ejemplo, desencadenar una señal de transducción.

La expresión “molécula de ácido nucleico” hace referencia a moléculas de ADN y moléculas de ARN. Una molécula de ácido nucleico puede ser monocatenaria o bicatenaria, pero preferiblemente es ADN bicatenario. Un ácido nucleico está “unido operablemente” cuando se coloca en una relación funcional con otra secuencia de ácido nucleico. Por ejemplo, un promotor o potenciador está unido operablemente a una secuencia codificante si afecta a la transcripción de la secuencia.

Para los ácidos nucleicos, la expresión “homología sustancial” indica que dos ácidos nucleicos, o las secuencias designadas de los mismos, cuando se alinean y comparan óptimamente, son idénticas, con las inserciones o deleciones adecuadas de nucleótidos, en al menos aproximadamente un 80% de los nucleótidos, normalmente al menos aproximadamente de un 90% a un 95%, y más preferiblemente al menos aproximadamente de un 98% a un 99,5% de los nucleótidos. Como alternativa, existe una homología sustancial cuando los segmentos hibridan en condiciones de hibridación selectiva con la hebra complementaria. Dichas condiciones de hibridación se conocen en la técnica y se describen en, por ejemplo, Sambrook *et al.*, citado más adelante.

El porcentaje de identidad entre dos secuencias es una función del número de posiciones idénticas compartidas por las secuencias, teniendo en cuenta el número de huecos, y la longitud de cada hueco, que se han de

introducir para la alineación óptima de las dos secuencias. La comparación de las secuencias y la determinación del porcentaje de identidad entre dos secuencias se puede conseguir usando un algoritmo matemático, tal como se describe en los ejemplos no limitativos siguientes.

- 5 El porcentaje de identidad entre dos secuencias de nucleótidos se puede determinar usando el programa GAP en el paquete de software GCG usando un NWSgapdna. La matriz CMP y un peso del hueco de 40, 50, 60, 70 u 80 y un peso de la longitud de 1, 2, 3, 4, 5, o 6. El porcentaje de identidad entre dos secuencias nucleotídicas o de aminoácidos también se puede determinar usando el algoritmo de E. Meyers y W. Miller (CABIOS, 4:11-17 [1989]) que se ha incorporado en el programa ALIGN (versión 2.0) usando una tabla de ponderación de restos PAM120, un penalización de la longitud del hueco de 12 y una penalización del hueco de 4. Además, el porcentaje de identidad entre dos secuencias de aminoácidos se puede determinar usando el algoritmo de Needleman y Wunsch (*J. Mol. Biol.* 48:444-453 [1970]) que se ha incorporado en el programa GAP en el paquete de software GCG, usando una matriz Blossum 62 o una matriz PAM250, y una ponderación de hueco de 16, 14, 12, 10, 8, 6 o 4 y una ponderación de longitud de 1, 2, 3, 4, 5 o 6.
- 10
- 15 Las secuencias de ácido nucleico y de proteínas de la presente invención pueden usarse además como “secuencia de consulta” para realizar una búsqueda contra bases de datos públicas para, por ejemplo, identificar secuencias relacionadas. Dichas búsquedas se pueden realizar usando los programas NBLAST y XBLAST (versión 2.0) de Altschul, et al. (1990) *J. Mol. Biol.* 215:403-10. Las búsquedas de nucleótidos en BLAST se pueden realizar con el programa NBLAST, puntuación = 100; longitud de palabra = 12, para obtener secuencias de nucleótidos homólogas a las moléculas de ácido nucleico de la invención. Las búsquedas de proteínas en BLAST se pueden realizar con el programa XBLAST, puntuación = 50; longitud de palabra = 3, para obtener secuencias de aminoácidos homólogas a las moléculas de proteínas de la invención. Para obtener alineaciones de huecos con fines comparativos, se puede usar Gapped BLAST como se describe en Altschul *et al.*, (1997) *Nucleic Acids Res.* 25(17):3389-3402. Cuando se usan los programas BLAST y Gapped BLAST, se pueden usar los parámetros por defecto de los respectivos programas (*por ejemplo*, XBLAST y NBLAST).
- 20
- 25

También están abarcadas las “modificaciones conservativas de secuencia” de las secuencias expuestas en las SEC ID N.º en la presente memoria, *es decir*, modificaciones en las secuencias de nucleótidos y de aminoácidos que no anulan la unión del anticuerpo codificado por la secuencia de nucleótidos o que contiene la secuencia de aminoácidos, al antígeno. Dichas modificaciones de secuencia conservativas incluyen sustituciones, adiciones y deleciones de nucleótidos y de aminoácidos. Por ejemplo, pueden introducirse modificaciones mediante de técnicas convencionales conocidas en la materia, tales como mutagénesis de sitio dirigido y mutagénesis mediada por PCR. Las sustituciones de aminoácidos conservativas incluyen aquellas en las que el resto de aminoácido está sustituido por otro resto de aminoácido que tiene una cadena lateral similar. En la técnica se han definido familias de restos de aminoácidos que tienen cadenas laterales similares. Estas familias incluyen aminoácidos con cadenas laterales básicas (*por ejemplo*, lisina, arginina, histidina), cadenas laterales ácidas (*por ejemplo*, ácido aspártico, ácido glutámico), cadenas laterales polares sin carga (*por ejemplo*, glicina, asparagina, glutamina, serina, treonina, tirosina, cisteína, triptófano), cadenas laterales no polares (*por ejemplo*, alanina, valina, leucina, isoleucina, prolina, fenilalanina, metionina), cadenas laterales ramificadas beta (*por ejemplo*, treonina, valina, isoleucina) y cadenas laterales aromáticas (*por ejemplo*, tirosina, fenilalanina, triptófano, histidina). Por tanto, un resto de aminoácido no esencial predicho en un anticuerpo humano anti-ALK se sustituye, preferiblemente, con otro resto de aminoácido de la misma familia de cadenas laterales. Los métodos para identificar sustituciones conservativas de nucleótidos y aminoácidos que no eliminen la unión al antígeno se conocen bien en la técnica (véase, *por ejemplo*, Brummell et al., *Biochem.* 32:1180-1187 [1993]; Kobayashi et al. *Protein Eng.* 12[10]:879-884 [1999]; y Burks et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94:412-417 [1997]).

Como alternativa, en otra realización, las mutaciones se introducen de forma aleatoria a lo largo de la totalidad o parte de una secuencia codificante de un anticuerpo anti-ALK, tal como mediante mutagénesis por saturación, y los anticuerpos anti-ALK modificados resultantes se pueden someter a exploración respecto de su actividad de unión. Una “secuencia consenso” es una secuencia formada por los aminoácidos (o nucleótidos) de aparición más frecuentes en una familia de secuencias relacionadas (véase, *por ejemplo*, Winnaker, *From Genes to Clones* (Verlagsgesellschaft, Weinheim, Alemania, 1987). En una familia de proteínas, cada posición en la secuencia consenso está ocupada por el aminoácido que aparece con mayor frecuencia en dicha posición en la familia. Si hay dos aminoácidos igualmente frecuentes, puede incluirse cualquiera de los dos en la secuencia consenso.

Mediante referencia a las tablas y las figuras proporcionadas en la presente memoria se puede obtener una secuencia consenso para la o las CDR de la región variable de la cadena pesada/ligera del anticuerpo mediante la alineación óptima de las secuencias de aminoácidos de las CDR de la región variable de los anticuerpos que son reactivos contra el epítipo de 390-406 de la proteína ALK-1 humana.

El término “vector” se refiere a una molécula de ácido nucleico capaz de transportar otro ácido nucleico al que se ha unido. Un tipo de vector es un “plásmido”, que se refiere a un bucle de ADN circular bicatenario en el que se pueden ligar segmentos adicionales de ADN. Otro tipo de vector es un vector viral, en donde se pueden ligar en el genoma viral segmentos adicionales de ADN. Determinados vectores son capaces de una replicación autónoma en una célula hospedadora en la que se introducen (*por ejemplo*, vectores bacterianos que tienen un origen de replicación bacteriano y vectores episómicos de mamífero). Otros vectores (*por ejemplo*, vectores no episómicos

de mamífero) pueden integrarse en el genoma de una célula hospedadora tras la introducción en la célula hospedadora y, de este modo, se replican junto con el genoma del hospedador.

La expresión “célula hospedadora” hace referencia a una célula en la que se ha introducido un vector de expresión. Las células hospedadoras pueden incluir células bacterianas, microbianas, vegetales o animales. Las bacterias, que son susceptibles a la transformación, incluyen miembros de las enterobacteriáceas, tales como cepas de *Escherichia coli* o *Salmonella*; baciláceas, tales como *Bacillus subtilis*; *Pneumococcus*; *Streptococcus* y *Haemophilus influenzae*. Los microbios adecuados incluyen *Saccharomyces cerevisiae* y *Pichia pastoris*. Las líneas de células hospedadoras animales adecuadas incluyen células CHO (líneas de ovario de hámster chino) y NS0.

Los términos “tratar”, “que trata” y “tratamiento” hacen referencia a medidas terapéuticas o preventivas descritas en la presente memoria. El uso del anticuerpo para “tratamiento” emplea la administración a un sujeto que necesite dicho tratamiento, del anticuerpo divulgado en la presente memoria, por ejemplo un sujeto que tiene un trastorno mediado por ALK o un sujeto que, en última instancia, pueda adquirir dicho trastorno, con el fin de prevenir, curar, retrasar, reducir la gravedad de o mejorar uno o más síntomas del trastorno o trastorno recurrente o con el fin de prolongar la supervivencia de un sujeto más allá de lo esperado en ausencia de dicho tratamiento.

La expresión “trastorno mediado por ALK” se refiere a estados patológicos y/o síntomas asociados con cánceres o tumores mediados por ALK. En general, la expresión “trastorno mediado por ALK” hace referencia a cualquier trastorno cuyo inicio, progresión o persistencia de los síntomas requiere de la participación de ALK. Los trastornos mediados por ALK ilustrativos incluyen, pero sin limitación, por ejemplo, cáncer, en particular glioblastoma.

La expresión “dosis eficaz” o “dosificación eficaz” se refiere a una cantidad suficiente para conseguir o al menos conseguir parcialmente el efecto deseado. La expresión “dosis terapéuticamente eficaz” se define como una cantidad suficiente para curar o al menos detener parcialmente la enfermedad y sus complicaciones en un paciente que ya padece la enfermedad. Las cantidades eficaces para este uso dependerán de la gravedad del trastorno que se esté tratando y del estado general de sistema inmunológico del propio paciente.

El término “sujeto” se refiere a cualquier ser humano o animal no humano. Por ejemplo, los métodos y composiciones de la presente invención se pueden usar para tratar a un sujeto con cáncer, *por ejemplo* glioblastoma.

A menos que se defina otra cosa, todos los términos técnicos y científicos usados en la presente memoria tienen el mismo significado entendido habitualmente por un experto en la técnica a la que pertenece esta invención.

Varios aspectos de la invención se describen con más detalle en las subsecciones siguientes. Se entiende que las diversas realizaciones, preferencias e intervalos se pueden combinar a voluntad. Además, en función de la realización específica, las definiciones, realizaciones o intervalos determinados pueden no ser de aplicación.

En un primer aspecto, se proporciona un anticuerpo que se une a la proteína ALK humana, comprendiendo dicho anticuerpo una CDR3 de cadena pesada variable de SEC ID N.º: 2.

El anticuerpo se une específicamente a la proteína ALK humana, es decir, no se une a la proteína ALK de ratón, cuyo sitio de unión a PTN difiere en únicamente 2 restos de aminoácidos en comparación con el sitio de unión a PTN (SEC ID N.º: 1) de la proteína ALK humana. La isoleucina humana en la posición 3 es una valina y el aspartato es una alanina en la correspondiente secuencia de ratón.

El anticuerpo es un scFv.

La cadena pesada y la cadena ligera están compuestas por secuencias de regiones marco conservadas, comprendiendo cada una tres CDR, CDR1, CDR2 y CDR3, que están implicadas principalmente en la unión al antígeno. El anticuerpo divulgado en la presente memoria comprende el dominio VH de tipo H3 y un dominio VL del tipo lambda 1.

La región marco conservada de VH y VL del anticuerpo de la presente invención es estable y soluble para que sea funcional en un ambiente reductor intracelular. Preferiblemente, es la región marco conservada 4.4. que anteriormente se ha aislado mediante un sistema de exploración en levaduras conocido como el “sistema de control de calidad” (Auf der Maur et al., 2001; Auf der Maur et al. 2004). La secuencia de la región marco conservada se puede deducir a partir, por ejemplo, de la SEC ID N.º: 20 (véase más adelante), donde las porciones de la región marco conservada están representadas por letras rectas no subrayadas, mientras que las secuencias de CDR están subrayadas y la secuencia enlazante está en cursiva.

El anticuerpo divulgado en la presente memoria es capaz de unirse a un epítipo peptídico de ALK de 16 aminoácidos de SEC ID N.º: 1. Esta secuencia también se cita como sitio de unión a PTN y es una secuencia única en todo el genoma humano. La secuencia correspondiente de ratón varía en 2 de 16 aminoácidos, es decir V en la posición 3 y A en la posición 7 en lugar de I o D, respectivamente. Preferiblemente, el anticuerpo divulgado en la presente memoria se une a ALK humana pero no de ratón, es decir, es específico para la proteína humana. El epítipo de ALK que comprende aproximadamente los restos 391-406 o que comprende estos restos

está adecuado de forma única para seleccionar un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno que puede unirse específicamente a ALK y bloquear o inhibir la actividad mediada por ALK. Este epítipo también es adecuado para seleccionar o producir anticuerpos que bloquean específicamente la actividad de ALK. El anticuerpo divulgado en la presente memoria tiene una afinidad por el epítipo peptídico de ALK con una K_d de 10 nM o menor.

El anticuerpo comprende una CDR3 de la cadena ligera variable de SEC ID N.º: 3. De nuevo, este anticuerpo se une a un epítipo peptídico de ALK de 16 aminoácidos de SEC ID N.º: 1. Asimismo, el anticuerpo tiene una afinidad por el epítipo peptídico de ALK con una K_d de menos de 10 nM, preferiblemente de menos de 7 nM.

El anticuerpo comprende una secuencia de VH de SEC ID N.º: 4 y una secuencia de VL de SEC ID N.º: 5. Adicionalmente, puede comprender al menos una mutación en al menos una de las CDR que da como resultado una mayor afinidad caracterizada por una K_d de menos de aproximadamente 3 nM. Dicha al menos una mutación se encuentra, preferiblemente, en la CDR1 o la CDR2 de VH y/o VL, con máxima preferencia en la CDR2 de VH.

El anticuerpo de la presente invención comprende una secuencia de VH de SEC ID N.º: 4 y una secuencia de VL de SEC ID N.º: 5. En los anticuerpos scFv, la estructura del dominio puede ser NH_2 -VL-enlazador-VH-COOH o NH_2 -VH-enlazador-VL-COOH; preferiblemente, el enlazador tiene la secuencia de SEC ID N.º: 16. Como alternativa, las regiones variables representadas por las SEC ID N.º: 4 y 5 pueden modificarse en un anticuerpo de longitud completa, por ejemplo, IgG o IgM. Las regiones constantes adecuadas para combinar con las regiones variables de la invención se conocen en la técnica.

También se divulga el uso del anticuerpo o derivado de anticuerpo como medicamento o como herramienta diagnóstica. Preferiblemente, se prevé la producción de un medicamento para el tratamiento de cánceres o tumores. Para este fin, puede radiomarcarse un anticuerpo usando radionúclidos o marcaje con metales radiactivos. Esto es particularmente valioso para dirigirse a tumores y para estudios de imagen y de biodistribución. Asimismo, la tecnología de ADN recombinante hace posible fusionar genéticamente regiones codificantes de genes V variables a dominios de toxinas modificados. Por ejemplo, una fusión scFv-toxina en donde el scFv es específico de una proteína marcadora tumoral puede dirigir la toxina al tumor, donde la toxina produce citotoxicidad. Dicha terapia dirigida da como resultado la concentración selectiva de agentes citotóxicos o radionúclidos en tumores y debería disminuir la toxicidad para los tejidos normales.

En una realización preferida de la presente invención, el anticuerpo se usa para un tratamiento de cánceres o tumores, preferiblemente neuroblastoma, glioblastoma, rhabdomyosarcoma, carcinoma de mama, melanoma, cáncer de páncreas, linfoma no Hodgkin de linfocitos B, carcinoma de tiroides, carcinoma de pulmón microcítico, retinoblastoma, sarcoma de Ewing, cáncer de próstata, cáncer de colon o cáncer de páncreas, preferiblemente glioblastoma, neuroblastoma y rhabdomyosarcoma. La expresión de ALK y la proteína se han detectado en muchos tumores de tejidos blandos (Li et al., 2004). ALK de longitud completa se ha encontrado en estos tumores humanos. Además, el anticuerpo se usa, preferiblemente, para tratamientos locales. El más preferido es el tratamiento local del glioblastoma.

También se proporciona una secuencia de ADN que codifica el anticuerpo divulgado en la presente memoria. Un vector de expresión procariota adecuado para ESBA512 (SEC ID N.º: 19) es pTFT74 (véase la SEC ID N.º: 90 para la secuencia que incluye la secuencia codificante de ESBA512). En este, la secuencia codificante de ESBA512 está bajo el control del promotor de T7 y el producto génico recombinante se purifica normalmente sobre cuerpos de inclusión. Otro vector de expresión procariota preferido es pAK400, en donde la secuencia de ESBA512 se marca con his para purificación simplificada (véase la SEC ID N.º: 89 para la secuencia que incluye la secuencia codificante de ESBA512). El producto génico se secreta por la célula hospedadora en el periplasma.

Además, se proporciona un vector de expresión que comprende dicha secuencia de ADN y una célula hospedadora adecuada transformada con dicho vector de expresión. Preferiblemente, dicha célula hospedadora es una célula de E. coli.

Otro aspecto más es la producción del anticuerpo divulgado en la presente memoria, que comprende cultivar la célula hospedadora que está transformada con el vector de expresión para dicho anticuerpo, en condiciones que permiten la síntesis de dicho anticuerpo y recuperarlo de dicho cultivo.

Las secuencias divulgadas en la presente memoria son las siguientes:

SEC ID N.º: 1: GRIGRPDNPFRVALEY

Epítipo peptídico de ALK humana (aminoácidos 391-406 de la proteína ALK), los restos subrayados son diferentes en el homólogo de ratón.

SEC ID N.º: 2: RDAWLDLVLSDGFDY

CDR3 de VH de ESBA521. Los restos obtenidos después de la aleatorización están subrayados.

SEC ID N.º: 3: ATWDNDKWGVV

CDR3 de VL de ESBA521. Los restos obtenidos después de la aleatorización están subrayados.

5 SEC ID N.º: 4:

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSAISGSGGSTYYADSVKGRFTISRDN
SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDAWLDVLSDFDYWGQGTLVTVSS

10 VH de ESBA521. Las CDR están subrayadas.

SEC ID N.º: 5:

15 QSVLTQPPSVSAAPGQKVTISCSSGSTSNIGDNYVSWYQQLPGTAPQLLIYDNTKRPSGIPDRFSGSKSGTSATLGIT
GLQTGDEADYYCATWDNDKWGVVFGGGTKLEVLG

VL de ESBA521. Las CDR están subrayadas.

SEC ID N.º: 6:

20 AISGSGGSTYYADSVKG

CDR 2 de VH de ESBA521

25 SEC ID N.º: 7:

AINMKGNDRIYADSVKG

CDR 2 de VH de scFv 265.1

30 SEC ID N.º: 8:

AIRTNKEYYADSVKG

35 CDR 2 de VH de scFv 43.2

SEC ID N.º: 9

AIKTDGNHKYYADSVKG

40 CDR 2 de VH de scFv 100.2

SEC ID N.º: 10:

45 RTDSKEQYYADSVKG

CDR 2 de VH de scFv 2.11

SEC ID N.º: 11:

50 ETSSGSTYYADSVKG

CDR 2 de VH de scFv 28.11

55 SEC ID N.º: 12:

NTGGGSTYYADSVKG

CDR 2 de VH de scFv 33.11

60 SEC ID N.º: 13:

NTRGQNEYADSVKG

65 CDR 2 de VH de scFv 4.12

SEC ID N.º: 16:

GGGSGGGSGGGSSGGGS

5 Enlazador que conecta VL y VH

SEC ID N.º: 17:

YYADSVKG

10 Mitad C-terminal de CDR2 de ESBA521 y sus derivados.

SEC ID N.º: 18:

15 DAGIAVAGTGFDY

CDR3 de VH de FW4.4

SEC ID N.º: 19:

20 QSVLTQPPSVSAAPGQKVTISCSGSTSNIGDNYVSWYQQLPGTAPQLLIYDNTKRPSGIPDRFSGSKSGTSATLGIT
GLQTGDEADYYCATWDNDKWGVVFGGGTKLEVLGGGGSGGGSGGGSSGGGSEVQLVESGGGLVQPGGS
LRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSAISGSGGSTYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTA
VYYCARDAWLDVLSGDFDYWGQGT LTVSS

25 scFv ESBA521, las CDR están subrayadas, el enlazador en cursiva

SEC ID N.º: 20:

30 QSVLTQPPSVSAAPGQKVTISCSGSTSNIGDNYVSWYQQLPGTAPQLLIYDNTKRPSGIPDRFSGSKSGTSATLGIT
GLQTGDEADYYCCTWDSSLSGVVFGGGTKLTVLGGGGSGGGSGGGSSGGGSEVQLVESGGGLVQPGGS
RLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSAISGSGGSTYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAV
YYCARDAGIAVAGTGFDYWGQGT LTVSS

35 FW4.4, las CDR están subrayadas, el enlazador en cursiva

SEC ID N.º: 21

40 cagtctgtgctgacgcagccgcccctcagtgtctcgccccaggacagaaggtcaccatctcctgctccggaagcacctccaacattggcgataattatgtatcctggtacca
acaactcccagggaacagcccccaactcctcattatgacaataactaaacgacctcagggattcctgacgggttcttggtccaagtctggcagctcagccaccctgggca
tcacgggactccagactggggacgagggcgattattactgcgacactgggataatgataagtggggtgtggttttcggcgagggaaccaagctcgaggtcctaggt

Secuencia de ácido nucleico de VL de ESBA521

45 Las CDR están subrayadas.

SEC ID N.º: 22

50 gaggtgcagctggtggagtcgggggaggctgtgtacagcctggggggtccctgagactctcctgtgcagcctctggattcacctttgacagctatgccatgagct
gggtccgcccagggtccagggaaggggctggagtggtctcagctattagtggtggttagcacatactacgcagactccgtgaagggccgggtcaccatc
tcagagacaattccaagaacacgctgtatctgcaaatgaacagcctgagagccgaggacacggccgtatattactgcgcgctgctgctggttggtggtgctt
tcggatggcctttgactactggggccagggaaccctgtcaccgtctcctcg

Secuencia de ácido nucleico de VH de ESBA521

55 Las CDR están subrayadas.

SEC ID N.º: 23

60 cagtctgtgctgacgcagccgcccctcagtgtctcgccccaggacagaaggtcaccatctcctgctccggaagcacctccaacattggcgataattatgtatcctggtac
caacaactcccagggaacagcccccaactcctcattatgacaataactaaacgacctcagggattcctgacgggttcttggtccaagtctggcagctcagccaccct
gggcatcaccggactccagactggggacgagggcgattattactgcgacactgggataatgataagtggggtgtggttttcggcgagggaaccaagctcgaggtccta
ggtggtggtggtggttctggtggtggtggttctggcgccggcggtccagtggtggtggtcaggtgcagctggtggagtcgggggaggctgtgtacagcctggggg
gtccctgagactctcctgtgcagcctctggattcacctttgacagctatgccatgagctgggtccgcccagggtccagggaaggggctggagtggtctcagctattaggtg
65 agtggtggttagcacatactacgcagactccgtgaagggccgggtcaccatctcagagacaattccaagaacacgctgtatctgcaaatgaacagcctgagagccgag
gacacggccgtatattactgcgcgctgagctggtggtggtggttgccttcggatggcctttgactactggggccagggaaccctgtcaccgtctcctcg

Secuencia de ácido nucleico de ESBA521

Las CDR están subrayadas, el enlazador en cursiva

La invención se describe adicionalmente a continuación mediante ejemplos:

Materiales y métodos

En general, la práctica de la presente invención emplea, a menos que se indique lo contrario, técnicas convencionales de química, biología molecular, tecnología de ADN recombinante, inmunología (especialmente, *por ejemplo*, tecnología de anticuerpos) y técnicas estándar de preparación de polipéptidos. Véase, por ejemplo, Sambrook, Fritsch y Maniatis, *Molecular Cloning: Cold Spring Harbor Laboratory Press* (1989); *Antibody Engineering Protocols (Methods in Molecular Biology)*, 510, Paul, S., Humana Pr (1996); *Antibody Engineering: A Practical Approach* (Practical Approach Series, 169), McCafferty, Ed., Irl Pr (1996); *Antibodies: A Laboratory Manual*, Harlow et al., C.S.H.L. Press, Pub. (1999); y *Current Protocols in Molecular Biology*, eds. Ausubel et al., John Wiley & Sons (1992).

Experimento 1: Exploración para identificar scFv que se unen a Alk

En una gran cantidad de estudios estructurales sobre interacciones anticuerpo-antígeno se encontró que los restos en la región 3 determinante de la complementariedad (CDR-H3) de la cadena pesada generalmente contribuyen a los contactos más sustanciales con el antígeno (Chothia y Lesk, 1987; Chothia et al., 1985; Padlan, 1994). Los inventores han aplicado su tecnología de exploración de interacción antígeno-anticuerpo con dos híbridos de levadura descrita recientemente para aislar directamente los scFv de unión a antígeno mediante exploración de cuatro bibliotecas de scFv de secuencias de CDR-H3 sintéticas aleatorizadas (Auf der Maur et al., 2002). Las cuatro bibliotecas se basan en cuatro regiones marco conservadas de scFv humanas estables diferentes en las que se aleatorizaron 7 aminoácidos dentro del tercer bucle de CDR de la cadena pesada variable (VH-CDR3). Las partes aleatorizadas se introdujeron mediante técnicas de clonación de PCR estándar. Las bibliotecas de scFv se exploraron frente a un péptido de 16 aminoácidos derivados del dominio extracelular de la tirosina cinasa receptora humana cinasa de linfoma anaplásico (ALK) mediante un sistema de exploración de levaduras denominado "Control de calidad" (Auf der Maur et al., 2001; Auf der Maur et al., 2004). En resumen, la tecnología de control de calidad es un sistema de selección de intracuerpos independiente de antígeno para identificar a partir de un conjunto natural de regiones variables de cadenas pesada (VH) y ligera (VL) humanas aquellas combinaciones de VL y VH con propiedades biofísicas favorables, tales como estabilidad, solubilidad y rendimiento de expresión. Un aglutinante prometedor y específico de una de las cuatro bibliotecas de scFv se aisló después de la primera ronda de exploración. Este scFv concreto se derivó de la biblioteca de la región marco conservada FW4.4. FW4.4 (SEC ID N.º: 20) consiste en un dominio VL (λ 1) conectado mediante un enlazador flexible clásico de glicina-serina (GGGGS)₄ a un dominio VH3. La CDR3 de VH de FW4.4 comprende 13 aminoácidos (DAGIAVAGTGFDY; SEC ID N.º 18). Para construir la biblioteca, la parte central de la CDR3 de VH (DAXXXXXXXXXGFDY) se aleatorizó mediante métodos de clonación de PCR estándar usando un oligonucleótido degradado. Los últimos dos restos (Asp y Tyr) se mantuvieron constantes debido a que su importancia estructural se demostró en muchos casos (Chothia y Lesk, 1987). Los restos restantes no se modificaron con el fin de mantener la complejidad de la biblioteca en dimensiones manejables. La biblioteca de scFv se clonó en un vector de expresión en levaduras (pLib1) como una fusión en C-terminal del dominio de activación transcripcional de Gal4 (Auf der Maur et al., 2002).

El dominio de unión a ligando (LBD) de Alk humana se eligió como antígeno para la detección de interacciones (Stoica et al., 2001). Este péptido de 16 aminoácidos se clonó en otro vector de expresión en levaduras (pBait1) como fusión en C-terminal a la proteína de unión al ADN LexA.

La cepa indicadora de levadura YDE173 (Auf der Maur et al., 2002) que contiene los genes indicadores *HIS3* y *lacZ* integrados de forma estable bajo el control de seis sitios de unión a LexA se transformó con el vector cebo que expresa el LBD de Alk fusionado a LexA junto con la biblioteca aleatoria de ScFv de CDR-H3 fusionada al dominio de activación de Gal4. Las células transformadas se seleccionaron en placas que carecían de histidina y que contenían 3-amino-triazol (3-AT) 2,5 mM, que es un inhibidor competitivo del producto génico de *HIS3*. Las colonias en crecimiento se recogieron durante un periodo de seis días y se aislaron los plásmidos de la biblioteca. Se transformó la misma cepa indicadora con los plásmidos rescatados para confirmar la activación génica dependiente de antígeno. Se realizó un ensayo de β -galactosidasa líquida cuantitativo para medir la fuerza de la unión entre el LBD de Alk, es decir el péptido de ALK de 16 aminoácidos, y el scFv seleccionado. El scFv con la activación más alta de gen indicador también demostró mejor afinidad (~31 nM) para el péptido del LBD de Alk en el ELISA (datos no mostrados).

Las secuencias de otras secuencias de CDR3 de VH en las que se identificó que contribuían a la unión a ALK se proporcionan más adelante en la Tabla 1a.

Clon	CDR3 de VH (restos mutados)
FW4.4 TS	DAGIAVAGTGFDY (SEC ID N.º: 24)
H5 SH 2.1	DAKFMSDGIGFDY (SEC ID N.º: 25)
H5 SH 4.1	DAWGWTLISGFDY (SEC ID N.º: 26)
H5 SH 5.1	DAAYMIRYEGFDY (SEC ID N.º: 27)
H5 SH 2.3	DAWIYWAREGFDY (SEC ID N.º: 28)
H5 SH 3.3	DACMTYSREGFDY (SEC ID N.º: 29)
H5 SH 5.3	DAWLDVLSGFDY (SEC ID N.º: 30)
H5 SH 14.3	DAPSVNDREGFDY (SEC ID N.º: 31)

- 5 Las secuencias de otras regiones marco conservadas adecuadas se proporcionan a continuación en la Tabla 1b.

FW	Secuencia
5.2	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQTLTHYLAWYQQKPGQAPRLIYDTSKRATGTPARFSGSGSGTD FTLTISSELPEDSALYYCQQRNSWPHTFGGGTKLEIKRGGGGGSGGGGSGGGGSSGGGSEVQLVESG GGVAQPGGSLRVSCAASGFSFSYAMQWVRQAPGKGLEWVAVISNDGRIEHYADAVRGRFTISRDNISQ NTVFLQMNSLRSDDTALYYCAREIGATGYLDNWGGQTLTVSS (SEC ID N.º: 15)

Experimento 2: Maduración por afinidad

- 10 Con el fin de obtener un scFv con afinidad más alta, este aglutinante primario se sometió a un proceso de maduración de la afinidad adicional mediante mutagénesis y una segunda ronda de exploración en levaduras. Permitiendo la maduración por afinidad, el nivel de expresión de la proteína de fusión LexA-péptido de LBD de Alk se redujo con el fin de disminuir la activación del gen indicador dirigida por la interacción del aglutinante primario con el péptido LBD de Alk. El promotor fuerte de actina en el vector pBait1 se intercambió con la versión truncada y por
- 15 tanto menos activa del promotor de ADH (alcohol deshidrogenasa) dando como resultado pBait3. Esta reducción del nivel de expresión del cebo en presencia del aglutinante primario fue suficiente para inhibir el crecimiento en las placas que carecían de histidina y que contenían 3-AT 5 mM. La mutagénesis del aglutinante primario para la maduración por afinidad se consiguió mediante aleatorización de partes de la CDR3 dentro de la cadena ligera variable. Esto se realizó directamente en levaduras mediante recombinación de homólogos (Schaerer-Brodbeck y Barberis, 2004). La CDR3 de VL de FW4.4 comprende 11 aminoácidos (SEC ID N.º: 14: GTWDSLSGVV). Las primeras dos posiciones se aleatorizaron parcialmente, de modo que la primera posición codifica Gly, Ala o Gln, y la segunda posición Thr, Ser o Ala. En las posiciones 5 a 8 en la CDR3 de VL se permitieron todos los restos de aminoácidos. Las posiciones restantes se mantuvieron constantes. La aleatorización se introdujo mediante PCR. El producto de PCR resultante tenía un tamaño de 356 pb y comprendía el casete de CDR aleatorizado con secuencias
- 20 de regiones marco conservadas de 267 pb cadena arriba y de 27 pb cadena abajo. Este producto es el denominado fragmento de PCR donante, que porta homologías con el vector diana. El vector diana es el plásmido de levaduras (pLib1) que codifica el aglutinante primario fusionado con el dominio de activación de Gal4. Con el fin de mejorar la eficiencia de la recombinación de homólogos y de excluir los falsos positivos en la posterior exploración, la CDR L3 en el vector diana se modificó ligeramente. Se introdujo un único sitio de restricción SacI en el medio de CDR3 de VL, lo que da lugar a un desplazamiento de fase en la parte que codifica scFv de la proteína de fusión y tiene como resultado una proteína truncada incapaz de unirse a LBD de Alk. Además, el sitio SacI permite la linealización del vector diana, que potencia la eficacia de la recombinación en levaduras.

- La exploración se inició mediante pretransformación de la cepa indicadora de levadura YDE173 con el plásmido (pBait3) que expresa LBD de Alk de LexA a partir del promotor de ADH truncado. Estas células de levadura pretransformadas se hicieron competentes de nuevo y se cotransformaron con el vector diana linealizado y con el fragmento donante de la PCR, que porta homologías cadena arriba y cadena abajo de la CDR3 de VL. Tras la recombinación de homólogos entre el producto de la PCR y el vector diana, la nueva secuencia de CDR3 de VL está integrada en el correspondiente sitio del vector diana. Como resultado neto de este evento, la CDR3 de VL primordial se intercambia con la CDR3 de VL aleatorizada. Esto permite la reconstitución de un plásmido circular que expresa una proteína de fusión completamente funcional con una nueva secuencia de CD3 de VL, que activará la expresión del gen indicador y permitirá el crecimiento sobre placas selectivas tras la interacción con el péptido LBD de Alk.

- Un total de 119 clones creció en placas selectivas durante un periodo de observación de 6 días. Se recogieron estos clones y los plásmidos de la biblioteca se aislaron y se volvieron a transformar en la misma cepa indicadora de levadura. Se realizó un ensayo de β galactosidasa líquida cuantitativo para medir la fuerza de la unión entre LBD de Alk (antígeno) y el scFv madurado por afinidad. También se ensayaron los 20 clones con la activación de *lacZ* más alta en ELISA con péptido LBD de Alk. El mejor candidato reveló una K_D de aproximadamente 7 nM (Fig. 3) y se denominó ESBA521.

Las secuencias de otras secuencias de CDR3 de VL identificadas como contribuyentes a la unión a ALK se proporcionan a continuación en la Tabla 1c.

clon	CDR 3 de VL
WT FW4.4	GTWDSSLGCVV (SEC ID N.º: 32)
5.3-9.1	AAWDSVKHGVV (SEC ID N.º: 33)
5.3-21.1	AAWDNSMRGVV (SEC ID N.º: 34)
5.3-22.1	AAWDTMRYGVV (SEC ID N.º: 35)
5.3-25.1	AAWDTRVGVV (SEC ID N.º: 36)
5.3-27.1	ASWDTMLKGVV (SEC ID N.º: 37)
5.3-28.1	ASWDTPTCGVV (SEC ID N.º: 38)
5.3-29.1	ATWDISRCGVV (SEC ID N.º: 39)
5.3-46.1	ATWDTVCAGVV (SEC ID N.º: 40)
5.3-53.1	ATWDVDVFGVV (SEC ID N.º: 41)
5.3-57.1	ATWDDVVGCVV (SEC ID N.º: 42)
5.3-86.1	AAWDSFYNGVV (SEC ID N.º: 43)
5.3-94.1	ASWDTLIEGVV (SEC ID N.º: 44)
5.3-107.1	ATWDNDKWGVV (SEC ID N.º: 45)
5.3-112.1	AAWDSTTCGVV (SEC ID N.º: 46)
5.3-113.1	ATWDMWMKGVV (SEC ID N.º: 47)
5.3-117.1	GTWDSSLGCVV (SEC ID N.º: 48)
5.3-118.1	AAWDWVLGGVV (SEC ID N.º: 49)
14.3-6.1	ATWDNPGQGVV (SEC ID N.º: 50)
14.3-7.1	ATWDDWVIGVV (SEC ID N.º: 51)
14.3-8.1	ASWDDQKWGVV (SEC ID N.º: 52)
14.3-9.1	ATWDTNRHGVV (SEC ID N.º: 53)
14.3-12.1	ASWDDLHIGVV (SEC ID N.º: 54)
14.3-13.1	ASWDEEAWGVV (SEC ID N.º: 55)
14.3-21.1	ATWDYIKIGVV (SEC ID N.º: 56)
14.3-48.1	ATWDTFERGVV (SEC ID N.º: 57)
14.3-49.1	ATWDSNLIGVV (SEC ID N.º: 58)
5.3-24.,1	ATWDNNTCGVV (SEC ID N.º: 59)
5.3-3.1	AAWDCCDINGVV (SEC ID N.º: 60)
5.3-8.1	ASWDSMKIGVV (SEC ID N.º: 61)
5.3-19.1	ATWDCTRAGVV (SEC ID N.º: 62)

5

Experimento 3: El scFv ESBA521 se une específicamente a la forma transmembrana de ALK humana

Con el fin de analizar si el scFV recién identificado era capaz también reconocer a la proteína ALK humana transmembrana sobre la superficie de células vivas, se realizaron experimentos de inmunotinción de células HELA transfectadas de forma transitoria. ESBA521 reacciona con la proteína ALK de un modo comparable al de un anticuerpo policlonal (Fig. 4). En un experimento de control, se demostró que la región marco conservada 4.4 de scFv no reacciona con ALK humana. Sorprendentemente, ESBA521 solo se une a la proteína ALK humana, pero no a la correspondiente proteína de ratón, aunque el péptido antigénico de ratón solo difiere en dos posiciones de aminoácidos con respecto a la secuencia peptídica humana. Por el contrario, el anticuerpo policlonal de ALK reconoce a la proteína humana y de ratón. Por tanto, la unión de ESBA521 es específica de la proteína ALK humana en la superficie celular.

15

Experimento 4: Aislamiento de aglutinantes mejorados mediante mutagénesis por PCR de la CDR2 de VH

Para mejorar adicionalmente la unión a antígeno, se usó ESBA521 como scFv de partida en un ciclo adicional de maduración por afinidad usando el mismo enfoque de dos híbridos, tal como se ha descrito para el primer ciclo de maduración por afinidad, salvo que en este caso, la CDR2 de VH se modificó mediante mutagénesis por PCR y se transformó en el receptor de levadura, en donde se efectúa la recombinación de homólogos en CDR2 de una forma análoga. De nuevo se introdujo un sitio de restricción en la CDR2 para permitir la linealización del plásmido diana. Las mutaciones introducidas en la CDR2 se proporcionan en la Tabla 2.

20

25

scFv (mejor funcionamiento)	CDR2 de VH (restos mutados)
TS (ESBA521)	AISGSGGSTYYADSVKG (SEC ID N.º: 63)
1.1	AI-KTDGQNYADSVKG (SEC ID N.º: 64)
17.1	AIRSDGNERYADSVKG (SEC ID N.º: 65)
35.1	AINNGNEKYYADSVKG (SEC ID N.º: 66)
64.1	AISTNGKERYADSVKG (SEC ID N.º: 67)
130.1	AIRTQSQEEYYADSVKG (SEC ID N.º: 68)
152.1	AIKRSQEQYYADSVKG (SEC ID N.º: 69)
167.1	AIKSHSQQYYADSVKG (SEC ID N.º: 70)
214.1	AINSEGQQRYYADSVKG (SEC ID N.º: 71)
225.1	AIKSKGQNKYYADSVKG (SEC ID N.º: 72)
262.1	AIRTNSEEKYYADSVKG (SEC ID N.º: 73)
265.1	AINMKGNDYYADSVKG (SEC ID N.º: 74)
43.2	AI-RTNSKEYADSVKG (SEC ID N.º: 75)
70.2	AIKTESQQRYYADSVKG (SEC ID N.º: 76)
99.2	AINSGKQDYYADSVKG (SEC ID N.º: 77)
100.2	AIKTDGNHKKYYADSVKG (SEC ID N.º: 78)
109.2	AIDTKGNGQYYADSVKG (SEC ID N.º: 79)
146.2	AIRSDSSHKKYYADSVKG (SEC ID N.º: 80)
173.2	AINTKSNEQYYADSVKG (SEC ID N.º: 81)
199.2	AIRTSKNSYYADSVKG (SEC ID N.º: 82)
2.11	AIRTSKEQYYADSVKG (SEC ID N.º: 83)
19.11	AIRTSKEEYYADSVKG (SEC ID N.º: 84)
28.11	AIETSSGSTYYADSVKG (SEC ID N.º: 85)
33.11	AINTGGGSTYYADSVKG (SEC ID N.º: 86)
4.12	AINTRGQNEYADSVKG (SEC ID N.º: 87)
6.12	AISTSG-STYYADSVKG (SEC ID N.º: 88)

Entre los scFv aislados obtenidos tras este procedimiento, siete resultaron tener una afinidad significativamente mejorada con una K_d en el intervalo de 2-3 nM (Fig. 5), siendo el mejor de ellos 28.11.

5

Experimento 5: Prevención del crecimiento tumoral tras la administración de anticuerpo anti-ALK

Se seleccionaron los progenitores del anticuerpo ESBA521 para unirse a los aminoácidos 391-406 de ALK, que comprende los aminoácidos (396-406) que se sabe que se unen a pleiotrofina (Stoica 2001). ESBA521 se obtuvo aleatorizando aminoácidos adicionales en las CDR de su progenitor y seleccionando aglutinantes que se unen al tramo de 391-406 aminoácidos contenido en su contexto natural del dominio extracelular de ALK (ECD). Estos procedimientos dieron como resultado un anticuerpo que se une al ECD de ALK con una afinidad elevada en el mismo sitio que se une a la PTN según lo que se conoce. Este es el primer anticuerpo monoclonal dirigido específicamente al sitio de unión a PTN de ALK. Por consiguiente, se predice que ESBA521 tiene una afinidad elevada con el ECD de ALK y compete de forma eficiente con pleiotrofina (PTN) y midkina (MK) por la unión al receptor de ALK y, por tanto, el anticuerpo ESBA521 es adecuado para inhibir la unión del ligando tanto MK como PTN a la proteína ALK.

Dado que ALK y sus ligandos están implicados en la neoplasia, la invasión tumoral y la angiogénesis, la inhibición de la interacción entre ALK y sus ligandos afines rompe la tumorigénesis mediada por ALK.

El efecto de ESBA521 sobre un tumor específico se puede determinar mediante los siguientes dos ensayos que se describen a continuación.

En un primer ensayo se preparan experimentos de xenoinjerto con el fin de determinar el papel limitante de la velocidad de crecimiento del cáncer de ALK (Powers 2002). En resumen, se preparó una suspensión celular de U87MG de 20 millones de células/ml en medio suplementado con suero bovino fetal al 10%. Estas se inyectan en ratones NU/NU y se miden los tumores resultantes. Se introducen los anticuerpos de ensayo, preferiblemente anticuerpos de longitud completa, más preferiblemente anticuerpos pegilados, y se evalúa el crecimiento del tumor.

Aunque se muestran y describen las realizaciones de la invención preferidas actualmente, debe entenderse claramente que la invención no está limitada a las mismas sino que, de otro modo, puede ilustrarse y ponerse en práctica de varias formas dentro del alcance de las reivindicaciones siguientes.

Referencias:

- 5 Auf der Maur, A., Escher, D., y Barberis, A. (2001). Antigen-independent selection of stable intracellular single-chain antibodies. *FEBS Lett* 508, 407-412.
- 10 Auf der Maur, A., Tissot, K., y Barberis, A. (2004). Antigen-independent selection of intracellular stable antibody frameworks. *Methods* 34, 215-224.
- 15 Auf der Maur, A., et al., Direct in vivo screening of intrabody libraries constructed on a highly stable single-chain framework. *J Biol Chem*, 277(47): p. 45075-85, 2002.
- 20 Bai RY. et al. Nucleophosmin-anaplastic lymphoma kinase associated with anaplastic large-cell lymphoma activates the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt antiapoptotic signalling pathway. *Blood* 96(13), 4319-4327, 2000.
- 25 Bowden et al. Anti-apoptotic signaling of pleiotrophin through its receptor, anaplastic lymphoma kinase. *The Journal of Biological Chemistry* 277(39), 35862-35868, 2002.
- 30 Chothia, C. y Lesk, A. M. (1987). Canonical structures for the hypervariable regions of immunoglobulins. *J. Mol. Biol.* 196, 901-917.
- 35 Chothia, C., Novotny, J., Brucoleri, R., y Karplus, M. (1985). Domain association in immunoglobulin molecules. The packing of variable domains. *J. Mol. Biol.* 186, 651-663.
- 40 Choudhuri et al., An Angiogenic Role for the Neurokines Midkine and Pleiotrophin in Tumorigenesis. *Cancer Res.* 57, 1814-1819, 1997.
- 45 Czubayko et al., Melanoma angiogenesis and metastasis modulated by ribozyme targeting of the secreted growth factor pleiotrophin. *PNAS* 93, 14753-14758, 1996.
- 50 De Juan C. et al. Genomic organization of a novel glycosylphosphatidylinositol MAM gene expressed in human tissues and tumors. *Oncogene* 21, 3089-3094, 2002.
- 55 Delsol G. et al. A new subtype of large B-cell lymphoma expressing the ALK kinase and lacking the 2;5 translocation. *Blood* 89(5), 1483-1490, 1997.
- 60 Dirks WG. et al. Expression and functional analysis of the anaplastic lymphoma kinase (ALK) gene in tumor cell lines. *International Journal of cancer* 100, 49-56, 2002.
- 65 Duyster J. et al. Translocations involving anaplastic lymphoma kinase (ALK). *Oncogene* 20, 5623-5637, 2001.
- 70 Ergin M. et al. Inhibition of tyrosine kinase activity induces caspase-dependent apoptosis in anaplastic large cell lymphoma with NPM-ALK (p80) fusion protein. *Experimental Hematology* 29, 1082-1090, 2001.
- 75 Fang et al., Pleiotrophin stimulates fibroblasts and endothelial and epithelial cells and is expressed in human cancer. *JBC* vol. 267 p. 25889, 1992.
- 80 Fiorani C. et al. Primary systemic anaplastic large-cell lymphoma (CD30+): advances in biology and current therapeutic approaches. *Clinical Lymphoma* 2(1), 29-37, 2001.
- 85 Iwahara T. et al. Molecular characterization of ALK, a receptor tyrosine kinase expressed specifically in the nervous system. *Oncogene* 14, 439-449, 1997.
- 90 Kutok JL. y Aster JC. Molecular biology of anaplastic lymphoma kinase-positive anaplastic large-cell lymphoma. *Journal of Clinical Oncology* 20(17), 3691-3702, 2002.
- 95 Ladanyi M. Aberrant ALK tyrosine kinase signalling. Different cellular lineages, common oncogenic mechanisms? *American Journal of Pathology* 157(2), 341-345, 2000.
- 100 Lamant et al. Expression of the ALK tyrosine kinase gene in neuroblastoma. *Am. J. Pathol.* 156, 1711-1721, 2000.
- 105 Li, X.-Q., Hisaoka, M., Shi, D.-R., Zhu, X.-Z., y Hashimoto, H. Expression of Anaplastic Lymphoma Kinase in soft tissue tumors: an immunohistochemical and molecular study of 249 cases. *Human pathology* 35, 711—721, 2004.
- 110 Loren CE. et al. Identification and characterization of Dalk: a novel *Drosophila melanogaster* RTK which drives ERK activation in vivo. *Genes to cells* 6(6), 531-544, 2001.

- Miyake I. et al. Activation of anaplastic lymphoma kinase is responsible for hyperphosphorylation of ShcC in neuroblastoma cell lines. *Oncogene* 21, 5823-5834, 2002.
- 5 Morris SW. et al. ALK, the chromosome 2 gene locus altered by the t(2;5) in non-Hodgkin's lymphoma, encodes a novel neural receptor tyrosine kinase that is highly related to leukocyte tyrosine kinase (LTK). *Oncogene* 14, 2175-2188, 1997.
- Morris SW. et al. ALK+CD30+ lymphomas: A distinct molecular genetic subtype of non-Hodgkin's lymphoma. *British Journal of Haematology* 113, 275-295, 2001.
- 10 O'Brien et al., The angiogenic factor midkine is expressed in bladder cancer and overexpression correlates with a poor outcome in patients with invasive cancer. *Cancer Res.* 56, 2515-2518, 1996.
- Padlan, E. A. (1994). Anatomy of the antibody molecule. *Mol Immunol* 31, 169-217.
- 15 Powers C. et al. Pleiotrophin signalling through anaplastic lymphoma kinase is rate-limiting for glioblastoma growth. *The Journal of biological chemistry* 277(16), 14153-14158, 2002.
- Pulford K. et al. Anaplastic lymphoma kinase proteins and malignancy. *Current Opinion in Hematology* 81, 231-236, 2001.
- 20 Pulford K. et al. Anaplastic lymphoma kinase proteins in growth control and cancer. *J Cell Physiol* 199, 330-358, 2004.
- Schaerer-Brodbeck, C. y A. Barberis, Coupling homologous recombination with growth selection in yeast: a tool for construction of random DNA sequence libraries. *Biotechniques*, 37(2): p. 202-206, 2004.
- 25 Stoica GE. et al. Identification of anaplastic lymphoma kinase as a receptor for the growth factor pleiotrophin. *The Journal of Biological Chemistry* 276(20), 16772-16779, 2001.
- Stoica GE. et al. Midkine binds to anaplastic lymphoma kinase (ALK) and acts as a growth factor for different cell types. *The Journal of Biological Chemistry* 277 (39), 35990-35998, 2002.
- 30 Weber D. et al. Pleiotrophin can be rate-limiting for pancreatic cancer cell growth. *Cancer Research* 60, 5284-5288, 2000.
- Wellstein et al., A Heparin-binding Growth Factor Secreted from Breast Cancer Cells Homologous to a Developmentally Regulated Cytokine. *JBC Vol* 267, p2582, 1992.
- 35 SWISSPROT: www.expasy.org www.emedicine.com/med/topic2692.htm (glioblastoma)
www.emedicine.com/MED/topic3205.htm (ALCL)

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> ESBATech AG

5 <120> Anticuerpos que se unen al dominio extracelular del receptor
Tirosina cinasa ALK

<130> P100661PC

10 <150> US 60/795,831
<151> 2006-04-28

<160> 91

15 <170> PatentIn versión 3.3

<210> 1
<211> 16
<212> PRT

20 <213> Homo sapiens

<400> 1

Gly Arg Ile Gly Arg Pro Asp Asn Pro Phe Arg Val Ala Leu Glu Tyr

25 1 5 10 15

<210> 2
<211> 14
<212> PRT

30 <213> Artificial

<220>
<223> CDR3 de la región variable de la cadena pesada de ESBA512

35 <400> 2

Arg Asp Ala Trp Leu Asp Val Leu Ser Asp Gly Phe Asp Tyr

40 1 5 10

<210> 3
<211> 11
<212> PRT

45 <213> Artificial

<220>
<223> CDR3 de la región variable de la cadena ligera de ESBA512

50 <400> 3

Ala Thr Trp Asp Asn Asp Lys Trp Gly Val Val

55 1 5 10

<210> 4
<211> 122
<212> PRT

60 <213> Artificial

<220>
<223> Región variable de la cadena pesada de ESBA512

65

ES 2 547 248 T3

<400> 4

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

5

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

10

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

15

Ser Ala Ile Ser Gly Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

20

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

25

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

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

30

Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

35

<210> 5
<211> 111
<212> PRT
<213> Artificial

40

<220>
<223> Región variable de la cadena ligera de ESBA512

<400> 5

45

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

50

Lys Val Thr Ile Ser Cys Ser Gly Ser Thr Ser Asn Ile Gly Asp Asn
20 25 30

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

55

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

60

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

65

Thr Gly Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ala Thr Trp Asp Asn Asp Lys
85 90 95

Trp Gly Val Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Val Leu Gly
 100 105 110
 5
 <210> 6
 <211> 17
 <212> PRT
 10 <213> Artificial
 <220>
 <223> CDR2 de la región variable de la cadena pesada de ESBA512
 15 <400> 6
 Ala Ile Ser Gly Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys
 1 5 10 15
 20 Gly
 25 <210> 7
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Artificial
 30 <220>
 <223> CDR2 de la región variable de la cadena pesada de scFv 265.1
 <400> 7
 35 Ala Ile Asn Met Lys Gly Asn Asp Arg Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Gly
 1 5 10 15
 40 Lys
 45 <210> 8
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 <223> CDR2 de la región variable de la cadena pesada de scFv 43.2
 50 <400> 8
 Ala Ile Arg Thr Asn Ser Lys Glu Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly
 1 5 10 15
 55 <210> 9
 <211> 17
 <212> PRT
 60 <213> Artificial
 <220>
 <223> CDR2 de la región variable de la cadena pesada de scFv 100.2
 65

<400> 9

Ala Ile Lys Thr Asp Gly Asn His Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys
 1 5 10 15

5 Gly

10 <210> 10
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Artificial

15 <220>
 <223> CDR2 de la región variable de la cadena pesada de scFv 2.11

20 <400> 10

Arg Thr Asp Ser Lys Glu Gln Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly
 1 5 10 15

25 <210> 11
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Artificial

30 <220>
 <223> CDR2 de la región variable de la cadena pesada de scFv 28.11

<400> 11

35 Glu Thr Ser Ser Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly
 1 5 10 15

40 <210> 12
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>

45 <223> CDR2 de la región variable de la cadena pesada de scFv 33.11

<400> 12

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

50 <210> 13
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>

55 <223> CDR2 de la región variable de la cadena pesada de scFv 4.12

60 <400> 13

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

65

<210> 14
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Artificial
 5
 <220>
 <223> CDR3 de la región variable de la cadena ligera de la sección de marco 4.4
 <400> 14
 10
 Gly Thr Trp Asp Ser Ser Leu Ser Gly Val Val
 1 5 10
 15
 <210> 15
 <211> 248
 <212> PRT
 <213> Artificial
 20
 <220>
 <223> secuencia de la sección de marco 5.2
 <400> 15
 25
 Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
 1 5 10 15
 30
 Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Thr Leu Thr His Tyr
 20 25 30
 35
 Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile
 35 40 45
 40
 Tyr Asp Thr Ser Lys Arg Ala Thr Gly Thr Pro Ala Arg Phe Ser Gly
 50 55 60
 45
 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro
 65 70 75 80
 50
 Glu Asp Ser Ala Leu Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Asn Ser Trp Pro His
 85 90 95
 55
 Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Gly Gly Gly Gly
 100 105 110
 60
 Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Ser Gly Gly Gly
 115 120 125
 65
 Ser Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Ala Gln Pro Gly
 130 135 140
 70
 Gly Ser Leu Arg Val Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Ser Phe Ser Ser
 145 150 155 160
 75
 Tyr Ala Met Gln Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp
 165 170 175

ES 2 547 248 T3

Val Ala Val Ile Ser Asn Asp Gly Arg Ile Glu His Tyr Ala Asp Ala
 180 185 190
 5

Val Arg Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Gln Asn Thr Val
 195 200 205
 10

Phe Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Leu Tyr Tyr
 210 215 220
 15

Cys Ala Arg Glu Ile Gly Ala Thr Gly Tyr Leu Asp Asn Trp Gly Gln
 225 230 235 240
 20

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 245
 25

<210> 16
 <211> 20
 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 <223> Enlazador que conecta VH y VL en ESBA512
 30

<400> 16
 Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Ser
 1 5 10 15
 35

Gly Gly Gly Ser
 20
 40

<210> 17
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Artificial
 45

<220>
 <223> Mitad C-terminal de CDR2 de ESBA521 y sus derivados.
 <400> 17
 50

Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly
 1 5
 55

<210> 18
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> Artificial
 60

<220>
 <223> CDR3 de la secuencia variable de la cadena pesada de la sección de marco 4.4
 <400> 18
 65

Asp Ala Gly Ile Ala Val Ala Gly Thr Gly Phe Asp Tyr
 1 5 10

<210> 19
 <211> 253
 5 <212> PRT
 <213> Artificial

 <220>
 <223> Fragmento de anticuerpo de cadena sencilla ESBA512
 10
 <400> 19

 Gln Ser Val Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Ala Ala Pro Gly Gln
 1 5 10 15
 15
 Lys Val Thr Ile Ser Cys Ser Gly Ser Thr Ser Asn Ile Gly Asp Asn
 20 25 30
 20
 Tyr Val Ser Trp Tyr Gln Gln Leu Pro Gly Thr Ala Pro Gln Leu Leu
 35 40 45
 25
 Ile Tyr Asp Asn Thr Lys Arg Pro Ser Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser
 50 55 60
 30
 Gly Ser Lys Ser Gly Thr Ser Ala Thr Leu Gly Ile Thr Gly Leu Gln
 65 70 75 80
 35
 Thr Gly Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ala Thr Trp Asp Asn Asp Lys
 85 90 95
 40
 Trp Gly Val Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Val Leu Gly Gly
 100 105 110
 45
 Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Ser Gly
 115 120 125
 50
 Gly Gly Ser Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln
 130 135 140
 55
 Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe
 145 150 155 160
 60
 Ser Ser Tyr Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu
 165 170 175
 65
 Glu Trp Val Ser Ala Ile Ser Gly Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala
 180 185 190
 70
 Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn
 195 200 205
 75
 Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val
 210 215 220

Tyr Tyr Cys Ala Arg Asp Ala Trp Leu Asp Val Leu Ser Asp Gly Phe
 225 230 235 240
 5
 Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 245 250
 10
 <210> 20
 <211> 253
 <212> PRT
 <213> Artificial
 15
 <220>
 <223> scFv sirviendo como sección de marco
 <400> 20
 20
 Gln Ser Val Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Ala Ala Pro Gly Gln
 1 5 10 15
 25
 Lys Val Thr Ile Ser Cys Ser Gly Ser Thr Ser Asn Ile Gly Asp Asn
 20 25 30
 30
 Tyr Val Ser Trp Tyr Gln Gln Leu Pro Gly Thr Ala Pro Gln Leu Leu
 35 40 45
 35
 Ile Tyr Asp Asn Thr Lys Arg Pro Ser Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser
 50 55 60
 40
 Gly Ser Lys Ser Gly Thr Ser Ala Thr Leu Gly Ile Thr Gly Leu Gln
 65 70 75 80
 45
 Thr Gly Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gly Thr Trp Asp Ser Ser Leu
 85 90 95
 50
 Ser Gly Val Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly Gly
 100 105 110
 55
 Gly Gly Ser Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln
 130 135 140
 60
 Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe
 145 150 155 160
 65
 Ser Ser Tyr Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu
 165 170 175
 70
 Glu Trp Val Ser Ala Ile Ser Gly Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala
 180 185 190

ES 2 547 248 T3

5	Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn 195 200 205	
10	Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val 210 215 220	
15	Tyr Tyr Cys Ala Arg Asp Ala Gly Ile Ala Val Ala Gly Thr Gly Phe 225 230 235 240	
20	Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser 245 250	
25	<210> 21 <211> 333 <212> ADN <213> Artificial <220> <223> Región variable de la cadena ligera de ESBA512 <400> 21 cagtctgtgc tgacgcagcc gccctcagtg tctgcggccc caggacagaa ggtcaccatc 60	
30	tcctgtctccg gaagcacctc caacattggc gataattatg tatcctggta ccaacaactc 120 ccaggaacag ccccccaact cctcatttat gacaatacta aacgaccctc agggattcct 180	
35	gaccggttct ctggctccaa gtctggcacg tcagccaccc tgggcatcac cggactccag 240 actggggacg agggcgatta ttactgcgcg acctgggata atgataagtg ggggtgtggt 300 ttcggcggag ggaccaagct cgaggtccta ggt 333	
40	<210> 22 <211> 366 <212> ADN <213> Artificial	
45	<220> <223> Región variable de la cadena pesada de ESBA512 <400> 22	
50	gaggtgcagc tggtagagtc cgggggaggc ttgtacagc ctggggggtc cctgagactc 60 tcctgtgcag cctctggatt caccttagc agctatgcca tgagctgggt ccgccaggct 120	
55	ccagggaagg ggctggagtg ggtctcagct attagtggta gtggtgtag cacatactac 180 gcagactccg tgaagggccg gttcaccatc tccagagaca attccaagaa cacgtgtat 240 ctgcaaatga acagcctgag agccgaggac acggccgtat attactgcgc gcgtgatgcg 300	
60	tgggtgatg tgctttcgga tggctttgac tactggggcc aggaaccct ggtcaccgtc 360 tcctcg 366	
65	<210> 23 <211> 759	

<212> ADN
<213> Artificial

<220>
5 <223> Anticuerpo de cadena sencilla

<400> 23
cagtctgtgc tgacgcagcc gccctcagtg tctgcggccc caggacagaa ggtcaccatc 60
10 tctgtctccg gaagcacctc caacattggc gataattatg tatcctggta ccaacaactc 120
ccaggaacag cccccaact cctcatttat gacaatacta aacgaccctc agggattcct 180
gaccggttct ctggctcaa gtctggcacg tcagccaccc tgggcatcac cggactccag 240
15 actggggacg aggccgatta ttactgcgcg acctgggata atgataagtg ggggtggtt 300
ttcggcggag ggaccaagct cgaggctcta ggtggtggtg gtggttctgg tgggtggtg 360
20 tctggcggcg gcggctccag tgggtggtga tccgaggtgc agctggtgga gtccggggga 420
ggcttggtac agcctggggg gtccctgaga ctctcctgtg cagcctctgg attcacctt 480
agcagctatg ccatgagctg ggtccgccag gctccaggga aggggctgga gtgggtctca 540
25 gctattagtg gtagtggtgg tagcacatac tacgcagact ccgtgaaggg ccggttcacc 600
atctccagag acaattcaa gaacacgctg tatctgcaa tgaacagcct gagagccgag 660
30 gacacggccg tatattactg cgcgcgtgat gcgtggttg atgtgcttc ggaaggctt 720
gactactggg gccaggaac cctggtcacc gtctcctc 759

35 <210> 24
<211> 13
<212> PRT
<213> Artificial

40 <220>
<223> CDR3 de la región variable de la cadena pesada de la sección de marco 4.4

<400> 24

45 Asp Ala Gly Ile Ala Val Ala Gly Thr Gly Phe Asp Tyr
1 5 10

50 <210> 25
<211> 13
<212> PRT
<213> Artificial

55 <220>
<223> CDR3 de la región variable de la cadena pesada de H5 SH 2.1

<400> 25

60 Asp Ala Lys Phe Met Ser Asp Gly Ile Gly Phe Asp Tyr
1 5 10

65 <210> 26
<211> 13
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
 <223> CDR3 de la región variable de la cadena pesada de H5 SH 4.1

5 <400> 26

Asp Ala Trp Gly Trp Thr Ile Leu Ser Gly Phe Asp Tyr
 1 5 10

10 <210> 27
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> Artificial

15 <220>
 <223> CDR3 de la región variable de la cadena pesada de H5 SH 5.1

20 <400> 27

Asp Ala Ala Tyr Met Ile Arg Tyr Glu Gly Phe Asp Tyr
 1 5 10

25 <210> 28
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> Artificial

30 <220>
 <223> CDR3 de la región variable de la cadena pesada de H5 SH 2.3

35 <400> 28

Asp Ala Trp Ile Tyr Trp Ala Arg Glu Gly Phe Asp Tyr
 1 5 10

40 <210> 29
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> Artificial

45 <220>
 <223> CDR3 de la región variable de la cadena pesada de H5 SH 3.3

50 <400> 29

Asp Ala Cys Met Thr Tyr Ser Arg Glu Gly Phe Asp Tyr
 1 5 10

55 <210> 30
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> Artificial

60 <220>
 <223> CDR3 de la región variable de la cadena pesada de H5 SH 5.3

65 <400> 30

Asp Ala Trp Leu Asp Val Leu Ser Asp Gly Phe Asp Tyr
 1 5 10

5 <210> 31
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 <223> CDR3 de la región variable de la cadena pesada de H5 SH 14.3
 <400> 31
 10 Asp Ala Pro Ser Val Asn Asp Arg Glu Gly Phe Asp Tyr
 1 5 10
 15 <210> 32
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Artificial
 20 <220>
 <223> CDR3 de la región variable de la cadena ligera de WT FW4.4
 <400> 32
 25 Gly Thr Trp Asp Ser Ser Leu Ser Gly Val Val
 1 5 10
 30 <210> 33
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Artificial
 35 <220>
 <223> CDR3 de la región variable de la cadena ligera de 5.3-9.1
 <400> 33
 40 Ala Ala Trp Asp Ser Val Lys His Gly Val Val
 1 5 10
 45 <210> 34
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Artificial
 50 <220>
 <223> CDR3 de la región variable de la cadena ligera de 5.3-21.1
 <400> 34
 55 Ala Ala Trp Asp Asn Ser Met Arg Gly Val Val
 1 5 10
 60 <210> 35
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 <223> CDR3 de la región variable de la cadena ligera de 5.3-22.1
 65 <400> 35

Ala Ala Trp Asp Thr Met Arg Tyr Gly Val Val
1 5 10

5 <210> 36
<211> 11
<212> PRT
<213> Artificial

10 <220>
<223> CDR3 de la región variable de la cadena ligera de 5.3-25.1
<400> 36

15 Ala Ala Trp Asp Thr Thr Arg Val Gly Val Val
1 5 10

20 <210> 37
<211> 11
<212> PRT
<213> Artificial

25 <220>
<223> CDR3 de la región variable de la cadena ligera de 5.3-27.1
<400> 37

30 Ala Ser Trp Asp Thr Met Leu Lys Gly Val Val
1 5 10

35 <210> 38
<211> 11
<212> PRT
<213> Artificial

40 <220>
<223> CDR3 de la región variable de la cadena ligera de 5.3-28.1
<400> 38

45 Ala Ser Trp Asp Thr Pro Thr Cys Gly Val Val
1 5 10

50 <210> 39
<211> 11
<212> PRT
<213> Artificial

55 <220>
<223> CDR3 de la región variable de la cadena ligera de 5.3-29.1
<400> 39

60 Ala Thr Trp Asp Ile Ser Arg Cys Gly Val Val
1 5 10

65 <210> 40
<211> 11
<212> PRT
<213> Artificial
<220>

<223> CDR3 de la región variable de la cadena ligera de 5.3-46.1
 <400> 40

5 Ala Thr Trp Asp Thr Val Cys Ala Gly Val Val
 1 5 10

10 <210> 41
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Artificial

15 <220>
 <223> CDR3 de la región variable de la cadena ligera de 5.3-53.1
 <400> 41

20 Ala Thr Trp Asp Val Asp Val Phe Gly Val Val
 1 5 10

25 <210> 42
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Artificial

30 <220>
 <223> CDR3 de la región variable de la cadena ligera de 5.3-57.1
 <400> 42

35 Ala Thr Trp Asp Asp Val Val Gly Gly Val Val
 1 5 10

40 <210> 43
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Artificial

45 <220>
 <223> CDR3 de la región variable de la cadena ligera de 5.3-86.1
 <400> 43

50 Ala Ala Trp Asp Ser Phe Tyr Asn Gly Val Val
 1 5 10

55 <210> 44
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Artificial

60 <220>
 <223> CDR3 de la región variable de la cadena ligera de 5.3-94.1
 <400> 44

65 Ala Ser Trp Asp Thr Leu Ile Glu Gly Val Val
 1 5 10

65 <210> 45
 <211> 11

<212> PRT
 <213> Artificial

 <220>
 5 <223> CDR3 de la región variable de la cadena ligera de 5.3-107.1

 <400> 45

 Ala Thr Trp Asp Asn Asp Lys Trp Gly Val Val
 10 1 5 10

 <210> 46
 <211> 11
 15 <212> PRT
 <213> Artificial

 <220>
 20 <223> CDR3 de la región variable de la cadena ligera de 5.3-112.1

 <400> 46

 Ala Ala Trp Asp Ser Thr Thr Cys Gly Val Val
 25 1 5 10

 <210> 47
 <211> 11
 30 <212> PRT
 <213> Artificial

 <220>
 <223> CDR3 de la región variable de la cadena ligera de 5.3-113.1
 35 <400> 47

 Ala Thr Trp Asp Met Trp Met Lys Gly Val Val
 1 5 10
 40
 <210> 48
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Artificial
 45
 <220>
 <223> CDR3 de la región variable de la cadena ligera de 5.3-117.1

 <400> 48
 50
 Gly Thr Trp Asp Ser Ser Leu Ser Gly Val Val
 1 5 10

 55 <210> 49
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Artificial

 60 <220>
 <223> CDR3 de la región variable de la cadena ligera de 5.3-118.1

 <400> 49

 65 Ala Ala Trp Asp Trp Val Leu Gly Gly Val Val
 1 5 10

5 <210> 50
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Artificial

 10 <220>
 <223> CDR3 de la región variable de la cadena ligera de 14.3-6.1
 <400> 50

 Ala Thr Trp Asp Asn Pro Gly Gln Gly Val Val
 1 5 10
 15

 <210> 51
 <211> 11
 <212> PRT
 20 <213> Artificial

 <220>
 <223> CDR3 de la región variable de la cadena ligera de 14.3-7.1
 25 <400> 51

 Ala Thr Trp Asp Asp Trp Val Ile Gly Val Val
 1 5 10
 30
 <210> 52
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Artificial
 35
 <220>
 <223> CDR3 de la región variable de la cadena ligera de 14.3-8.1
 <400> 52
 40
 Ala Ser Trp Asp Asp Gln Lys Trp Gly Val Val
 1 5 10

 45 <210> 53
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Artificial

 50 <220>
 <223> CDR3 de la región variable de la cadena ligera de 14.3-9.1
 <400> 53

 55 Ala Thr Trp Asp Thr Asn Arg His Gly Val Val
 1 5 10

 60 <210> 54
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Artificial

 <220>
 65 <223> CDR3 de la región variable de la cadena ligera de 14.3-12.1

<400> 54

Ala Ser Trp Asp Asp Leu His Ile Gly Val Val
1 5 10

5

<210> 55
<211> 11
<212> PRT
10 <213> Artificial

<220>
<223> CDR3 de la región variable de la cadena ligera de 14.3-13.1

15 <400> 55

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

20

<210> 56
<211> 11
<212> PRT
25 <213> Artificial

<220>
<223> CDR3 de la región variable de la cadena ligera de 14.3-21.1

30 <400> 56

Ala Thr Trp Asp Tyr Ile Lys Ile Gly Val Val
1 5 10

35

<210> 57
<211> 11
<212> PRT
40 <213> Artificial

<220>
<223> CDR3 de la región variable de la cadena ligera de 14.3-48.1

<400> 57

45 Ala Thr Trp Asp Thr Phe Glu Arg Gly Val Val
1 5 10

50

<210> 58
<211> 11
<212> PRT
55 <213> Artificial

<220>
<223> CDR3 de la región variable de la cadena ligera de 14.3-49.1

<400> 58

60 Ala Thr Trp Asp Ser Asn Leu Ile Gly Val Val
1 5 10

65

<210> 59
<211> 11
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
 <223> CDR3 de la región variable de la cadena ligera de 5.3-24.,1
 5 <400> 59
 Ala Thr Trp Asp Asn Asn Thr Cys Gly Val Val
 1 5 10
 10
 <210> 60
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Artificial
 15
 <220>
 <223> CDR3 de la región variable de la cadena ligera de 5.3-3.1
 <400> 60
 20
 Ala Ala Trp Asp Cys Asp Ile Asn Gly Val Val
 1 5 10
 25
 <210> 61
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Artificial
 30
 <220>
 <223> CDR3 de la región variable de la cadena ligera de 5.3-8.1
 <400> 61
 35
 Ala Ser Trp Asp Ser Met Lys Ile Gly Val Val
 1 5 10
 40
 <210> 62
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 45 <223> CDR3 de la región variable de la cadena ligera de 5.3-19.1
 <400> 62
 Ala Thr Trp Asp Cys Thr Arg Ala Gly Val Val
 50 1 5 10
 <210> 63
 <211> 17
 55 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 <223> CDR2 de la región variable de la cadena pesada de scFv WT (ESBA521)
 60 <400> 63
 Ala Ile Ser Gly Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys
 1 5 10 15
 65

Gly

5 <210> 64
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Artificial

10 <220>
 <223> CDR2 de la región variable de la cadena pesada de scFv 1.1
 <400> 64

15 Ala Ile Lys Thr Asp Gly Gln Asn Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly
 1 5 10 15

20 <210> 65
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Artificial

25 <220>
 <223> CDR2 de la región variable de la cadena pesada de scFv 17.1
 <400> 65

30 Ala Ile Arg Ser Asp Gly Asn Glu Arg Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys
 1 5 10 15

Gly

35 <210> 66
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Artificial

40 <220>
 <223> CDR2 de la región variable de la cadena pesada de scFv 35.1
 <400> 66

45 Ala Ile Asn Thr Asn Gly Asn Glu Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys
 1 5 10 15

50 Gly

55 <210> 67
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Artificial

60 <220>
 <223> CDR2 de la región variable de la cadena pesada de scFv 64.1
 <400> 67

65 Ala Ile Ser Thr Asn Gly Lys Glu Arg Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys
 1 5 10 15

Gly

5

<210> 68
 <211> 17
 <212> PRT
 10 <213> Artificial

<220>
 <223> CDR2 de la región variable de la cadena pesada de scFv 130.1

15 <400> 68

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

20 Gly

25 <210> 69
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Artificial

30 <220>
 <223> CDR2 de la región variable de la cadena pesada de scFv 152.1

<400> 69

35 Ala Ile Lys Ser Arg Ser Gln Glu Gln Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys
 1 5 10 15

40 Gly

45 <210> 70
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 <223> CDR2 de la región variable de la cadena pesada de scFv 167.1

50 <400> 70

Ala Ile Lys Ser His Ser Gln Gln Gln Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys
 1 5 10 15

55 Gly

60 <210> 71
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Artificial

65 <220>

<223> CDR2 de la región variable de la cadena pesada de scFv 214.1

<400> 71

5 Ala Ile Asn Ser Glu Gly Gln Gln Arg Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys
1 5 10 15

Gly

10

<210> 72

<211> 17

15 <212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> CDR2 de la región variable de la cadena pesada de scFv 225.1

20

<400> 72

Ala Ile Lys Ser Lys Gly Gln Asn Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys
1 5 10 15

25

Gly

30

<210> 73

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial

35

<220>

<223> CDR2 de la región variable de la cadena pesada de scFv 262.1

<400> 73

40

Ala Ile Arg Thr Asn Ser Glu Glu Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys
1 5 10 15

45

Gly

<210> 74

50 <211> 17

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

55 <223> CDR2 de la región variable de la cadena pesada de scFv 265.1

<400> 74

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

60

Gly

65

<210> 75
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Artificial
 5
 <220>
 <223> CDR2 de la región variable de la cadena pesada de scFv 43.2
 <400> 75
 10
 Ala Ile Arg Thr Asn Ser Lys Glu Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly
 1 5 10 15
 15
 <210> 76
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Artificial
 20
 <220>
 <223> CDR2 de la región variable de la cadena pesada de scFv 70.2
 <400> 76
 25
 Ala Ile Lys Thr Glu Ser Gln Gln Arg Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys
 1 5 10 15
 30
 Gly
 35
 <210> 77
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Artificial
 40
 <220>
 <223> CDR2 de la región variable de la cadena pesada de scFv 99.2
 <400> 77
 45
 Ala Ile Asn Ser Asn Gly Lys Gln Asp Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys
 1 5 10 15
 50
 Gly
 55
 <210> 78
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Artificial
 60
 <220>
 <223> CDR2 de la región variable de la cadena pesada de scFv 100.2
 <400> 78
 65
 Ala Ile Lys Thr Asp Gly Asn His Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys
 1 5 10 15
 Gly

5 <210> 79
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Artificial

 10 <220>
 <223> CDR2 de la región variable de la cadena pesada de scFv 109.2
 <400> 79

 Ala Ile Asp Thr Lys Gly Asn Gly Gln Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys
 1 5 10 15

 15 Gly

 20
 <210> 80
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Artificial
 25
 <220>
 <223> CDR2 de la región variable de la cadena pesada de scFv 146.2
 <400> 80
 30
 Ala Ile Arg Ser Asp Ser Ser His Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys
 1 5 10 15

 35 Gly

 40
 <210> 81
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Artificial
 45
 <220>
 <223> CDR2 de la región variable de la cadena pesada de scFv 173.2
 <400> 81

 Ala Ile Asn Thr Lys Ser Asn Glu Gln Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys
 50 1 5 10 15

 Gly
 55
 <210> 82
 <211> 17
 <212> PRT
 60 <213> Artificial

 <220>
 <223> CDR2 de la región variable de la cadena pesada de scFv 199.2
 65 <400> 82

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

5 Gly

10 <210> 83
<211> 17
<212> PRT
<213> Artificial

15 <220>
<223> CDR2 de la región variable de la cadena pesada de scFv 2.11
<400> 83

20 Ala Ile Arg Thr Asp Ser Lys Glu Gln Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys
1 5 10 15

Gly

25

30 <210> 84
<211> 17
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> CDR2 de la región variable de la cadena pesada de scFv 19.11

35 <400> 84

Ala Ile Arg Thr Asn Ser Lys Glu Glu Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys
1 5 10 15

40 Gly

45 <210> 85
<211> 17
<212> PRT
<213> Artificial

50 <220>
<223> CDR2 de la región variable de la cadena pesada de scFv 28.11
<400> 85

55 Ala Ile Glu Thr Ser Ser Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys
1 5 10 15

Gly

60

65 <210> 86
<211> 17
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
 <223> CDR2 de la región variable de la cadena pesada de scFv 33.11

5 <400> 86

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

10 Gly

15 <210> 87
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Artificial

20 <220>
 <223> CDR2 de la región variable de la cadena pesada de scFv 4.12

<400> 87

25 Ala Ile Asn Thr Arg Gly Gln Asn Glu Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys
 1 5 10 15

Gly

30

<210> 88
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Artificial

35

<220>
 <223> CDR2 de la región variable de la cadena pesada de scFv 6.12

40 <400> 88

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

45

<210> 89
 <211> 2520
 <212> ADN
 <213> Artificial

50

<220>
 <223> vector de expresión pAK400 con la secuencia codificante ESBA521

55 <400> 89

accgcgacacc atcgaatggc gcaaaacctt tcgcggtatg gcatgatagc gcccggaaga 60

gagtcaattc aggggtgtga atgtgaaacc agtaacgtta tacgatgtcg cagagtatgc 120

60 cgggtgtctt tatcagaccg ttcccgct ggtgaaccag gccagccacg ttctgcgaa 180

aacgcgggaa aaagtggaag cggcgatggc ggagctgaat tacattcca accgcgtggc 240

acaacaactg gcgggcaaac agtcgttct gattggcgtt gccacctcca gtctggccct 300

65 gcacgcgccg tcgcaaattg tcgcggcgat taaatctcg gccgatcaac tgggtgccag 360

	cgtggtggtg tcgatggtag aacgaagcgg cgtgaagcc tgtaaagcgg cggtcacaa	420
5	tctctcgcg caacgcgtca gtgggctgat cattaactat ccgctggatg accaggatgc	480
	cattgctgtg gaagctgcct gcactaatgt tccggcggtta tttctgatg tctctgacca	540
	gacacccatc aacagtatta ttttctcca tgaagacggg acgcgactgg gcgtggagca	600
10	tctggtcgca ttgggtcacc agcaaatcgc gctgtagcg ggcccattaa gttctgtctc	660
	ggcgcgtctg cgtctggctg gctggcataa atatctcact cgcaatcaaa ttacgccgat	720
15	agcgaacagg gaaggcgact ggagtccat gtccggttt caacaaacca tgcaaatgct	780
	gaatgagggc atcgttccca ctgcgatgct ggttgccaac gatcagatgg cgctgggcgc	840
	aatgcgcgcc attaccgagt ccgggctcgc cgttggtgcg gacatctcgg tagtgggata	900
20	cgacgatacc gaagacagct catgttatat cccgccggtta accaccatca aacaggattt	960
	tcgcctgctg gggcaaacca gcgtggaccg ctgtctcaa ctctctcagg gccaggcggg	1020
25	gaagggcaat cagctgttgc ccgtctcact ggtgaaaaga aaaaccaccc tggcgcccaa	1080
	tacgcaaacc gcctctcccc gcgcgttggc cgattcatta atgcagctgg cagcacagg	1140
	ttcccgaact gaaagcgggc agtgagcggg acccgataaa agcggcttcc tgacaggagg	1200
30	ccgttttgtt ttgcagccca cctcaacgca attaatgtga gtagctcac tcattaggca	1260
	ccccaggctt tacactttat gcttccggct cgtatgttgt gtggaattgt gagcggataa	1320
35	caattcaca caggaaacag ctatgacat gattacgaat ttctagagaa ggagatatac	1380
	atatgaaata cctattgcct acggcagccg ctggattgtt attactcgcg gccagccgg	1440
	ccatggcgga ctacaaagac cagtctgtgc tgacgcagcc gccctcagtg tctcgggccc	1500
40	caggacagaa ggtcaccatc tctgctccg gaagcacctc caacattggc gataattatg	1560
	tatcttgga ccaacaactc ccaggaacag ccccccaact cctcatttat gacaatacta	1620
45	aacgacctc agggattcct gaccggttct ctggctcaa gtctggcacg tcagccaccc	1680
	tgggcatcac cggactccag actggggacg aggccgatta ttactgcgcg acctgggata	1740
	atgataagtg ggggtgtgtt ttcggcgag ggaccaagct cgaggctcta ggtggtggtg	1800
50	gtggttctgg tgggtgtgtt tctggcgcg gcggctccag tgggtgtgga tccgaggtgc	1860
	agctggtgga gtccggggga ggcttggtac agcctggggg gtccctgaga ctctcctgtg	1920
55	cagcctctgg attcacctt agcagctatg ccatgagctg ggtccgccag gctccaggga	1980
	aggggctgga gtgggtctca gctattatg gtagtggtg tagcacatac tacgcagact	2040
	ccgtgaaggg ccggttcacc atctccagag acaattcaa gaacacgctg tatctgcaaa	2100
60	tgaacagcct gagagccgag gacacggccg tataattactg cgcgcgtgat gcgtggttgg	2160
	atgtgcttgc ggatggctt gactactggg gccagggaac cctggtcacc gtctcctcgg	2220
65	cctcgggggc cgatcacat catcacatc attagtaagc ttgacctgtg aagtgaaaaa	2280
	tggcgacat tgtgcgacat tttttgtc tgccgtttac cgctactcgc tcacggatcc	2340

ES 2 547 248 T3

	ccacgcgccc tgtagcggcg cattaagcgc ggcgggtgtg gtggttacgc gcagcgtgac	2400
5	cgctacactt gccagcgcgc tagcgcgcgc tccttcgct ttctccctt cctttctgc	2460
	cacgttcgcc ggctttccc gtcaagctct aaatcggggc atcccttag ggtccgatt	2520
10	<210> 90 <211> 3319 <212> ADN <213> Artificial	
15	<220> <223> vector de expresión pTFT74 con la secuencia codificante ESBA521	
	<400> 90 acccgacacc atcgaaatta atacgactca ctataggag accacaacgg ttcccgaat	60
20	tgtgagcggg taacaataga aataatttg ttaacttta agaaggagat atatccatgg	120
	cgcagtctgt gctgacgcag ccgcccacg tgtctgcgc cccaggacag aaggtcacca	180
25	ttctctgctc cggaagcacc tccaacattg gcgataatta tgtatcttg taccaacaac	240
	tcccaggaac agcccccaa ctctcattt atgacaatac taaacgaccc tcagggattc	300
	ctgaccgggt ctctggctcc aagtctggca cgtcagccac cctgggcatc accggactcc	360
30	agactgggga cgaggccgat tattactgcg cgacctggga taatgataag tgggggtgtg	420
	tttcggcgg agggaccaag ctcgaggctc taggtgtgtg tgggtgttct ggtggtgtg	480
35	gttctggcgg cggcggtccc agtgggtgtg gatccgaggt gcagctgtg gagtccgggg	540
	gaggcttgtt acagcctggg gggccctga gactctctg tgcagcctt ggattcacct	600
	ttagcagcta tgccatgagc tgggtccgcc aggtccagg gaaggggctg gagggtgtt	660
40	cagctattag tgtagtgggt ggtagcacat actacgcaga ctccgtgaag gcccggtca	720
	ccatctccag agacaattcc aagaacacgc tgtatctga aatgaacagc ctgagagccg	780
45	aggacacggc cgtatattac tgcgcgcgtg atgcgtggtt ggatgtgctt tcggatggct	840
	ttgactactg gggccaggga accctgtgca ccgtctctc gtagtaagct tcagtccggg	900
	gcagtggatc cggctgctaa caaagccga aaggaagctg agttggctgc tgccaccgt	960
50	gagcaataac tagcataacc ccttggggcc tctaaacggg tcttgagggg tttttgctg	1020
	aaaggaggaa ctatatccgg atcgagatcc ccacgcgccc tgtagcggcg cattaagcgc	1080
55	ggcgggtgtg gtggttacgc gcagcgtgac cgctacactt gccagcgcgc tagcgcgcgc	1140
	tccttcgct ttctccctt cctttctgc cacgttcgcc ggctttccc gtcaagctct	1200
	aaatcggggc atcccttag ggtccgatt tagtgctta cggcacctc accccaaaaa	1260
60	actgattag ggtgatggtt cacgtagtgg gccatgcgcc tgatagacgg ttttcgccc	1320
	tttgacgttg gattccacgt tcttaatatg tggactctt ttccaaactg gaacaacact	1380
	caaccctatc tcggtctatt ctttgattt ataagggtt ttgccgattt cggcctattg	1440
65	gttaaaaaat gagctgattt aacaaaaatt taacgcgaat ttaacaaaa tattaacgtt	1500

	tacaatttca ggtggcactt ttcggggaaa tgtgcgcgga acccctattt gtttatttt	1560
5	ctaaatacat tcaaatatgt atccgctcat gagacaataa ccttgataaa tgcttcaata	1620
	atattgaaaa aggaagagta tgagtattca acatttccgt gtcgccctta ttccctttt	1680
	tgcggcattt tgccttctg ttttgctca ccagaaaacg ctggtgaaag taaaagatgc	1740
10	tgaagatcag ttgggtgcac gagtgggta catcgaactg gatctcaaca gcggtgaagat	1800
	ccttgagagt ttcgccccg aagaacgttt tccaatgatg agcactttta aagtctgct	1860
15	atgtggcgcg gtattatccc gtattgacgc cgggcaagag caactcggtc gccgcataca	1920
	ctattctcag aatgacttgg ttgagtactc accagtcaaca gaaaagcatc ttacggatgg	1980
	catgacagta agagaattat gcagtgtgc cataaccatg agtgataaca ctgcggccaa	2040
20	cttacttctg acaacgatcg gaggaccgaa ggagctaacc gctttttgc acaacatggg	2100
	ggatcatgta actgccttg atcgttggga accggagctg aatgaagcca taccaaacga	2160
25	cgagcgtgac accacgatgc ctgtagcaat ggcaacaacg ttgcgcaaac tattaactgg	2220
	cgaactactt actctagctt cccggcaaca attaatagac tggatggagg cggataaagt	2280
	tgcaggacca ctctgcgct cggccctcc ggctggctgg ttattgctg ataatctgg	2340
30	agccggtgag cgtgggtctc gcggtatcat tgcagcactg gggccagatg gtaagccctc	2400
	ccgtatcgta gttatctaca cgacggggag tcaggcaact atggatgaac gaaatagaca	2460
35	gatcgtgag atagggtcct cactgattaa gcattggtaa ctgtcagacc aagtttactc	2520
	atatatactt tagattgatt taaaacttca ttttaattt aaaaggatct aggtgaagat	2580
	ccttttgat aatctcatga ccaaaatccc ttaacgtgag tttcgttc actgagcgtc	2640
40	agaccccgtg gaaaagatca aaggatcttc ttgagatcct tttttctgc gcgtaactg	2700
	ctgcttgcaa acaaaaaaac caccgctacc agcggtggtt tgttgccgg atcaagagct	2760
45	accaactctt ttccgaagg taactggctt cagcagagcg cagataccaa atactgtcct	2820
	tctagttag ccgtagttag gccaccactt caagaactct gtagcaccgc ctacatacct	2880
	cgctctgcta atcctgttac cagtggctgc tgccagtggc gataagtcgt gtcttaccgg	2940
50	gttgactca agacgatagt taccggataa ggcgcagcgg tcgggctgaa cgggggggtc	3000
	gtgcacacag ccagcttgg agcgaacgac ctacaccgaa ctgagatacc tacagcgtga	3060
55	gctatgagaa agcggcacgc ttcccgaagg gagaaaggcg gacaggtatc cggtgaagcg	3120
	cagggtcgga acaggagagc gcacgagga gcttcaggg ggaaacgcct ggtatcttta	3180
	tagtctgtc gggtttcgcc acctctgact tgagcgtcga ttttgtgat gctcgtcagg	3240
60	ggggcgagc ctatggaaaa acgccagcaa cgcggccttt ttacggttcc tggcctttg	3300
	ctggcctttt gctcacatg	3319
65	<210> 91	
	<211> 22	

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 91

5

Val Leu Gln Gly Arg Ile Gly Arg Pro Asp Asn Pro Phe Arg Val Ala
1 5 10 15

10

Leu Glu Tyr Ile Ser Ser
20

REIVINDICACIONES

1. Un anticuerpo scFv que se une a la proteína cinasa de linfoma anaplásico (ALK) humana, comprendiendo dicho anticuerpo scFv
5 (i) una secuencia de la cadena pesada variable de SEC ID N.º: 4, y
(ii) una secuencia de la cadena ligera variable de SEC ID N.º: 5,
10 uniéndose dicho anticuerpo a un epítipo peptídico de ALK de 16 aminoácidos de SEC ID N.º: 1 con una afinidad K_d de 10 nM o menor y en donde el anticuerpo no se une a la proteína ALK de ratón.
2. El anticuerpo scFv de la reivindicación 1, comprendiendo dicho anticuerpo la estructura NH2-VL-enlazador-VH-COOH o NH2-VH-enlazador-VL-COOH, en donde el enlazador tiene la secuencia SEC ID N.º: 16.
- 15 3. El anticuerpo scFv de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, estando dicho anticuerpo radiomarcado o marcado con una toxina.
4. El anticuerpo scFv de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores para uso como un medicamento o como una herramienta diagnóstica.
- 20 5. El uso del anticuerpo scFv de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores para la producción de un medicamento para el tratamiento de cánceres o tumores.
- 25 6. El uso según la reivindicación 5, en donde el medicamento es adecuado para la inhibición de la unión de MK y/o PTN a ALK y/o la señalización mediada por ALK.
7. El uso de la reivindicación 5 o 6, en donde el medicamento es adecuado para administrar dicho anticuerpo scFv junto con un agente anticanceroso, por ejemplo, metotrexato.
- 30 8. El uso de la reivindicación 5, en donde el tratamiento es un tratamiento de neuroblastoma, glioblastoma, rabdomiosarcoma, carcinoma de mama, melanoma, cáncer de páncreas, LNH de linfocitos B, carcinoma de tiroides, carcinoma microcítico de pulmón, retinoblastoma, sarcoma de Ewing, cáncer de próstata, cáncer de colon, cáncer de páncreas, lipoma, liposarcoma, fibrosarcoma, en particular glioblastoma, neuroblastoma y rabdomiosarcoma.
- 35 9. Una secuencia de ADN que codifica el anticuerpo scFv de una cualquiera de las reivindicaciones 1 o 2.
10. Un vector de expresión que comprende la secuencia de ADN de la reivindicación 9.
- 40 11. Una célula hospedadora adecuada transformada con el vector de expresión de la reivindicación 10, en particular una célula *E. coli*.
- 45 12. Un método para la producción de un anticuerpo scFv de una cualquiera de las reivindicaciones 1 o 2, que comprende cultivar la célula hospedadora de la reivindicación 11 en condiciones que permiten la síntesis de dicho anticuerpo scFv y recuperarlo de dicho cultivo.

Fig. 1

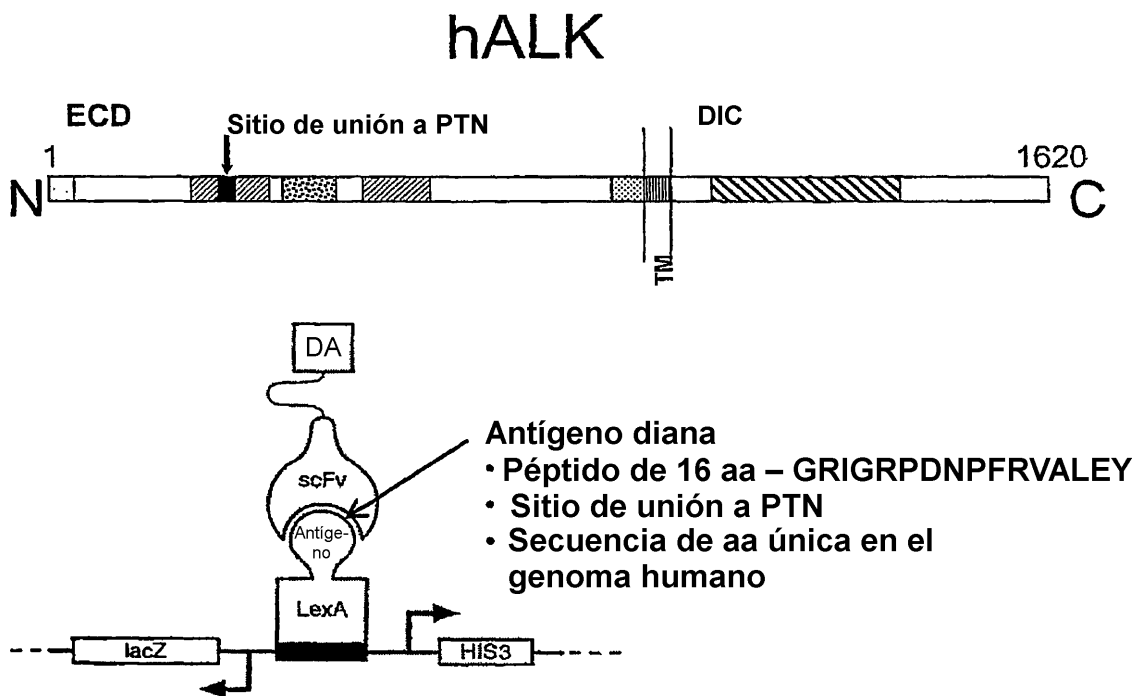


Fig. 2

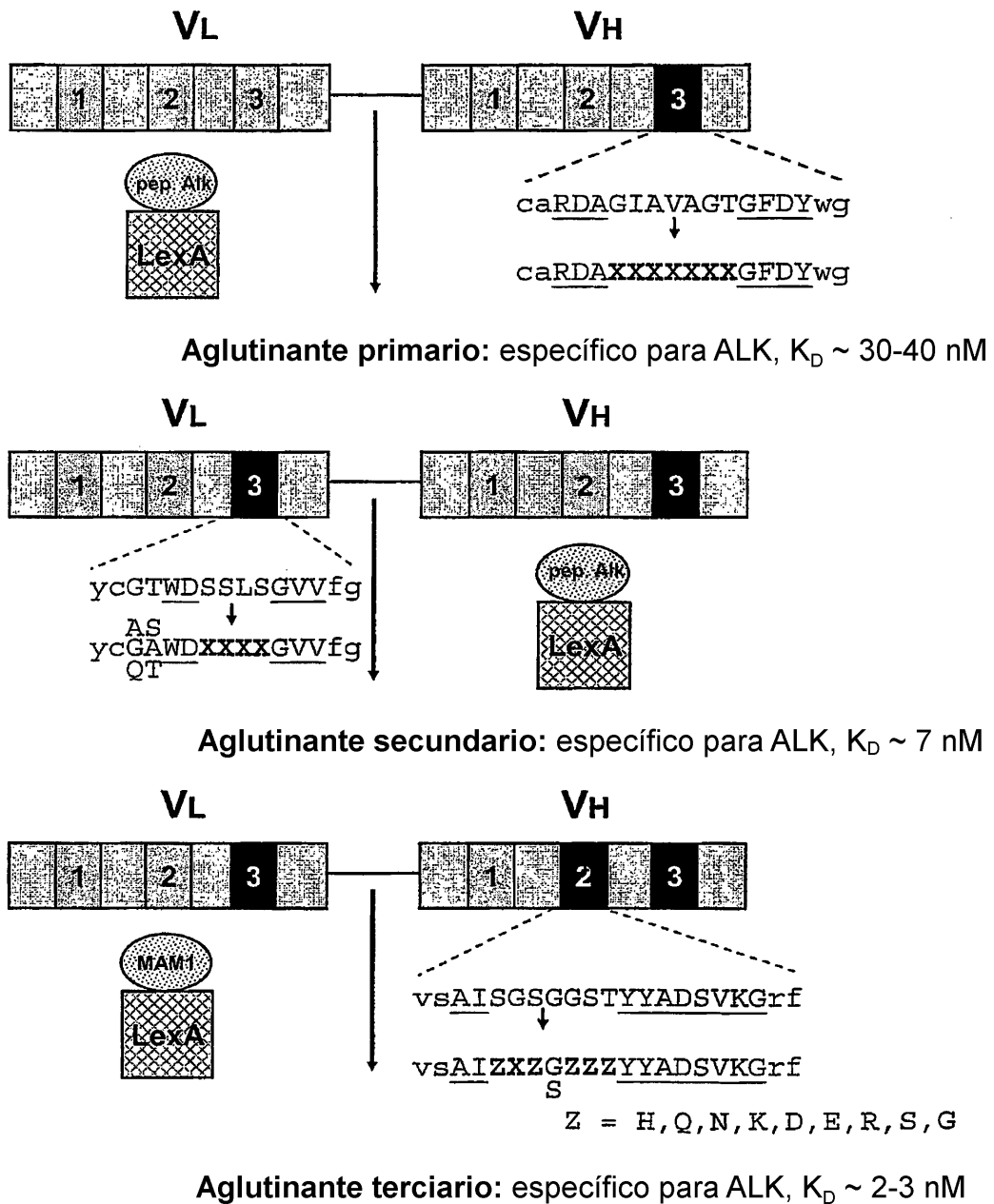
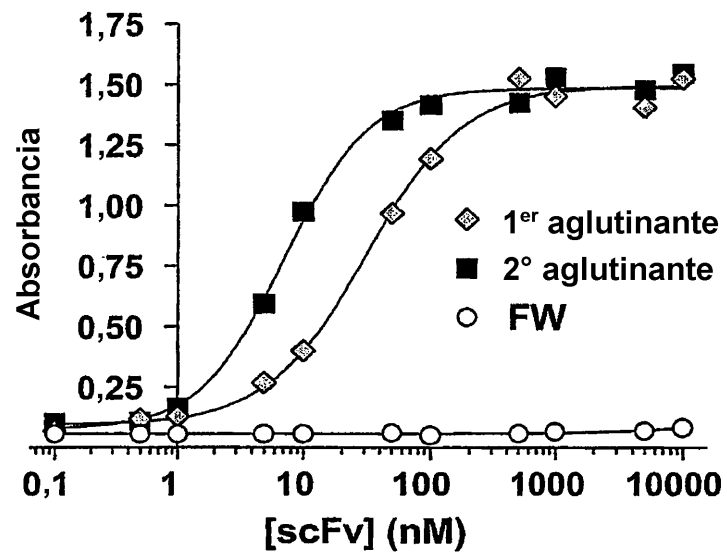


Fig. 3



ELISA: péptido GST-ALK

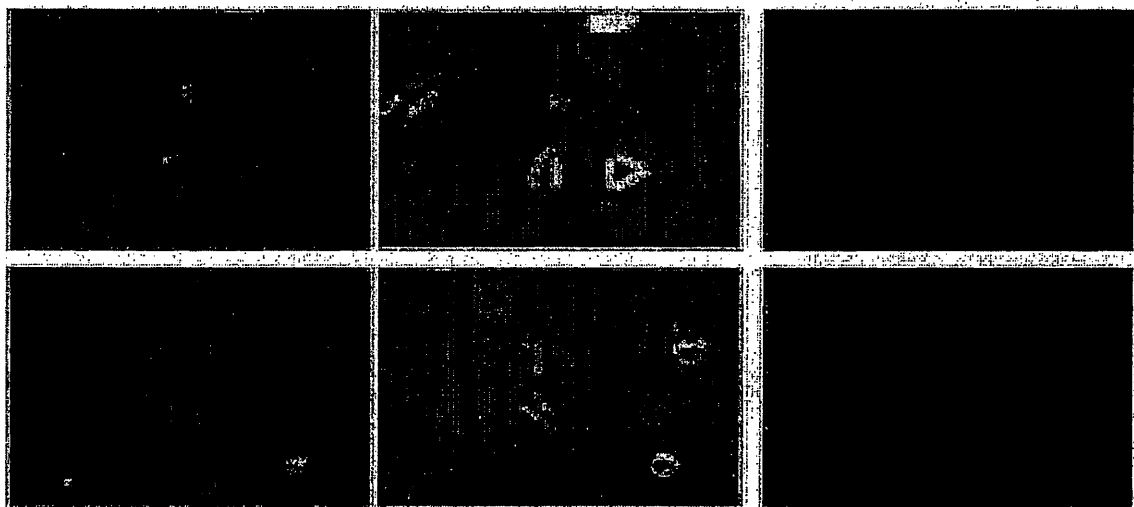
K_d

1^{er} aglutinante: $31,0 \pm 1,3$ nM

2º aglutinante: $7,2 \pm 1,4$ nM → ESBA521

Fig. 4

ALK humana



ESBA521

AC polyclonal

Fig. 5

