

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 582 038**

51 Int. Cl.:

A61K 39/00 (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)
C07K 16/00 (2006.01)
C07K 16/28 (2006.01)
C07K 16/30 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **01.06.2011 E 11722828 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **20.04.2016 EP 2575879**

54 Título: **Nuevo anticuerpo anti-c-Met**

30 Prioridad:

01.06.2010 US 791681

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

08.09.2016

73 Titular/es:

**PIERRE FABRE MÉDICAMENT (100.0%)
45, Place Abel Gance
92100 Boulogne-Billancourt, FR**

72 Inventor/es:

**GOETSCH, LILIANE;
WURCH, THIERRY y
BES, CÉDRIC**

74 Agente/Representante:

CURELL AGUILÁ, Mireia

ES 2 582 038 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

Nuevo anticuerpo anti-c-Met.

- 5 La presente invención divulga un nuevo anticuerpo divalente que puede unirse específicamente al receptor c-Met humano y/o que puede inhibir específicamente la actividad de tirosina cinasa de dicho receptor, preferentemente tanto en una forma dependiente de ligando como en una forma independiente de ligando, así como también las secuencias de aminoácidos y ácidos nucleicos que codifican dicho anticuerpo. Es divulgado que dicho anticuerpo comprende una región bisagra modificada y presenta una actividad antagonista mejorada. Es divulgado que dicho anticuerpo puede inhibir la dimerización de c-Met. La invención asimismo comprende el uso de dicho anticuerpo como un medicamento para el tratamiento profiláctico y/o terapéutico de cánceres, preferentemente para cáncer caracterizado por una activación independiente de ligando de c-Met, o de cualquier patología relacionada con la sobreexpresión de dicho receptor así como también en procesos o kits para el diagnóstico de enfermedades relacionadas con la sobreexpresión de c-Met. Son divulgados unos productos y/o unas composiciones que comprenden ese tipo de anticuerpo en combinación con otros anticuerpos y/o compuestos químicos dirigidos contra otros factores de crecimiento involucrados en la progresión de tumores o metástasis y/o compuestos y/o agentes anticancerígenos o agentes conjugados con toxinas y su utilización para la prevención y/o el tratamiento de ciertos cánceres.
- 10
- 15
- 20 Los agentes dirigidos hacia la tirosina cinasa receptora (RTK) tales como los inhibidores de trastuzumab, cetuximab, bevacizumab, imatinib y gefitinib han ilustrado el interés de emplear esta clase de proteína para el tratamiento de cánceres seleccionados.
- 25 La c-Met es el miembro prototípico de una subfamilia de RTKs la cual también incluye RON y SEA. La familia de RTK de c-Met es estructuralmente diferente de otras familias de RTK y es el único receptor de alta afinidad conocido para el factor del crecimiento de hepatocitos (HGF), también denominado factor de dispersión (SF, scatter factor) [D.P. Bottaro *et al.*, *Science* 1991, 251: 802-804; L. Naldini *et al.*, *Eur. Mol. Biol. Org. J.* 1991, 10:2867-2878]. c-Met y HGF son ampliamente expresados en una variedad de tejidos y su expresión está normalmente restringida a células de origen epitelial y mesenquimal respectivamente [M.F. Di Renzo *et al.*, *Oncogene* 1991, 6:1997-2003; E. Sonnenberg *et al.*, *J. Cell. Biol.* 1993, 123:223-235]. Son ambos requeridos para el desarrollo normal de los mamíferos y han demostrado ser particularmente importantes en la migración celular, diferenciación morfogénica, y organización de las estructuras tubulares tridimensionales así como también el crecimiento y la angiogénesis [F. Baldt *et al.*, *Nature* 1995, 376:768-771; C. Schmidt *et al.*, *Nature*. 1995:373:699-702; Tsarfaty *et al.*, *Science* 1994, 263:98-101]. Si bien la regulación controlada de c-Met y HGF ha demostrado ser importante en el desarrollo de mamíferos, mantenimiento y reparación de los tejidos [Nagayama T., Nagayama M., Kohara S., Kamiguchi H., Shibuya M., Katoh Y., Itoh J., Shinohara Y., *Brain Res.* 2004, 5:999(2):155-66; Tahara Y., Ido A., Yamamoto S., Miyata Y., Uto H., Hori T., Hayashi K., Tsubouchi H., *J Pharmacol Exp Ther.* 2003, 307(1):146-51], su desregulación está implicada en la progresión de cánceres.
- 30
- 35
- 40 La señalización aberrante impulsada por la activación inapropiada de c-Met es una de las alteraciones más frecuentes observada en los cánceres humanos y juega un rol fundamental en la tumorigénesis y en la metástasis [Birchmeier *et al.*, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2003, 4:915-925; L. Trusolino y Comoglio P. M., *Nat Rev. Cancer.* 2002, 2(4):289-300].
- 45 La activación inapropiada de c-Met puede surgir mediante mecanismos dependientes e independientes del ligando, los cuales incluyen la sobreexpresión de c-Met, y/o la activación paracrina o autocrina, o a través del aumento de la mutación funcional [J.G. Christensen, Burrows J. y Salgia R., *Cancer Letters.* 2005, 226:1-26]. Sin embargo, una oligomerización del receptor c-Met, en presencia o en ausencia del ligando, es requerida para regular la afinidad de unión y la cinética de unión de la cinasa hacia ATP y los sustratos peptídicos que contienen tirosina [Hays JL, Watowich SJ, *Biochemistry*, 2004 17 de agosto, 43:10570-8]. c-Met activado recluta efectores de la señalización a su sitio "multidocking" ubicado en el dominio citoplasmático, dando como resultado la activación de diversas rutas de señalización claves, incluyendo Ras-MAPK, PI3K, Src y Stat3 [Gao CF, Vande Woude GF, *Cell Res.* 2005, 15(1):49-51; Furge KA, Zhang YW, Vande Woude GF, *Oncogene.* 2000, 19(49):5582-9]. Estas rutas son esenciales para la proliferación, invasión y angiogénesis de células tumorales y para evadir la apoptosis [Furge KA, Zhang YW, Vande Woude GF, *Oncogene*, 2000, 19(49):5582-9; Gu H., Neel BG, *Trends Cell Biol.* Mar 2003, 13(3):122-30; Fan S., Ma YX, Wang JA, Yuan RQ, Meng Q., Cao Y., Lattera JJ, Goldberg ID, Rosen EM, *Oncogene.* 27 de abril 2000, 19(18):2212-23]. Por añadidura, una faceta única de la señalización de c-Met relacionada con otro RTK es su interacción reportada con complejos de adhesión focal y compañeros de la unión no cinasa tales como las integrinas $\alpha 6\beta 4$ [Trusolino L., Bertotti A., Comoglio PM, *Cell.* 2001, 107:643-54], CD44v6 [Van der Voort R., Taher TE, Wielenga VJ, Spaargaren M., Prevo R., Smit L., David G., Hartmann G., Gherardi E., Pals ST, *J. Biol. Chem.* 1999, 274(10):6499-506], Plexina B1 o semaforinas [Giordano S., Corso S., Conrotto P., Artigiani S., Gilestro G., Barberis D., Tamagnone L., Comoglio PM, *Nat Cell Biol.* 2002, 4(9):720-4; Conrotto P., Valdembri D., Corso S., Serini G., Tamagnone L., Comoglio PM, Bussolino F., Giordano S., *Blood.* 2005, 105(11):4321-9; Conrotto P., Corso S., Gamberini S., Comoglio PM, Giordano S., *Oncogene.* 2004, 23:5131-7] los cuales pueden sumar adicionalmente a la complejidad de regulación de la función celular por este receptor. Finalmente, datos recientes demuestran que c-Met podría estar involucrado en la resistencia tumoral a gefitinib o erlotinib lo cual sugiere que la combinación del
- 50
- 55
- 60
- 65

direccionamiento de compuestos hacia EGFR y c-Met podría ser de interés significativo [Engelman JA *et al.*, Science, 2007, 316:1039-43].

5 En los últimos pocos años, se han desarrollado muchas estrategias diferentes para atenuar la señalización de c-Met en líneas celulares cancerígenas. Estas estrategias incluyen i) neutralizar anticuerpos contra c-Met o HGF/SF [Cao B., Su Y., Oskarsson M., Zhao P., Kort EJ, Fisher RJ, Wang LM, Vande Woude GF, Proc Natl Acad Sci U S A. 2001, 98(13):7443-8; Martens T., Schmidt NO, Eckerich C., Fillbrandt R., Merchant M., Schwall R., Westphal M., Lamszus K., Clin Cancer Res. 2006, 12(20):6144-52] o el uso de NK4 antagonista de HGF/SF para evitar la unión del ligando a c-Met [Kuba K., Matsumoto K., Date K., Shimura H., Tanaka M., Nakamura T., Cancer Res., 2000, 60:6737-43], ii) inhibidores del sitio de unión a ATP pequeño a c-Met que bloquean la actividad de cinasas [Christensen JG, Schreck R., Burrows J., Kuruganti P., Chan E, Le P., Chen J., Wang X., Ruslim L., Blake R., Lipson KE, Ramphal J., Do S., Cui JJ, Cherrington JM, Mendel DB, Cancer Res. 2003, 63:7345-55], iii) polipéptido de dominio SH2 genomanipulado que interfiere con el acceso al sitio "multidocking" y RNAi o ribozima que reducen la expresión del receptor o del ligando. La mayoría de estos métodos exhiben una inhibición selectiva de c-Met dando como resultado la inhibición tumoral y mostrando que c-Met podría ser interesante para la intervención terapéutica en el cáncer.

Entre las moléculas generadas para el direccionamiento hacia c-Met, algunas son anticuerpos. El más extensamente descrito es el anticuerpo anti-c-Met 5D5 generado por Genentech [WO 96/38557] el cual se comporta como un potente agonista cuando es agregado solo en diversos modelos y como un antagonista cuando se utiliza como un fragmento Fab. Una forma genomanipulada monovalente de este anticuerpo descrito como un 5D5 armado (OA5D5) y producida como una proteína recombinante en *E. Coli* es también el objeto de una solicitud de patente [documento WO 2006/015371] por Genentech. Sin embargo, esta molécula que no podría ser considerada como un anticuerpo debido a su estructura en particular, exhibe también mutaciones que podrían ser inmunógenas en seres humanos. En términos de actividad, esta molécula no glicosilada está desprovista de funciones efectoras y finalmente, no hay datos claros que demuestran que OA5D5 inhibe la dimerización de c-Met. Adicionalmente, cuando se ensaya en el modelo in vivo de G55, una línea de células de glioblastoma que expresa c-Met pero no ARNm de HGF y proteína y que crece independientemente del ligando, el anti-c-Met armado no tuvo efecto significativo alguno sobre el crecimiento tumoral de G55 lo cual sugiere que OA5D5 actúa principalmente bloqueando la unión de HGF y no es capaz de dirigirse hacia tumores activados independientemente de HGF [Martens T. *et al*, Clin. Cancer Res., 2006, 12(20):6144-6152].

Otro anticuerpo que se dirige hacia c-Met es descrito por Pfizer como un anticuerpo que actúa "predominantemente como antagonista de c-Met, y en algunos casos como un agonista de c-Met" [documento WO 2005/016382]. No hay datos descritos en esta solicitud que muestren efecto alguno de los anticuerpos de Pfizer sobre la dimerización de c-Met.

Finalmente, un anticuerpo humanizado denominado 224G 11 que dianiza c-Met es descrito por Pierre Fabre Medicament como un anticuerpo que actúa como un antagonista de c-Met que inhibe la dimerización de c-Met para su utilización en el tratamiento del cáncer [documento WO 2010/069765].

Uno de los aspectos innovadores de la presente invención consiste en generar un anticuerpo monoclonal quimérico y/o humanizado sin actividad agonista intrínseca e inhibir la dimerización de c-Met. Más particularmente, un aspecto innovador de la presente invención consiste en generar un anticuerpo monoclonal quimérico y/o humanizado con actividad antagonista e inhibir la dimerización de c-Met.

Además de dirigirse contra tumores dependientes de ligando, este método también disminuirá las activaciones independientes del ligando de c-Met debido a su sobreexpresión o mutaciones de los dominios intracelulares los cuales permanecieron dependientes de la oligomerización para la señalización. Otro aspecto de la actividad de este anticuerpo podría ser un impedimento estérico para la interacción de c-Met con sus socios que dará como resultado un menoscabo de las funciones de c-Met. Este anticuerpo es humanizado y genomanipulado con preferencia, aunque sin limitarse a, como IgG1 humana para obtener funciones efectoras tales como ADCC y CDC además de funciones vinculadas con el bloqueo específico del receptor c-Met.

Sorprendentemente, por primera vez, los inventores han podido generar un anticuerpo antagonista monoclonal quimérico y/o humanizado capaz de unirse a c-Met pero también capaz de inhibir la dimerización de c-Met, siendo dicho anticuerpo monoclonal divalente en oposición a los anticuerpos antagonistas existentes dirigidos contra c-Met. Si es cierto que, en la técnica anterior, algunas veces se sugiere que un anticuerpo capaz de inhibir la dimerización de c-Met con sus socios podría ser un anticuerpo interesante, nunca se ha descrito, o claramente sugerido, un anticuerpo capaz de hacerlo. Por añadidura, en cuanto a la especificidad del anticuerpo, no fue evidente para nada el tener éxito en la generación de ese tipo de anticuerpo divalente activo.

Según lo explicado anteriormente, la inhibición de la dimerización de c-Met es un aspecto capital de la invención ya que ese tipo de anticuerpos presentarán un real interés para una población más grande de pacientes. No solo el cáncer de c-Met activado dependiente del ligando, como resultó ser el caso hasta la presente invención, sino además el cáncer de c-Met activado independiente del ligando pudo tratarse con los anticuerpos generados mediante el proceso de la presente invención.

Los anticuerpos fueron evaluados mediante análisis BRET sobre células que expresan tanto c-Met-RLuc/c-Met-YFP y se seleccionaron por su capacidad de inhibir por lo menos 40%, con preferencia 45%, 50%, 55% y con máxima preferencia 60% de la señal de BRET.

5 La tecnología BRET es conocida como siendo representativa de la dimerización proteica [Angers *et al.*, PNAS, 2000, 97:3684-89].

10 La tecnología BRET es bien conocida por el experto en la materia y será detallada en los siguientes ejemplos. Más particularmente, BRET (Transferencia de Energía por Resonancia de Bioluminiscencia) es un transferencia de energía no radiactiva que ocurre entre un donante bioluminiscente (Renilla Luciferasa (Rluc) y un aceptor fluorescente, un mutante de GFP (Proteína Fluorescente Verde) o YFP (Proteína fluorescente amarilla). En el presente caso, se utilizó EYFP (Proteína Fluorescente Amarilla Potenciada). La eficacia de la transferencia depende de la orientación y la distancia entre el donante y el aceptor. Luego, la transferencia de energía puede ocurrir solamente si las dos moléculas están en cercana proximidad (1-10 nm). Esta propiedad se utiliza para generar ensayos de interacción proteína- proteína. De hecho, con el fin de estudiar la interacción entre dos socios, el primero es genéticamente fusionado a la Renilla Luciferasa y el segundo al mutante amarillo de la GFP. Las proteínas de fusión son generalmente, aunque no obligatoriamente, expresadas en células de mamífero. En presencia de su sustrato permeable a la membrana (coelenterazina), Rluc emite luz azul. Si el mutante de GFP está más cerca que 10 nm de la Rluc, puede producirse una transferencia energética y puede detectarse una señal amarilla adicional. La señal de BRET se mide como la relación entre la luz emitida por el aceptor y la luz emitida por el donante. De modo que la señal de BRET aumentará a medida que las dos proteínas de fusión se llevan a proximidad o si un cambio conformacional trae a Rluc y el mutante de GFP más cerca.

25 Si el análisis de BRET consiste en una forma de realización preferida, cualquier método conocido por el experto en la materia puede utilizarse para medir la dimerización de c-Met. Sin limitación, pueden mencionarse las siguientes tecnologías: FRET (Transferencia de Energía por Resonancia de Fluorescencia), HTRF (Fluorescencia Homogénea resuelta en el Tiempo), FLIM (Microscopía por Imágenes de Tiempo de Vida de Fluorescencia) o SW-FCCS (espectroscopia de correlación cruzada de fluorescencia de longitud de onda única).

30 Otras tecnologías clásicas también podrían utilizarse, tales como Coimmunoprecipitación, Alpha screen, Entrecruzamiento químico, Doble Híbrido, Cromatografía de Afinidad, ELISA o transferencia Far western.

35 Los términos "anticuerpo", "anticuerpos" o "inmunoglobulina" se utilizan de manera indistinta en el sentido más amplio e incluyen anticuerpos monoclonales (por ejemplo, anticuerpos monoclonales de longitud completa o intactos), anticuerpos policlonales, anticuerpos multivalentes o anticuerpos multispecíficos (por ejemplo, anticuerpos biespecíficos siempre y cuando exhiban la actividad biológica deseada).

40 Más particularmente, dicha molécula consiste en una glucoproteína que comprende por lo menos dos cadenas pesadas (H) y dos cadenas ligeras (L) interconectadas por enlaces disulfuro. Cada cadena pesada está compuesta por una región variable de cadena pesada (o dominio) (abreviado en la presente invención HCVR o VH) y una región constante de cadena pesada. La región constante de cadena pesada está compuesta por tres dominios, CH1, CH2 y CH3. Cada cadena ligera está compuesta por una región variable de cadena ligera (abreviado en esta invención como LCVR o VL) y una región constante de cadena ligera. La región constante de cadena ligera está compuesta por un dominio, CL. Las regiones de VH y VL puede estar adicionalmente subdivididas en regiones de hipervariabilidad, denominadas regiones determinantes de complementariedad (CDR), mezcladas con regiones que son más conservadas, denominadas regiones estructurales (FR). Cada VH y VL está compuesta por tres CDR y cuatro FR, dispuestas desde el término amino hasta el término carboxi en el siguiente orden: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4. Las regiones variables de las cadenas pesada y ligera contienen un dominio de unión que interactúa con un antígeno. Las regiones constantes de los anticuerpos pueden intervenir en la unión de la inmunoglobulina a los tejidos o factores huéspedes, incluyendo diversas células del sistema inmune (por ejemplo células efectoras) y el primer componente (Clq) del sistema de complementos clásico.

55 Las cadenas pesadas de las inmunoglobulinas pueden estar divididas en tres regiones funcionales: la región Fd, la región bisagra, y la región Fc (cristalizable por fragmento). La región Fd comprende los dominios VH y CHI y, en combinación con la cadena ligera, forma Fab - el fragmento de unión al antígeno. El fragmento Fc es responsable de las funciones efectoras de inmunoglobulinas, lo cual incluye, por ejemplo, la fijación al complemento y la unión a los receptores de Fc cognados de las células efectoras. La región bisagra, encontrada en las clases de inmunoglobulinas IgG, IgA, y IgD, actúa como un espaciador flexible que permite que la porción de Fab se mueva libremente en el espacio con relación a la región Fc. Los dominios bisagra son estructuralmente diversos, variando en la secuencia como en la longitud entre las clases y subclases de inmunoglobulinas.

65 De acuerdo con estudios cristalográficos, la región bisagra de inmunoglobulina puede estar adicionalmente subdividida estructural y funcionalmente en tres regiones: la bisagra superior, el núcleo y la bisagra inferior (Shin *et al.*, Immunological Reviews 130:87, 1992). La bisagra superior incluye aminoácidos desde el extremo carboxilo de CHI hasta el primer residuo en la bisagra que restringe el movimiento, en general el primer residuo cisteína que

forma un enlace disulfuro entre cadenas entre las dos cadenas pesadas. La longitud de la región bisagra superior se correlaciona con la flexibilidad segmental del anticuerpo. La región bisagra núcleo contiene los puentes disulfuro entre las cadenas pesadas. La región bisagra inferior une el extremo terminal amino de, e incluye los residuos en el dominio CH2. La región bisagra núcleo de IgG1 humana contiene la secuencia Cys-Pro-Pro-Cys que, cuando se dimeriza mediante la formulación de un enlace disulfuro, da como resultado un octapéptido cíclico que se cree que actúa como un pivote, confiriendo de ese modo flexibilidad. Los cambios conformacionales permitidos por la estructura y flexibilidad de la secuencia polipeptídica de la región bisagra de la inmunoglobulina pueden afectar las funciones efectoras de la porción Fc del anticuerpo.

El término "anticuerpo monoclonal" se utiliza de acuerdo con su significado común para denotar un anticuerpo obtenido a partir de una población de anticuerpos sustancialmente homogéneos, es decir, los anticuerpos individuales que comprenden la población son idénticos excepto por las posibles mutaciones de presentación natural que pueden estar presentes en cantidades menores. Es decir, un anticuerpo monoclonal consiste en un anticuerpo homogéneo que es el resultado de la proliferación de un único clon de células (por ejemplo, células de hibridoma, células hospedadoras eucarióticas transfectadas con ADN que codifica el anticuerpo homogéneo, células hospedadoras procarióticas transformadas con ADN que codifica el anticuerpo homogéneo, etc.), y el cual es generalmente caracterizado por cadenas pesadas de una única clase y subclase, y cadenas ligeras de un solo tipo. Los anticuerpos monoclonales son altamente específicos, siendo dirigidos contra un único antígeno. Adicionalmente, en contraste con las preparaciones de anticuerpos policlonales que típicamente incluyen diferentes anticuerpos dirigidos contra diferentes determinantes, o epítipo, cada anticuerpo monoclonal es dirigido contra un único determinante en el antígeno.

En la presente descripción, los términos polipéptidos, secuencias de polipéptidos, secuencias de aminoácidos, péptidos y proteínas unidos a compuestos de anticuerpo o a su secuencia son intercambiables.

Es divulgado un anticuerpo monoclonal, o a un fragmento o derivado del mismo funcional divalente, capaz de inhibir la dimerización de c-Met y que comprende una cadena pesada que comprende CDR-H1, CDR-H2 y CDR-H3 con respectivamente las secuencias de aminoácidos SEC ID nº 1, 2 y 3 o una secuencia que tiene por lo menos 80% de identidad después de la alineación óptima con secuencias SEC ID nº 1, 2 y 3; y una cadena ligera que comprende CDR-L1, CDR-L2 y CDR-L3 con respectivamente las secuencias de aminoácidos SEC ID nº 5, 6 y 7 o una secuencia que tiene por lo menos 80% de identidad después de la alineación óptima con las secuencias SEC ID nº 5, 6 o 7, estando dicho anticuerpo adicionalmente caracterizado por que también comprende una región bisagra que comprende la secuencia de aminoácidos SEC ID nº 56.

La presente invención se dirige a un anticuerpo monoclonal, o un fragmento funcional divalente que contiene por lo menos sus 6 CDR y su región bisagra, que puede inhibir la dimerización c-Met, comprendiendo dicho anticuerpo una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos SEC ID nº 37 y una cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos SEC ID nº 40,

para su utilización para la prevención o el tratamiento de un cáncer caracterizado por que presenta una sobreexpresión de c-Met que resulta de la amplificación génica de c-Met, y

en el que dicho cáncer es seleccionado de entre el grupo que consiste en carcinoma de células renales y cáncer gástrico.

La presente invención se refiere asimismo a una composición que comprende como principio activo un compuesto que consiste en un anticuerpo monoclonal, o un fragmento funcional divalente del mismo que contiene por lo menos sus 6 CDR y su región bisagra, que puede inhibir la dimerización de c-Met, comprendiendo dicho anticuerpo una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos SEC ID nº 37 y una cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos SEC ID nº 40,

para su utilización para la prevención o el tratamiento de un cáncer caracterizado por que presenta la sobreexpresión de c-Met que resulta de la amplificación génica de c-Met, y

en el que dicho cáncer es seleccionado de entre el grupo que consiste en carcinoma de células renales y cáncer gástrico.

Es divulgado asimismo un método para la prevención o el tratamiento de un paciente que lo requiere, que tiene un cáncer, caracterizado por activación independiente de ligando de c-Met, preferentemente un cáncer adicionalmente caracterizado por sobreexpresión de c-Met, la sobreexpresión de c-Met resulta más preferido de amplificación génica de c-Met, y también más preferentemente, que resulta en activación independiente de ligando de c-Met, el método comprende la etapa de administrar una composición que comprende un anticuerpo monoclonal, o un fragmento funcional divalente o su derivado, capaz de inhibir la dimerización c-Met, el anticuerpo comprende una cadena pesada que comprende CDR-H1, CDR-H2 y CDR-H3 respectivamente con las secuencias de aminoácidos SEQ ID nº 1, 2 y 3; y una cadena ligera que comprende CDR-L1, CDR-L2 y CDR-L3 respectivamente con las secuencias de aminoácidos SEQ ID nº 5, 6 y 7, el anticuerpo además comprende una región bisagra que comprende

la secuencia de aminoácidos SEC ID nº 56.

5 Es asimismo divulgado que dicho cáncer se caracteriza por activación independiente de ligando de c-Met, y más preferible además caracterizado por sobreexpresión de c-Met, que resulta más preferible de amplificación génica de c-Met, y también más preferible, resulta en activación independiente de ligando de c-Met, se elige del grupo que consiste de carcinoma de células renales y cáncer gástrico.

10 Es divulgado asimismo un anticuerpo monoclonal, o su fragmento o derivado funcional divalente, según lo descrito anteriormente caracterizado por que dicha región bisagra comprende la secuencia de aminoácidos SEC ID nº 57.

15 Es asimismo divulgado un anticuerpo monoclonal, o su fragmento o derivado funcional divalente, capaz de inhibir la dimerización de c-Met y que comprende una cadena pesada que comprende CDR-H1, CDR-H2 y CDR-H3 con respectivamente las secuencias de aminoácidos SEC ID nº 1, 2 y 3 o una secuencia que tiene por lo menos 80% de identidad después de la alineación óptima con las secuencias SEC ID nº 1, 2 y 3; y una cadena ligera que comprende CDR-L1, CDR-L2 y CDR-L3 con respectivamente las secuencias de aminoácidos SEC ID nº 5, 6 y 7 o una secuencia que tiene por lo menos 80% de identidad después de la alineación óptima con las secuencias SEC ID nº 5, 6 o 7, estando dicho anticuerpo adicionalmente caracterizado por que también comprende una región bisagra que comprende la secuencia de aminoácidos SEC ID nº 57.

20 Es asimismo divulgado un anticuerpo monoclonal, o su fragmento o derivado funcional divalente, según lo descrito anteriormente caracterizado por que también comprende una región bisagra que comprende la secuencia de aminoácidos SEC ID nº 21.

25 Es asimismo divulgado un anticuerpo monoclonal, o su fragmento o derivado funcional divalente, capaz de inhibir la dimerización de c-Met y que comprende una cadena pesada que comprende CDR-H1, CDR-H2 y CDR-H3 con respectivamente las secuencias de aminoácidos SEC ID nº 1, 2 y 3 o una secuencia que tiene por lo menos 80% de identidad después de la alineación óptima con las secuencias SEC ID nº 1, 2 y 3; y una cadena ligera que comprende CDR-L1, CDR-L2 y CDR-L3 con respectivamente las secuencias de aminoácidos SEC ID nº 5, 6 y 7 o una secuencia que tiene por lo menos 80% de identidad después de la alineación óptima con las secuencias SEC ID nº 5, 6 o 7, estando dicho anticuerpo adicionalmente caracterizado por que también comprende una región bisagra que comprende la secuencia de aminoácidos SEC ID nº 21.

35 Como resulta evidente para el experto en la materia, las secuencias de consenso SEC ID nº 57 y 21 están comprendidas en la secuencia de consenso SEC ID nº 56.

Tabla 1

	#01	#02	#03	#04	#05	#06	#07
B) SEC ID NO 56	X1	X2	X3	C	X5	X6	X7
C) SEC ID NO 57	X1	X2	X3	C	X5	X6	X7
D) SEC ID NO 21	X1	X2	X3	C	X5	-	C

Tabla 1

	#08	#09	#10	#11	#12	#13	#14
E) SEC ID NO 56	X8	X9	C	X11	X12	C	X14
F) SEC ID NO 57	X8	X9	C	P	P	C	P
G) SEC ID NO 21	X8	X9	C	X11	X12	C	X14

Para SEC ID nº 56:

45 X1: P, R, C, - X5: D, C, G, - X8: H, V, K, - X12: P, -
 X2: K, C, R, - X6: K, C, - X9: T, C, E, P, - X14: P, T
 X3: S, C, D, - X7: T, C, - X11: P, I

La expresión "fragmentos y derivados funcionales" será definida en detalle a continuación en la presente memoria.

50 Por regiones CDR o CDR(s), se pretende indicar las regiones hipervariables de las cadenas pesada y ligera de las inmunoglobulinas según lo definido por IMGT.

55 La numeración única de IMGT ha sido definida para comparar los dominios variables cualquiera sea el receptor del antígeno, el tipo de cadena o la especie [Lefranc M.-P., Immunology Today 18, 509 (1997); Lefranc M.-P., The Immunologist, 7, 132-136 (1999); Lefranc, M.-P., Pommié, C., Ruiz, M., Giudicelli, V., Foulquier, E., Truong, L., Thouvenin-Contet, V. y Lefranc, Dev. Comp. Immunol., 27, 55-77 (2003)]. En la numeración única de IMGT, los aminoácidos conservados siempre tienen la misma posición, por ejemplo cisteína 23 (1er-CYS), triptófano 41 (TRP-

CONSERVADO), aminoácido hidrófobo 89, cisteína 104 (2da-CYS), fenilalanina o triptófano 118 (J-PHE o J-TRP). La numeración única de IMGT proporciona una delimitación estandarizada de las regiones estructurales (FR1-IMGT: posiciones 1 a 26, FR2-IMGT: 39 a 55, FR3-IMGT: 66 a 104 y FR4-IMGT: 118 a 128) y de las regiones determinantes de complementariedad: CDR1-IMGT: 27 a 38, CDR2-IMGT: 56 a 65 y CDR3-IMGT: 105 a 117. Como los espacios vacíos representan posiciones no ocupadas, las longitudes de CDR-IMGT (mostradas entre corchetes y separadas por puntos, por ej. [8.8.13]) resultan una información crucial. La numeración única de IMGT se utiliza en representaciones gráficas en 2D, designadas como IMGT Colliers de Perles [Ruiz, M. y Lefranc, M.-P., Immunogenetics, 53, 857-883 (2002); Kaas, Q. y Lefranc, M.-P., Current Bioinformatics, 2, 21-30 (2007)], y en las estructuras en 3D en IMGT/estructura 3D-DB [Kaas, Q., Ruiz, M. y Lefranc, M.-P., T cell receptor and MHC structural data. Nucl. Acids. Res., 32, D208-D210 (2004)].

Existen tres CDR de cadena pesada y 3 CDR de cadena ligera. El término CDR o CDR se utiliza en esta invención con el fin de indicar, de acuerdo con el caso, una de estas regiones o varias, o incluso la totalidad, de estas regiones las cuales contienen la mayoría de los residuos de aminoácidos responsables de la unión por afinidad del anticuerpo para el antígeno o el epítipo el cual reconoce.

Por "porcentaje de identidad" entre dos secuencias de ácidos nucleicos o aminoácidos en el sentido de la presente invención, tiene el propósito de indicar un porcentaje de nucleótidos o de residuos aminoácidos idénticos entre las dos secuencias que se van a comparar, obtenidas después de la mejor alineación (alineación óptima), siendo este porcentaje puramente estadístico y las diferentes entre las dos secuencias son distribuidas al azar y por toda su longitud. Las comparaciones de secuencias entre dos secuencias de ácidos nucleicos o aminoácidos se llevan a cabo, tradicionalmente, comparando estas secuencias después de haberlas alineado en forma óptima, siendo dicha comparación capaz de ser llevada a cabo por segmento o por "ventana de comparación". La alineación óptima de las secuencias para la comparación puede llevarse a cabo, además de manualmente, por medio del algoritmo de homología local de Smith y Waterman (1981) [Ad. App. Math. 2:482], por medio del algoritmo de homología local de Needleman y Wunsch (1970) [J. Mol. Biol. 48: 443], por medio del método de investigación de similitudes de Pearson y Lipman (1988) [Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:2444], por medio de programas informáticos que utilizan estos algoritmos (GAP, BESTFIT, FASTA y TFASTA en el paquete informático Wisconsin Genetics Software Package, Genetics Computer Group, 575 Science Dr., Madison, WI, o sino mediante programa informático de comparación BLAST N o BLAST P).

El porcentaje de identidad entre dos secuencias de ácidos nucleicos o aminoácidos se determina comparando estas dos secuencias alineadas en forma óptima y en las cuales la secuencia de ácidos nucleicos o aminoácidos a ser comparadas pueden comprender adiciones o deleciones con respecto a la secuencia de referencia para una alineación óptima entre estas dos secuencias. El porcentaje de identidad se calcula determinando la cantidad de posiciones idénticas para las cuales el nucleótido o el residuo aminoácido es idéntico entre las dos secuencias, dividiendo este número de posiciones idénticas por la cantidad total de posiciones en la ventana de comparación y multiplicando el resultado obtenido por 100 con el fin de obtener el porcentaje de identidad entre estas dos secuencias.

Por ejemplo, es posible utilizar el programa BLAST, "secuencias BLAST 2" (Tatusova *et al.*, "Blast 2 sequences - a new tool for comparing protein and nucleotide sequences", FEMS Microbiol Lett. 174:247-250) disponible en el sitio <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gorf/bl2.html>, siendo los parámetros utilizados aquellos proporcionados por error (en particular para los parámetros "open gap penalty": 5, y "extension gap penalty": 2; siendo la matriz seleccionada, por ejemplo, la matriz "BLOSUM 62" propuesta por el programa), el porcentaje de identidad entre las dos secuencias que se van a comparar es calculado directamente por el programa.

Por secuencia de aminoácidos que tiene por lo menos 80%, preferentemente 85%, 90%, 95% y 98% de identidad con una secuencia de aminoácidos de referencia, aquellas que tienen, con respecto a la secuencia de referencia, ciertas modificaciones, en particular una deleción, adición o sustitución de por lo menos un aminoácido, una truncación o una elongación son preferidas. En el caso de una sustitución de uno o más aminoácidos consecutivos o no consecutivos, las sustituciones son preferidas en las cuales los aminoácidos sustituidos son reemplazados por aminoácidos "equivalentes". La expresión "aminoácidos equivalentes" tiene el propósito de indicar cualquier aminoácido capaz de ser sustituido con uno de los aminoácidos de la estructura de base sin, sin embargo, modificar esencialmente las actividades biológicas de los anticuerpos correspondientes y como serán definidos más adelante, especialmente en los ejemplos. Estos aminoácidos equivalentes pueden ser determinados ya sea basándose en su homología estructural con los aminoácidos que los mismos reemplazan, o en los resultados de ensayos comparativos de actividad biológica entre los diferentes anticuerpos capaces de llevarse a cabo.

A título de ejemplo, se mencionan las posibilidades de sustitución que pueden ser llevadas a cabo sin dar como resultado una modificación profunda de la actividad biológica del anticuerpo modificado correspondiente.

Como ejemplo no limitativo, la siguiente tabla 2 proporciona posibilidades de sustitución concebibles con una conservación de la actividad biológica del anticuerpo modificado. Las sustituciones inversas también son, naturalmente, posibles en las mismas condiciones.

Tabla 2

Residuo original	Sustitución(es)
Ala (A)	Val, Gly, Pro
Arg (R)	Lys, His
Asn (N)	Gln
Asp (D)	Glu
Cys (C)	Ser
Gln (Q)	Asn
Glu (G)	Asp
Gly (G)	Ala
His (H)	Arg
Ile (I)	Leu
Leu (L)	Ile, Val, Met
Lys (K)	Arg
Met (M)	Leu
Phe (F)	Tyr
Pro (P)	Ala
Ser (S)	Thr, Cys
Thr (T)	Ser
Trp (W)	Tyr
Tyr (Y)	Phe, Trp
Val (V)	Leu, Ala

5 Debe apreciarse que la invención no se refiere a los anticuerpos en forma natural, es decir, no están en su medio ambiente natural pero que han sido capaces de ser aislados u obtenidos por purificación de fuentes naturales, o han sido obtenidos mediante recombinación genética, o mediante síntesis química, y pueden entonces contener aminoácidos no naturales como será descrito a continuación.

10 También debe apreciarse, según lo mencionado anteriormente, que la invención se refiere, más particularmente, a un anticuerpo divalente quimérico y/o humanizado, o cualquier fragmento o derivado funcional divalente, con una actividad antagonista. Los anticuerpos divalentes de la técnica anterior son agonistas o agonistas parciales. El anticuerpo monoclonal de la invención, incluyendo una bisagra modificada según lo descrito anteriormente, es decir, incluyendo una región bisagra que comprende la secuencia de aminoácidos SEC ID nº 56, 57 o 21, es nuevo y presenta la particularidad de tener una actividad antagonista mejorada en comparación con el anticuerpo quimérico o humanizado 224G11 sin ese tipo de bisagra modificada como será evidente de los ejemplos siguientes.

15 Los inventores han obtenido una actividad antagonista mejorada sin modificar el formato del anticuerpo. De hecho, en la técnica previa más cercana representada por el anticuerpo 5D5, ha sido necesario desarrollar un fragmento monovalente del anticuerpo para generar una actividad antagonista. En la presente solicitud, mediante el uso de la bisagra de la invención, es posible, por primera vez, obtener un anticuerpo divalente completo con mayor actividad antagonista, y esto se opone al conocimiento general.

20 Es divulgado asimismo el anticuerpo que comprende una región bisagra que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo formado por SEC ID nº 22 a 28 y 58 a 72, o una secuencia que tiene por lo menos 80% de identidad después de la alineación óptima con las secuencias SEC ID nº 22 a 28 y 58 a 72.

25 Para más claridad, las siguientes tablas 3 y 4 reagrupan a los aminoácidos y secuencias nucleotídicas de las diferentes bisagras preferidas de la invención.

30 Tabla 3

SEC ID nº	Aminoácidos	SEC ID nº	Nucleótidos
22	RKCCVECP	29	AGGAAGTGCTGTGTGGAGTGCCCCCCTGCCCA
23	PRDCGCKPCICT	30	CCCCGGGACTGTGGGTGCAAGCCTTGCAATTTGTACC
24	PKSCGCKPCICT	31	CCCAAGAGCTGTGGGTGCAAGCCTTGCAATTTGTACC
25	PKSCGCKPCICP	32	CCAAAGAGCTGCGGCTGCAAGCCTTGATCTGTCCC
26	PRDCGCKPCPPCP	33	CCACGGGACTGTGGGTGCAAGCCTGCCCTCCGTGTCCA
27	PRDCGCHTCPPCP	34	CCCAGAGACTGTGGGTGTACACCTGCCCTCCTTGTCT
28	PKSCDCHCPCP	35	CCCAAAAGCTGCGATTGCCACTGTCTCCATGTCCA

Tabla 4

SEC ID nº	Aminoácidos	SEC ID nº	Nucleótidos
58	CKSCDKHTCPCPCP	73	TGCAAGAGCTGCGACAAGACCCACACCTGTCCCCCCTGCC CT
59	PCSCDKHTCPCPCP	74	CCCTGCAGCTGCGACAAGACCCACACCTGTCCCCCCTGCC CT
60	PKCCDKHTCPCPCP	75	CCCAAGTGCTGCGACAAGACCCACACCTGTCCCCCCTGCC CT
61	PKSCCKHTCPCPCP	76	CCTAAGAGCTGTTGCAAGACCCACACCTGTCCCCCCTGCC T
62	PKSCDCTHTCPCPCP	77	CCCAAGAGCTGCGACTGCACCCACACCTGTCCCCCCTGCC CT
63	PKSCDKCHTCPCPCP	78	CCCAAGAGCTGCGACAAGTGCCACACCTGTCCCCCCTGCC CT
64	PKSCDKTHCCPCPCP	79	CCCAAGAGCTGCGACAAGACCCACTGCTGTCCCCCCTGCC CT
65	KCDKHTCPCPCP	80	AAGTGCAGACAAGACCCACACCTGTCCCCCCTGCCCT
66	PKSCDCHTCPCPCP	81	CCCAAGAGCTGCGACTGCCACACCTGTCCCCCCTGCCCT
67	PKSCDCTHCPCPCP	82	CCCAAGAGCTGCGACTGCACCCACTGCCCCCTGCCCT
68	PCSKHTCPCPCP	83	CCCTGCAGCTGCAAGCACACCTGTCCCCCCTGCCCT
69	PSCCTHTCPCPCP	84	CCTAGCTGCTGCACCCACACCTGTCCCCCCTGCCCT
70	PSCDKHCCPCPCP	85	CCCAGCTGCGACAAGCACTGCTGCCCCCTGCCCT
71	PKSCTCPCPCP	86	CCCAAGAGCTGCACCTGTCCCCCTTGTCT
72	PKSCDKCVCPCPCP	87	CCCAAGAGCTGCGATAAGTGCCTGGAGTGCCCCCTTGT CT

5 De acuerdo con un primer enfoque, el anticuerpo será definido por su secuencia de cadena pesada. Más particularmente, el anticuerpo de la invención, o uno de sus fragmentos o derivados funcionales, es caracterizado por que comprende una cadena pesada que comprende por lo menos una CDR seleccionada entre las CDR que comprenden las secuencias de aminoácidos SEC ID nº 1 a 3.

Las secuencias mencionadas son las siguientes:

10 SEC ID nº 1: GYIFTAYT
SEC ID nº 2: IKPNNGLA
SEC ID nº 3: ARSEITTEFDY

15 Es divulgado asimismo el anticuerpo, o uno de sus fragmentos o derivados funcionales, que comprende una cadena pesada que comprende por lo menos una, preferentemente dos, y todavía más preferentemente tres, CDR(s) seleccionadas entre CDR-H1, CDR-H2 y CDR-H3, donde:

- 20 - CDR-H1 comprende la secuencia de aminoácidos SEC ID nº 1,
- CDR-H2 comprende la secuencia de aminoácidos SEC ID nº 2,
- CDR-H3 comprende la secuencia de aminoácidos SEC ID nº 3.

25 En un segundo enfoque, el anticuerpo será ahora definido por su secuencia de cadena ligera. Más particularmente, el anticuerpo, o uno de sus fragmentos o derivados funcionales, es caracterizado por que comprende una cadena ligera que comprende por lo menos una CDR seleccionada entre CDR que comprenden la secuencia de aminoácidos SEC ID nº 5 a 7.

Las secuencias mencionadas son las siguientes:

30 SEC ID nº 5: ESVDSYANSF
SEC ID nº 6: RAS
SEC ID nº 7: QSKEDPLT

35 Es divulgado asimismo un anticuerpo de la invención, o uno de sus fragmentos o derivados funcionales, que comprende una cadena ligera que comprende por lo menos una, preferentemente dos, y todavía más preferentemente tres, CDR(s) seleccionadas entre CDR-L1, CDR-L2 y CDR-L3, donde:

- 40 - CDR-L1 comprende la secuencia de aminoácidos SEC ID nº 5,
- CDR-L2 comprende la secuencia de aminoácidos SEC ID nº 6,
- CDR-L3 comprende la secuencia de aminoácidos SEC ID nº 7.

El hibridoma murino capaz de secretar anticuerpos monoclonales de acuerdo con la presente invención, especialmente hibridoma de origen murino, fue depositado en el CNCM (Institut Pasteur, París, Francia) el 14/03/2007 bajo el número CNCM I-3731.

5 En la presente solicitud, se prefiere que IgG1 obtengan funciones efectoras, y todavía más preferentemente, ADCC y CDC.

10 El experto en la materia reconocerá que las funciones efectoras incluyen, por ejemplo, unión de C1q; citotoxicidad dependiente del complemento (CDC); unión al receptor de Fc; citotoxicidad mediada por células dependientes del anticuerpo (ADCC); fagocitosis; y regulación descendente de receptores de superficie celular (por ejemplo el receptor de células B; BCR).

15 Los anticuerpos son anticuerpos monoclonales específicos, especialmente de origen murino, quimérico o humanizado, los cuales pueden ser obtenidos de acuerdo con métodos convencionales bien conocidos por el experto en la materia.

20 En general, para la preparación de anticuerpos monoclonales o sus fragmentos o derivados funcionales, especialmente de origen murino, es posible hacer referencia a técnicas que son descritas en particular en el manual "Antibodies" (Harlow y Lane, Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor NY, pp. 726, 1988) o a la técnica de preparación a partir de hibridomas descrita por Kohler y Milstein (Nature, 256:495-497, 1975).

25 Los anticuerpos monoclonales pueden obtenerse, por ejemplo, de una célula animal inmunizada con el c-Met, o uno de sus fragmentos que contiene el epítipo específicamente reconocido por dichos anticuerpos monoclonales de acuerdo con la invención. Dicho c-Met, o uno de sus fragmentos, puede especialmente ser producido de acuerdo con los métodos de elaboración usuales, mediante recombinación genética comenzando con una secuencia de ácidos nucleicos contenida en la secuencia de ADNc que codifica al c-Met o por síntesis peptídica comenzando a partir de una secuencia de aminoácidos comprendida en la secuencia peptídica del c-Met.

30 Los anticuerpos monoclonales pueden ser, por ejemplo, purificados en una columna de afinidad en la cual el c-Met o uno de sus fragmentos que contiene el epítipo específicamente reconocido por dichos anticuerpos monoclonales de acuerdo con la invención ha sido previamente inmovilizado. Más particularmente, dichos anticuerpos monoclonales pueden ser purificados por cromatografía en proteína A y/o G, seguido o no seguido por cromatografía de intercambio iónico que apunta a eliminar los contaminantes proteicos residuales así como también el ADN y el LPS, en si mismo seguido o no seguido por cromatografía de exclusión en gel Sepharose™ con el fin de eliminar los potenciales agregados debido a la presencia de dímeros o de otros multímeros. En una forma aún más preferida, la totalidad de estas técnicas pueden utilizarse en forma simultánea o consecutiva.

40 El anticuerpo, o su fragmento o derivado funcional divalente, consiste preferentemente en un anticuerpo quimérico.

45 Por anticuerpo quimérico, se pretende indicar un anticuerpo el cual contiene una región variable natural (de cadena pesada y cadena ligera) derivada de un anticuerpo de una especie determinada en combinación con las regiones constantes de cadena ligera y cadena pesada de un anticuerpo de una especie heteróloga a dicha especie determinada (por ejemplo, ratón, caballo, conejo, perro, vaca, gallina, etc.).

50 Los anticuerpos o sus fragmentos del tipo quimérico pueden prepararse utilizando las técnicas de recombinación genética. Por ejemplo, el anticuerpo quimérico puede ser producido clonando un ADN recombinante que contiene un promotor y una secuencia que codifica la región variable de un anticuerpo monoclonal, no humano, especialmente murino, y una secuencia que codifica la región constante de anticuerpo humano. Un anticuerpo quimérico codificado por ese tipo de gen recombinante será, por ejemplo, una quimera de ratón- hombre, determinándose la especificidad de este anticuerpo por la región variable derivada del ADN murino y su isotipo determinado por la región constante derivada del ADN humano. Para los métodos de preparación de anticuerpos quiméricos, es posible, por ejemplo, referirse a los documentos Verhoeyn *et al.* (BioEssays, 8:74, 1988), Morrison *et al.* (Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82:6851-6855, 1984) o patente US nº 4.816.567.

55 Más particularmente, dicho anticuerpo, o su fragmento o derivado funcional, comprende un dominio variable de cadena pesada quimérico de secuencia que comprende la secuencia de aminoácidos SEC ID nº 46 o una secuencia que tiene por lo menos 80% de identidad después de alineación óptima con la secuencia SEC ID nº 46.

60 SEC. ID. nº 46: EVQLQQSGPELVKPGASVKISCKTSGYIFTAYTMHWVRQSLGESLDWIGGIKPNNGLANYNQKFKG KATLTVDKSSSTAYMDLRSLTSEDSAVYYCARSEITTEFDYWGQGTALTVSS

65 Más particularmente, dicho anticuerpo, o un fragmento o derivado del mismo funcional, comprende un dominio variable de cadena ligera quimérico de secuencia que comprende la secuencia de aminoácidos SEC ID nº 47 o una secuencia que tiene por lo menos 80% de identidad después de alineación óptima con la secuencia SEC ID nº 47.

SEC ID nº 47: DIVLTQSPASLAVSLGQRATISCRASESVDSYANSFMHWYQQKPGQPPKLLIYRASNLESGIPARFS
GSGSRTDFLTINPVEADDVATYYCQSKEDPLTFGSGTKLEMKR

- 5 Es asimismo divulgado un anticuerpo preferido, o su fragmento o derivado funcional divalente, denominado [224G11][IgG2quim], que comprende un dominio variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos SEC ID nº 46, un dominio variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos SEC ID nº 47, y una región bisagra que comprende la secuencia de aminoácidos SEC ID nº 22.
- 10 En la presente solicitud, el uso de corchetes no es necesario y, como en el ejemplo, la referencia [224G11][IgG2quim] debe ser considerada como idéntica a 224G11IgG2chim. En un mismo modo, para indicar que el anticuerpo es un anticuerpo murino, la expresión murino o la letra n puede agregarse para indicar que el anticuerpo es un anticuerpo quimérico, la expresión quim o la letra c puede agregarse y ; para indicar que el anticuerpo es un anticuerpo humanizado, puede agregarse la expresión, hz, Hz o la letra h. Como un ejemplo, el anticuerpo quimérico 224G11IgG2 puede ser denominado c224G11IgG2, c224G11[IgG2], c[224G11]IgG2, c[224G11][IgG2], 224G11IgG2quim, 224G11[IgG2quim], [224G11]IgG2quim o [224G11][IgG2quim].
- 15 Es divulgado asimismo un anticuerpo preferido, o su fragmento o derivado funcional divalente, denominado [224G11] [TH7quim], que comprende un dominio variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos SEC ID nº 46, un dominio variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos SEC ID nº 47, y una región bisagra que comprende la secuencia de aminoácidos SEC ID nº 28.
- 20 En la presente solicitud, la referencia TH7 debe ser considerada como idéntica a C7Δ6-9 o TH7C7Δ6-9. El símbolo Δ significa delección.
- 25 Es divulgado asimismo un anticuerpo, o su fragmento o derivado funcional divalente, denominado [224G11] [MHquim], que comprende un dominio variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos SEC ID nº 46, un dominio variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos SEC ID nº 47, y una región bisagra que comprende la secuencia de aminoácidos SEC ID nº 23.
- 30 Es divulgado asimismo un anticuerpo preferido, o su fragmento o derivado funcional divalente, denominado [224G11] [MUP9Hquim], que comprende un dominio variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos SEC ID nº 46, un dominio variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos SEC ID nº 47, y una región bisagra que comprende la secuencia de aminoácidos SEC ID nº 26.
- 35 Es divulgado asimismo un anticuerpo preferido, o su fragmento o derivado funcional divalente, denominado [224G11] [MMCHquim], que comprende un dominio variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos SEC ID nº 46, un dominio variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos SEC ID nº 47, y una región bisagra que comprende la secuencia de aminoácidos SEC ID nº 24.
- 40 Es divulgado asimismo un anticuerpo preferido, o su fragmento o derivado funcional divalente, denominado [224G11] [C1], que comprende un dominio variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos SEC ID nº 46, un dominio variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos SEC ID nº 47, y una región bisagra que comprende la secuencia de aminoácidos SEC ID nº 58.
- 45 Es divulgado asimismo un anticuerpo preferido, o su fragmento o derivado funcional divalente, denominado [224G11] [C2], que comprende un dominio variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos SEC ID nº 46, un dominio variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos SEC ID nº 47, y una región bisagra que comprende la secuencia de aminoácidos SEC ID nº 59.
- 50 Es divulgado asimismo un anticuerpo preferido, o su fragmento o derivado funcional divalente, denominado [224G11] [C3], que comprende un dominio variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos SEC ID nº 46, un dominio variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos SEC ID nº 47, y una región bisagra que comprende la secuencia de aminoácidos SEC ID nº 60.
- 55 Es divulgado asimismo un anticuerpo preferido, o su fragmento o derivado funcional divalente, denominado [224G11] [C5], que comprende un dominio variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos SEC ID nº 46, un dominio variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos SEC ID nº 47, y una región bisagra que comprende la secuencia de aminoácidos SEC ID nº 61.
- 60 Es divulgado asimismo un anticuerpo preferido, o su fragmento o derivado funcional divalente, denominado [224G11] [C6], que comprende un dominio variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos SEC ID nº 46, un dominio variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos SEC ID nº 47, y una región bisagra que comprende la secuencia de aminoácidos SEC ID nº 62.
- 65 Es divulgado asimismo un anticuerpo preferido, o su fragmento o derivado funcional divalente, de acuerdo con la invención y denominado [224G11] [C7], que comprende un dominio variable de cadena pesada que comprende la

secuencia de aminoácidos SEC ID nº 46, un dominio variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos SEC ID nº 47, y una región bisagra que comprende la secuencia de aminoácidos SEC ID nº 63.

5 Es divulgado asimismo un anticuerpo preferido, o su fragmento o derivado funcional divalente, denominado [224G11] [C9], que comprende un dominio variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos SEC ID nº 46, un dominio variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos SEC ID nº 47, y una región bisagra que comprende la secuencia de aminoácidos SEC ID nº 64.

10 Es divulgado asimismo un anticuerpo preferido, o su fragmento o derivado funcional divalente, y denominado [224G11] [Δ 1-3], que comprende un dominio variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos SEC ID nº 46, un dominio variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos SEC ID nº 47, y una región bisagra que comprende la secuencia de aminoácidos SEC ID nº 65.

15 Es divulgado asimismo un anticuerpo preferido, o su fragmento o derivado funcional divalente, [224G11] [C7 Δ 6], que comprende un dominio variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos SEC ID nº 46, un dominio variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos SEC ID nº 47, y una región bisagra que comprende la secuencia de aminoácidos SEC ID nº 66.

20 Es divulgado asimismo un anticuerpo preferido, o su fragmento o derivado funcional divalente, denominado [224G11] [C6 Δ 9], que comprende un dominio variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos SEC ID nº 46, un dominio variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos SEC ID nº 47, y una región bisagra que comprende la secuencia de aminoácidos SEC ID nº 67.

25 Es divulgado asimismo un anticuerpo preferido, o su fragmento o derivado funcional divalente, denominado [224G11] [C2 Δ 5-7], que comprende un dominio variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos SEC ID nº 46, un dominio variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos SEC ID nº 47, y una región bisagra que comprende la secuencia de aminoácidos SEC ID nº 68.

30 Es divulgado asimismo un anticuerpo preferido, o su fragmento o derivado funcional divalente, denominado [224G11] [C5 Δ 2-6], que comprende un dominio variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos SEC ID nº 46, un dominio variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos SEC ID nº 47, y una región bisagra que comprende la secuencia de aminoácidos SEC ID nº 69.

35 Es divulgado asimismo un anticuerpo preferido, o su fragmento o derivado funcional divalente, denominado [224G11] [C9 Δ 2-7], que comprende un dominio variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos SEC ID nº 46, un dominio variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos SEC ID nº 47, y una región bisagra que comprende la secuencia de aminoácidos SEC ID nº 70.

40 Es divulgado asimismo un anticuerpo preferido, o su fragmento o derivado funcional divalente, denominado [224G11] [Δ 5-6-7-8], que comprende un dominio variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos SEC ID nº 46, un dominio variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos SEC ID nº 47, y una región bisagra que comprende la secuencia de aminoácidos SEC ID nº 71.

45 Es divulgado asimismo un anticuerpo preferido, o su fragmento o derivado funcional divalente, denominado [224G11] [IgG1/IgG2], comprende un dominio variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos SEC ID nº 46, un dominio variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos SEC ID nº 47, y una región bisagra que comprende la secuencia de aminoácidos SEC ID nº 72.

50 Es divulgado asimismo que el anticuerpo, o su fragmento o derivado funcional divalente, consiste en un anticuerpo humano.

55 El término "anticuerpo humano" incluye a todos los anticuerpos que tienen una o más regiones variables y constantes derivadas de secuencias de inmunoglobulina humana. En una forma de realización preferida, todos los dominios variables y constantes (o regiones) son derivados de secuencia de inmunoglobulina humana (anticuerpo totalmente humano). En otras palabras, incluye cualquier anticuerpo que presenta regiones variables y constantes (en caso de estar presentes) derivado de secuencias de inmunoglobulina de línea germinal humana, es decir, que posee una secuencia de aminoácidos la cual corresponde a la de un anticuerpo producido por un humano y/o que ha sido preparado utilizando cualquiera de las técnicas para la preparación de anticuerpos humanos conocidas por el expertos en la materia.

60 En una forma de realización, los anticuerpos monoclonales humanos son producidos mediante un hibridoma el cual incluye una célula B obtenida de un animal no humano transgénico, por ejemplo, un ratón transgénico, que presenta un genoma que comprende un transgén de cadena pesada humano y un transgén de cadena ligera fusionados a una célula inmortalizada.

65

Como ejemplo para ese tipo de ratón transgénico, puede mencionarse el XENOMOUSE™ el cual es una cepa de ratón modificada por ingeniería genética que comprende fragmentos grandes de los sitios de inmunoglobulina humana y es deficiente en la producción de anticuerpos de ratón (Green *et al.*, 1994, *Nature Genetics*, 7:13-21). El XENOMOUSE™ produce un repertorio humano del tipo adulto de anticuerpos completamente humanos, y genera anticuerpos monoclonales humanos específico para el antígeno. Una segunda generación XENOMOUSE™ contiene aproximadamente 80% del repertorio de anticuerpos humanos (Green & Jakobovits, 1998, *J. Exp. Med.*, 188:483-495).

Cualquier otra técnica conocida por el experto en la materia, tal como la técnica de exhibición de fagos, también puede utilizarse para la generación de anticuerpo humano de acuerdo con la invención.

El anticuerpo de la invención, o su fragmento o derivado funcional divalente, consiste en un anticuerpo humanizado.

Mediante la expresión "anticuerpo humanizado", se pretende indicar un anticuerpo el cual contiene regiones CDR derivadas de un anticuerpo de origen no humano, las otras partes de la molécula del anticuerpo son derivadas de uno (o de varios) anticuerpos humanos. Asimismo, algunos de los residuos de los segmentos del esqueleto (denominado FR) pueden ser modificados con el fin de conservar la afinidad de la unión (Jones *et al.*, *Nature*, 321:522-525, 1986; Verhoeven *et al.*, *Science*, 239:1534-1536, 1988; Riechmann *et al.*, *Nature*, 332:323-327, 1988).

Los anticuerpos humanizados de acuerdo con la invención o sus fragmentos pueden prepararse mediante técnicas conocidas por el experto en la materia (tales como, por ejemplo, aquellas descritas en los documentos Singer *et al.*, *J. Immun.* 150:2844-2857, 1992; Mountain *et al.*, *Biotechnol. Genet. Eng. Rev.*, 10: 1-142, 1992; o Bebbington *et al.*, *Bio/Technology*, 10:169-175, 1992).

El experto en la materia conoce otros métodos de humanización como, por ejemplo, el método "CDR Grafting" ("Injerto de CDR") descrito por Protein Design Lab (PDL) en las solicitudes de patente EP 0 451261, EP 0 682 040, EP 0 9127, EP 0 566 647 o las patentes US nº 5.530.101, US nº 6.180.370, US nº 5.585.089 y US nº 5.693.761. También pueden mencionarse las siguientes solicitudes de patentes: US nº 5.639.641; US nº 6.054.297; US nº 5.886.152 y US nº 5.877.293.

Es divulgado asimismo que dicho anticuerpo, o su fragmento o derivado funcional, comprende un dominio variable de cadena pesada humanizado de secuencia que comprende la secuencia de aminoácidos SEC ID nº 4 o una secuencia que tiene por lo menos 80% de identidad después de alineación óptima con la secuencia SEC ID nº 4.

SEC. ID. nº 4: QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYIFTAYTMHWVRQAPGQGLEWMGWIKPNNGLANYAQKFQGRVTMTRDTSISTAYMELSRLLRSDDTAVYYCARSEITTEFDYWGQGTLVTVSS

Es divulgado asimismo que dicho anticuerpo, o su fragmento o derivado funcional, comprende un dominio variable de cadena ligera humanizado seleccionado del grupo de secuencias que comprende la secuencia de aminoácidos SEC ID nº 8, 9 o 10 o una secuencia que tiene por lo menos 80% de identidad después de alineación óptima con la secuencia SEC ID nº 8, 9 o 10.

SEC. ID. nº 8: DIVLTQSPDSLAVSLGERATINCKSSSEVDSYANSFMHWYQQKPGQPPKLLIYRASTRESGVPDRFSGSGSRTDFTLTISLQAEDVAVYYCQQSKEDPLTFGGGTKVEIKR

SEC. ID. nº 9: DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSSEVDSYANSFMHWYQQKPGQPPKLLIYRASTRESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISLQAEDVAVYYCQQSKEDPLTFGGGTKVEIKR

SEC. ID. nº 10: DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSSEVDSYANSFLHWYQQKPGQPPKLLIYRASTRESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISLQAEDVAVYYCQQSKEDPLTFGGGTKVEIKR

Es divulgado asimismo un anticuerpo o su fragmento o derivado funcional divalente, denominado [224G11] [IgG2H21], que comprende un dominio variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos SEC ID nº 4, un dominio variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos SEC ID nº 8, y una región bisagra que comprende la secuencia de aminoácidos SEC ID nº 22.

Es divulgado asimismo un anticuerpo o su fragmento o derivado funcional divalente, denominado [224G11] [IgG2H22], que comprende un dominio variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos SEC ID nº 4, un dominio variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos SEC ID nº 9, y una región bisagra que comprende la secuencia de aminoácidos SEC ID nº 22.

Es divulgado asimismo un anticuerpo, o su fragmento o derivado funcional divalente, denominado [224G11] [IgG2H23], que comprende un dominio variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos SEC ID nº 4, un dominio variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos SEC ID nº 10, y una región bisagra que comprende la secuencia de aminoácidos SEC ID nº 22.

Es divulgado asimismo un anticuerpo o su fragmento o derivado funcional divalente denominado [224G11] [TH7Hz1], que comprende un dominio variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos SEC ID nº 4, un dominio variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos SEC ID nº 8, y una región bisagra que comprende la secuencia de aminoácidos SEC ID nº 28.

Es divulgado asimismo un anticuerpo, o su fragmento o derivado funcional divalente, denominado [224G11] [TH7z2], que comprende un dominio variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos SEC ID nº 4, un dominio variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos SEC ID nº 9, y una región bisagra que comprende la secuencia de aminoácidos SEC ID nº 28.

Es divulgado asimismo un anticuerpo o su fragmento o derivado funcional divalente, denominado [224G11] [TH7Hz3], que comprende un dominio variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos SEC ID nº 4, un dominio variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos SEC ID nº 10, y una región bisagra que comprende la secuencia de aminoácidos SEC ID nº 28.

Es divulgado asimismo que los anticuerpos pueden describirse por sus cadenas pesadas y ligeras totales, respectivamente.

Es divulgado asimismo que el anticuerpo [224G11] [IgG2quim] comprende una cadena pesada completa que comprende la secuencia de aminoácidos SEC ID nº 50, o una secuencia que tiene por lo menos 80% de identidad después de alineación óptima con la secuencia SEC ID nº 50, y una cadena ligera completa que comprende la secuencia de aminoácidos SEC ID nº 52, o una secuencia que tiene por lo menos 80% de identidad después de alineación óptima con la secuencia SEC ID nº 52.

Es divulgado asimismo que el anticuerpo [224G11] [TH7quim] de la invención comprende una cadena pesada completa que comprende la secuencia de aminoácidos SEC ID nº 51, o una secuencia que tiene por lo menos 80% de identidad después de alineación óptima con la secuencia SEC ID nº 51, y una cadena ligera completa que comprende la secuencia de aminoácidos SEC ID nº 52, o una secuencia que tiene por lo menos 80% de identidad después de alineación óptima con la secuencia SEC ID nº 52.

Es divulgado asimismo que el anticuerpo [224G11] [C1] comprende una cadena pesada completa que comprende la secuencia de aminoácidos SEC ID nº 88, o una secuencia que tiene por lo menos 80% de identidad después de alineación óptima con la secuencia SEC ID nº 88, y una cadena ligera completa que comprende la secuencia de aminoácidos SEC ID nº 52, o una secuencia que tiene por lo menos 80% de identidad después de alineación óptima con la secuencia SEC ID nº 52.

Es divulgado asimismo que el anticuerpo [224G11] [C2] comprende una cadena pesada completa que comprende la secuencia de aminoácidos SEC ID nº 89, o una secuencia que tiene por lo menos 80% de identidad después de alineación óptima con la secuencia SEC ID nº 89, y una cadena ligera completa que comprende la secuencia de aminoácidos SEC ID nº 52, o una secuencia que tiene por lo menos 80% de identidad después de alineación óptima con la secuencia SEC ID nº 52.

Es divulgado asimismo que el anticuerpo [224G11] [C3] comprende una cadena pesada completa que comprende la secuencia de aminoácidos SEC ID nº 90, o una secuencia que tiene por lo menos 80% de identidad después de alineación óptima con la secuencia SEC ID nº 90, y una cadena ligera completa que comprende la secuencia de aminoácidos SEC ID nº 52, o una secuencia que tiene por lo menos 80% de identidad después de alineación óptima con la secuencia SEC ID nº 52.

Es divulgado asimismo que el anticuerpo [224G11] [C5] comprende una cadena pesada completa que comprende la secuencia de aminoácidos SEC ID nº 91, o una secuencia que tiene por lo menos 80% de identidad después de alineación óptima con la secuencia SEC ID nº 91, y una cadena ligera completa que comprende la secuencia de aminoácidos SEC ID nº 52, o una secuencia que tiene por lo menos 80% de identidad después de alineación óptima con la secuencia SEC ID nº 52.

Es divulgado asimismo que el anticuerpo [224G11] [C6] comprende una cadena pesada completa que comprende la secuencia de aminoácidos SEC ID nº 92, o una secuencia que tiene por lo menos 80% de identidad después de alineación óptima con la secuencia SEC ID nº 92, y una cadena ligera completa que comprende la secuencia de aminoácidos SEC ID nº 52, o una secuencia que tiene por lo menos 80% de identidad después de alineación óptima con la secuencia SEC ID nº 52.

Es divulgado asimismo que el anticuerpo [224G11] [C7] comprende una cadena pesada completa que comprende la secuencia de aminoácidos SEC ID nº 93, o una secuencia que tiene por lo menos 80% de identidad después de alineación óptima con la secuencia SEC ID nº 93, y una cadena ligera completa que comprende la secuencia de aminoácidos SEC ID nº 52, o una secuencia que tiene por lo menos 80% de identidad después de alineación óptima con la secuencia SEC ID nº 52.

- 5 Es divulgado asimismo que el anticuerpo [224G11] [IgG2Hz3] comprende una cadena pesada completa que comprende la secuencia de aminoácidos SEC ID nº 36, o una secuencia que tiene por lo menos 80% de identidad después de alineación óptima con la secuencia SEC ID nº 36 y una cadena ligera completa que comprende la secuencia de aminoácidos SEC ID nº 40, o una secuencia que tiene por lo menos 80% de identidad después de alineación óptima con la secuencia SEC ID nº 40.
- 10 Es divulgado asimismo que el anticuerpo [224G11] [TH7Hz1] comprende una cadena pesada completa que comprende la secuencia de aminoácidos SEC ID nº 37, o una secuencia que tiene por lo menos 80% de identidad después de alineación óptima con la secuencia SEC ID nº 37 y una cadena ligera completa que comprende la secuencia de aminoácidos SEC ID nº 38, o una secuencia que tiene por lo menos 80% de identidad después de alineación óptima con la secuencia SEC ID nº 38.
- 15 Es divulgado asimismo que el anticuerpo [224G11] [TH7Hz2] comprende una cadena pesada completa que comprende la secuencia de aminoácidos SEC ID nº 37, o una secuencia que tiene por lo menos 80% de identidad después de alineación óptima con la secuencia SEC ID nº 37 y una cadena ligera completa que comprende la secuencia de aminoácidos SEC ID nº 39, o una secuencia que tiene por lo menos 80% de identidad después de alineación óptima con la secuencia SEC ID nº 39.
- 20 Es divulgado asimismo que el anticuerpo [224G11] [TH7Hz3] comprende una cadena pesada completa que comprende la secuencia de aminoácidos SEC ID nº 37, o una secuencia que tiene por lo menos 80% de identidad después de alineación óptima con la secuencia SEC ID nº 37 y una cadena ligera completa que comprende la secuencia de aminoácidos SEC ID nº 40, o una secuencia que tiene por lo menos 80% de identidad después de alineación óptima con la secuencia SEC ID nº 40.
- 25 Es divulgado asimismo que otros ejemplos de anticuerpos, o sus derivados, comprenden cadenas pesadas completas que comprenden una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo formado por SEC ID nº 88 a 102 (secuencias nucleotídicas correspondientes son SEC ID nº 103 a 117).
- 30 Por "fragmento funcional" de un anticuerpo de acuerdo con la invención, tiene el propósito de indicar en particular un fragmento de anticuerpo, tal como fragmentos Fv, scFv (sc por cadena simple), Fab, F(ab')₂, Fab', scFv-Fc o diacuerpos, o cualquier fragmento del cual el tiempo de vida media se habría incrementado mediante modificación química, tal como la adición de poli(alquilen)glicol tal como poli(etilen)glicol ("PEGilación") (fragmentos pegilados denominados Fv-PEG, scFv-PEG, Fab-PEG, F(ab')₂-PEG o Fab'-PEG) ("PEG" por Poli(Etilen) Glicol), o mediante la
- 35 incorporación en un liposoma, teniendo dichos fragmentos por lo menos una de las CDR características de secuencia SEC ID nº 1 a 3 y de 5 a 7 de acuerdo con la invención, y, especialmente, en que es capaz de ejercer en forma general una actividad parcial uniforme del anticuerpo del cual descende, tal como, en particular, la capacidad de reconocer y de unirse al c-Met, y, en caso necesario, inhibir la actividad del c-Met.
- 40 Preferentemente, dichos fragmentos funcionales estarán constituidos por o comprenderán una secuencia parcial de la cadena variable pesada o ligera del anticuerpo del cual derivan, siendo dicha secuencia parcial suficiente para retener la misma especificidad de unión que el anticuerpo del cual descende y una afinidad suficiente, preferentemente por lo menos igual a 1/100, en un modo más preferido hasta por lo menos 1/10, de la del anticuerpo del cual descende, con respecto al c-Met. Ese tipo de fragmento funcional contendrá por lo menos 5 aminoácidos,
- 45 preferentemente 6, 7, 8, 9, 10, 12, 15, 25, 50 y 100 aminoácidos consecutivos de la secuencia del anticuerpo del cual descende.
- 50 Preferentemente, estos fragmentos funcionales serán fragmentos de tipo Fv, scFv, Fab, F(ab')₂, F(ab'), scFv-Fc o diacuerpos, los cuales generalmente tienen la misma especificidad de unión que el anticuerpo del cual descenden. En una forma de realización más preferida de la invención, estos fragmentos son seleccionados entre fragmentos divalentes tales como fragmentos F(ab')₂. De acuerdo con la presente invención, los fragmentos de anticuerpo de la invención pueden obtenerse comenzando de anticuerpos tales como los descritos anteriormente mediante métodos tales como digestión por enzimas, tal como pepsina y/o papaína y/o por disociación de los puentes disulfuro mediante reducción química. De otro modo, los fragmentos de anticuerpo comprendidos en la presente invención
- 55 pueden obtenerse mediante técnicas de recombinación genética asimismo bien conocidas por el experto en la materia o de otro modo mediante síntesis peptídica por medio de, por ejemplo, sintetizadores peptídicos automáticos tales como aquellos suministrados por la compañía Applied Biosystems, etc.
- 60 Por "fragmento divalente", debe entenderse cualquier fragmento de anticuerpo que comprende dos brazos y, más particularmente, fragmentos F(ab')₂.
- 65 Por "derivados" de un anticuerpo, se hace referencia a una proteína de unión que comprende una estructura proteica y por lo menos una de las CDR seleccionadas del anticuerpo original con el fin de mantener la capacidad de unión. Dichos compuestos son bien conocidos por el experto en la materia y serán descritos con mayor detalle en la siguiente memoria.

Es divulgado asimismo que el anticuerpo, o uno de sus fragmentos o derivados funcionales, está caracterizado por que dicho derivado consiste en una proteína de unión que comprende una estructura en la cual por lo menos una CDR ha sido injertada para la conservación de las propiedades de reconocimiento paratópicas del anticuerpo original.

5 Una o varias secuencias a través de las 6 secuencias de CDR descritas en la invención pueden presentarse en una estructura proteica. En este caso, la estructura proteica reproduce el armazón proteico con pliegue apropiado de las CDR(s) injertada(s), permitiéndole(s) mantener sus propiedades de reconocimiento paratópicas del antígeno.

10 El experto en la materia sabe cómo seleccionar la estructura proteica sobre la cual por lo menos una CDR seleccionada del anticuerpo original podría ser injertada. Más particularmente, es conocido que, para ser seleccionada, dicha estructura debería exhibir diversas características como sigue (Skerra A., J. Mol. Recogn., 13, 2000, 167-187):

- 15 - filogenéticamente buena conservación,
- arquitectura robusta con una organización molecular tridimensional bien conocida (tal como, por ejemplo, cristalografía o RMN),
- 20 - tamaño pequeño,
- ningún grado o solamente bajo grado de modificaciones postraducción,
- fácil de producir, expresar y purificar.

25 Dicha estructura proteica puede ser, aunque sin limitarse a, una estructura seleccionada del grupo formado por fibronectina y preferentemente el décimo dominio del tipo III de fibronectina (FNfn10), lipocalina, anticalina (Skerra A., J. Biotechnol., 2001, 74(4):257-75), el derivado de proteína Z del dominio B de la proteína A estafilocócica, tioredoxina A o cualquier proteína con dominio repetido tal como "repetición de anquirina" (Kohl *et al.*, PNAS, 2003, vol. 100, No.4, 1700-1705), "repetición de armadillo", "repetición rica en leucina" o "repetición de tetratricopéptido".

30 También puede mencionarse el derivado de estructura de toxinas (tales como, por ejemplo, toxinas de escorpión, insecto, planta o molusco) o inhibidores proteicos de la sintasa de óxido nítrico neuronal (PIN).

35 Como un ejemplo no limitativo de dichas construcciones híbridas, puede mencionarse la inserción de la CDR-H1 (cadena pesada) de un anticuerpo anti-CD4, es decir, el anticuerpo 13B8.2, en uno de los lazos expuestos de la PIN. Las propiedades de unión de la proteína de unión obtenida siguen siendo similares al anticuerpo original (Bes *et al.*, BBRC 343, 2006, 334-344). También puede mencionarse el injerto de la CDR-H3 (cadena pesada) de un anticuerpo VHH anti-lisozima en un lazo de neocarzinostatina (Nicaise *et al.*, 2004).

40 Según lo mencionado anteriormente, dicha estructura proteica puede comprender entre 1 y 6 CDR(s) del anticuerpo original. En una forma de realización preferida, pero sin limitación alguna, el experto en la materia seleccionaría por lo menos una CDR de la cadena pesada, sabiendo que dicha cadena pesada está particularmente implicada en la especificidad del anticuerpo. La selección de la(s) CDR(s) de interés será evidente para el experto en la materia con método conocido (BES *et al.*, FEBS letters 508, 2001, 67-74).

45 Como una evidencia, estos ejemplos no son limitativos y cualquier otra estructura conocida o descrita debe estar incluida en la presente memoria descriptiva.

50 Es divulgado asimismo un ácido nucleico aislado, caracterizado por que se selecciona entre los siguientes ácidos nucleicos:

- a) un ácido nucleico, ADN o ARN, que codifica un anticuerpo, o uno de sus fragmentos o derivados funcionales, de acuerdo con la invención;
- 55 b) una secuencia de ácidos nucleicos que comprende las secuencias SEC ID nº 11, SEC ID nº 12, SEC ID nº 13 y las secuencias SEC ID nº 15, SEC ID nº 16 y SEC ID nº 17;
- c) una secuencia de ácidos nucleicos que comprende las secuencias SEC ID nº 14 y SEC ID nº 18, 19 o 20;
- 60 d) los correspondientes ácidos nucleicos de ARN de los ácidos nucleicos según lo definido en b) o c);
- e) los ácidos nucleicos complementarios de los ácidos nucleicos según lo definido en a), b) y c); y
- 65 f) un ácido nucleico de por lo menos 18 nucleótidos capaz de hibridación bajo condiciones de elevada severidad con por lo menos una de las CDR de la secuencia SEC ID nº 11 a 13 y 15 a 17.

Es divulgado asimismo un ácido nucleico aislado, caracterizado por que se selecciona entre los siguientes ácidos nucleicos:

- 5 - un ácido nucleico, ADN o ARN, que codifica un anticuerpo, o uno de sus fragmentos o derivados funcionales, de acuerdo con la presente invención y donde la secuencia de ácidos nucleicos que codifica para la región bisagra de dicho anticuerpo comprende o tiene una secuencia seleccionada entre el grupo formado por las secuencias SEC ID nº 29 a 35 y SEC ID nº 73 a 87.

10 Por ácido nucleico, nucleico o secuencia de ácido nucleico, polinucleótido, oligonucleótido, secuencia de polinucleótidos, secuencia de nucleótidos, términos que serán empleados en forma indistinta en la presente invención, se pretende indicar una ligación precisa de nucleótidos, los cuales están modificados o sin modificar, permitiendo la definición de un fragmento o una región de un ácido nucleico, que contiene o no contiene nucleótidos no naturales, y pudiendo corresponder también con un ADN de doble hebra, un ADN de hebra simple como a los
15 productos de transcripción de dichos ADN.

Debe entenderse también en este punto que la presente invención no se ocupa de las secuencias nucleotídicas en su entorno cromosómico natural, es decir, en el estado natural. Se refiere a secuencias las cuales han sido aisladas y/o purificadas, es decir, han sido seleccionadas en forma directa o indirecta, por ejemplo por copia, habiendo sido
20 su entorno por lo menos parcialmente modificado. Por lo tanto, asimismo se pretende indicar en este punto los ácidos nucleicos aislados obtenidos por recombinación genética por medio de, por ejemplo, células hospedadoras u obtenidos por síntesis química.

Una hibridación bajo condiciones de elevada severidad significa que las condiciones de temperatura y las
25 condiciones de resistencia iónica se seleccionan de modo tal que permiten el mantenimiento de la hibridación entre dos fragmentos de ADN complementario. A modo de ilustración, las condiciones de elevada severidad de la etapa de hibridación para los propósitos de definir los fragmentos polinucleotídicos antes descritos son ventajosamente las siguientes.

30 La hibridación de ADN-ADN o ADN-ARN se lleva a cabo en dos etapas: (1) prehibridación a 42°C durante 3 horas en tampón de fosfato (20 mM, pH 7,5) que contiene 5 x SSC (1 x SSC corresponde a una solución de NaCl 0.15 M + citrato sódico 0.015 M), 50% de formamida, 7% de dodecilsulfato sódico (SDS), 10 x Denhardt's, 5% de sulfato de dextrano y 1% de ADN de esperma de salmón; (2) hibridación real durante 20 horas a una temperatura dependiente del tamaño de la sonda (es decir, 42°C, para un tamaño de sonda > 100 nucleótidos) seguido por 2 lavados de 20
35 minutos a 20°C en 2 x SSC + 2% de SDS, 1 lavado de 20 minutos a 20°C en 0,1 x SSC + 0,1% de SDS. El último lavado se lleva a cabo en 0,1 x SSC + 0,1% de SDS durante 30 minutos a 60°C para un tamaño de sonda de > 100 nucleótidos. Las condiciones de hibridación de elevada severidad antes descritas para un polinucleótido de tamaño definido pueden adaptarse por el experto en la materia para oligonucleótidos de tamaño mayor o menor, de acuerdo con las enseñanzas de Sambrook *et al.* (1989, Molecular cloning: a laboratory manual. 2nd Ed. Cold Spring Harbor).

40 Es divulgado asimismo un vector que comprende un ácido nucleico.

Son divulgados asimismo vectores de clonación y/o expresión que contienen una secuencia nucleotídica.

45 Los vectores contienen elementos los cuales permiten la expresión y/o la secreción de las secuencias nucleotídicas traducidas en una células hospedadoras determinadas. Por lo tanto, el vector debe contener un promotor, señales de iniciación y terminación de la traducción, así como también regiones apropiadas de regulación de la transcripción. Debe poder mantenerse en forma estable en la célula hospedadora y puede opcionalmente tener señales particulares las cuales especifican la secreción de la proteína traducida. Estos elementos diferentes son
50 seleccionados y optimizados por el experto en la materia en función de la célula hospedadora utilizada. Con este fin, las secuencias nucleotídicas de acuerdo con la invención pueden insertarse en vectores de replicación autónomos en el hospedador seleccionado, o pueden ser vectores integrativos del hospedador seleccionado.

55 Ese tipo de vectores son preparados mediante métodos actualmente utilizados por el experto en la materia, y los clones resultantes pueden ser introducidos en un hospedador apropiado mediante métodos convencionales, tales como lipofección, electroporación, choque térmico, o métodos químicos.

Los vectores son, por ejemplo, vectores de origen plasmídico o viral. Son útiles para transformar células
60 hospedadoras con el fin de clonar o expresar las secuencias nucleotídicas de acuerdo con la invención.

Son divulgadas asimismo unas células hospedadoras transformadas mediante o que comprenden un vector.

65 La célula hospedadora puede seleccionarse entre sistemas procarióticos o eucarióticos, por ejemplo, células bacterianas pero asimismo células de levadura o células animales, en particular células de mamífero. Es asimismo posible utilizar células de insecto o células vegetales.

Son divulgados asimismo animales, excepto el hombre, que comprenden por lo menos una célula transformada de acuerdo con la invención.

5 Es divulgado asimismo un proceso para la producción de un anticuerpo, o uno de sus fragmentos funcionales, caracterizado por que comprende las siguientes etapas:

a) cultivar en un medio y unas condiciones de cultivo apropiadas una célula hospedadora; y

10 b) recuperar dichos anticuerpos, o uno de sus fragmentos funcionales, producidos de ese modo comenzado del medio de cultivo o dichas células cultivadas.

15 Las células transformadas pueden utilizarse en procesos para la preparación de polipéptidos recombinantes de acuerdo con la invención. Los procesos para la preparación de un polipéptido en forma recombinante, caracterizado por que emplean un vector y/o una célula transformada mediante un vector de acuerdo, son asimismo divulgados. Es divulgado asimismo que una célula transformada por un vector se cultiva bajo condiciones que permiten la expresión de dicho polipéptido y se recupera dicho péptido recombinante.

20 Según lo mencionado, la célula hospedadora puede seleccionarse entre sistemas procarióticos o eucarióticos. En particular, es posible identificar secuencias nucleotídicas de acuerdo con la invención, facilitando la secreción en dicho sistema procariótico o eucariótico. Un vector de acuerdo con la invención portador de ese tipo de secuencia puede, por lo tanto, utilizarse ventajosamente para la producción de proteínas recombinantes, destinadas a ser secretadas. En efecto, la purificación de estas proteínas recombinantes de interés será facilitada por el hecho de que están presentes en el sobrenadante del cultivo celular más que en el interior de las células hospedadoras.

25 Es asimismo posible preparar los polipéptidos mediante síntesis química. Ese tipo de proceso de preparación es asimismo un objeto de la invención. El experto en la materia conoce los procesos de síntesis química, por ejemplo las técnicas que emplean fases sólidas [Steward *et al.*, 1984, Solid phase peptide synthesis, Pierce Chem. Company, Rockford, 111, 2da ed., (1984)] o técnicas que utilizan fases sólidas parciales, por condensación de fragmentos o mediante una síntesis clásica en solución. Los polipéptidos obtenidos mediante síntesis química y que son capaces de contener aminoácidos no naturales correspondientes son asimismo divulgados.

30 Es asimismo divulgado que los anticuerpos, o uno de sus fragmentos o derivados funcionales, pueden ser obtenidos mediante un proceso como es divulgado.

35 Es divulgado asimismo un anticuerpo de la invención como un medicamento.

40 Es divulgada asimismo una composición farmacéutica que comprende a modo de principio activo un compuesto que consiste en un anticuerpo, o uno de sus fragmentos funcionales, preferentemente mezclado con un excipiente y/o un vehículo aceptable para uso farmacéutico.

Es divulgada asimismo una composición tal como se describe con anterioridad la cual comprende, adicionalmente, como un producto de combinación para el uso simultáneo, separado o consecutivo, un anticuerpo antitumoral.

45 Todavía más preferentemente, dicho segundo anticuerpo antitumoral podría seleccionarse entre los anticuerpos anti-IGF-IR, anti-EGFR, anti-HER2/neu, anti-VEGFR, anti-VEGF, etc., o entre cualquiera de los otros anticuerpos antitumorales conocidos por el experto en la materia. Es divulgado asimismo el uso, como segundo anticuerpo, de fragmentos funcionales o derivados de los anticuerpos mencionados anteriormente.

50 Es divulgado asimismo que los anticuerpos anti-EGFR se seleccionan tal como por ejemplo el anticuerpo C225 (Erbix).

“Uso simultáneo” quiere decir la administración de los dos compuestos de la composición en una forma farmacéutica única e idéntica.

55 “Uso por separado” se entiende que significa la administración, al mismo tiempo, de los dos compuestos de la composición en formas farmacéuticas distintas.

60 “Uso consecutivo” debe apreciarse que significa la administración sucesiva de los dos compuestos de la composición, cada uno en una forma farmacéutica distinta.

65 En forma general, la composición aumenta considerablemente la eficacia del tratamiento del cáncer. En otras palabras, el efecto terapéutico de los anticuerpos anti-c-Met de acuerdo con la invención es potenciado en forma inesperada mediante la administración de un agente citotóxico. Otra ventaja subsiguiente principal producida por una composición se refiere a la posibilidad de utilizar dosis eficaces inferiores de principio activo, lo cual permite evitar los riesgos de aparición de efectos secundarios o la reducción de los mismos, en particular los efectos del agente citotóxico.

Además, esta composición permitiría el logro del efecto terapéutico esperado de manera más rápida.

5 La composición también puede ser caracterizada por que comprende, adicionalmente, como un producto combinado para el uso simultáneo, separado o consecutivo, un agente citotóxico/citostático.

10 Por "agentes terapéuticos anticancerígenos" o "agentes citotóxicos/citostáticos", se quiere decir una sustancia la cual, cuando se administra a un sujeto, trata o previene el desarrollo de cáncer en el cuerpo del sujeto. Como un ejemplo no limitativo de ese tipo de agentes, puede mencionarse agentes alquilantes, antimetabolitos, antibióticos antitumorales, inhibidores mitóticos, inhibidores de la función de cromatina, agentes antiangiogénesis, antiestrógenos, antiandrógenos o inmunomoduladores.

15 Dichos agentes son, por ejemplo, citados en la edición 2001 de VIDAL, en la página dedicada a los compuestos vinculados con la columna de cancerología y hematología "Citotóxicos", estos compuestos citotóxicos citados haciendo referencia a este documento son citados en la presente memoria como agentes citotóxicos preferidos.

Son divulgados los agentes siguientes.

20 "Agente alquilante" se refiere a cualquier sustancia la cual puede entrecruzar o alquilar cualquier molécula, con preferencia, ácido nucleico (por ejemplo, ADN), dentro de una célula. Los ejemplos de agentes alquilantes incluyen mostaza de nitrógeno tal como mecloretamina, clorambucol, melfalen, cloridrato, pipobromen, prednimustina, fosfato disódico o estramustina; oxazoforinas tales como ciclofosfamida, altretamina, trofosfamida, sulfosfamida o ifosfamida; aziridinas o imina-etilenos tales como tiotepa, trietilenamina o altetramina; nitrosourea tales como carmustina, estreptozocina, fotemustina o lomustina; alquilen-sulfonatos tales como busulfan, treosulfan o improsulfan; triacenos tales como dacarbazina; o complejos de platino tales como cis-platino, oxaliplatino y carboplatino.

30 "Anti-metabolitos" se refieren a sustancias que bloquean el crecimiento y/o el metabolismo celular interfiriendo con ciertas actividades, generalmente con la síntesis del ADN. Los ejemplos de anti-metabolitos incluyen metotrexato, 5-fluoruracilo, floxuridina, 5-fluorodesoxiuridina, capecitabina, citarabina, fludarabina, arabinósido de citosina, 6-mercaptopurina (6-MP), 6-tioguanina (6-TG), clorodesoxiadenosina, 5-azacitidina, gemcitabina, cladribina, desoxicofomicina y pentostatina.

35 "Antibióticos antitumorales" se refieren a compuestos los cuales pueden evitar o inhibir la síntesis del ADN, ARN y/o proteína. Los ejemplos de antibióticos antitumorales incluyen doxorubicina, daunorubicina, idarubicina, valrubicina, mitoxantrona, dactinomicina, mitramicina, plicamicina, mitomicina C, bleomicina, y procarbazona.

40 "Inhibidores mitóticos" previenen la evolución normal del ciclo celular y la mitosis. En general, los inhibidores microtubulares o taxoides tales como paclitaxel y docetaxel son capaces de inhibir la mitosis. Los alcaloides de la Vinca tales como vinblastina, vincristina, vindesina y vinorelbina son también capaces de inhibir la mitosis.

45 "Inhibidores de la función de la cromatina" o "inhibidores de la topoisomerasa" se refieren a sustancias las cuales inhiben la función normal de las proteínas de modelado de la cromatina tales como topoisomerasa I o topoisomerasa II. Los ejemplos de los inhibidores de la función de la cromatina incluyen, para topoisomerasa I, camptotecina y sus derivados tales como topotecan o irinotecan, y, para la topoisomerasa II, etopósido, fosfato de etopósido y tenipósido.

50 "Agente antiangiogénesis" se refiere a cualquier fármaco, compuesto, sustancia o agente el cual inhibe el crecimiento de los vasos sanguíneos. Los agentes antiangiogénesis ejemplares incluyen, aunque sin limitarse a, razoxina, marimastat, batimastat, prinomastat, tanomastat, ilomastat, CGS-27023A, halofuginon, COL-3, neovastat, BMS-275291, talidomida, CDC 501, DMXAA, L-651582, escualamina, endostatina, SU5416, SU6668, interferón-alfa, EMD121974, interleucina-12, IM862, angiostatina y vitaxin.

55 "Antiestrógeno" o "agente antiestrogénico" se refiere a cualquier sustancia la cual reduce, antagoniza o inhibe la acción de estrógeno. Los ejemplos de agentes antiestrogénicos son tamoxifeno, toremifeno, raloxifeno, droloxifeno, iodoxifeno, anastrozol, letrozol, y exemestano.

60 "Antiandrógenos" o "agentes antiandrógenos" se refiere a cualquier sustancia la cual reduce, antagoniza o inhibe la acción de un andrógeno. Los ejemplos de antiandrógenos son flutamida, nilutamida, bicalutamida, espironolactona, acetato de ciproterona, finasterida y cimitidina.

"Inmunomoduladores" son sustancias que estimulan el sistema inmunitario.

65 Los ejemplos de inmunomoduladores incluyen interferón, interleucina tales como aldesleucina, OCT-43, denileucina diflitox y interleucina-2, factores de necrosis tumoral tales como tasonermina u otros inmunomoduladores tales como lentinan, sizofiran, roquinimex, pidotimod, pegademase, timopentina, poli I:C o levamisol en conjunto con 5-

fluorouracilo.

Para más detalle, el experto en la materia podría hacer referencia al manual editado por the "Association Française des Enseignants de Chimie Thérapeutique" y titulado "Traité de chimie thérapeutique", vol. 6, Médicaments antitumoraux et perspectives dans le traitement des cancers, edición TEC & DOC, 2003.

Se pueden mencionar además como agentes químicos o agentes citotóxicos, todos los inhibidores de cinasa tales como, por ejemplo, gefitinib o erlotinib.

En una forma de realización particularmente preferida, dicha composición como un producto de combinación es caracterizada por que dicho agente citotóxico es acoplado químicamente a dicho anticuerpo para uso simultáneo.

Con el fin de facilitar el acoplamiento entre dicho agente citotóxico y dicho anticuerpo de acuerdo con la invención, es especialmente posible introducir moléculas espaciadoras entre los dos compuestos que se van a acoplar, tales como poli(alquilen)glicoles tal como polietilenglicol, o sino aminoácidos, o, en otra forma de realización, para utilizar derivados activos de dichos agentes citotóxicos en los cuales se habrían introducido funciones capaces de reaccionar con dicho anticuerpo. Estas técnicas de acoplamiento son bien conocidas por el experto en la materia y no serán descritas con mayor detalle en la presente descripción.

Es divulgada asimismo una composición caracterizada por que uno, por lo menos, de dichos anticuerpos, o uno de sus fragmentos funcionales o derivados, se conjuga con una toxina celular y/o un radioelemento.

Es divulgado asimismo que dicha toxina o dicho radioelemento es capaz de inhibir por lo menos una actividad celular de células que expresan el c-Met, en un modo más preferido capaz de prevenir el crecimiento o la proliferación de dicha célula, especialmente o totalmente inactivando dicha células.

Es divulgado asimismo que dicha toxina es una toxina enterobacteriana, especialmente la exotoxina A de Pseudomonas.

Los radioelementos (o radioisótopos) preferentemente conjugados a los anticuerpos empleados para la terapia son radioisótopos los cuales emiten rayos gamma y preferentemente yodo¹³¹, itrio⁹⁰, oro¹⁹⁹, paladio¹⁰⁰, cobre⁶⁷, bismuto²¹⁷ y antimonio²¹¹. Los radioisótopos los cuales emiten rayos beta y alfa pueden asimismo utilizarse para la terapia.

Por toxina o radioelemento conjugado a por lo menos un anticuerpo, o uno de sus fragmentos funcionales, se pretende indicar cualesquier medios que permitan a dicha toxina o dicho radioelemento unirse a dicho por lo menos un anticuerpo, especialmente mediante acoplamiento covalente entre los dos compuestos, con o sin introducción de una molécula de enlace.

Entre los agentes que permiten la unión en una forma química (covalente), electrostática o no covalente de la totalidad o parte de los componentes del conjugado, puede mencionarse particularmente a la benzoquinona, carbodiimida y más particularmente EDC (clorhidrato de 1-etil-3-[3-dimetil-aminopropil]-carbodiimida), dimaleimida, ácido ditiobis-nitrobenzoico (DTNB), N-succinimidil S-acetil tio-acetato (SATA), los agentes puente que tienen uno o más grupos fenilazida que reaccionan con los ultravioletas (U.V.) y con preferencia N-[-4-(azidosalicilamino)butil]-3'-(2'-piridilditio)-propionamida (APDP), N-succinimidil 3-(2-piridilditio)propionato (SPDP), 6-hidrazino-nicotinamida (HYNIC).

Otra forma de acoplamiento, especialmente para los radioelementos, puede consistir en el uso de un quelante iónico bifuncional.

Entre estos quelatos, es posible mencionar los quelatos derivados de EDTA (ácido etilendiaminatetraacético) o de DTPA (ácido dietilentriaminapentaacético) los cuales han sido desarrollados para unir metales, especialmente metales radiactivos e inmunoglobulinas. Por lo tanto, DTPA y sus derivados pueden ser sustituidos por diferentes grupos en la cadena de carbono con el fin de aumentar la estabilidad y la rigidez del complejo de ligando-metal (Krejcarek *et al.* (1977); Brechbiel *et al.* (1991); Gansow (1991); patente US n° 4.831.175).

Por ejemplo, el ácido dietilentriaminapentaacético (DTPA) y sus derivados, los cuales han sido ampliamente utilizados en medicina y en biología durante un largo tiempo ya sea en su forma libre, o en la forma de un complejo con un ión metálico, tienen la característica notable de formar quelatos estables con iones metálicos y de ser acoplados con proteínas de interés terapéutico o de diagnóstico tales como anticuerpos para el desarrollo de radioinmunoconjugados en terapia contra el cáncer (Meases *et al.*, 1984; Gansow *et al.*, 1990).

Asimismo, preferentemente, dicho por lo menos un anticuerpo que forma dicho conjugado de acuerdo con la invención se selecciona de entre sus fragmentos funcionales, especialmente los fragmentos amputados de su componente de Fc tales como los fragmentos scFv.

Como se ha mencionado anteriormente, dicho agente citotóxico/ citostático o dicha toxina y/o un radioelemento es acoplado químicamente a por lo menos uno de los elementos de dicha composición para uso simultáneo.

Es divulgada asimismo la composición descrita como un medicamento.

Es divulgada asimismo la composición para la preparación de un medicamento.

Es divulgado asimismo el uso de un anticuerpo, o uno de sus fragmentos o derivados funcionales, y/o de una composición según lo descrito anteriormente para la preparación de un medicamento destinado a inhibir el crecimiento y/o la proliferación de células tumorales.

Es divulgado asimismo el uso de un anticuerpo, o uno de sus fragmentos o derivados funcionales y/o de una composición, según lo descrito anteriormente o el uso mencionado anteriormente, para la preparación de un medicamento destinado a la prevención o al tratamiento del cáncer.

Es divulgado asimismo un método destinado a inhibir el crecimiento y/o la proliferación de células tumorales en un paciente que comprende la administración a un paciente que lo necesita de un anticuerpo, o de uno de sus fragmentos o derivados funcionales, un anticuerpo producido por un hibridoma o una composición.

Es divulgado asimismo un método para la prevención o el tratamiento del cáncer en un paciente que lo necesita, que comprende la administración al paciente de un anticuerpo, o de uno de sus fragmentos o derivados funcionales, un anticuerpo producido por un hibridoma o una composición.

Es divulgado asimismo que dicho cáncer es un cáncer seleccionado entre cáncer de próstata, osteosarcomas, cáncer de pulmón, cáncer de mama, cáncer de endometrio, glioblastoma o cáncer de colon.

Como se ha explicado anteriormente, una ventaja de la invención consiste en el tratamiento de la activación de Met dependiente o independiente de HGF relacionada con cánceres.

Es divulgado asimismo el uso de un anticuerpo, o uno de sus fragmentos funcionales o derivados y/o de una composición, como se describe anteriormente o el uso anteriormente mencionado, para la preparación de un medicamento pretendido para la prevención o para el tratamiento de un paciente que lo requiere que tiene un cáncer caracterizado por sobreexpresión de c-Met (por ejemplo, debido a una amplificación génica de c-Met) que resulta en una activación constitutiva independiente de ligando del receptor c-Met.

Preferentemente, dicho cáncer se caracteriza por una amplificación génica de c-Met que resulta en una activación constitutiva independiente de ligando del receptor c-Met, se selecciona del grupo que consiste de carcinoma de células renales y cáncer gástrico.

Es divulgado asimismo un método de diagnóstico *in vitro* de enfermedades inducidas por una sobreexpresión o una expresión insuficiente del receptor c-Met comenzando a partir de una muestra biológica en la cual la presencia anormal del receptor c-Met es sospechada, estando dicho método caracterizado por que comprende un paso donde dicha muestra biológica se pone en contacto con un anticuerpo, siendo posible que dicho anticuerpo sea etiquetado en caso de ser necesario.

Es divulgado asimismo que dichas enfermedades conectadas con una presencia anormal del receptor c-Met en dicho método de diagnóstico serán cánceres.

Dicho anticuerpo, o uno de sus fragmentos funcionales, puede estar presente en la forma de un inmunoconjugado o de un anticuerpo etiquetado de modo de obtener una señal detectable y/o cuantificable.

Los anticuerpos etiquetados de acuerdo con la invención o sus fragmentos funcionales incluyen, por ejemplo, anticuerpos denominados inmunoconjugados los cuales pueden ser conjugados, por ejemplo, con enzimas tales como peroxidasa, fosfatasa alcalina, beta-D-galactosidasa, glucosa oxidasa, glucosa amilasa, anhidrasa carbónica, acetilcolinesterasa, lisozima, malato deshidrogenasa o glucosa 6-fosfato deshidrogenasa o mediante una molécula tal como biotina, digoxigenina o 5-bromodesoxiuridina. Las etiquetas fluorescentes pueden asimismo conjugarse a los anticuerpos o a sus fragmentos funcionales de acuerdo con la invención y especialmente incluyen fluoresceína y sus derivados, fluorocromo, rodamina y sus derivados, GFP (GFP por "Green Fluorescent Protein" (Proteína Fluorescente Verde), dansilo, umbeliferona etc. En ese tipo de conjugados, los anticuerpos de la invención o sus fragmentos funcionales pueden prepararse mediante métodos conocidos por el experto en la materia. Pueden acoplarse a las enzimas o a las etiquetas fluorescentes directamente o mediante el intermediario o un grupo espaciador o de un grupo de ligación tal como un polialdehído, tal como glutaraldehído, ácido etilendiaminatetraacético (EDTA), ácido dietilen-triaminapentaacético (DPTA), o en presencia de agentes de acoplamiento tales como aquellos antes mencionados para los conjugados terapéuticos. Los conjugados que contienen etiquetas de tipo fluoresceína pueden prepararse mediante reacción con un isotiocianato.

Otros conjugados pueden incluir, asimismo, etiquetas quimiluminiscentes tales como luminol y los diojetanos, etiquetas bio-luminiscentes tales como luciferasa y luciferina, o sino etiquetas radiactivas tales como yodo¹²³, yodo¹²⁵, yodo¹²⁶, yodo¹³³, bromo⁷⁷, tecnecio^{99m}, indio¹¹¹, indio^{113m}, galio⁶⁷, galio⁶⁸, rutenio⁹⁵, rutenio⁹⁷, rutenio¹⁰³, rutenio¹⁰⁵, mercurio¹⁰⁷, mercurio²⁰³, renio^{99m}, renio¹⁰¹, renio¹⁰⁵, escandio⁴⁷, telurio^{121m}, telurio^{122m}, telurio^{125m}, tulio¹⁶⁵, tulio¹⁶⁷, tulio¹⁶⁸, flúor¹⁸, itrio¹⁹⁹, yodo¹³¹. Los métodos conocidos por el experto en la materia existentes para acoplar los radioisótopos terapéuticos a los anticuerpos ya sea directamente o por medio de un agente quelante tales como EDTA, DTPA mencionados anteriormente pueden utilizarse para los radioelementos los cuales pueden utilizarse en diagnóstico. Asimismo, es posible mencionar el marcado con NaI¹²⁵ mediante el método de cloramina T [Hunter W.M. y Greenwood F.C. (1962) Nature 194:495] o sino con tecnecio^{99m} mediante la técnica de Crockford *et al.* (patente US nº 4.424.200) o unido por medio de DTPA según lo descrito por Hnatowich (patente US nº 4.479.930).

Es divulgado asimismo que el anticuerpo, o un fragmento o derivado funcional del mismo, puede emplearse en un proceso para la detección y/o la cuantificación de una sobreexpresión o de una expresión insuficiente, preferentemente una sobreexpresión, del receptor c-Met en una muestra biológica, caracterizado por que comprende las siguientes etapas:

- a) poner en contacto la muestra biológica con un anticuerpo, o con su fragmento o derivado funcional, de acuerdo con la invención; y
- b) la demostración del complejo de c-Met/anticuerpo posiblemente formado.

Es divulgado asimismo que el anticuerpo, o un fragmento o derivado funcional del mismo, puede emplearse en un proceso para la detección y/o la cuantificación del receptor c-Met en una muestra biológica, para la monitorización de la eficacia de un tratamiento profiláctico y/o terapéutico de cáncer dependiente de c-Met.

Es divulgado asimismo que el anticuerpo o un fragmento o derivado funcional del mismo puede emplearse ventajosamente en cualquier situación donde la expresión del receptor c-Met debe ser observada en forma cualitativa y/o cuantitativa.

Es divulgado asimismo que la muestra biológica es formada mediante un fluido biológico, tal como suero, sangre entera, células, una muestra de tejido o biopsias de origen humano.

Puede emplearse cualquier procedimiento o ensayo convencional con el fin de llevar a cabo ese tipo de detección y/o dosificación. Dicho ensayo puede ser un ensayo de competición o sándwich, o cualquier ensayo conocido por el experto en la materia dependiente de la formación de un complejo inmune de tipo anticuerpo-antígeno. Tras las aplicaciones de acuerdo con la invención, el anticuerpo o un fragmento o derivado funcional del mismo puede ser inmovilizado o marcado. Esta inmovilización puede llevarse a cabo en numerosos soportes conocidos por el experto en la materia. Estos soportes pueden incluir, especialmente, vidrio, poliestireno, polipropileno, polietileno, dextrano, nailon, o células naturales o modificadas. Estos soportes pueden ser solubles o insolubles.

A título de ejemplo, un método preferido implica procesos inmunoenzimáticos de acuerdo con la técnica ELISA, por inmunofluorescencia, o técnica de radio-inmunoensayo (RIA) o equivalente.

Son divulgados asimismo los kits o conjuntos necesarios para llevar a cabo un método de diagnóstico de enfermedades inducidas por una sobreexpresión o una expresión insuficiente del receptor c-Met o para llevar a cabo un proceso para la detección y/o la cuantificación de una sobreexpresión o de una expresión insuficiente del receptor c-Met en una muestra biológica, preferentemente, una sobreexpresión de dicho receptor, caracterizado por que dicho kit o conjunto comprende los siguientes elementos:

- a) un anticuerpo, o un fragmento o derivado funcional del mismo;
- b) opcionalmente, los reactivos para la formación del medio favorables para la reacción inmunitaria;
- c) opcionalmente, los reactivos que permiten la demostración de complejos de c-Met/anticuerpo producidos mediante la reacción inmunitaria.

Es divulgado asimismo el uso de un anticuerpo o una composición para la preparación de un medicamento destinado al direccionamiento específico de un compuesto biológicamente activo hacia células que expresan o que sobreexpresan el receptor c-Met.

Se pretende en la presente memoria indicar por compuesto biológicamente activo cualquier compuesto capaz de modular, especialmente de inhibir, la actividad celular, en particular su crecimiento, su proliferación, transcripción o traducción genética.

Es divulgado asimismo un reactivo de diagnóstico *in vivo* que comprende un anticuerpo, o un fragmento o derivado funcional del mismo, preferentemente marcado, especialmente radioetiquetado, y su uso en la obtención de

imágenes médicas, en particular para la detección del cáncer en conexión con la expresión o la sobreexpresión por una célula del receptor c-Met.

5 Es divulgada asimismo una composición como un producto combinado o a un conjugado anti-c-Met/toxina o radioelemento como un medicamento.

Es divulgado asimismo que dicha composición como un producto combinado o dicho conjugado de acuerdo con la invención se mezclará con un excipiente y/o un vehículo farmacéuticamente aceptable.

10 En la presente descripción, vehículo aceptable para uso farmacéutico tiene el propósito de indicar un compuesto o una combinación de compuestos que entran en una composición farmacéutica sin provocar reacciones secundarias y el cual permite, por ejemplo, la facilitación de la administración del o de los compuestos activos, un aumento en su vida útil y/o en su eficacia en el cuerpo, un aumento de su solubilidad en solución o sino una mejora en su conservación. Estos vehículos aceptables para uso farmacéutico son bien conocidos y serán adaptados por el
15 experto en la materia en función de la naturaleza y del modo de administración del compuesto o de los compuestos activos seleccionados.

Es divulgado asimismo que estos compuestos serán administrados por la ruta sistémica, en particular mediante la ruta intravenosa, por la ruta intramuscular, intradérmica, intraperitoneal o subcutánea, o por la ruta oral. En una
20 forma más preferida, la composición que comprende los anticuerpos de acuerdo con la invención será administrada varias veces, en forma consecutiva.

Sus modos de administración, dosificaciones y formas farmacéuticas óptimas pueden determinarse de acuerdo con los criterios generalmente tomados en cuenta en el establecimiento de un tratamiento adaptado a un paciente tal
25 como, por ejemplo, la edad o el peso corporal del paciente, la seriedad de su condición general, la tolerancia al tratamiento y los efectos secundarios observados.

Otras características y ventajas de la invención aparecen a continuación en la descripción con los ejemplos y las
30 figuras en las que:

figura 1: Efecto de Mabs de IgG1 irrelevantes de origen murino y humano y PBS sobre la fosforilación del receptor c-Met sobre células A549.

35 Figuras 2A y 2B: Efecto de Mabs 224G11 murinos y humanizados producidos como un isotipo humano de IgG1/kappa sobre la fosforilación del receptor c-Met sobre las células A549.

Figura 2A: efecto agonista calculado como porcentaje versus estimulación máxima de la fosforilación de c-Met por HGF [100 ng/ml].

40 Figura 2B: efecto antagonista calculado como porcentaje de inhibición de la estimulación máxima de fosforilación de c-Met por HGF [100 ng/ml].

Figuras 3A y 3B: Comparación entre Mab 224G11 murino y Mabs 224G11 quiméricos que contienen diversas regiones bisagra genomanipuladas, sobre la fosforilación del receptor c-Met sobre las células A549.

45 Figura 3A: efecto agonista calculado como porcentaje contra la estimulación máxima de la fosforilación de c-Met mediante HGF [100 ng/ml].

50 Figura 3B: efecto antagonista calculado como porcentaje de inhibición de la estimulación máxima de la fosforilación de c-Met mediante HGF [100 ng/ml].

Figuras 4A y 4B: Comparación entre Mab 224G11 murino y Mabs 224G11 quiméricos y humanizados producidos como un isotipo de IgG2/kappa humano, sobre la fosforilación del receptor c-Met en células A549.

55 Figura 4A: efecto agonista calculado como porcentaje contra la estimulación máxima de la fosforilación de c-Met mediante HGF [100 ng/ml].

Figura 4B: efecto antagonista calculado como porcentaje de inhibición de la estimulación máxima de fosforilación de c-Met mediante HGF [100 ng/ml].

60 Figuras 5A y 5B: Comparación entre Mab 224G11 murino y Mabs 224G11 quiméricos y humanizados producidos como un mutante bisagra genomanipulado TH7IgG1/kappa, sobre la fosforilación del receptor c-Met en células A549.

65 Figura 5A: efecto agonista calculado como porcentaje contra la estimulación máxima de la fosforilación de c-Met mediante HGF [100 ng/ml].

Figura 5B: efecto antagonista calculado como porcentaje de inhibición de la estimulación máxima de fosforilación de c-Met mediante HGF [100 ng/ml].

5 Figuras 6A y 6B, figuras 7A y 7B, figuras 8A y 8B, figuras 9A y 9B, figuras 10A y 10B: modelos de BRET con figuras A: modelo de dimerización de c-Met; y figuras B: modelo de activación de c-Met.

Figura 11: reconocimiento de c-Met mediante formas de 224G11 quiméricas y humanizadas.

10 Figura 12: Efecto de anticuerpos murinos y quiméricos sobre la proliferación inducida por HGF de células NCI-H441 *in vitro*. Las células NCI-H441 fueron plaqueadas en medio libre de suero. 24 horas después de colocación en placas, se agregaron m224G11 y [224G11]quim ya sea en ausencia o en presencia de HGF. Las flechas negras indican los pocillos plaqueados con células solas ya sea en ausencia  o en presencia  de HGF. Una IgG1 murina (mIgG1) se introdujo como un control de isotipo.

15 Figura 13: Comparación *in vivo* de Mabs de 224G11 quiméricos de IgG1 y murinos en el modelo de xenoinjerto de NCI-H441.

20 Figuras 14A y 14B: Efecto del Mab 224G11 murino y de diversas versiones quiméricas y humanizadas de este anticuerpo sobre la proliferación inducida por HGF de células NCI-H441 *in vitro*. Las células NCI-H441 se colocaron en placas en medio libre de suero. Veinticuatro horas después de colocación en placa, los anticuerpos que se van a analizar se agregaron ya sea en ausencia o en presencia de HGF. En el panel (figura 14A), Las versiones m224G11 murino, IgG1 quimérica [224G11]quim, IgG1 humanizada [224G11] [Hz1], [224G11] [Hz2], [224G11] [Hz3] se mostraron. En el panel (figura 14B), se presentaron las formas de m224G11 murino y diversas formas de IgG1 quiméricas ([224G11] quim, [224G11] [MH quim], [224G11] [MUP9H quim], [224G11] [MMCH quim], [224G11] [TH7 quim]). Las flechas negras indican los pocillos plaqueados con células solas ya sea en ausencia  o en presencia  de HGF. Se introdujo una IgG1 murina como un control negativo para la actividad agonista. El m5D5 se utilizó como un control agonista completo dosis-dependiente.

30 Figura 15: Efecto del Mab 224G11 murino y de diversas versiones quiméricas y humanizadas de este anticuerpo sobre la proliferación inducida por HGF de células NCI-H441 *in vitro*. Las células NCI-H441 se plaquearon en medio libre de suero. 24 Horas después de la colocación en placas, los anticuerpos que se van a analizar se agregaron ya sea en ausencia o en presencia de HGF. Se presentaron las formas m224G11 murina, [224G11] quim, [224G11] [TH7 quim]) IgG1 quiméricas y [224G11] [TH7 Hz1], [224G11] [TH7 Hz3]). Las flechas negras indican los pocillos con células solas ya sea en ausencia  o en presencia  de HGF. Se introdujo una IgG1 murina como un control negativo para la actividad agonista. Se utilizó el m5D5 como un control agonista completo dependiente de la dosis.

40 Figuras 16A-16C: Comparación *in vivo* de Mabs 224G11 murinos, quiméricos y humanizados en el modelo de xenoinjerto NCI-H441.

Figura 17A: efecto agonista calculado como porcentaje contra la estimulación máxima de la fosforilación de c-Met mediante HGF [100 ng/ml].

45 Figura 17B: efecto antagonista calculado como porcentaje de inhibición de la estimulación máxima de fosforilación de c-Met mediante HGF [100 ng/ml].

Figura 18: Modelos de BRET con modelo de activación de c-Met.

50 Figuras 19A-19B: Efecto de m224G11 y h224G11 sobre la degradación de c-Met en células A549. A) Media de 4 experimentos independientes +/- s.e.m. B) Imagen de transferencia western representativa de los 4 experimentos independientes realizados.

55 Figuras 20A a 20B: Efecto de m224G11 y h224G11 sobre la degradación de c-Met en células NCI-H441. A) Media de 4 experimentos independientes +/- s.e.m. B) Imagen de transferencia Western representativa de los 4 experimentos independientes realizados.

Figura 21: Configuración de un ELISA para evaluar la eliminación de c-Met.

60 Figura 22: Evaluación *in vitro* de eliminación de c-Met en células NCI-H441 tratadas durante 5 días con m224G11. mIgG1 es un anticuerpo irrelevante utilizado como un control de isotipo.

65 Figura 23: Evaluación *in vitro* de eliminación de c-Met en líneas celulares Hs746T, MKN45 y EBC-1 amplificadas tratadas durante 5 días con m224G11. mIgG1 es un anticuerpo irrelevante utilizado como un control de isotipo. PMA es un inductor de eliminación utilizado como un control positivo.

Figura 24: Evaluación *in vitro* de eliminación de c-Met en NCI-H441 y líneas celulares Hs746T, MKN45 y EBC-1 amplificadas tratadas durante 5 días con m224G11. mlgG1 es un anticuerpo irrelevante utilizado como un control de isotipo. PMA es un inductor de la eliminación utilizado como un control positivo.

5 Figura 25: Estudio de fosforilación intrínseca de h224G11 en línea celular Hs746T.

Figuras 26A-26B: Estudio de fosforilación intrínseca de h224G11 en línea celular NCI-H441. A) fosfo-ELISA y B) análisis Western.

10 Figuras 27A-27B: Estudio de fosforilación intrínseca de h224G11 en línea celular Hs578T. A) fosfo-ELISA y B) análisis Western.

Figuras 28A-28B: Estudio de fosforilación intrínseca de h224G11 en línea celular NCI-H125. A) fosfo-ELISA y B) análisis Western.

15 Figuras 29A-29B: Estudio de fosforilación intrínseca de h224G11 en línea celular T98G. A) fosfo-ELISA y B) análisis Western.

20 Figuras 30A-30B: Estudio de fosforilación intrínseca de h224G11 en línea celular MDA-MB-231. A) fosfo-ELISA y B) análisis Western.

Figuras 31A-31B: Estudio de fosforilación intrínseca de h224G11 en línea celular PC3. A) fosfo-ELISA y B) análisis Western.

25 Figura 32: Estudio de fosforilación intrínseca de h224G11 en células HUVEC.

Figura 33: Comparación *in vivo* del anticuerpo 224G11 murino de tipo salvaje con Mabs del 224G11 quimérico con genomanipulación en la región bisagra [C2D5-7] en el modelo de xenoinjerto NCI-H441.

30 Figuras 34A-34B: Inducción ADCC por h224G11 en células Hs746T y NCI-H441. Se mezclaron células Hs746T marcadas con ⁵¹Cr (A) o NCI-H441 (B) cargadas (cuadrados llenos) o no (cuadrados vacíos) con h224G11 con relación diferente de células NK humanas y se incubaron durante 4 horas. Se cosecharon las células y se realizó el recuento de cpm de ⁵¹Cr liberado por lisis. Los resultados se representaron como la lisis porcentual frente a la relación de efector/células objetivo. NL corresponde a las células sin carga.

35 Figuras 35A-35C: Tinción con h224G11 en xenoinjerto tumoral que expresó diversos niveles de c-Met (A : línea celular amplificada Hs746T para c-Met, B : alto nivel de expresión c-Met en NCI-H441 y C : bajo nivel de c-Met en MCF-7).

40 Figuras 36A-36D: Actividad *in vivo* de h224G11 en el modelo de xenoinjerto Hs746T. A) Análisis FACS que muestra expresión de c-Met en células Hs746T en comparación con otras líneas celulares que expresan c-Met. B) QRT-PCR muestra amplificación c-Met. C) Fosforilación c-Met en ausencia o en presencia de HGF. D) Modelo *In vivo*.

45 Figuras 37A-37 D: Actividad *in vivo* de h224G11 en el modelo de xenoinjerto MKN-45. A) Análisis FACS que muestra expresión c-Met en células MKN45 en comparación con otras líneas celulares que expresan c-Met. B) QRT-PCR muestra amplificación c-Met. C) Fosforilación c-Met en ausencia o en presencia de HGF. D) Modelo *in vivo*.

50 Figuras 38A-38D: Actividad *in vivo* de h224G11 en el modelo de xenoinjerto EBC-1. A) Análisis FACS que muestra la expresión c-Met en células EBC-1 en comparación con otras líneas celulares que expresan c-Met. B) QRT-PCR muestra amplificación c-Met. C) Fosforilación c-Met en ausencia o en presencia de HGF. D) Modelo *in vivo*.

55 Figuras 39A-39H: Examen IHC de tumores Hs746T en ratones tratados con h224G11 Mab en comparación con tumores tratados con control. Los paneles (A) y (B) corresponden a anticuerpos de control de isotipo. (C) y (D) muestran la expresión de c-Met en secciones de tumor de ratones tratados con PBS o h224G11 respectivamente demostrando que un tratamiento crónico con h224G11 induce una regulación a la baja dramática de c-Met. Tinción con Ki-67 se disminuye significativamente en tumores tratados (F) en comparación con muestras de control PBS (E). Se observó una apoptosis significativa en tumor tratado con h224G11 (H) mientras que no se anotó apoptosis en control de tumores (G).

60

Ejemplo 1: Generación de anticuerpos contra c-Met

65 Para generar anticuerpos anti-c-Met se inmunizaron ratones BALB/c de 8 semanas de edad ya sea 3 a 5 veces subcutáneamente con una línea celular transfectada CHO que expresa c-Met en su membrana plasmática (20×10^6)

células/dosis/ratón) o 2 a 3 veces con una proteína de fusión de dominio extracelular de c-Met (10-15 µg/dosis/ratón) (R&D Systems, Catálogo # 358MT) o fragmentos de esta proteína recombinante mezclada con adyuvante completo de Freund para la primera inmunización y adyuvante incompleto de Freund para las siguientes. Los protocolos mixtos en los cuales los ratones recibieron tanto células CHO-cMet como proteínas recombinantes también se llevaron a cabo. Tres días antes de la fusión celular, los ratones fueron estimulados i.p. o i.v. con la proteína recombinante o fragmentos. A continuación, los bazos de ratones se recolectaron y fusionaron a células de mieloma SP2/0-Ag14 (ATCC) y se sometieron a selección de HAT. Se llevaron a cabo cuatro fusiones. En general, para la preparación de anticuerpos monoclonales o sus fragmentos funcionales, especialmente de origen murino, es posible hacer referencia a técnicas las cuales son descritas en particular en el manual "Anticuerpos" (Harlow y Lane, Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor NY, pp. 726, 1988) o a la técnica de preparación de hibridomas descrita por Kohler y Milstein (Nature, 256:495-497, 1975).

Los hibridomas obtenidos fueron inicialmente cribados por ELISA sobre la proteína recombinante de c-Met y luego mediante análisis FACS en líneas celulares A549 NSCLC, BxPC3 pancreática, y U87-MG glioblastoma para asegurarse de que los anticuerpos producidos serán capaces de reconocer también al receptor nativo en células tumorales. Los reactores positivos en estos 2 ensayos fueron amplificados, clonados y un conjunto de hibridomas fue recuperado, purificado y cribado para determinar su capacidad de inhibir la proliferación celular *in vitro* en el modelo BxPC3.

Para ese propósito 50.000 células BxPC3 se colocaron en placas de 96 pocillos en medio RPMI, 2 mM L. Glutamina, sin SVF. 24 Horas después de colocación en placas, los anticuerpos que se van a analizar se agregaron a una concentración final que oscilaba entre 0,0097 y 40 µg/ml 60 min antes de la adición de 100 ng/ml de hHGF. Después de 3 días, las células fueron pulsadas con 0,5 µCi de [³H]timidina durante 16 horas. La magnitud de [³H]timidina incorporada en ADN insoluble en ácido tricloroacético se cuantificó mediante recuento por centelleo líquido. Los resultados fueron expresados como datos sin elaborar para realmente evaluar el efecto agonista intrínseco de cada Mab.

A continuación, los anticuerpos que inhiben por lo menos 50% de proliferación celular se evaluaron para determinar su actividad en la dimerización de c-Met y análisis de BRET de activación en células transfectadas. La actividad del receptor c-Met se cuantificó midiendo el reclutamiento de moléculas de señalización de Gab1 en c-Met activado. Para ese propósito, se generaron líneas celulares estables CHO que expresan C-Met-Rluc o C-Met-Rluc y C-Met-K1100A-YFP para la dimerización de c-Met o C-Met-Rluc y una forma mutada de Gab1 [Maroun *et al.*, Mol. Cell. Biol., 1999, 19:1784-1799] fusionada a YFP para la activación de c-Met. Las células fueron distribuidas en microplacas de 96 pocillos blancas en DMEM-F12/FBS 5% de medio de cultivo uno o dos días antes de los experimentos de BRET. Las células fueron cultivadas, en primer lugar, a 37°C con CO₂ 5% con el fin de permitir la unión celular a la placa. A continuación, las células se matan de hambre con 200 µl de DMEM/pocillo durante la noche. Inmediatamente antes del experimento, DMEM se eliminó y las células se lavaron rápidamente con PBS. Las células se incubaron en PBS en presencia o ausencia de anticuerpos a ser analizados o compuestos de referencia, 10 min a 37°C con anterioridad a la adición de coel enterazina con o sin HGF en un volumen final de 50 µl. Después de la incubación durante otros 10 minutos a 37°C, se inició la adquisición de emisión de luz a 485 nm y 530 nm utilizando el luminómetro Mithras (Berthold) (1s/longitud de onda /pocillo repetido 15 veces).

La relación de BRET ha sido definida previamente [Angers *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 2000, 97:3684-3689] como: [(emisión a 530 nm) - (emisión a 485 nm) X Cf] / (emisión a 485 nm), donde Cf corresponde a (emisión a 530 nm) / (emisión a 485 nm) para células que expresan proteína de fusión Rluc solamente en las mismas condiciones experimentales. La simplificación de esta ecuación muestra que la relación de BRET corresponde a la relación 530/485 nm obtenida cuando los dos socios estaban presentes, corregido por la relación 530/485 nm obtenida bajo las mismas condiciones experimentales, cuando solamente el socio fusionado a R. reniformis luciferasa estaba presente en el ensayo. Por cuestiones de legibilidad, los resultados son expresados en unidades miliBRET (mBU); mBU corresponde a la relación de BRET multiplicada por 1000.

Después de este segundo ensayo *in vitro*, se seleccionó el anticuerpo 224G11 i) sin actividad intrínseca como una molécula entera en el ensayo funcional de proliferación, ii) inhibiendo significativamente la proliferación de BxPC3 y iii) inhibiendo la dimerización de c-Met. En los experimentos, el Mab 5D5, generado por Genentech, y disponible en la ATCC, se agregó como un control para la actividad agonista intrínseca.

Ejemplo 2: Proceso de humanización de Mab 224G11 de ratón por injerto de CDR

1) Humanización del dominio variable (VL) de cadena ligera

Como una etapa preliminar, la secuencia nucleotídica de 224G11 VL se comparó con las secuencias genéticas de línea germinal murinas incluidas en la base de datos de IMGT (<http://imgt.cines.fr>). Los genes de línea germinal murinos IGKV3-5*01 y IGKJ4*01 que muestran una identidad de secuencia de 99,31% para la región V y 94,28% para la región J, respectivamente, han sido identificados. Considerando estas homologías elevadas, la secuencia nucleotídica 224G11VL ha sido utilizada directamente para buscar homologías humanas, en lugar de líneas germinales de ratón correspondientes.

En una segunda etapa, el gen de línea germinal humano que exhibe la mejor identidad con el 224G11VL ha sido buscado para identificar el mejor candidato humano para el injerto de CDR. Para la optimización de la selección, se han llevado a cabo alineaciones entre las secuencias de aminoácidos. El gen de línea germinal humano IGKV4-1*01 produjo una identidad de secuencia de 67,30%, pero mostró una longitud diferente para CDR1 (10 aminoácidos en 224G11 VL y 12 aminoácidos en IGKV4-1*01). Para la región J, se seleccionó el gen de línea germinal humano IGKJ4*02 (identidad de secuencia de 77,14%).

En una etapa siguiente, las regiones de CDR de 224G11 VL de ratón se injertaron en las secuencias estructurales humanas seleccionadas anteriormente. Se analizó cada posición de aminoácido para diversos criterios tales como participación en la interfase VH/VL, en la unión al antígeno o en la estructura de CDR, localización del residuo en la estructura 3D del dominio variable, anclajes de CDR, residuos pertenecientes a la zona Vernier. Se construyeron tres versiones humanizadas, correspondientes a SEC ID nº 8, SEC ID nº 9 y SEC ID nº 10, y que contenían respectivamente cuatro (4, 39, 40, 84), dos (39, 40) o un (40) residuos murinos en sus regiones FR y las CDR correspondientes a 224G11 VL de ratón.

2) Humanización del dominio variable de cadena pesada (VH)

Como una etapa preliminar, la secuencia nucleotídica del 224G11 VH se comparó con las secuencias de genes de línea germinal murinas incluidas en la base de datos de IMGT (<http://imgt.cines.fr>).

Los genes murinos de líneas germinales IGHV1-18*01, IGH2-4*01 y IGHJ2*01 con una identidad de secuencia de 92,70% para la región V, 75,00% para la región D y 89,36% para la región J, respectivamente, han sido identificados. Conforme a estas homologías elevadas, se ha decidido utilizar directamente las secuencias nucleotídicas 224G11VH para buscar homologías humanas, en lugar de líneas germinales de ratón correspondientes.

En una segunda etapa, el gen de línea germinal humano que exhibe la mejor identidad con el 224G11 VH ha sido investigado para identificar el mejor candidato humano para el injerto de CDR. Con este propósito, la secuencia nucleotídica de 224G11 VH ha sido alineada con las secuencias de genes de líneas germinales humanas pertenecientes a la base de datos de IMGT. La secuencia humana IGHV1-2*02 V exhibió una identidad de secuencia de 75,00% en el nivel nucleotídico y 64,30% en el nivel de aminoácidos. Buscando homologías para la región H se ha alcanzado la identificación del gen de línea germinal IGHJ4*04 humano con una identidad de secuencia de 78,72%.

En una etapa siguiente, se injertaron regiones de CDR de 224G11 VH de ratón en las secuencias estructurales humanas seleccionadas anteriormente. Se analizó cada posición de aminoácido para diversos criterios tales como la participación en la interfase VH/VL, en la unión al antígeno o en la estructura de CDR, localización del residuo en la estructura 3D del dominio variable, anclajes de CDR, residuos pertenecientes a la zona Vernier. Se construyó una forma completamente humanizada, correspondiente a SEC ID 4; contiene residuos exclusivamente humanos en sus regiones FR y las CDR correspondientes a 224G11 VH de ratón.

Ejemplo 3: Genomanipulación de mutantes bisagra mejorados

Es bien conocido por el experto en la materia que la región bisagra participa fuertemente en la flexibilidad del dominio variable de inmunoglobulinas (véase Brekke *et al.*, 1995; Roux *et al.*, 1997). Durante el proceso de quimerización de Mab 224G11, el dominio constante murino IGHG1 fue reemplazado por la porción IGHG1 equivalente de origen humano. Puesto que las secuencias de aminoácidos de la región bisagra eran altamente divergentes, la "murinización" de la región bisagra se llevó a cabo con el fin de mantener su longitud y rigidez. Puesto que la región bisagra IGHG2 humana corresponde al homólogo más cercano de la bisagra IGHG1 murina, esta secuencia también fue considerada. Una serie de 7 secuencias bisagra diferentes fueron construidas (SEC ID nº 22 a 28) mediante la incorporación de porciones de las bisagras IGHG1 de ratón y la bisagra IGHG2 humana en la porción bisagra IGHG1 humana.

Otra serie de mutantes bisagra fue diseñada y construida (SEC ID nº 58 a 72) para evaluar la influencia de una cisteína adicional y su posición a lo largo del dominio bisagra, la delección de 1, 2, 3 o 4 aminoácidos a lo largo del dominio bisagra y una combinación de estos dos parámetros (adición de cisteína y delección de aminoácidos).

Ejemplo 4: Producción de Mab 224G11 humanizado y formatos de Mab bisagra genomanipulados

Todas las formas de Mab descritas anteriormente que contenían regiones bisagra quiméricas, humanizadas y/o genomanipuladas fueron producidas luego de la transfección transitoria y utilizando el sistema HEK293/EBNA con un vector de expresión pCEP4 (InVitrogen, US).

Las secuencias nucleotídicas enteras correspondientes a las versiones humanizadas del dominio variable de las cadenas ligera (SEC ID nº 18, SEC ID nº 19 y SEC ID nº 20) y pesada (SEC ID nº 14) de Mab 224G11 se

5 sintetizaron mediante síntesis genética global (Genecust, Luxemburgo). Se subclonaron en un vector pCEP4 (InVitrogen, US) portando la secuencia codificante entera del dominio constante [CH1-Bisagra-CH2-CH3] de una inmunoglobulina IgG1 o IgG2 humana. La modificación de la región bisagra se llevó a cabo intercambiando un fragmento de restricción {*Nhe1-Bcl1*} por la porción equivalente que porta las modificaciones deseadas, siendo sintetizado cada fragmento {*Nhe1-Bcl1*} respectivo mediante síntesis genética global (Genecust, LU). Todos los pasos de clonación se llevaron a cabo de acuerdo con técnicas de biología molecular convencionales según lo descrito en el manual de Laboratorio (Sambrook y Russel, 2001) o de acuerdo con las instrucciones del proveedor. Cada constructo genético fue completamente validado por secuenciamiento de nucleótidos utilizando el kit de secuenciamiento de ciclo terminador Big Dye terminator cycle sequencing kit (Applied Biosystems, US) y analizado utilizando un Analizador Genético 3100 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, US).

15 Las células HEK293 EBNA adaptadas en suspensión (InVitrogen, US) se cultivaron rutinariamente en frascos de 250 ml en 50 ml de medio libre de suero Excell 293 (SAFC Biosciences) suplementado con glutamina 6 mM en un agitador orbital (velocidad de rotación 110 rpm). La transfección transitoria se llevó a cabo con 2.10⁶ células/ml utilizando polietilenimina de 25 kDa lineal (PEI) (Polysciences) preparada en agua a una concentración final de 1 mg/ml de ADN mixto y plásmido (concentración final de 1,25 µg/ml para relación de plásmido de cadena pesada a ligera de 1:1). A las 4 horas postransfección, el cultivo se diluyó con un volumen de medio de cultivo fresco para lograr una densidad celular final de 10⁶ células/ml. El proceso de cultivo se monitoreó sobre la base de la viabilidad celular y producción de Mab. Típicamente, los cultivos se mantuvieron durante 4 a 5 días. Los Mabs se purificaron utilizando un método de cromatografía convencional en una resina de Proteína A (GE Healthcare, US).

20 Todas las formas diferentes de Mabs fueron producidas en niveles adecuados con evaluaciones funcionales. Los niveles de productividad fueron producidos a niveles adecuados con evaluaciones funcionales. Los niveles de productividad oscilan típicamente entre 15 y 30 mg/l de Mabs purificados.

25 **Ejemplo 5: Evaluación de estado de fosforilación de c-Met mediante ensayo ELISA específico para Fosfo-c-Met**

30 Este ensayo funcional permite controlar la modulación del estado de fosforilación de c-Met ya sea por Mabs solos o en la presencia conjunta de HGF.

35 Se sembraron células A549 en una placa de 12MW en medio de crecimiento completo [F12K + 10 % FCS]. Las células se sometieron a inanición durante 16 horas antes de la estimulación con HGF [100 ng/ml], y cada Mab que se va a analizar se agregó en su concentración final de 30 µg/ml 15 minutos antes de la estimulación del ligando. Se agregó tampón de lisis enfriado con hielo 15 minutos después de la adición de HGF para detener la reacción de fosforilación. Las células se rasparon mecánicamente y los lisados celulares se recolectaron por centrifugación a 13000 rpm durante 10 min. a 4°C y corresponden a la fase de sobrenadante. El contenido proteico se cuantificó utilizando un kit BCA (Pierce) y se almacenó a -20°C hasta su utilización. El estado de fosforilación de c-Met se cuantificó por ELISA. Se utilizó un Mab anti-c-Met de cabra (R&D, ref AF276) como un anticuerpo de captura (recubrimiento durante toda la noche a 4°C) y después un paso de saturación con un tampón de 5% de TBS-BSA (1 hora a temperatura ambiente (TA)), se agregaron 25 µg de lisados proteicos a cada pocillo de la placa de 96 MW recubierta. Después de una incubación de 90 minutos a TA, las placas se lavaron cuatro veces y se agregó el anticuerpo de detección (Mab anti-fosfo-c-Met, dirigido contra los residuos Tyr fosforilados en posición 1230, 1234 y 1235). Después de una incubación adicional de 1 hora y 4 lavados, se agregó un anticuerpo anti-conejo acoplado a HRP (Biosource) durante 1 hora a TA, y se llevó a cabo la detección por luminiscencia agregando Luminol. Las lecturas de luminiscencia eran en un lector de placas multimodo Mithras LB920 (Berthold).

40 Tanto el nivel basal como el nivel de fosforilación del receptor c-Met inducido por HGF [100 ng/ml] no se vieron afectados ni por el tratamiento con PBS, ni por la adición de Mabs murinos o humanos los cuales no se dirigen contra el receptor c-Met humano (figura 1). Por otro lado, el Mab murino (m) 224G11 inhibió fuertemente la fosforilación de c-Met inducida por HGF [100 ng/ml] (figura 2B) sin alterar por sí mismo la fosforilación del receptor (figura 2A). Sorprendentemente, la forma quimérica de Mab 224G11 (224G11quim/IgG1), lo que significa dominio variable (VH+VL) de m224G11 combinado con dominio constante humano IgG1/kappa proporcionó actividad agonista fuerte (17% del efecto máximo de HGF, figura 2A) asociada con una eficacia antagonista reducida (54% de inhibición del efecto máximo de HGF comparado con el m224G11 que produce 75% de inhibición del efecto máximo de HGF, figura 2B). Tres formas humanizadas de Mab 224G11, [224G11]Hz1/IgG1, [224G11]Hz2/IgG1 y [224G11]Hz3/IgG1, también construidas en una estructura humana IgG1/kappa, produjeron también una disminución de la eficacia antagonista y actividad agonista significativa (11 a 24% del nivel de HGF máximo) en comparación con 224G11 murino (figuras 2A y 2B). Se construyó una serie de versiones genomanipuladas del dominio bisagra de cadena pesada y se analizaron en el ensayo de fosforilación del receptor c-Met. Como se muestra en la figura 3A, se observó una importante reducción del efecto agonista asociada con el isotipo de hIgG1/kappa tanto para el constructo basado en IgG2 como para los constructos de IgG1/kappa genomanipulados [MH, MUP9H y TH7]. También se obtuvo un aumento concomitante de la eficacia antagonista. El mutante bisagra TH7 basado en hIgG1/kappa, con la secuencia más humana, se seleccionó para completar el proceso de humanización. En una etapa siguiente, se generaron tres versiones humanizadas de dominio variable de Mab 224G11 mediante combinación con ya sea un IgG2/kappa humano o un dominio constante bisagra genomanipulado de TH7 basado en

IgG1/kappa. Para los constructos humanizados de hlgG2/kappa, la versión humanizada Hz3 produjo un fuerte agonismo (figura 4A), y para las tres versiones humanizadas, la eficacia antagonista estaba por debajo de aquella observada con Mab 224G11 murino y comparable con Mab basado en hlgG1 quimérico (56-57% de inhibición de efecto de HGF, figura 4B). Por otro lado, la combinación de las tres versiones humanizadas Hz1, Hz2 o Hz3 con el mutante IgG1/TH7 genomanipulado casi restauró por completo las propiedades del Mab murino 224G11 en términos de actividad agonista débil (5-6% de efecto de HGF) y actividad antagonista fuerte (68 a 72% de inhibición del efecto de HGF) de la fosforilación del receptor c-Met (figuras 5A y 5B). Estas variantes fueron altamente mejoradas en comparación con Mab 224G11 basado en IgG1 quimérico pero también con las formas humanizadas basadas en IgG2.

Una segunda serie de versiones genomanipuladas del dominio bisagra de cadena pesada se construyó y analizó en el ensayo de fosforilación de receptor c-Met. Como se muestra en la figura 17A, todas esas versiones nuevas (c224G11[C2], c224G11[C3], c224G11[C5], c224G11[C6], c224G11[C7], c224G11[Δ1-3], c224G11[C7Δ6], c224G11[C6Δ9], c224G11[C2Δ5-7], c224G11[C5Δ2-6], c224G11[C9Δ2-7] y c224G11[Δ5-6-7-8]) exhibieron efecto agonista más débil que c224G11 puesto que sus actividades agonistas están comprendidas entre el 6 y el 14% del efecto de HGF comparado con 23% para c224G11. Como c224G11[TH7], todas esas nuevas versiones exhibieron un aumento concomitante en la eficacia antagonista [figura 17B]. Dichos resultados mostraron que la construcción por ingeniería genética del dominio de cadena pesada por mutación puntual y/o deleción podría modificar las propiedades agonistas/ antagonistas de un anticuerpo.

Ejemplo 6: análisis de BRET

En un primer grupo de experimentos, se había controlado que IgG1 murino, IgG1 humano e IgG2 humano irrelevantes no tuvieron efecto alguno de señal de BRET inducida por HGF en ambos modelos de BRET (experimento representativo de 12 experimentos independientes; figura 6). Estos Mabs son mencionados como controles.

Se evaluó el efecto de una forma quimérica de IgG1 de Mab 224G11 de ratón ([224G11]quim) tanto en el modelo BRET de dimerización de c-Met como de activación de c-Met. Si bien el Mab 224G11 de ratón inhibió 59,4% de la señal de BRET inducida por HGF en el modelo de dimerización de c-Met, el Mab [224G11]quim inhibió solamente 28,9% (figura 7A). El anticuerpo [224G11]quim también era menos eficaz en la inhibición de la activación de c-Met inducida por HGF puesto que los anticuerpos [224G11]quim y m224G11 inhibieron respectivamente 34,5% y 56,4% de la señal de BRET inducida por HGF (figura 7B). Además, m224G11 solo no tuvo efecto alguno sobre la activación de c-Met mientras que [224G11]quim tuvo un efecto agonista parcial sobre la activación de c-Met correspondiente a 32,9% de la señal inducida por HGF. Este efecto agonista parcial del [224G11]quim también fue observado en el modelo BRET de dimerización de c-Met puesto que [224G11]quim solo indujo un aumento de BRET correspondiente a 46,6% de la señal inducida por HGF contra 21,3% para m224G11 (figura 7A).

En las figuras 8A y 8B, las formas quiméricas mutadas bisagra de anticuerpo 224G11 mostraron un efecto inhibitor mayor sobre la señal de BRET inducida por HGF que [224G11]quim puesto que mostraron una inhibición del 59,7%, 64,4%, 53,2% y 73,8% de la señal de BRET de activación inducida por HGF (figura 8B) y 61,8%, 64,4%, 52,5% y 64,4% de inhibición de la señal de BRET de dimerización de c-Met inducida por HGF (figura 8A) para [224G11][MH quim], [224G11][MUP9H quim], [224G11][MMCH quim] y [224G11][TH7 quim] respectivamente. En contrario a [224G11]quim, el cual tuvo un efecto agonista parcial sobre la activación de c-Met, las formas quiméricas mutadas bisagra del anticuerpo 224G11 no mostraron un efecto significativo sobre la activación de c-Met solamente (5,1%, 7,6%, -2,0% y -6,9% respectivamente) según lo observado para m224G11.

En la figura 9B, al igual que el [224G11] [TH7 quim], las 3 versiones humanizadas de anticuerpo de IgG1 224G11 con la bisagra TH7 no indujeron un aumento significativo de la señal de BRET en el modelo de activación cuando se analizó solo y mostró una fuerte inhibición de la señal de BRET inducida por HGF: 59,9%, 41,8% y 57,9% para las formas Hz1, Hz2 y Hz3 respectivamente. Asimismo, [224G11] [TH7 Hz1], [224G11] [TH7 Hz2] y [224G11] [TH7 Hz3] inhibieron la señal de BRET inducida por HGF en el modelo de dimerización de 52,2%, 35,8% y 49,4% respectivamente (figura 9A).

Contrariamente a [224G11]quim, la forma quimérica del anticuerpo de IgG2 224G11 ([224G11] [IgG2 quim]) no mostró efecto agonista parcial alguno solo e inhibió 66,3% del efecto de HGF sobre el modelo de activación de c-Met (figura 10B). En el modelo de dimerización de c-Met, [224G11] [IgG2 quim] inhibió 62,4% de la señal de BRET inducida por HGF (figura 10A).

La eficacia agonista de la segunda serie de versiones genomanipuladas del dominio bisagra de cadena pesada se evaluó en el modelo BRET de activación del c-Met (figura 18). En contraste con c224G11, el cual tenía un efecto agonista parcial sobre la activación del c-Met, las formas quiméricas mutadas bisagra c224G11[C2], c224G11[C3], c224G11[C5], c224G11[C6], c224G11[C7], c224G11[Δ1-3], c224G11[C7Δ6], c224G11[C6Δ9], c224G11[C2Δ5-7], c224G11[C5Δ2-6], c224G11[C9Δ2-7] y c224G11[Δ5-6-7-8] del anticuerpo 224G11 no mostraron efecto significativo alguno sobre la activación del c-Met sola.

Ejemplo 7: Reconocimiento del c-Met por formas de 224G11 quiméricas y humanizadas

Se ha llevado a cabo un ELISA directo para determinar la habilidad de unión de las diversas formas quiméricas y humanizadas en el c-Met recombinante. Brevemente, c-Met dimérico recombinante de R&D Systems fue recubierto a 1,25 µg/ml en placas de 96 pocillos Immulon II. Después de una incubación durante toda la noche a 4°C, los pocillos fueron saturados con una solución de 0,5% de gelatina/PBS. A continuación, las placas se incubaron durante 1 hora a 37°C antes de la adición de diluciones de 2 veces de anticuerpos que se van a analizar. Las placas se incubaron durante una hora más antes de la adición de un HRP de IgG de cabra anti-ratón para detectar el anticuerpo murino y una HRP de cadena ligera Kappa anti-humana de cabra para el reconocimiento de anticuerpos quiméricos y humanizados. Las placas se incubaron durante una hora y se agregó el sustrato de peroxidasa TMB Uptima durante 5 min antes de la neutralización con H₂SO₄ 1M. Los resultados presentados en la figura 11 demostraron que todas las formas analizadas eran comparables para el reconocimiento del c-Met.

Ejemplo 8: Efecto de 224G11 murino y quimérico sobre la proliferación inducida por HGF de células NCI-H441 *in vitro*

Se cultivaron de manera rutinaria células NCI-H441 de ATCC en medio RPMI 1640 (Invitrogen Corporation, Escocia, Reino Unido), 10% FCS (Invitrogen Corporation), 1% L-Glutamina (Invitrogen Corporation). Para los ensayos de proliferación, las células se separaron 3 días antes del uso de modo que estuviesen en la fase confluyente de crecimiento antes del plaqueo. Las células NCI-H441 se colocaron en placas de cultivo tisular de 96 pocillos a una densidad de 3,75x10⁴ células/pocillo en 200 µl de medio libre de suero (medio RPMI 1640 más 1% de L-Glutamina). Veinticuatro horas después de la colocación en placas, se agregaron los anticuerpos que se van a analizar a NCI-H441 y se incubaron a 37°C durante treinta minutos antes del agregado de HGF a una concentración final de 400 ng/ml (5 nM) durante 142 horas adicionales. El rango de dosis ensayado para cada anticuerpo es de 10 a 0,0097 µg/ml (concentración final en cada pocillo). En este experimento, se agregó un Mab de IgG1 murino como un control de isotipo murino y los anticuerpos ensayados eran los siguientes: m224G11 y su forma quimérica de IgG1 humana identificada como [224G11]quim. Los pocillos plaqueados con células solas +/- HGF también fueron incluidos. Luego, las células se pulsaron con 0,25 µCi de [³H]Timidina (Amersham Biosciences AB, Uppsala, Suecia) durante 7 horas y 30 minutos. La magnitud de [³H]Timidina incorporada en ADN insoluble en ácido tricloroacético se cuantificó por recuento por centelleo líquido. Los resultados son expresados como datos de cpm no transformados para evaluar mejor la actividad agonista intrínseca potencial que podría ocurrir con Mabs anti-c-Met cuando se agregan solos a célula tumoral.

Los resultados descritos en la figura 12 demostraron que, según lo esperado, el anticuerpo murino m224G11 no exhibió efecto agonista alguno cuando se agregó solo a células cancerígenas cualquiera sea la dosis ensayada. No se observó inhibición significativa alguna de la proliferación inducida por HGF con el control de isotipo con respecto a las variaciones de cpm observadas para este compuesto en este experimento. Cuando se agrega solo, el anticuerpo m224G11 no mostró efecto agonista alguno en comparación con el Mab control de isotipo de mIgG1 o las células solas. Se observó una actividad antiproliferativa dependiente de la dosis que alcanzó 78% para m224G11 (% de cálculo de inhibición: 100-[(cpm de células+Mab que va a ser ensayadas- cpm media de mIgG1 "de fondo") x 100 / (cpm media de células + HGF- cpm media células solas)]). Sorprendentemente, la forma quimérica de los Mabs 224G11 indujo un efecto agonista dependiente de la dosis, significativo, cuando se agregó sola. Este efecto agonista tuvo un impacto sobre la inhibición *in vitro* de la proliferación inducida por HGF que cambió de 78% para el 224G11 murino hasta 50% para su forma quimérica. Para determinar su dicha actividad agonista intrínseca *in vitro* "inferior" era compatible con un efecto *in vivo* sin cambiar, se produjeron tanto m224G11 como [224G11]quim para el ensayo *in vivo*. Como, en estudios previos, la dosis de 30 µg/ratón había demostrado una actividad *in vivo* significativa, esa dosis fue seleccionada para la evaluación *in vivo*.

Ejemplo 9: Comparación *in vivo* de Mabs 224G11 murinos y quiméricos en el modelo de xenoinjerto de NCI-H441

NCI-H441 es derivado de adenocarcinoma pulmonar papilar, expresa altos niveles de c-Met, y demuestra fosforilación constitutiva de c-Met RTK.

Para evaluar el efecto *in vivo* de anticuerpos en el modelo de xenoinjerto de NCI-H441, se alojaron ratones atómicos de seis a ocho semanas de edad en jaulas esterilizadas con filtro superior, se mantuvieron en condiciones estériles y se manipularon de acuerdo con las pautas francesas y europeas. Los ratones recibieron inyecciones subcutáneas con 9x10⁶ células. A continuación, seis días después del implante de células, se midieron los tumores (aproximadamente 100 mm³), los animales se dividieron en grupos de 6 ratones con tamaño de tumores comparable y se trataron, en primer lugar, con una dosis de carga de 60 µg de anticuerpo/ratón y luego dos veces por semana con 30 µg/dosis de cada anticuerpos que se va a analizar. Los ratones fueron monitoreados para la observación del índice de crecimiento del xenoinjerto. El volumen tumoral se calculó mediante la fórmula: π (Pi)/6 X largo X ancho X altura. Los resultados descritos en la figura 13 demuestran que el Mab murino desprovisto de actividad agonista se comporta, *in vivo*, según lo esperado, como antagonista potente incluso a la dosis analizada baja. Contrariamente a lo observado con el Mab murino, el Mab quimérico exhibió una actividad *in vivo* muy transitoria y el tumor escapó completamente al tratamiento a la inyección de células luego de D20. Este experimento demuestra claramente que

el aumento del efecto agonista *in vitro* que dio como resultado una disminución de la actividad antagonista también fue responsable de una pérdida *in vivo* significativa de actividad antagonista.

Ejemplo 10: Efecto del Mab 224G11 murino y de diversas versiones quiméricas y humanizadas de este anticuerpo sobre la proliferación inducida por HGF de células NCI-H441 *in vitro*

Se cultivaron rutinariamente células NCI-H441 de ATCC en medio RPMI 1640 (Invitrogen Corporation, Escocia, Reino Unido), 10% de FCS (Invitrogen Corporation), 1% de L-Glutamina (Invitrogen Corporation). Para los ensayos de proliferación, las células se dividieron 3 días antes del uso de modo que estuviesen en la fase confluyente de crecimiento antes de la colocación en placas. Las células NCI-H441 se colocaron en placas de cultivo tisular de 96 pocillos a una densidad de $3,75 \times 10^4$ células/pocillo en 200 μ l de medio libre de suero (medio RPMI 1640 más 1% de L-Glutamina). Veinticuatro horas después de la colocación en placas, los anticuerpos que se van a ensayar fueron agregados a NCI-H441 e incubados a 37°C durante treinta minutos antes de agregar HGF a una concentración final de 400 ng/ml (5 nM) durante 142 horas más. El rango de dosis ensayado para cada anticuerpo es de 10 a 0,0097 μ g/ml (concentración final en cada pocillo). En este experimento, se agregó Mab de IgG1 murino como un control de isotipo murino y como un control negativo agonista. Los anticuerpos ensayados fueron los siguientes: i) m224G11, ii) sus formas quiméricas de IgG1 humanas respectivamente identificadas como [224G11] quim, [224G11] [MH quim], [224G11] [MUP9H quim], [224G11] [MMCH quim], [224G11] [TH7 quim] iii) sus formas de IgG1 humanizadas respectivamente descritas como [224G11] [Hz1], [224G11] [Hz2], [224G11] [Hz3]. También se incluyeron pocillos plaqueados con células solas +/- HGF. El anticuerpo entero 5D5 de Genentech disponible en el mercado en la ATCC como una línea de células de hibridoma se introdujo como un control positivo agonista completo y llamado a continuación m5D5. Luego, las células fueron pulsadas con 0,25 μ Ci de [³H]Timidina (Amersham Biosciences AB, Uppsala, Suecia) durante 7 horas y 30 minutos. La magnitud de [³H]Timidina incorporada en ADN insoluble en ácido tricloroacético se cuantificó por recuento por centelleo líquido. Los resultados son expresados como datos de cpm no transformados para evaluar mejor la actividad agonista intrínseca potencial que podría ocurrir con Mabs anti-c-Met cuando se agregan solos a células tumoral.

Los resultados descritos en la figura 14A demostraron que, según lo esperado, ni el control de isotipo ni el m224G11 exhibieron actividad agonista alguna en la proliferación de NCI-H441. El control isotipo no tuvo efecto alguno sobre la proliferación celular inducida por HGF mientras que m224G11 mostró un 66% de inhibición cuando se agregó a la concentración final de 10 μ g/ml. El m5D5 utilizado como control agonista mostró, según lo esperado, un efecto completo agonista dependiente de la dosis cuando se agrega solo a las células. Como ya se ha observado, el Mab [224G11] quim exhibió un efecto agonista dependiente de la dosis significativo y, se observó una actividad inhibidora disminuida de esta forma quimérica: 19% en lugar de 66% para la forma murina. Cuando se agregan por si solos, los 3 Mabs humanizados de IgG1 demostraron efectos agonistas dependientes de la dosis comparados con la forma m224G11. [224G11] [Hz1], [224G11] [Hz2] y [224G11] [Hz3] tuvieron actividades antagonistas comparables aproximadamente 46, 30 y 35%. Estas actividades son significativamente inferiores que aquella observada para m224G11. En la figura 14B, se analizaron diversas formas quiméricas de IgG1. Comparada con la forma [224G11] quim la cual exhibió un efecto agonista dependiente de la dosis cuando se agregó por si sola a células NCI-H441, las formas [224G11] [MH quim], [224G11] [MUP9H quim], [224G11] [MMCH quim], [224G11] [TH7 quim] no tuvieron un efecto agonista intrínseco significativo. Su actividad antagonista era superior a la observada para el Mab m224G11 (57%) con inhibiciones que alcanzan 79, 78, 84 y 93% respectivamente para [224G11] [MH quim], [224G11] [MUP9H quim], [224G11] [MMCH quim] y [224G11] [TH7 quim].

Ejemplo 11: Efecto *in vitro* de diversas formas humanizadas de IgG1 del Mab 224G11

Se cultivaron rutinariamente células NCI-H441 de ATCC en medio RPMI 1640 (Invitrogen Corporation, Escocia, Reino Unido), 10% de FCS (Invitrogen Corporation), 1% de L-Glutamina (Invitrogen Corporation). Para los ensayos de proliferación, las células se separaron 3 días antes del uso de modo que estuviesen en la fase confluyente de crecimiento antes de la colocación en placas. Las células NCI-H441 se colocaron en placas de cultivo tisular de 96 pocillos a una densidad de $3,75 \times 10^4$ células/pocillo en 200 μ l de medio libre de suero (medio RPMI 1640 más 1% de L-Glutamina). Veinticuatro horas después de la colocación en placas, se agregaron los anticuerpos que se van a analizar a NCI-H441 y se incubaron a 37°C durante treinta minutos antes de agregar HGF a una concentración final de 400 ng/ml (5 nM) durante 142 horas adicionales. El rango de dosis analizado para cada anticuerpo es de 10 a 0,0097 μ g/ml (concentración final en cada pocillo). En este experimento, se agregó Mab de IgG1 murino como un control negativo "de fondo" para la actividad agonista y los anticuerpos analizados eran los siguientes: i) m224G11, ii) sus formas quiméricas de IgG1 humanas respectivamente identificadas como [224G11] quim, [224G11] [TH7 quim] iii) sus formas de IgG1 humanizadas respectivamente descritas como [224G11] [TH7 Hz1], [224G11] [TH7 Hz3]. También se incluyeron pocillos plaqueados con células solas +/- HGF. El anticuerpo entero 5D5 de Genentech disponible en el mercado en la ATCC como una línea celular de hibridoma se introdujo como un control positivo agonista completo y luego se lo llamó m5D5. Luego, las células fueron pulsadas con 0,25 μ Ci de [³H]Timidina (Amersham Biosciences AB, Uppsala, Suecia) durante 7 horas y 30 minutos. La magnitud de [³H]Timidina incorporada en ADN insoluble en ácido tricloroacético se cuantificó mediante recuento por centelleo líquido. Los resultados son expresados como datos de cpm no transformados para evaluar mejor la potencial actividad agonista intrínseca que podría producirse con Mabs anti-c-Met cuando se agregan por si solos a células tumorales.

La figura 15 mostró que el Mab m224G11 exhibió el efecto inhibitor usual (74% de inhibición). La forma de IgG1 quimérica [224G11] quim tuvo, según lo esperado, un efecto agonista intrínseco dependiente de la dosis y un efecto antagonista inferior comparado con la forma murina: 33% contra 74% de inhibición. El [224G11] [TH7 quim] tuvo una actividad agonista muy débil en este experimento. Sin embargo, exhibió un efecto inhibitor elevado (81%) próximo al observado para el Mab murino. Las 2 formas humanizadas no tuvieron efecto agonista intrínseco alguno y tuvieron una actividad antagonista próxima a las observadas para el Mab murino o el [224G11] [TH7 quim] con respectivamente 67 y 76% de inhibición para [224G11] [TH7 Hz1] y [224G11] [TH7 Hz3].

Ejemplo 12: Comparación *in vivo* de Mabs 224G11 murinos, quiméricos y humanizados que portan el tipo salvaje o la bisagra genomanipulada TH7 (modelo de xenoinjerto NCI-H441).

NCI-H441 es derivado de adenocarcinoma pulmonar papilar, expresa altos niveles de c-Met, y demuestra fosforilación constitutiva de c-Met RTK.

Para evaluar la necesidad de genomanipulación de bisagra para ahorrar actividad *in vivo* del anticuerpo murino 224G11, se alojaron ratones atímicos de seis a ocho semanas de edad en jaulas esterilizadas con filtro superior, mantenidas en condiciones estériles y manipuladas de acuerdo con las normas francesas y europeas. Los ratones recibieron inyecciones subcutáneas con 9×10^5 células NCI-H441. Luego, seis días después de la implantación celular, los tumores eran medibles (aproximadamente 100 mm^3), los animales se dividieron en grupos de 6 ratones con tamaño tumoral comparable y se trataron, en primer lugar, con una dosis de carga de 2 mg de anticuerpo/ratones y luego dos veces a la semana con una dosis de 1 mg de cada anticuerpo que se va a ensayar. Se evaluaron diez anticuerpos en este experimento incluyendo el m224G11, la forma quimérica que exhibe la bisagra del tipo salvaje (c224G11), la forma quimérica construida por ingeniería genética TH7 (224G11[TH7 quim]), portando tres formas humanizadas la bisagra del tipo salvaje (224G11[IgG1 Hz1], 224G11[IgG1 Hz2] y 224G11[IgG1 Hz3]) y las tres formas genomanipuladas TH7 correspondientes (224G11[TH7 Hz1], 224G11[TH7 Hz2] y 224G11 [TH7 Hz3]). Se hizo un seguimiento a los ratones para la observación del índice de crecimiento de los xenoinjertos.

El volumen tumoral se calculó mediante la fórmula: $\pi (\text{Pi})/6 \times \text{largo} \times \text{ancho} \times \text{altura}$.

Los resultados descritos en la figura 16 demuestran que el Mab murino desprovisto de cualquier actividad agonista *in vitro* se comportó, según lo esperado, como un potente antagonista *in vivo*. En contraste con lo observado con el Mab murino, ambas formas quiméricas y humanizadas que portan la bisagra del tipo salvaje exhibieron solamente una actividad *in vivo* muy transitoria. En cualquiera de los casos, la sustitución de la bisagra del tipo salvaje por la genomanipulada TH7 dio como resultado una completa restauración de la actividad *in vivo* observada con anticuerpos murinos. Este experimento demuestra claramente que el aumento del efecto agonista *in vitro* que dio como resultado una reducción de la actividad antagonista también fue responsable de una pérdida *in vivo* significativa de la actividad antagonista. También demuestra que el uso de una región genomanipulada TH7 en lugar de la del tipo salvaje es necesaria para mantener las propiedades *in vivo* del Mab murino.

Ejemplo 13: Efecto de m224G11 y su forma humanizada h224G11 sobre la regulación descendente de c-Met *in vitro*

En los siguientes ejemplos, para que no haya lugar a duda alguna, la expresión h224G11 se refiere a la forma humanizada 224G11 [TH7 Hz3] del anticuerpo de la invención.

Se han seleccionado dos líneas celulares para ensayar la actividad de anticuerpos anti-c-Met en la degradación del receptor c-Met. A549 (#HTB-174) y NCI-H441 (#CCL-185) son dos líneas celulares NSCLC de la recolección ATCC. Las células NCI-H441 se sembraron en RPMI 1640 + 1% de L-glutamina + 10% de FBS inactivado por calor, a 3×10^4 células/cm² en placas de seis pocillos durante 24 h a 37°C en una atmósfera de 5% de CO₂. Las células A549 se sembraron en F12K + 10% de FBS inactivado por calor, a 2×10^4 células/cm² en placas de seis pocillos durante 24 h a 37°C en una atmósfera de 5% de CO₂.

A continuación, las células se lavaron dos veces con solución salina tamponada con fosfato (PBS) antes de ser sometidas a privación de suero durante 24 horas adicionales. Se agregaron los anticuerpos anti-c-Met (10 µg/ml), mIgG1(10 µg/ml) irrelevante, o HGF (400 ng/mL) en medio DMEM libre de suero a 37°C. Después de 4 horas o 24 horas de incubación, el medio se retiró suavemente y las células se lavaron dos veces con PBS fría. Las células se lisaron con 500 µL de tampón de lisis enfriado con hielo [50 mM de Tris-HCl (pH 7,5); NaCl 150 mM; 1% de Nonidet P40; 0,5% de desoxicolato; y 1 tableta de cóctel de inhibidor de proteasa completo más 1% de antifosfatasa]. Los lisados celulares se agitaron durante 90 min a 4°C y se aclararon a 15.000 rpm durante 10 minutos. En esta etapa, los lisados celulares pudieron almacenarse a -20°C hasta ser necesarios para el análisis de transferencia western. Se cuantificó la concentración proteica utilizando BCA. Se separaron los lisados de células enteras (5µg en 20 µl) por SDS-PAGE y se transfirieron a membrana de nitrocelulosa. Las membranas se saturaron durante 1 h a TA con TBS-Tween 20 0,1%(TBST); 5% de leche en polvo descremada y se sondearon con anticuerpo anti-c-Met (dilución 1/1000) durante toda la noche a 4°C en TBST-5% de leche en polvo descremada. Los anticuerpos se diluyeron en solución salina tamponada con TRIS -0,1% de tween 20 (v/v) (TBST) con 1% de leche en polvo descremada. A

continuación, las membranas se lavaron con TBST y se incubaron con anticuerpo secundario conjugado con peroxidasa (dilución 1:1000) durante 1 h a TA. Las proteínas inmunorreactivas se visualizaron con ECL (Pierce # 32209). Después de la visualización de c-Met, las membranas se lavaron una vez más con TBST y se incubaron durante 1 h a TA con anticuerpo anti-GAPDH de ratón (dilución 1/200 000) en TBST-5% de leche en polvo descremada. Luego, las membranas se lavaron en TBST y se incubaron con anticuerpos secundarios conjugados con peroxidasa, durante 1 h a TA. Las membranas se lavaron y GAPDH se reveló utilizando ECL. Se midió la intensidad de banda por densitometría.

Los resultados presentados en las figuras 19A y 20A demostraron que tanto m224G11 como h224G11 son capaces de regular en forma descendente y significativamente c-Met, de un modo dependiente de la dosis, en líneas de células A549 y NCI-H441. La regulación descendente ya es significativa después de un tiempo de incubación de 4 horas y siguió aumentando a 24 horas. Los histogramas presentados en las figuras 19A y 20A corresponden a los valores medios o respectivamente 4 y 3 experimentos independientes. Se incluyeron las imágenes de transferencia Western correspondientes a un experimento significativo en las figuras 19B y 20B.

Ejemplo 14: Efecto de m224G11 y su forma humanizada h224G11 sobre la propagación de c-Met *in vitro*

Las formas propagadas solubles del receptor c-Met se producen naturalmente en el suero de ratones con xenoinjerto de tumor humano o en suero de paciente humano con tumores que expresan c-Met. Adicionalmente, los anticuerpos dirigidos contra c-Met tales como el Mab DN30, son descritos como inductores de la propagación de c-Met en experimentos *in vitro*. Para determinar si el m224G11 como ese tipo de propiedad, las células se sembraron en placas de seis pocillos en medio de FCS al 10%. Cuando alcanzaron aproximadamente 80% de confluencia, se retiró el medio y se agregó medio de cultivo completo fresco +/- los compuestos que se van a ensayar. Las células se incubaron 72 horas adicionales con m224G11, un control de isotipo mIgG1 o PBS. Se introdujo PMA (acetato de forbol meristato) como un inductor de la propagación. También se ensayó HGF en células para determinar el impacto del ligando de c-Met sobre la propagación natural. Los sobrenadantes se recolectaron y filtraron en 0,2 µm antes del uso en un ensayo ELISA cuyas formas solubles de c-Met fueron capturadas con un anticuerpo anti-c-Met que no reconoce el mismo epítipo como m224G11 o el c11E1 (figura 21). Además, las células de cada pocillo se lavaron una vez con PBS y se lisaron para determinar la concentración proteica. Para el ELISA, 224D10 se utilizó como un anticuerpo de captura y después saturación de placas, los sobrenadantes filtrados de placas de seis pocillo se agregaron en el ensayo ELISA. Se utilizó una forma de c-Met monomérica como un control positivo. Después de la incubación de los sobrenadantes, las placas se lavaron para eliminar el c-Met no unido y se utilizó c11E1 para detectar c-Met capturado por el Mab 224G11. La revelación del ensayo se llevó a cabo finalmente mediante la adición de un anticuerpo policlonal anti-hFc HRP-conjugado.

Los resultados mostrados en la figura 22 indican que se produjo una propagación natural de c-Met cuando las células se cultivaron durante 72 horas *in vitro*. No se observó efecto alguno del mIgG1. Sin embargo, la adición de m224G11 pareció inhibir la propagación del c-Met. Estos resultados fueron confirmados para 3 otras líneas celulares (Hs746T, EBC1 y MKN45) en la figura 23. En ese segundo experimento, el PMA, agregado como un inductor de propagación positivo, aumentó significativamente, según lo esperado, la propagación del c-Met por lo menos en 2 líneas celulares (Hs746T y MKN45). Finalmente, en un tercer experimento (figura 24), se introdujo HGF como un control. No se indujo propagación adicional por HGF en comparación con células solas o células + mIgG1. Una vez más, se observó una inhibición significativa de la propagación de c-Met con m224G11.

Ejemplo 15: Efecto intrínseco de h224G11 Ab sobre diversas líneas celulares

En experimentos previos descritos en esta patente, se ha demostrado que, en contraste con lo observado con otros anticuerpos tales como 5D5, el m224G11 y su forma humanizada h224G11 no exhiben actividad intrínseca significativa en líneas celulares tumorales. Para extender esta propiedad a otras líneas celulares, se llevaron a cabo experimentos transferencia western y fosfo-ELISA con el anticuerpo por sí solo, agregado en diversos momentos, en un conjunto de líneas de células cancerígenas, con niveles variables de expresión de c-Met, incluyendo Hs746T, NCI-H441, Hs578T, NCI-H125, T98G, MDA-MB-231, PC3. También se llevó a cabo el mismo ensayo en una célula normal: HUVEC.

El método para el ensayo ELISA de fosfo cMet ya fue descrito en el ejemplo 5 de la presente solicitud de patente. Para el análisis western, se prepararon lisados proteicos a partir de células peletizadas mediante incubación en tampón de lisis con proteasas e inhibidores de fosfatasa [10nM Tris (pH 7,4), NaCl 150 mM, EDTA 1mM, EGTA 1mM, 0,5% de Nonidet P40, fluoruro sódico 100 mM, pirofosfato sódico 10 mM, ortovanadato sódico 2 mM, PMSF 2 mM, 10 mg/ml de leupeptina, 10 mg/ml de aprotinina] a 4°C. Se aclararon los lisados proteicos de restos celulares por centrifugación, se resolvieron por electroforesis en geles 8% SDS-PAGE, y se electrotransferieron a una membrana de nitrocelulosa. Para los experimentos con c-Met, los lisados fueron inmunoprecipitados para proteína específica de interés antes de la electroforesis y transferencia.

Los resultados presentados en las figuras 25 a 32 demuestran una vez más que no se observó actividad intrínseca alguna del anticuerpo h224G11 en las células ensayadas.

Ejemplo 16: Comparación *in vivo* del anticuerpo 224G11 murino de tipo salvaje con una forma del 224G11 quimérico genomanipulada en bisagra descrita como 224G11[C2D5-7] (modelo de xenoinjerto NCI-H441).

El NCI-H441 deriva de adenocarcinoma pulmonar papilar, expresa niveles elevados de c-Met y demuestra fosforilación constitutiva de c-Met RTK.

Para evaluar la necesidad de la genomanipulación en la región bisagra para proteger la actividad *in vivo* del anticuerpo murino 224G11, se colocaron en jaulas tapadas con filtro esterilizado ratones atímicos de seis a ocho semanas de vida, se los mantuvo en condiciones estériles y se los manipuló de acuerdo con las normas francesas y europeas. A los ratones se les inyectó por vía subcutánea 9×10^6 de células NCI-H441. Posteriormente, a los seis días del implante celular, fue posible medir los tumores (aproximadamente 100 mm^3), se dividió a los animales en grupos de 6 ratones con tamaño de tumor comparable y se los trató primero con una dosis de carga de 2 mg de anticuerpo/ratón y luego dos veces por semana con 1 mg/dosis de cada anticuerpo a ser evaluado. Se llevó a cabo un seguimiento de los ratones con el fin de observar el índice de crecimiento del xenoinjerto. El volumen tumoral fue calculado por medio de la fórmula: $\pi (\text{Pi})/6 \times \text{longitud} \times \text{ancho} \times \text{alto}$. Los resultados que se describen en la figura 33 demuestran que el Mab murino desprovisto de toda actividad agonista *in vitro*, se comporta, según lo esperado, como un potente antagonista *in vivo*. Tal como lo sugieren los resultados obtenidos *in vitro*, en los ensayos de fosforilación, el anticuerpo con genomanipulación en la región bisagra 224G11[C2D5-7], que no demostraba un efecto agonista significativo, demuestra una fuerte actividad *in vivo*, comparable a la del m224G11 en el modelo de xenoinjerto NCI-H441.

Ejemplo 17: Evaluación de h224G11 en un ensayo ADCC

Puesto que h224G11 es del isotipo IgG1, el ADCC podría ser parte de su eficacia *in vivo* en seres humanos. Se llevó a cabo un ensayo *in vitro* de citotoxicidad de liberación [^{51}Cr] usando ya sea células Hs746T o NCI-H441 como células objetivo y células NK purificadas a partir de linfocitos mononucleares de sangre periférica humana.

En resumen, se incubaron un millón de células objetivo Hs746T o NCI-H441 con o sin 20 μg de h224G11 Ab en presencia de 100 μCi de ^{51}Cr (Perkin Elmer) durante 1 hr. A continuación, se plaquetearon 4×10^3 células con una cantidad creciente de células asesinas naturales (NK) aisladas de células mononucleares de sangre periférica (PBMC) usando una selección negativa (Stemcell Technologies). Las células se incubaron juntas durante un lapso adicional de 4 horas a 37°C . Se calculó el porcentaje de lisis celular siguiendo la fórmula: $[(\text{liberación experimental de } ^{51}\text{Cr} - \text{liberación espontánea de } ^{51}\text{Cr}) / (\text{liberación total de } ^{51}\text{Cr} - \text{liberación espontánea } ^{51}\text{Cr})] \times 100$. La liberación espontánea representa los recuentos obtenidos cuando las células objetivo fueron cultivadas en ausencia de células asesinas naturales. La liberación total representa los recuentos obtenidos cuando las células objetivo fueron lisadas con 1% Triton X-100. El h224G11 aumentó significativamente la lisis de tanto células Hs746T (figura 34A) como NCI-H441 (figura 34B) en un 62.9% y 63.2%, respectivamente, en una relación de células NK/Objetivo de 100.

Ejemplo 18: Estudios Inmunohistoquímicos (IHC)

Procedimientos para la tinción IHC de tumores incrustados en parafina: Se fraccionaron secciones de 8 a 12 μM de tumor congelado e inmediatamente se las fijó en acetona pre enfriada -20°C durante 3 minutos. Los cortes se enfriaron a temperatura ambiente durante 30 minutos a 1 hora. Luego de 2 lavados en PBS se bloqueó la actividad de peroxidasa endógena usando reactivo de bloqueo de peroxidasa (Dako K4007) durante cinco minutos. Las secciones fueron lavados con PBS y se incubaron en reactivo de bloqueo avidina/biotina (Dako X0590) inmediatamente antes de la saturación de los sitios no específicos en PBS-BSA 4% durante 30 minutos a temperatura ambiente. A continuación, se incubaron los cortes con h224G11 biotinilado (50 a 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$) o IgG1/kappa biotinilado humano (50 a 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$, el Sitio de Unión) como control negativo durante 2 horas a temperatura ambiente.

Las secciones se lavaron con PBS y se incubaron con complejo universal estreptavidina-peroxidasa (Dako K0679) por espacio de 30 a 45 minutos. Se usó 3-amino-9-etilcarbazol para el desarrollo de un producto de reacción de color rojo (Sigma). Los cortes fueron sumergidos en hematoxilina durante 4 minutos para contrateñir (Dako S3309).

Los resultados están representados en las figuras 35A-35C.

El h224G11 tiñe diferencialmente la membrana celular de diversos tipos de tumor. En este procedimiento inmunohistoquímico, el producto de reacción rojo se correlaciona con la tinción positiva de la membrana celular y la falta de producto de reacción rojo se correlaciona con la tinción negativa y la no visualización de la membrana celular. El control IgG, IgG1/kappa humano es un control correlacionado con el isotipo.

Ejemplo 19: Actividad *in vivo* de anti-c-Met Mabs en tres líneas celulares amplificadas para c-Met y xenoinjerto en ratones.

Hs746T (ATCC) y MKN45 (JCRB), dos células de carcinoma estomacal, y EBC-1 (JCRB), un carcinoma de células escamosas pulmonares, son 3 líneas celulares que sobre-expresan c-Met como se muestra por análisis FACS en las

figuras 36A, 37A y 38A. Estas líneas celulares también se describen en la literatura como líneas celulares amplificadas para c-Met. Para confirmar este punto último, amplificación de genes c-Met se determina por PCR en tiempo real cuantitativo utilizando el método $\Delta\Delta C_t$. Cincuenta ng de ADN genómico de cada línea celular indicada, que se extrae utilizando el equipo QIAamp DNA midi kit (Qiagen, Les Ulis, FR) se emplearon. El gen de referencia fue ADN topoisomerasa III alfa ubicada en el cromosoma 17. Cebadores para el gen c-Met se ubicaron en el exón 14. Los cebadores correspondientes para ambos genes son aquellos descritos por Smolen *et al.* (PNAS, 2006, 103:2316-2321) y producen eficiencias PCR similares. El protocolo QPCR consiste en un ciclo de 10 min a 95 grados C, seguido por 40 ciclos sucesivos de 15 seg a 95 grados C/45 seg a 95 grados C. Datos primero se normalizaron al gen de referencia y después cada línea celular se normalizó a células MCF-7 que contienen una sola copia del gen c-Met por genoma haploide. Los resultados presentados en las figuras 36B, 37B y 38B muestran que 3 líneas celulares exhiben una amplificación significativa de c-Met en el rango de amplificaciones de genes de 5 a 10-veces.

Como se ha descrito que estas células se activan constitutivamente para c-Met, se realizó un ensayo de transferencia Western para determinar el nivel de fosforilación c-Met de cada línea celular ya sea en ausencia o en presencia de HGF (50 ng/ml). Para ese propósito, se cultivaron células durante la noche en medio libre de suero y después trataron o no con 50 ng/ml de HGF durante 2 minutos. Las células se lisaron con amortiguador de lisis suplementado con inhibidores de proteasa. Lisados celulares se incubaron a 4 grados C por 90 min, después centrifugaron y los sobrenadantes se recolectaron. Se determinaron concentraciones de proteínas utilizando el ensayo de proteínas BCA (Pierce) y se inmunotransfirieron muestras. Anticuerpos empleados incluyen el anticuerpo anti-c-Met, clon 25H2 de Cell Signaling y el anti-P-c-Met Y1230, 1234, 1235 de Biosource. Inmunotransferencia con el anticuerpo c-Met fosfo-específico contra Y1230/1234/1235 mostró fuerte fosforilación de línea de referencia del receptor en cada línea celular amplificada (figuras 36C, 37C y 38C). No se observa fosforilación adicional cuando HGF se agrega a estas células. Esta última observación confirma que c-Met se active en una forma independiente de HGF en líneas celulares de Hs746T, MKN45 y EBC-1.

Con el fin de probar nuestros anticuerpos anti-c-Met *in vivo* en líneas celulares independiente de ligando, células Hs746T, MKN45 y EBC-1 se cultivaron rutinariamente en medio DMEM completo, RPMI 1640 o EMEM, respectivamente. Las células se dividieron dos días antes de injerto de manera tal que estuvieron en fase exponencial de crecimiento. Se injertaron siete millones de células a cualquiera de SCID (para Hs746T y EBC-1) o ratones desnudos CD1 Swiss (para MKN45). Cinco a siete días después de implante, los tumores fueron medibles y los animales se dividieron en grupos de 6 ratones con tamaño de tumor comparable. Los ratones se trataron i.p. con una dosis de carga de 2 mg de h224G11 Mab /ratón y después dos veces a la semana con 1 mg de anticuerpo/ratón. Volumen de tumor se midió dos veces a la semana y calcula por la fórmula: $\pi/6 \times \text{longitud} \times \text{ancho} \times \text{altura}$. Análisis estadístico se realiza en cada tiempo medido utilizando una prueba Mann-Whitney.

Este experimento demostró que h224G11 reduce significativamente el crecimiento de tumor de Hs746T, MKN45 y EBC1 (figuras 36D, 37D y 38D), indicando que el anticuerpo humanizado es capaz de inhibir crecimiento de tumor de líneas celulares independientes de ligando de pulmón y gástricas. Antes de que estos resultados se obtuvieran, no hubiera sido aparente como la presencia de una bisagra modificada en este anticuerpo humanizado afectaría su inactivación independiente de ligando de c-Met, debido a que la bisagra alterada también afecta sus propiedades agonistas/antagonistas.

Ejemplo 20: Análisis *ex vivo* de actividad h224G11 en el modelo de xenoinjerto Hs746T en ratones SCID.

Con el fin de determinar en forma más precisa mecanismos de acción que resultan en inhibición de xenoinjerto de tumor Hs746T, el efecto de 3 inyecciones i. p. de h224G11 se evalúa en el índice mitótico de tumor (Ki67), apoptosis (caspasa 3 activada) y expresión de c-Met utilizando métodos de inmunohistoquímica (IHC). Tres ratones se analizaron por cada condición. Una regulación a la baja asignificante de c-Met se observa en los tumores tratados en comparación con control (figuras 39C y D respectivamente). Los paneles 39A y B corresponden a controles de isotipos. Además, una disminución significativa en niveles Ki67 (figuras 39E y F) y un aumento en tinción de caspasa 3 activada (figuras 39G y H) se notó en todos los tumores tratados indicando que h224G11 fue capaz de inhibir significativamente proliferación celular y para inducir apoptosis celular dentro del tumor.

Listado de secuencias

<110> PIERRE FABRE MEDICAMENT

<120> Nuevo anticuerpo anti-cMet

<130> 358326D27117

<150> US 12/791.681

<151> 2010-06-01

<160> 117

<170> PatentIn versión 3.3

5 <210> 1
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

10 <400> 1
 Gly Tyr Ile Phe Thr Ala Tyr Thr
 1 5

15 <210> 2
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

20 <400> 2
 Ile Lys Pro Asn Asn Gly Leu Ala
 1 5

25 <210> 3
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

30 <400> 3
 Ala Arg Ser Glu Ile Thr Thr Glu Phe Asp Tyr
 1 5 10

35 <210> 4
 <211> 118
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

<400> 4
 Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
 1 5 10 15
 Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ile Phe Thr Ala Tyr
 20 25 30
 Thr Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
 35 40 45
 Gly Trp Ile Lys Pro Asn Asn Gly Leu Ala Asn Tyr Ala Gln Lys Phe
 50 55 60
 Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Ile Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 Met Glu Leu Ser Arg Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Ser Glu Ile Thr Thr Glu Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
 100 105 110

40 Leu Val Thr Val Ser Ser
 115

<210> 5
 <211> 10

ES 2 582 038 T3

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

<210> 10
 <211> 112
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

5

<400> 10

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

10

<210> 11
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Mus musculus

15

<400> 11

20

ggctacatct tcacagcata cacc 24

<210> 12
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Mus musculus

25

<400> 12

30

attaaaccca acaatgggct ggcc 24

<210> 13

ES 2 582 038 T3

<211> 33
 <212> ADN
 <213> Mus musculus

5 <400> 13

gccaggagcg aaattacaac agaattcgat tac 33

<210> 14
 <211> 354
 <212> ADN
 <213> Mus musculus

10

<400> 14
 15

cagggtccagc tgggtgcaatc cggcgcagag gtgaagaagc caggcgcttc cgtgaagggt 60
agctgtaagg cctctggcta catcttcaca gcatacacca tgcactgggt gaggcaagct 120
cctgggcagg gactggagtg gatgggatgg attaaacca acaatgggct ggccaactac 180
gcccagaaat tccagggtag ggtcactatg acaagggata ccagcatcag caccgcatat 240
atggagctga gcaggctgag gtctgacgac actgctgtct attattgcgc caggagcgaa 300
attacaacag aattcgatta ctgggggcag ggcaccctgg tgaccgtgtc ctct 354

<210> 15
 <211> 30
 <212> ADN
 <213> Mus musculus

20

<400> 15

25 gaatctgtgg actcttacgc aaacagctt 30

<210> 16
 <211> 9
 <212> ADN
 <213> Mus musculus

30

<400> 16

35 agggttct 9

<210> 17
 <211> 27
 <212> ADN
 <213> Mus musculus

40

<400> 17

cagcagtcca aggaggaccc cctgact 27

<210> 18
 <211> 333
 <212> ADN
 <213> Mus musculus

50 <400> 18

ES 2 582 038 T3

gacattgtgc tgaccagtc tcccgatagc ctggccgtgt ccctgggcca gagggctacc 60
 atcaactgta aaagctccga atctgtggac tcttacgcaa acagctttat gcaactggat 120
 cagcaaaaagc caggccaacc tccaaagctg ctgatttaca gggcttctac caggagagc 180
 ggcgtgcccg ataggttcag cggatctggc agcaggaccg actttacact gaccatctcc 240
 agcctgcagg ccgaagatgt ggcagtctat tactgccagc agtccaagga ggaccccctg 300
 actttcgggg gtggtactaa agtggagatc aag 333

5 <210> 19
 <211> 333
 <212> ADN
 <213> Mus musculus

<400> 19

gacattgtga tgaccagtc tcccgatagc ctggccgtgt ccctgggcca gagggctacc 60
 atcaactgta aaagctccga atctgtggac tcttacgcaa acagctttat gcaactggat 120
 cagcaaaaagc caggccaacc tccaaagctg ctgatttaca gggcttctac caggagagc 180
 ggcgtgcccg ataggttcag cggatctggc agcggcaccg actttacact gaccatctcc 240
 agcctgcagg ccgaagatgt ggcagtctat tactgccagc agtccaagga ggaccccctg 300
 10 actttcgggg gtggtactaa agtggagatc aag 333

15 <210> 20
 <211> 333
 <212> ADN
 <213> Mus musculus

<400> 20

gacattgtga tgaccagtc tcccgatagc ctggccgtgt ccctgggcca gagggctacc 60
 atcaactgta aaagctccga atctgtggac tcttacgcaa acagctttct gcaactggat 120
 20 cagcaaaaagc caggccaacc tccaaagctg ctgatttaca gggcttctac caggagagc 180
 ggcgtgcccg ataggttcag cggatctggc agcggcaccg actttacact gaccatctcc 240
 agcctgcagg ccgaagatgt ggcagtctat tactgccagc agtccaagga ggaccccctg 300
 actttcgggg gtggtactaa agtggagatc aag 333

25 <210> 21
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

30 <220>
 <223> secuencia proteica bisagra artificial de consenso

35 <220>
 <221> MUTAGEN
 <222> (1)..(1)
 <223> Xaa es P o R

<220>

<221> MUTAGEN
 <222> (2)..(2)
 <223> Xaa es K o R

5

<220>
 <221> MUTAGEN
 <222> (3)..(3)
 <223> Xaa es S, D o ausente

10

<220>
 <221> MUTAGEN
 <222> (5)..(5)
 <223> Xaa es G, D o ausente

15

<220>
 <221> MUTAGEN
 <222> (7)..(7)
 <223> Xaa es K, H o V

20

<220>
 <221> MUTAGEN
 <222> (8)..(8)
 <223> Xaa es E, P, T o ausente

25

<220>
 <221> MUTAGEN
 <222> (10)..(10)
 <223> Xaa es P o I

30

<220>
 <221> MUTAGEN
 <222> (11)..(11)
 <223> Xaa es P o ausente

35

<220>
 <221> MUTAGEN
 <222> (13)..(13)
 <223> Xaa es P o T

40

<400> 21

Xaa Xaa Xaa Cys Xaa Cys Xaa Xaa Cys Xaa Xaa Cys Xaa
 50 **1 5 10**

<210> 22
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

55

<220>
 <223> bisagra artificial derivada de IgG2

60

<400> 22

Arg Lys Cys Cys Val Glu Cys Pro Pro Cys Pro
 1 5 10

65

<210> 23

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

5 <220>
 <223> bisagra artificial derivada de IgG1

<400> 23

10 **Pro Arg Asp Cys Gly Cys Lys Pro Cys Ile Cys Thr**
 1 5 10

<210> 24
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

15 <220>
 <223> bisagra artificial derivada de IgG1

<400> 24

Pro Lys Ser Cys Gly Cys Lys Pro Cys Ile Cys Thr
 1 5 10

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

25 <220>
 <223> bisagra artificial derivada de IgG1

<400> 25

Pro Lys Ser Cys Gly Cys Lys Pro Cys Ile Cys Pro
 1 5 10

35 <210> 26
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

40 <220>
 <223> bisagra artificial derivada de IgG1

<400> 26

45 **Pro Arg Asp Cys Gly Cys Lys Pro Cys Pro Pro Cys Pro**
 1 5 10

<210> 27
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

50 <220>
 <223> bisagra artificial derivada de IgG1

<400> 27

60 **Pro Arg Asp Cys Gly Cys His Thr Cys Pro Pro Cys Pro**
 1 5 10

<210> 28
 <211> 12

<212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 5 <223> bisagra artificial derivada de IgG1

<400> 28

Pro Lys Ser Cys Asp Cys His Cys Pro Pro Cys Pro
1 5 10

10 <210> 29
 <211> 33
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

15 <220>
 <223> bisagra artificial derivada de IgG2

<400> 29

20 aggaagtgct gtgtggagtg cccccctgc cca 33

<210> 30
 <211> 36
 25 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Secuencia artificial derivada de IgG1

30 <400> 30

ccccgggact gtgggtgcaa gccttgcat tgtacc 36

35 <210> 31
 <211> 36
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

40 <220>
 <223> bisagra artificial derivada de IgG1

<400> 31

45 cccaagagct gtgggtgcaa gccttgcat tgtacc 36

<210> 32
 <211> 36
 <212> ADN
 50 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> bisagra artificial derivada de IgG1

55 <400> 32

ccaaagagct gcggtgcaa gcctgtatc tgtccc 36

<210> 33
 <211> 39
 60 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 65 <223> bisagra artificial derivada de IgG1

ES 2 582 038 T3

<400> 33

5 ccacgggact gtggctgcaa gccctgccct ccgtgtcca 39

<210> 34
 <211> 39
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> bisagra artificial derivada de IgG1

15 <400> 34

cccagagact gtgggtgtca cacctgccct cctgtcct 39

<210> 35
 <211> 36
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <223> bisagra artificial derivada de IgG1

25 <400> 35

cccaaaagct gcgattgcca ctgctctcca tgtcca 36

30 <210> 36
 <211> 443
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

35 <400> 36

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

ES 2 582 038 T3

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ile Phe Thr Ala Tyr
 20 25 30

Thr Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
 35 40 45

Gly Trp Ile Lys Pro Asn Asn Gly Leu Ala Asn Tyr Ala Gln Lys Phe
 50 55 60

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

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

Ala Arg Ser Glu Ile Thr Thr Glu Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
 100 105 110

Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro
 115 120 125

Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly
 130 135 140

Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn
 145 150 155 160

Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln
 165 170 175

Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser
 180 185 190

Asn Phe Gly Thr Gln Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser
 195 200 205

Asn Thr Lys Val Asp Lys Thr Val Glu Arg Lys Cys Cys Val Glu Cys
 210 215 220

Pro Pro Cys Pro Ala Pro Pro Val Ala Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe
 225 230 235 240

Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val
 245 250 255

Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe
 260 265 270

Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro
 275 280 285

Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Phe Arg Val Val Ser Val Leu Thr
 290 295 300

Val Val His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val
 305 310 315 320

Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Thr
 325 330 335

Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg
 340 345 350

Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly
 355 360 365

ES 2 582 038 T3

Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro
 370 375 380
 Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Met Leu Asp Ser Asp Gly Ser
 385 390 395 400
 Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln
 405 410 415
 Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His
 420 425 430
 Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
 435 440

<210> 37
 <211> 445
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

5

<400> 37

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

10

ES 2 582 038 T3

Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu
 225 230 235 240

Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu
 245 250 255

Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys
 260 265 270

Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys
 275 280 285

Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu
 290 295 300

Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys
 305 310 315 320

Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys
 325 330 335

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

Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys
 355 360 365

Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln
 370 375 380

Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly
 385 390 395 400

Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln
 405 410 415

Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn
 420 425 430

His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 435 440 445

<210> 38
 <211> 218
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

5

<400> 38

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

Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Lys Ser Ser Glu Ser Val Asp Ser Tyr
 20 25 30

Ala Asn Ser Phe Met His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro
 35 40 45

Lys Leu Leu Ile Tyr Arg Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val Pro Asp
 50 55 60

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

10

ES 2 582 038 T3

Ser Leu Gln Ala Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Lys
 85 90 95
 Glu Asp Pro Leu Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
 100 105 110
 Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln
 115 120 125
 Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr
 130 135 140
 Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser
 145 150 155 160
 Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr
 165 170 175
 Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys
 180 185 190
 His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro
 195 200 205
 Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 210 215

<210> 39
 <211> 218
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

5

<400> 39

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

10

ES 2 582 038 T3

Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr
 165 170 175
 Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys
 180 185 190
 His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro
 195 200 205
 Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 210 215

5 <210> 40
 <211> 218
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

<400> 40

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

10 <210> 41
 <211> 1332
 <212> ADN
 15 <213> Mus musculus

<400> 41

ES 2 582 038 T3

caggtccagc tgggtcaatc cggcgcagag gtgaagaagc cagggcgcttc cgtgaaggtg 60
 agctgtaagg cctctggcta catcttcaca gcatacacca tgcactgggt gaggcaagct 120
 cctgggcagg gactggagtg gatgggatgg attaaaccca acaatgggct ggccaactac 180
 gcccagaaat tccagggtag ggtcactatg acaagggata ccagcatcag caccgcatat 240
 atggagctga gcaggctgag gtctgacgac actgctgtct attattgctc caggagcgaa 300
 attacaaacag aattcgatta ctgggggcag ggcaccctgg tgaccgtgtc ctctgccagc 360
 accaagggcc caagcgtgtt cccgctagcg ccctgctcca gaagcaccag cgagagcaca 420
 gccgccctgg gctgcctggt gaaggactac ttccccgagc ccgtgaccgt gtccctggaac 480
 agcggagccc tgaccagcgg cgtgcacacc ttccccgccc tgctgcagag cagcggcctg 540
 tacagcctga gcagcgtggt gaccgtgcca agcagcaact tcggcaccca gacctacacc 600
 tgtaacgtgg accacaagcc cagcaacacc aaggtggaca agaccgtgga gaggaagtgc 660
 tgtgtggagt gccccccctg cccagcccc ccagtggccg gaccacagct gttcctgttc 720
 ccccccaagc ccaaggacac cctgatgatc agcagaacct ccgaggtgac ctgtgtggtg 780
 gtggacgtgt cccacgagga ccccgaggtg cagttcaact ggtacgtgga cggcgtggag 840
 gtgcacaacg ccaagaccaa gccagagag gagcagttta acagcacctt ccgggtggtg 900
 tccgtgctga ccgtggtgca ccaggactgg ctgaacggca aggagtacaa gtgtaaggtc 960
 tccaacaagg gcctgccagc ccccatcgaa aagaccatca gcaagaccaa gggacagcca 1020
 agagagccac aggtctacac cctgcccccc agcagggag agatgaccaa gaaccaggtg 1080
 tcctgacct gtctggtgaa gggcttctac ccaagcgaca tcgccgtgga gtgggagagc 1140
 aacggccagc ccgagaacaa ctacaagacc acccccccaa tgctggacag cgacggcagc 1200
 ttcttctgt acagcaagct gacagtggac aagagcagat ggcagcaggg caacgtgttc 1260
 agctgctccg tgatgcacga ggccctgcac aaccactaca cccagaagag cctgagcctg 1320
 tccccaggct ga 1332

<210> 42
 <211> 1341
 <212> ADN
 <213> Mus musculus

<400> 42

caggtccagc tgggtcaatc cggcgcagag gtgaagaagc cagggcgcttc cgtgaaggtg 60
 agctgtaagg cctctggcta catcttcaca gcatacacca tgcactgggt gaggcaagct 120
 cctgggcagg gactggagtg gatgggatgg attaaaccca acaatgggct ggccaactac 180
 gcccagaaat tccagggtag ggtcactatg acaagggata ccagcatcag caccgcatat 240

5

10

ES 2 582 038 T3

atggagctga gcaggctgag gtctgacgac actgctgtct attattgctc caggagcgaa 300
 attacaacag aattcgatta ctgggggagc ggcaccctgg tgaccgtgtc ctctgccagc 360
 accaagggcc caagcgtggt cccgctagcc ccgtcttcaa agagtacctc aggcggaact 420
 gccgctcttg gttgccttgt gaaggactat tttcctgagc ccgtgacggt cagctggaac 480
 tctggcgcac tgactagcgg cgtacacaca ttccctgcgg tgctccaaag ttccgggctg 540
 tactcactgt cctccgttgt gaccgttcca tctagttccc tcgggacaca gacatacatc 600
 tgtaatgtga atcataagcc ttcaaacc accaggtcgaca aacgggtcga gcccaaaagc 660
 tgcgattgcc actgtcctcc atgtccagcc cccgaactgt tgggcggacc gagcgtgttc 720
 ttgtttccac ccaagcccaa agataccctc atgatcagca gaacccccga ggtgacctgt 780
 gtggtggtgg acgtgtccca cgaggaccca gaggtgaagt tcaactggtc cgtggacggc 840
 gtggaggtgc acaacgcca gaccaagccc agagaggagc agtacaacag cacctacagc 900
 gtggtgtccg tgctgaccgt gctgcaccag gactggctga acggcaagga gtacaagtgt 960
 aagggtgtcca acaagccct gccagcccca atcgaaaaga ccatcagcaa ggccaagggc 1020
 cagccaagag agccccaggt gtacaccctg ccaccagca gggaggagat gaccaagaac 1080
 caggtgtccc tgacctgtct ggtgaagggc ttctacccea gcgacatcgc cgtggagtgg 1140
 gagagcaacg gccagccca gaacaactac aagaccacc cccagtgct ggacagcgac 1200
 ggcagcttct tcctgtacag caagctgacc gtggacaaga gcagatggca gcagggcaac 1260
 gtgttcagct gctccgtgat gcacgaggcc ctgcacaacc actacacca gaagagcctg 1320
 agcctgtccc caggcaagtg a 1341

<210> 43
 <211> 657
 <212> ADN
 <213> Mus musculus

5

<400> 43

gacattgtgc tgaccagtc tccgatagc ctggccgtgt ccctgggcga gagggctacc 60
 atcaactgta aaagctccga atctgtggac tcttacgcaa acagctttat gactggtat 120
 cagcaaaagc caggccaacc tccaaagctg ctgatttaca gggcttctac cagggagagc 180
 ggcgtgcccg ataggttcag cggatctggc agcaggaccg actttacact gaccatctcc 240
 agcctgcagg ccgaagatgt ggcagtctat tactgccagc agtccaagga ggacccctg 300
 actttcgggg gtggtactaa agtggagatc aagcgtacgg tggccgctcc cagcgtgttc 360
 atcttcccc caagcgacga gcagctgaag agcggcaccg ccagcgtggt gtgtctgctg 420
 aacaacttct accccagggg ggccaaggtg cagtggaaag tggacaacgc cctgcagagc 480
 ggcaacagcc aggagagcgt caccgagcag gacagcaagg actccaccta cagcctgagc 540
 agcaccctga ccctgagcaa ggccgactac gagaagcaca aggtgtacgc ctgtgaggtg 600

10

accaccagg gcctgtccag ccccgtagc aagagcttca acaggggcga gtgctga 657

<210> 44
 <211> 657
 <212> ADN

15

ES 2 582 038 T3

<213> Mus musculus

<400> 44

```

gacattgtga tgaccagtc tccgatagc ctggccgtgt ccctgggcga gagggctacc      60
atcaactgta aaagctccga atctgtggac tcttacgcaa acagctttat gactgggtat      120
cagcaaaagc caggccaacc tccaaagctg ctgatttaca gggcttctac cagggagagc      180
ggcgtgcccc ataggttcag cggatctggc agcggcaccg actttacact gaccatctcc      240
agcctgcagg ccgaagatgt ggcagtctat tactgccagc agtccaagga ggaccccctg      300
actttcgggg gtggtactaa agtggagatc aagcgtacgg tggccgctcc cagcgtgttc      360
atcttcccc caagcgacga gcagctgaag agcggcaccg ccagcgtggt gtgtctgctg      420
aacaacttct accccagggg ggccaaggtg cagtggaagg tggacaacgc cctgcagagc      480
ggcaacagcc aggagagcgt caccgagcag gacagcaagg actccaccta cagcctgagc      540
agcaccctga ccctgagcaa ggcgactac gagaagcaca aggtgtacgc ctgtgaggtg      600
5  acccaccagg gcctgtccag ccccgtagc aagagcttca acaggggcga gtgctga      657

```

<210> 45

<211> 657

<212> ADN

10 <213> Mus musculus

<400> 45

```

gacattgtga tgaccagtc tccgatagc ctggccgtgt ccctgggcga gagggctacc      60
atcaactgta aaagctccga atctgtggac tcttacgcaa acagctttct gactgggtat      120
cagcaaaagc caggccaacc tccaaagctg ctgatttaca gggcttctac cagggagagc      180
ggcgtgcccc ataggttcag cggatctggc agcggcaccg actttacact gaccatctcc      240
agcctgcagg ccgaagatgt ggcagtctat tactgccagc agtccaagga ggaccccctg      300
actttcgggg gtggtactaa agtggagatc aagcgtacgg tggccgctcc cagcgtgttc      360
atcttcccc caagcgacga gcagctgaag agcggcaccg ccagcgtggt gtgtctgctg      420
aacaacttct accccagggg ggccaaggtg cagtggaagg tggacaacgc cctgcagagc      480
ggcaacagcc aggagagcgt caccgagcag gacagcaagg actccaccta cagcctgagc      540
agcaccctga ccctgagcaa ggcgactac gagaagcaca aggtgtacgc ctgtgaggtg      600
15 acccaccagg gcctgtccag ccccgtagc aagagcttca acaggggcga gtgctga      657

```

<210> 46

<211> 118

<212> PRT

20 <213> Mus musculus

<400> 46

ES 2 582 038 T3

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

<210> 47
 <211> 112
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

5

<400> 47

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

10

<210> 48
 <211> 354
 <212> ADN
 <213> Mus musculus

15

<400> 48

gaggtccagc tgcagcagag cgggccagaa ctggttaaac ctggcgccag cgtgaagatt 60
 agctgtaaga ccagcggtta catctttaca gcatatacca tgcactgggt gaggcagagt 120
 ctgggggaat ctctggactg gatcggaggt attaagccca acaatggcct ggctaactat 180
 aatcaaaaat tcaagggcaa agccacactg accgtcgata agtcctcttc cacagcttac 240
 atggatctga gaagcctgac atccgaggac agtgcagtgt actactgcgc ccggtctgag 300
 atcactacog agttcgacta ttggggacag ggcactgcac tgaccgtctc ctcc 354

20

ES 2 582 038 T3

<210> 49
 <211> 333
 <212> ADN
 <213> Mus musculus

5

<400> 49

```

gatattgtgc tgacacagtc tcccgcaagc ctcgctgtta gcctgggtca acgggccaca      60
attagtgtgc ggcctctctga atccgtcgac tcttatgcta acagctttat gcaactggtat    120
caacagaagc cggggcagcc acctaaactg ctgatctaca gggccagcaa tctggagagt      180
ggcatcccag ctagatttag cggttccggg tccaggaccg acttcaactct gaccatcaac     240
cccgtggagg cagacgacgt ggccacttac tactgccagc agtctaaaga ggatcccctc     300
acattcggct ccggaacaaa gctggaaatg aag                                  333
    
```

10

<210> 50
 <211> 443
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

15

<400> 50

```

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

ES 2 582 038 T3

Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn
 145 150 155 160
 Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln
 165 170 175
 Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser
 180 185 190
 Asn Phe Gly Thr Gln Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser
 195 200 205
 Asn Thr Lys Val Asp Lys Thr Val Glu Arg Lys Cys Cys Val Glu Cys
 210 215 220
 Pro Pro Cys Pro Ala Pro Pro Val Ala Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe
 225 230 235 240
 Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val
 245 250 255
 Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe
 260 265 270
 Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro
 275 280 285
 Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Phe Arg Val Val Ser Val Leu Thr
 290 295 300
 Val Val His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val
 305 310 315 320
 Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Thr
 325 330 335
 Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg
 340 345 350
 Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly
 355 360 365
 Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro
 370 375 380
 Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Met Leu Asp Ser Asp Gly Ser
 385 390 395 400
 Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln
 405 410 415
 Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His
 420 425 430
 Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
 435 440

<210> 51
 <211> 446
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

 <400> 51

5

ES 2 582 038 T3

Glu Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala
 1 5 10 15
 Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Thr Ser Gly Tyr Ile Phe Thr Ala Tyr
 20 25 30
 Thr Met His Trp Val Arg Gln Ser Leu Gly Glu Ser Leu Asp Trp Ile
 35 40 45
 Gly Gly Ile Lys Pro Asn Asn Gly Leu Ala Asn Tyr Asn Gln Lys Phe
 50 55 60
 Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 Met Asp Leu Arg Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Ser Glu Ile Thr Thr Glu Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
 100 105 110
 Ala Leu Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro
 115 120 125
 Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly
 130 135 140
 Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn
 145 150 155 160
 Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln
 165 170 175
 Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser
 180 185 190
 Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser
 195 200 205
 Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Cys His
 210 215 220
 Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe
 225 230 235 240
 Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro
 245 250 255
 Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val
 260 265 270
 Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr
 275 280 285
 Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val
 290 295 300
 Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys
 305 310 315 320
 Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser
 325 330 335
 Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro
 340 345 350

Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val
 355 360 365
 Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly
 370 375 380
 Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp
 385 390 395 400
 Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp
 405 410 415
 Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His
 420 425 430
 Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 435 440 445

<210> 52
 <211> 218
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

5

<400> 52

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

10

<210> 53
 <211> 1332
 <212> ADN
 <213> Mus musculus

15

ES 2 582 038 T3

<400> 53

gaggtccagc tgcagcagag cgggccagaa ctggttaaac ctggcgccag cgtgaagatt 60
 agctgtaaga ccagcggtta catctttaca gcatatacca tgcactgggt gaggcagagt 120
 ctgggggaat ctctggactg gatcggaggt attaagccca acaatggcct ggctaactat 180
 aatcaaaaat tcaagggcaa agccacactg accgtcgata agtcctcttc cacagcttac 240
 atggatctga gaagcctgac atccgaggac agtgcagtgt actactgctc ccggtctgag 300
 atcactaccg agttcgacta ttggggacag ggcactgcac tgaccgtctc ctccgccagc 360
 accaagggcc caagcgtgtt cccgctagcg ccctgctcca gaagcaccag cgagagcaca 420
 gccgccctgg gctgcctggt gaaggactac ttccccgagc ccgtgaccgt gtcctggaac 480
 agcggagccc tgaccagcgg cgtgcacacc ttccccgccg tgctgcagag cagcggcctg 540
 tacagcctga gcagcgtggt gaccgtgcc a gcagcaact tcggcaccca gacctacacc 600
 tgtaacgtgg accacaagcc cagcaacacc aaggtggaca agaccgtgga gaggaagtgc 660
 tgtgtggagt gccccccctg cccagcccc ccagtgggccg gaccagcgt gttcctgttc 720
 ccccccaagc ccaaggacac cctgatgatc agcagaacc ccgaggtgac ctgtgtggtg 780
 gtggacgtgt cccacgagga ccccgaggtg cagttcaact ggtacgtgga cggcgtggag 840
 gtgcacaacg ccaagaccaa gccagagag gagcagttta acagcacctt ccgggtggtg 900
 tccgtgctga ccgtggtgca ccaggactgg ctgaacggca aggagtaca gtgtaaggtc 960
 tccaacaagg gcctgccagc ccccatcgaa aagaccatca gcaagaccaa gggacagcca 1020
 agagagccac aggtctacac cctgcccccc agcagggag agatgaccaa gaaccaggtg 1080
 tccctgacct gtctggtgaa gggcttctac ccaagcgaca tcgccgtgga gtgggagagc 1140
 aacggccagc ccgagaacaa ctacaagacc accccccaa tgctggacag cgacggcagc 1200
 ttcttcctgt acagcaagct gacagtggac aagagcagat ggcagcaggg caacgtgttc 1260
 agctgctccg tgatgcacga ggcctgcac aaccactaca cccagaagag cctgagcctg 1320
 tccccaggct ga 1332

5

<210> 54
 <211> 1341
 <212> ADN
 <213> Mus musculus

10

<400> 54

gaggtccagc tgcagcagag cgggccagaa ctggttaaac ctggcgccag cgtgaagatt 60

ES 2 582 038 T3

agctgtaaga ccagcgggta catctttaca gcatatacca tgcactgggt gaggcagagt 120
ctgggggaat ctctggactg gatcggaggt attaagccca acaatggcct ggctaactat 180
aatcaaaaat tcaagggcaa agccacactg accgtcgata agtcctcttc cacagcttac 240
atggatctga gaagcctgac atccgaggac agtgcagtgt actactgctc ccggtctgag 300
atcactaccg agttogacta ttggggacag ggcactgcac tgaccgtctc ctccgccagc 360
accaagggcc caagcgtggt cccgctagcc ccgtcttcaa agagtacctc aggcggaact 420
gccgctcttg gttgccttgt gaaggactat tttcctgagc ccgtgacggt cagctggaac 480
tctggcgcac tgactagcgg cgtacacaca ttccctgcgg tgctccaaag ttccgggctg 540
tactcactgt cctccgttgt gaccggtcca tctagttccc tcgggacaca gacatacatc 600
tgtaatgtga atcataagcc ttcaaacc accggtcgaca aacgggtcga gcccaaaagc 660
tgcgattgcc actgtcctcc atgtccagcc cccgaactgt tgggcggacc gagcgtgttc 720
ttgtttccac ccaagcccaa agataccctc atgatcagca gaacccccga ggtgacctgt 780
gtggtggtgg acgtgtccca cgaggaccca gaggtgaagt tcaactggta cgtggacggc 840
gtggaggtgc acaacgcaa gaccaagccc agagaggagc agtacaacag cacctacagg 900
gtggtgtccg tgctgacctg gctgcaccag gactggctga acggcaagga gtacaagtgt 960
aaggtgtcca acaaggccct gccagcccca atcgaaaaga ccatcagcaa ggccaagggc 1020
cagccaagag agccccaggt gtacaccctg ccaccagca gggaggagat gaccaagaac 1080
caggtgtccc tgacctgtct ggtgaagggc ttctaccaa gcgacatcgc cgtggagtgg 1140
gagagcaacg gccagcccga gaacaactac aagaccacc cccagtgct ggacagcgac 1200
ggcagcttct tcctgtacag caagctgacc gtggacaaga gcagatggca gcagggcaac 1260
gtgttcagct gctccgtgat gcacgaggcc ctgcacaacc actacacca gaagagcctg 1320
agcctgtccc caggcaagtg a 1341

<210> 55
<211> 657
5 <212> ADN
<213> Mus musculus

<400> 55

gatattgtgc tgacacagtc tcccgcaagc ctogctgta gcctgggtca acgggccaca 60
attagttgtc gcgcctctga atccgtcgac tcttatgcta acagctttat gcaactggtat 120
caacagaagc ccgggcagcc acctaaactg ctgatctaca gggccagcaa tctggagagt 180
ggcatcccag ctagatttag cgttccggg tccaggaccg acttactct gaccatcaac 240
cccgtggagg cagacgacgt gccacttac tactgccagc agtctaaaga ggatcccctc 300
acattcggct ccggaacaaa gctggaaatg aagcgtacgg tggcogctcc cagcgtgttc 360
10 atcttcccc caagcgacga gcagctgaag agcggcaccg ccagcgtgggt gtgtctgctg 420
aacaacttct accccagggg gccaaggtg cagtggaaag tggacaacgc cctgcagagc 480
ggcaacagcc aggagagcgt caccgagcag gacagcaagg actccaccta cagcctgagc 540
agcaccctga ccctgagcaa ggcgactac gagaagcaca aggtgtacgc ctgtgaggtg 600
accaccaggg gcctgtccag ccccgtagcc aagagcttca acaggggcca gtgtctga 657

- <210> 56
 <211> 14
 <212> PRT
 5 <213> artificial

 <220>
 <223> secuencia proteica bisagra artificial de consenso

 10 <220>
 <221> mutagen
 <222> (1)..(1)
 <223> X es P, R, C o ausente

 15 <220>
 <221> mutagen
 <222> (2)..(2)
 <223> X es K, C, R o ausente

 20 <220>
 <221> mutagen
 <222> (3)..(3)
 <223> X es S, C, D o ausente

 25 <220>
 <221> mutagen
 <222> (5)..(5)
 <223> X es D, C, G o ausente

 30 <220>
 <221> mutagen
 <222> (6)..(6)
 <223> X es K, C o ausente

 35 <220>
 <221> mutagen
 <222> (7)..(7)
 <223> X es T, C o ausente

 40 <220>
 <221> mutagen
 <222> (8)..(8)
 <223> X es H, V, K o ausente

 45 <220>
 <221> mutagen
 <222> (9)..(9)
 <223> X es T, C, E, P o ausente

 50 <220>
 <221> mutagen
 <222> (11)..(11)
 <223> X es P o I

 55 <220>
 <221> mutagen
 <222> (12)..(12)
 <223> X es P o ausente

 60 <220>
 <221> mutagen
 <222> (14)..(14)
 <223> X es P o T

 65 <400> 56

ES 2 582 038 T3

Xaa Xaa Xaa Cys Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Cys Xaa Xaa Cys Xaa
1 5 10

5 <210> 57
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> artificial

10 <220>
 <223> secuencia proteica bisagra artificial de consenso

<220>
 <221> mutagen
 <222> (1)..(1)
 <223> X es P, R, C o ausente

15 <220>
 <221> mutagen
 <222> (2)..(2)
 <223> X es K, C, R o ausente

20 <220>
 <221> mutagen
 <222> (3)..(3)
 <223> X es S, C, D o ausente

25 <220>
 <221> mutagen
 <222> (5)..(5)
 <223> X es D, C, G o ausente

30 <220>
 <221> mutagen
 <222> (6)..(6)
 <223> X es K, C o ausente

35 <220>
 <221> mutagen
 <222> (7).. (7)
 <223> X es T, C o ausente

40 <220>
 <221> mutagen
 <222> (8)..(8)
 <223> X es H, V, K o ausente

45 <220>
 <221> mutagen
 <222> (9)..(9)
 <223> X es T, C, E, P o ausente

50 <400> 57

Xaa Xaa Xaa Cys Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Cys Pro Pro Cys Pro
1 5 10

55 <210> 58
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> artificial

60 <220>
 <223> región bisagra artificial

<400> 58

Cys Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro
1 5 10

5 <210> 59
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> artificial

10 <220>
 <223> región bisagra artificial
 <400> 59

Pro Cys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro
1 5 10

15 <210> 60
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> artificial

20 <220>
 <223> región bisagra artificial
 <400> 60

Pro Lys Cys Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro
1 5 10

25 <210> 61
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> artificial

30 <220>
 <223> región bisagra artificial
 <400> 61

Pro Lys Ser Cys Cys Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro
1 5 10

40 <210> 62
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> artificial

45 <220>
 <223> región bisagra artificial
 <400> 62

Pro Lys Ser Cys Asp Cys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro
1 5 10

50 <210> 63
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> artificial

55 <220>
 <223> región bisagra artificial
 <400> 63

60

Pro Lys Ser Cys Asp Lys Cys His Thr Cys Pro Pro Cys Pro
1 5 10

5 <210> 64
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> artificial

10 <220>
 <223> región bisagra artificial
 <400> 64

Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Cys Cys Pro Pro Cys Pro
1 5 10

15 <210> 65
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> artificial

20 <220>
 <223> región bisagra artificial
 <400> 65

Lys Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro
1 5 10

25 <210> 66
 <211> 13
 <212> PRT
 30 <213> artificial

<220>
 <223> región bisagra artificial

35 <400> 66

Pro Lys Ser Cys Asp Cys His Thr Cys Pro Pro Cys Pro
1 5 10

40 <210> 67
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> artificial

45 <220>
 <223> región bisagra artificial
 <400> 67

Pro Lys Ser Cys Asp Cys Thr His Cys Pro Pro Cys Pro
1 5 10

50 <210> 68
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> artificial

55 <220>
 <223> región bisagra artificial

60 <400> 68

Pro Cys Ser Cys Lys His Thr Cys Pro Pro Cys Pro
1 5 10

5 <210> 69
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> artificial

10 <220>
 <223> región bisagra artificial
 <400> 69

Pro Ser Cys Cys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro
1 5 10

15 <210> 70
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> artificial

20 <220>
 <223> región bisagra artificial
 <400> 70

Pro Ser Cys Asp Lys His Cys Cys Pro Pro Cys Pro
1 5 10

25 <210> 71
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> artificial

30 <220>
 <223> región bisagra artificial
 <400> 71

Pro Lys Ser Cys Thr Cys Pro Pro Cys Pro
1 5 10

40 <210> 72
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> artificial

45 <220>
 <223> región bisagra artificial
 <400> 72

Pro Lys Ser Cys Asp Lys Cys Val Glu Cys Pro Pro Cys Pro
1 5 10

50 <210> 73
 <211> 42
 <212> ADN
 <213> artificial

55 <220>
 <223> región bisagra artificial
 <400> 73

60 tgcaagagct gcgacaagac ccacacctgt cccccctgcc ct

ES 2 582 038 T3

<210> 74
 <211> 42
 <212> ADN
 5 <213> artificial

 <220>
 <223> región bisagra artificial

 10 <400> 74

 ccctgcagct gcgacaagac ccacacctgt cccccctgcc ct 42

 <210> 75
 15 <211> 42
 <212> ADN
 <213> artificial

 <220>
 20 <223> región bisagra artificial

 <400> 75

 cccaagtgt gcgacaagac ccacacctgt cccccctgcc ct 42
 25
 <210> 76
 <211> 42
 <212> ADN
 <213> artificial
 30
 <220>
 <223> región bisagra artificial

 <400> 76
 35
 cctaagagct gttgcaagac ccacacctgt cccccctgcc ct 42

 <210> 77
 <211> 42
 40 <212> ADN
 <213> artificial

 <220>
 <223> región bisagra artificial
 45
 <400> 77

 cccaagagct gcgactgcac ccacacctgt cccccctgcc ct 42
 50
 <210> 78
 <211> 42
 <212> ADN
 <213> artificial

 <220>
 <223> región bisagra artificial

 <400> 78
 55

 60 cccaagagct gcgacaagtg ccacacctgt cccccctgcc ct 42

 <210> 79
 <211> 42
 <212> ADN
 65 <213> artificial

	<220>	
	<223> región bisagra artificial	
	<400> 79	
5	cccaagagct gcgacaagac ccaactgctgt cccccctgcc ct	42
	<210> 80	
	<211> 36	
10	<212> ADN	
	<213> artificial	
	<220>	
	<223> región bisagra artificial	
15	<400> 80	
	aagtgcgaca agaccacac ctgtcccccc tgcct	36
20	<210> 81	
	<211> 39	
	<212> ADN	
	<213> artificial	
25	<220>	
	<223> región bisagra artificial	
	<400> 81	
30	cccaagagct gcgactgcca cacctgtccc ccctgcct	39
	<210> 82	
	<211> 39	
	<212> ADN	
35	<213> artificial	
	<220>	
	<223> región bisagra artificial	
40	<400> 82	
	cccaagagct gcgactgcac ccaactgccc ccctgcct	39
45	<210> 83	
	<211> 36	
	<212> ADN	
	<213> artificial	
50	<220>	
	<223> artificial hinge domain	
	<400> 83	
55	ccctgcagct gcaagcacac ctgtcccccc tgcct	36
	<210> 84	
	<211> 36	
	<212> ADN	
	<213> artificial	
60	<220>	
	<223> región bisagra artificial	
	<400> 84	
65	cctagctgct gcaccacac ctgtcccccc tgcct	36

<210> 85
 <211> 36
 <212> ADN
 5 <213> artificial

 <220>
 <223> región bisagra artificial

 10 <400> 85

 ccagctgcg acaagcactg ctgcccccc tgcct 36

 <210> 86
 15 <211> 30
 <212> ADN
 <213> artificial

 <220>
 20 <223> región bisagra artificial

 <400> 86

 cccaagagct gcacctgtcc ccctgtcct 30
 25
 <210> 87
 <211> 42
 <212> ADN
 <213> artificial
 30
 <220>
 <223> región bisagra artificial

 <400> 87
 35
 cccaagagct gcgataagtg cgtggagtgc ccccctgtc ct 42

 <210> 88
 <211> 448
 40 <212> PRT
 <213> Mus musculus

 <400> 88

ES 2 582 038 T3

Glu Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala
 1 5 10 15
 Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Thr Ser Gly Tyr Ile Phe Thr Ala Tyr
 20 25 30
 Thr Met His Trp Val Arg Gln Ser Leu Gly Glu Ser Leu Asp Trp Ile
 35 40 45
 Gly Gly Ile Lys Pro Asn Asn Gly Leu Ala Asn Tyr Asn Gln Lys Phe
 50 55 60
 Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 Met Asp Leu Arg Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Ser Glu Ile Thr Thr Glu Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
 100 105 110
 Ala Leu Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro
 115 120 125
 Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly
 130 135 140
 Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn
 145 150 155 160
 Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln
 165 170 175
 Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser
 180 185 190
 Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser
 195 200 205
 Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Cys Lys Ser Cys Asp Lys Thr
 210 215 220
 His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser
 225 230 235 240
 Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg
 245 250 255
 Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro
 260 265 270
 Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala
 275 280 285

ES 2 582 038 T3

Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val
 290 295 300

Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr
 305 310 315 320

Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr
 325 330 335

Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu
 340 345 350

Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys
 355 360 365

Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser
 370 375 380

Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp
 385 390 395 400

Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser
 405 410 415

Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala
 420 425 430

Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 435 440 445

<210> 89
 <211> 448
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

5

<400> 89

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

Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Thr Ser Gly Tyr Ile Phe Thr Ala Tyr
 20 25 30

Thr Met His Trp Val Arg Gln Ser Leu Gly Glu Ser Leu Asp Trp Ile
 35 40 45

Gly Gly Ile Lys Pro Asn Asn Gly Leu Ala Asn Tyr Asn Gln Lys Phe
 50 55 60

Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80

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

Ala Arg Ser Glu Ile Thr Thr Glu Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
 100 105 110

Ala Leu Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro
 115 120 125

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

10

ES 2 582 038 T3

Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn
 145 150 155 160
 Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln
 165 170 175
 Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser
 180 185 190
 Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser
 195 200 205
 Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Pro Cys Ser Cys Asp Lys Thr
 210 215 220
 His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser
 225 230 235 240
 Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg
 245 250 255
 Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro
 260 265 270
 Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala
 275 280 285
 Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val
 290 295 300
 Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr
 305 310 315 320
 Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr
 325 330 335
 Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu
 340 345 350
 Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys
 355 360 365
 Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser
 370 375 380
 Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp
 385 390 395 400
 Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser
 405 410 415
 Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala
 420 425 430
 Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 435 440 445

<210> 90
 <211> 448
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

 <400> 90

5

ES 2 582 038 T3

Glu Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala
 1 5 10 15
 Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Thr Ser Gly Tyr Ile Phe Thr Ala Tyr
 20 25 30
 Thr Met His Trp Val Arg Gln Ser Leu Gly Glu Ser Leu Asp Trp Ile
 35 40 45
 Gly Gly Ile Lys Pro Asn Asn Gly Leu Ala Asn Tyr Asn Gln Lys Phe
 50 55 60
 Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 Met Asp Leu Arg Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Ser Glu Ile Thr Thr Glu Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
 100 105 110
 Ala Leu Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro
 115 120 125
 Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly
 130 135 140
 Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn
 145 150 155 160
 Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln
 165 170 175
 Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser
 180 185 190
 Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser
 195 200 205
 Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Pro Lys Cys Cys Asp Lys Thr
 210 215 220
 His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser
 225 230 235 240
 Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg
 245 250 255
 Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro
 260 265 270
 Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala
 275 280 285
 Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val
 290 295 300
 Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr
 305 310 315 320
 Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr
 325 330 335
 Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu

ES 2 582 038 T3

			340						345							350
Pro	Pro	Ser	Arg	Glu	Glu	Met	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser	Leu	Thr	Cys	
		355					360					365				
Leu	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	Val	Glu	Trp	Glu	Ser	
	370					375					380					
Asn	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn	Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro	Pro	Val	Leu	Asp	
385					390					395					400	
Ser	Asp	Gly	Ser	Phe	Phe	Leu	Tyr	Ser	Lys	Leu	Thr	Val	Asp	Lys	Ser	
				405				410						415		
Arg	Trp	Gln	Gln	Gly	Asn	Val	Phe	Ser	Cys	Ser	Val	Met	His	Glu	Ala	
			420					425					430			
Leu	His	Asn	His	Tyr	Thr	Gln	Lys	Ser	Leu	Ser	Leu	Ser	Pro	Gly	Lys	
		435					440					445				

<210> 91
 <211> 448
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

5

<400> 91

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

10

ES 2 582 038 T3

<212> PRT
 <213> Mus musculus

<400> 93

5

Glu Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala
 1 5 10 15
 Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Thr Ser Gly Tyr Ile Phe Thr Ala Tyr
 20 25 30
 Thr Met His Trp Val Arg Gln Ser Leu Gly Glu Ser Leu Asp Trp Ile
 35 40 45
 Gly Gly Ile Lys Pro Asn Asn Gly Leu Ala Asn Tyr Asn Gln Lys Phe
 50 55 60
 Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 Met Asp Leu Arg Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Ser Glu Ile Thr Thr Glu Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
 100 105 110
 Ala Leu Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro
 115 120 125
 Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly
 130 135 140
 Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn
 145 150 155 160
 Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln
 165 170 175
 Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser
 180 185 190
 Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser
 195 200 205
 Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Cys
 210 215 220
 His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser
 225 230 235 240
 Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg
 245 250 255

ES 2 582 038 T3

Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro
 260 265 270

Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala
 275 280 285

Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val
 290 295 300

Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr
 305 310 315 320

Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr
 325 330 335

Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu
 340 345 350

Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys
 355 360 365

Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser
 370 375 380

Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp
 385 390 400

Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser
 405 410 415

Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala
 420 425 430

Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 435 440 445

<210> 94
 <211> 448
 5 <212> PRT
 <213> Mus musculus

<400> 94

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

Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Thr Ser Gly Tyr Ile Phe Thr Ala Tyr
 20 25 30

Thr Met His Trp Val Arg Gln Ser Leu Gly Glu Ser Leu Asp Trp Ile
 35 40 45

Gly Gly Ile Lys Pro Asn Asn Gly Leu Ala Asn Tyr Asn Gln Lys Phe
 50 55 60

Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80

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

Ala Arg Ser Glu Ile Thr Thr Glu Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
 100 105 110

10

ES 2 582 038 T3

Ala Leu Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro
115 120 125

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

Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn
145 150 155 160

Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln
165 170 175

Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser
180 185 190

Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser
195 200 205

Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr
210 215 220

His Cys Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser
225 230 235 240

Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg
245 250 255

Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro
260 265 270

Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala
275 280 285

Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val
290 295 300

Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr
305 310 315 320

Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr
325 330 335

Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu
340 345 350

Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys
355 360 365

Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser
370 375 380

Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp
385 390 395 400

Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser
405 410 415

Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala
420 425 430

Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
435 440 445

<210> 95
<211> 446
5 <212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 95

ES 2 582 038 T3

Glu Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala
 1 5 10 15
 Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Thr Ser Gly Tyr Ile Phe Thr Ala Tyr
 20 25 30
 Thr Met His Trp Val Arg Gln Ser Leu Gly Glu Ser Leu Asp Trp Ile
 35 40 45
 Gly Gly Ile Lys Pro Asn Asn Gly Leu Ala Asn Tyr Asn Gln Lys Phe
 50 55 60
 Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 Met Asp Leu Arg Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Ser Glu Ile Thr Thr Glu Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
 100 105 110
 Ala Leu Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro
 115 120 125
 Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly
 130 135 140
 Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn
 145 150 155 160
 Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln
 165 170 175
 Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser
 180 185 190
 Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser
 195 200 205
 Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Lys Cys Asp Lys Thr His Thr
 210 215 220
 Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe
 225 230 235 240
 Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro
 245 250 255
 Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val
 260 265 270
 Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr
 275 280 285
 Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val
 290 295 300
 Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys
 305 310 315 320

ES 2 582 038 T3

Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser
 325 330 335
 Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro
 340 345 350
 Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val
 355 360 365
 Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly
 370 375 380
 Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp
 385 390 395 400
 Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp
 405 410 415
 Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His
 420 425 430
 Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 435 440 445

<210> 96
 <211> 447
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

5

<400> 96

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

10

ES 2 582 038 T3

Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser
 180 185 190

Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser
 195 200 205

Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Cys His
 210 215 220

Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val
 225 230 235 240

Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr
 245 250 255

Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu
 260 265 270

Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys
 275 280 285

Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser
 290 295 300

Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys
 305 310 315 320

Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile
 325 330 335

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

Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu
 355 360 365

Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn
 370 375 380

Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser
 385 390 395 400

Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg
 405 410 415

Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu
 420 425 430

His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 435 440 445

<210> 97
 <211> 447
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

<400> 97

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

Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Thr Ser Gly Tyr Ile Phe Thr Ala Tyr
 20 25 30

5

10

ES 2 582 038 T3

Thr Met His Trp Val Arg Gln Ser Leu Gly Glu Ser Leu Asp Trp Ile
 35 40 45
 Gly Gly Ile Lys Pro Asn Asn Gly Leu Ala Asn Tyr Asn Gln Lys Phe
 50 55 60
 Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 Met Asp Leu Arg Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Ser Glu Ile Thr Thr Glu Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
 100 105 110
 Ala Leu Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro
 115 120 125
 Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly
 130 135 140
 Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn
 145 150 155 160
 Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln
 165 170 175
 Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser
 180 185 190
 Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser
 195 200 205
 Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Cys Thr
 210 215 220
 His Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val
 225 230 235 240
 Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr
 245 250 255
 Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu
 260 265 270
 Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys
 275 280 285
 Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser
 290 295 300
 Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys
 305 310 315 320
 Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile
 325 330 335
 Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro
 340 345 350
 Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu
 355 360 365
 Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn

370	375	380																	
Gly	Gln	Pro	Glu	Asn	Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro	Pro	Val	Leu	Asp	Ser				
385					390					395					400				
Asp	Gly	Ser	Phe	Phe	Leu	Tyr	Ser	Lys	Leu	Thr	Val	Asp	Lys	Ser	Arg				
			405						410				415						
Trp	Gln	Gln	Gly	Asn	Val	Phe	Ser	Cys	Ser	Val	Met	His	Glu	Ala	Leu				
			420					425					430						
His	Asn	His	Tyr	Thr	Gln	Lys	Ser	Leu	Ser	Leu	Ser	Pro	Gly	Lys					
		435					440					445							

<210> 98
 <211> 446
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

5

<400> 98

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

10

ES 2 582 038 T3

Glu Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala
 1 5 10 15
 Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Thr Ser Gly Tyr Ile Phe Thr Ala Tyr
 20 25 30
 Thr Met His Trp Val Arg Gln Ser Leu Gly Glu Ser Leu Asp Trp Ile
 35 40 45
 Gly Gly Ile Lys Pro Asn Asn Gly Leu Ala Asn Tyr Asn Gln Lys Phe
 50 55 60
 Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 Met Asp Leu Arg Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Ser Glu Ile Thr Thr Glu Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
 100 105 110
 Ala Leu Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro
 115 120 125
 Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly
 130 135 140
 Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn
 145 150 155 160
 Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln
 165 170 175
 Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser
 180 185 190
 Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser
 195 200 205
 Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Pro Ser Cys Asp Lys His Cys
 210 215 220
 Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe
 225 230 235 240
 Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro
 245 250 255
 Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val
 260 265 270
 Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr
 275 280 285

Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val
 290 295 300
 Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys
 305 310 315 320
 Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser
 325 330 335
 Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro
 340 345 350
 Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val
 355 360 365
 Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly
 370 375 380
 Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp
 385 390 395 400
 Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp
 405 410 415
 Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His
 420 425 430
 Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 435 440 445

<210> 101
 <211> 444
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

5

<400> 101

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

10

ES 2 582 038 T3

Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn
 145 150 155 160
 Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln
 165 170 175
 Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser
 180 185 190
 Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser
 195 200 205
 Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys Thr Cys Pro
 210 215 220
 Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe
 225 230 235 240
 Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val
 245 250 255
 Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe
 260 265 270
 Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro
 275 280 285
 Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr
 290 295 300
 Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val
 305 310 315 320
 Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala
 325 330 335
 Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg
 340 345 350
 Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly
 355 360 365
 Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro
 370 375 380
 Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser
 385 390 395 400
 Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln
 405 410 415
 Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His
 420 425 430
 Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 435 440

<210> 102
 <211> 448
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

 <400> 102

5

ES 2 582 038 T3

Glu Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala
 1 5 10 15
 Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Thr Ser Gly Tyr Ile Phe Thr Ala Tyr
 20 25 30
 Thr Met His Trp Val Arg Gln Ser Leu Gly Glu Ser Leu Asp Trp Ile
 35 40 45
 Gly Gly Ile Lys Pro Asn Asn Gly Leu Ala Asn Tyr Asn Gln Lys Phe
 50 55 60
 Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 Met Asp Leu Arg Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Ser Glu Ile Thr Thr Glu Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
 100 105 110
 Ala Leu Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro
 115 120 125
 Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly
 130 135 140
 Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn
 145 150 155 160
 Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln
 165 170 175
 Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser
 180 185 190
 Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser
 195 200 205
 Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Cys
 210 215 220
 Val Glu Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser
 225 230 235 240
 Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg
 245 250 255
 Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro
 260 265 270
 Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala
 275 280 285
 Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val
 290 295 300
 Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr
 305 310 315 320
 Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr
 325 330 335
 Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu
 340 345 350

ES 2 582 038 T3

Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys
 355 360 365
 Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser
 370 375 380
 Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp
 385 390 395 400
 Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser
 405 410 415
 Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala
 420 425 430
 Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 435 440 445

<210> 103
 <211> 1347
 <212> ADN
 <213> Mus musculus

5

<400> 103

gaggtccagc tgcagcagag cgggccagaa ctggttaaac ctggcgccag cgtgaagatt 60
 agctgtaaga ccagcggtta catctttaca gcatatacca tgcactgggt gaggcagagt 120
 ctgggggaat ctctggactg gatcggaggt attaagccca acaatgcctt ggctaactat 180
 aatcaaaaat tcaagggcaa agccacactg accgtcgata agtcctcttc cacagcttac 240
 atggatctga gaagcctgac atccgaggac agtgacagtgt actactgctc ccggtctgag 300
 atcactaccg agttcgacta ttggggacag ggcactgcac tgaccgtctc ctccgccagc 360
 accaagggcc caagcgtggt cccgctagcc cccagcagca agagcaccag cggcggcaca 420
 gccgccctgg gctgcctggt gaaggactac ttccccgagc ccgtgaccgt gtccctggaac 480
 agcggagccc tgacctccgg cgtgcacaca ttccccgccg tgctgcagag cagcggcctg 540
 tacagcctga gcagcgtggt gaccgtgcct agcagcagcc tgggcaccca gacctacatc 600
 tgcaacgtga accacaagcc cagcaacacc aaggtggaca agcgggtgga gtgcaagagc 660
 tgcgacaaga cccacacctg tccccctgc cctgccctg aactgctggg cggaccagc 720
 gtgttcctgt tccccccaa gcccaaggac accctgatga tcagcagaac ccccagagtg 780
 acctgtgtgg tgggtgagct gtcccacgag gaccagagg tgaagttaa ctggtacgtg 840
 gacggcgtgg aggtgcacaa cgccaagacc aagcccagag aggagcagta caacagcacc 900
 tacagggtgg tgtccgtgct gaccgtgctg caccaggact ggctgaacgg caaggagtac 960
 aagtgtaaag tgtccaacaa ggcctgccca gccccaatcg aaaagaccat cagcaaggcc 1020
 aagggccagc caagagagcc ccaggtgtac accctgccac ccagcagggg ggagatgacc 1080
 aagaaccagg tgtccctgac ctgtctggtg aagggcttct acccaagcga catcgccgtg 1140
 gagtgggaga gcaacggcca gcccgagaac aactacaaga ccaccccccc agtgctggac 1200
 agcgacggca gcttcttctt gtacagcaag ctgaccgtgg acaagagcag atggcagcag 1260
 ggcaacgtgt tcagctgctc cgtgatgcac gaggccctgc acaaccacta caccagaag 1320
 agcctgagcc tgtccccagg caagtga 1347

10

ES 2 582 038 T3

<210> 104
 <211> 1347
 <212> ADN
 <213> Mus musculus

5

<400> 104

```

gaggtccagc tgcagcagag cgggccagaa ctggttaaac ctggcgccag cgtgaagatt    60
agctgtaaga ccagcgggta catctttaca gcatatacca tgcactgggt gaggcagagt    120
ctgggggaat ctctggactg gatcggaggt attaagccca acaatggcct ggctaactat    180
aatcaaaaat tcaagggcaa agccacactg accgtcgata agtcctcttc cacagcttac    240
atggatctga gaagcctgac atccgaggac agtgcagtgt actactgcgc ccggtctgag    300
atcactaccg agttcgacta ttggggacag ggcactgcac tgaccgtctc ctccgcagc    360
accaagggcc caagcgtggt cccgctagcc cccagcagca agagcaccag cggcggcaca    420
gccgccctgg gctgcctggt gaaggactac ttccccgagc ccgtgaccgt gtcttggaac    480
agcggagccc tgacctccgg cgtgcacaca ttccccgccg tgctgcagag cagcggcctg    540
tacagcctga gcagcgtggt gaccgtgcct agcagcagcc tgggcaccca gacctacatc    600
tgcaacgtga accacaagcc cagcaacacc aaggtggaca agagagtgga gccctgcagc    660
tgcgacaaga cccacacctg tccccctgc cctgccctg aactgctggg cggaccacagc    720
gtgttcctgt tccccccaa gcccaaggac accctgatga tcagcagaac ccccgaggtg    780
acctgtgtgg tggtagcgtg gtcccacgag gaccagagg tgaagttaa ctggtacgtg    840
gacggcgtgg aggtgcacaa cgccaagacc aagcccagag aggagcagta caacagcacc    900
tacagggtgg tgtccgtgct gaccgtgctg caccaggact ggctgaacgg caaggagtac    960
aagtgtaagg tgtccaacaa ggcctgccca gcccgaatcg aaaagaccat cagcaaggcc   1020
aagggccagc caagagagcc ccaggtgtac accctgccac ccagcagggg ggagatgacc   1080
aagaaccagg tgtccctgac ctgtctggtg aagggcttct acccaagcga catcgccctg   1140
gagtgggaga gcaacggcca gcccgagaac aactacaaga ccaccccccc agtgctggac   1200
agcgacggca gcttcttcct gtacagcaag ctgaccgtgg acaagagcag atggcagcag   1260
ggcaacgtgt tcagctgctc cgtgatgcac gaggccctgc acaaccacta caccagaag   1320
agcctgagcc tgtccccagg caagtga                                     1347
    
```

10 <210> 105
 <211> 1347
 <212> ADN
 <213> Mus musculus

15 <400> 105

ES 2 582 038 T3

gaggtccagc tgcagcagag cgggccagaa ctggttaaac ctggcgccag cgtgaagatt 60
 agctgtaaga ccagcgggta catctttaca gcatatacca tgcactgggt gaggcagagt 120
 ctgggggaat ctctggactg gatcggaggt attaagccca acaatggcct ggctaactat 180
 aatcaaaaat tcaagggcaa agccacactg accgtcgata agtcctcttc cacagcttac 240
 atggatctga gaagcctgac atccgaggac agtgcagtgt actactgccc cgggtctgag 300
 atcactaccg agttcgacta ttggggacag ggcactgcac tgaccgtctc ctccgccagc 360
 accaagggcc caagcgtgtt cccgctagcc cccagcagca agagcaccag cggcggcaca 420
 gccgccctgg gctgcctggt gaaggactac ttccccgagc ccgtgaccgt gtctctggaac 480
 agcggagccc tgacctccgg cgtgcacaca ttccccgccc tgctgcagag cagcggcctg 540
 tacagcctga gcagcgtggt gaccgtgcct agcagcagcc tgggcaccca gacctacatc 600
 tgcaacgtga accacaagcc cagcaacacc aaggtggaca agcgcgtgga gcccaagtgc 660
 tgcgacaaga cccacacctg tccccctgc cctgccctg aactgctggg cggaccacagc 720
 gtgttcctgt tccccccaa gcccaaggac accctgatga tcagcagaac ccccaggtg 780
 acctgtgtgg tgggtgacgt gtcccacgag gaccagagg tgaagttaa ctggtacgtg 840
 gacggcgtgg aggtgcacaa cgccaagacc aagcccagag aggagcagta caacagcacc 900
 tacaggtggt tgtccgtgct gaccgtgctg caccaggact ggctgaacgg caaggagtac 960
 aagtgaagg tgtccaacaa ggccctgcc gcccacatcg aaaagaccat cagcaaggcc 1020
 aagggccagc caagagagcc ccaggtgtac accctgccac ccagcagggg gagatgacc 1080
 aagaaccagg tgtccctgac ctgtctggtg aagggcttct acccaagcga catcgccgtg 1140
 gagtgggaga gcaacggcca gcccgagaac aactacaaga ccaccccccc agtctgggac 1200
 agcgacggca gcttcttct gtacagcaag ctgaccgtgg acaagagcag atggcagcag 1260
 ggcaacgtgt tcagctgctc cgtgatgcac gaggccctgc acaaccacta caccagaag 1320
 agcctgagcc tgtccccagg caagtga 1347

<210> 106
 <211> 1347
 <212> ADN
 <213> Mus musculus

5

<400> 106

gaggtccagc tgcagcagag cgggccagaa ctggttaaac ctggcgccag cgtgaagatt 60
 agctgtaaga ccagcgggta catctttaca gcatatacca tgcactgggt gaggcagagt 120
 ctgggggaat ctctggactg gatcggaggt attaagccca acaatggcct ggctaactat 180
 aatcaaaaat tcaagggcaa agccacactg accgtcgata agtcctcttc cacagcttac 240
 atggatctga gaagcctgac atccgaggac agtgcagtgt actactgccc cgggtctgag 300

10

ES 2 582 038 T3

atcactaccg agttcgacta ttggggacag ggcactgcac tgaccgtctc ctccgccagc 360
 accaagggcc caagcgtggt cccgctagcc cccagcagca agagcaccag cggcggcaca 420
 gccgccctgg gctgcctggt gaaggactac ttccccgagc ccgtgaccgt gtccctggaac 480
 agcggagccc tgacctccgg cgtgcacaca ttccccgccg tgctgcagag cagcggcctg 540
 tacagcctga gcagcgtggt gaccgtgcct agcagcagcc tgggcaccca gacctacatc 600
 tgcaacgtga accacaagcc cagcaacacc aaggtggaca agagagtgga gcctaagagc 660
 tgttgcaaga cccacacctg tccccctgc cctgcccctg aactgctggg cggaccacagc 720
 gtgttctgt tccccccaa gcccaaggac accctgatga tcagcagaac ccccaggtg 780
 acctgtgtgg tgggtgacgt gtcccacgag gaccacagag tgaagtcaa ctggtacgtg 840
 gacggcgtgg aggtgcacaa cgccaagacc aagcccagag aggagcagta caacagcacc 900
 tacagggtgg tgtccgtgct gaccgtgctg caccaggact ggctgaacgg caaggagtac 960
 aagtgtaagg tgtccaacaa ggccctgcc gcccgaatcg aaaagaccat cagcaaggcc 1020
 aagggccagc caagagagcc ccaggtgtac accctgccac ccagcagggg gagatgacc 1080
 aagaaccagg tgtccctgac ctgtctggtg aagggcttct acccaagcga catcgccgtg 1140
 gagtgggaga gcaacggcca gcccgagaac aactacaaga ccaccccccc agtgctggac 1200
 agcgacggca gcttcttct gtacagcaag ctgaccgtgg acaagagcag atggcagcag 1260
 ggcaacgtgt tcagctgctc cgtgatgcac gaggccctgc acaaccacta caccagaag 1320
 agcctgagcc tgtccccagg caagtga 1347

<210> 107
 <211> 1346
 <212> ADN
 <213> Mus musculus

5

<400> 107

gaggtccagc tgcagcagag cgggccagaa ctggttaaac ctggcggccag cgtgaagatt 60
 agctgtaaga ccagcgggta catctttaca gcatatacca tgcactgggt gaggcagagt 120
 ctgggggaat ctctggactg gatcggaggt attaagccca acaatggcct ggctaactat 180
 aatcaaaaat tcaagggcaa agccacactg accgtcgata agtcctcttc cacagcttac 240
 atggatctga gaagcctgac atccgaggac agtgcagtgt actactgcgc ccggtctgag 300
 atcactaccg agttcgacta ttggggacag ggcactgcac tgaccgtctc ctccgccagc 360
 accaagggcc caagcgtggt cccgctagcc cccagcagca agagcaccag cggcggcaca 420
 gccgccctgg gctgcctggt gaaggactac ttccccgagc ccgtgaccgt gtccctggaac 480
 agcggagccc tgacctccgg cgtgcacaca ttccccgccg tgctgcagag cagcggcctg 540
 tacagcctga gcagcgtggt gaccgtgcct agcagcagcc tgggcaccca gacctacatc 600
 tgcaacgtga accacaagcc cagcaacacc aaggtggaca agagagtgga gcccaagagc 660

10

ES 2 582 038 T3

tgcgactgca cccacacctg tccccctgc cctgcccctg aactgctggg cggaccaccg 720
 gtgttcctgt tccccccaa gcccaaggac accctgatga tcagcagaac ccccagagtg 780
 acctgtgtgg tggtagacgt gtcccacgag gaccagaggg tgaagttaa ctggtacgtg 840
 gacggcgtgg aggtgcacaa cgccaagacc aagcccagag aggagcagta caacagcacc 900
 tacagggtagg tgtccgtgct gaccgtgctg caccaggact ggctgaacgg caaggagtac 960
 aagtgttaagg tgtccaacaa ggcctgccca gccccaatcg aaaagaccat cagcaaggcc 1020
 aagggccagc caagagagcc ccaggtgtac accctgccac ccagcagggg gagatgacc 1080
 aagaaccagg tgtccctgac ctgtctgggt aagggcttct acccaagcga catcgccgtg 1140
 gagtgggaga gcaacggcca gcccgagaac aactacaaga ccaccccccc agtctgggac 1200
 agcgacggca gcttcttct gtacagcaag ctgaccgtgg acaagagcag atggcagcag 1260
 ggcaacgtgt tcagctgctc cgtgatgcac gaggcccctg acaaccacta caccagaag 1320
 agcctgagcc tgtcccagg caagtg 1346

<210> 108
 <211> 1347
 <212> ADN
 <213> Mus musculus

5

<400> 108

gaggtccagc tgcagcagag cgggccagaa ctggttaaac ctggcgcag cgtgaagatt 60
 agctgttaaga ccagcggta catctttaca gcatatacca tgcactgggt gaggcagagt 120
 ctgggggaat ctctggactg gatcggaggt attaagcca acaatggcct ggctaactat 180
 aatcaaaaat tcaagggcaa agccacactg accgtcgata agtcctcttc cacagcttac 240
 atggatctga gaagcctgac atccgaggac agtgcagtgt actactgccc ccggtctgag 300
 atcactaccg agttcgacta ttggggacag ggcactgcac tgaccgtctc ctccgccagc 360
 accaagggcc caagcgtgtt cccgctagcc cccagcagca agagcaccag cggcggcaca 420
 gccgcccctgg gctgcctggt gaaggactac tccccgagc ccgtgaccgt gtcttggaac 480
 agcggagccc tgacctccgg cgtgcacaca tccccgccc tgctgcagag cagcggcctg 540
 tacagcctga gcagcgtggt gaccgtgcct agcagcagcc tgggcaccca gacctacatc 600
 tgcaacgtga accacaagcc cagcaacacc aaggtggaca agagagtggg gcccaagagc 660
 tgcgacaagt gccacacctg tccccctgc cctgcccctg aactgctggg cggaccaccg 720
 gtgttcctgt tccccccaa gcccaaggac accctgatga tcagcagaac ccccagagtg 780
 acctgtgtgg tggtagacgt gtcccacgag gaccagaggg tgaagttaa ctggtacgtg 840
 gacggcgtgg aggtgcacaa cgccaagacc aagcccagag aggagcagta caacagcacc 900
 tacagggtagg tgtccgtgct gaccgtgctg caccaggact ggctgaacgg caaggagtac 960
 aagtgttaagg tgtccaacaa ggcctgccca gccccaatcg aaaagaccat cagcaaggcc 1020

10

ES 2 582 038 T3

aagggccagc caagagagcc ccaggtgtac accctgccac ccagcagggga ggagatgacc 1080
 aagaaccagg tgtccctgac ctgtctggtg aagggcttct acccaagcga catcgccgtg 1140
 gagtgggaga gcaacggcca gcccgagaac aactacaaga ccaccccccc agtgctggac 1200
 agcgacggca gcttcttctct gtacagcaag ctgaccgtgg acaagagcag atggcagcag 1260
 ggcaacgtgt tcagctgctc cgtgatgcac gaggccctgc acaaccacta caccagaag 1320
 agcctgagcc tgtccccagg caagtga 1347

<210> 109
 <211> 1347
 <212> ADN
 <213> Mus musculus

5

<400> 109

gaggtccagc tgcagcagag cgggccagaa ctggttaaac ctggcgccag cgtgaagatt 60
 agctgtaaga ccagcgggta catctttaca gcatatacca tgcactgggt gaggcagagt 120
 ctgggggaat ctctggactg gatcggaggt attaagccca acaatggcct ggctaactat 180
 aatcaaaaat tcaagggcaa agccacactg accgtcgata agtcctcttc cacagcttac 240
 atggatctga gaagcctgac atccgaggac agtgcagtgt actactgctc cgggtctgag 300
 atcaactaccg agttcgacta ttggggacag ggcactgcac tgaccgtctc ctccgccagc 360
 accaagggcc caagcgtggt cccgctagcc ccagcagca agagcaccag cggcggcaca 420
 gccgccctgg gctgcctggt gaaggactac ttccccgagc ccgtgaccgt gtccctggaac 480
 agcggagccc tgacctccgg cgtgcacacc ttccccgccc tgctgcagag cagcggcctg 540
 tacagcctga gcagcgtggt gaccgtgcct agcagcagcc tgggcacca gacctacatc 600
 tgcaacgtga accacaagcc cagcaacacc aaggtggaca agagagtgga gcccaagagc 660
 tgcgacaaga cccactgctg tccccctgc cctgccctg aactgctggg cggaccaccg 720
 gtgttcctgt tccccccaa gcccaaggac accctgatga tcagcagaac ccccagagtg 780
 acctgtgtgg tggtagcgtg gtcccacgag gaccagagg tgaagttaa ctggtacgtg 840
 gacggcgtgg aggtgcacaa cgccaagacc aagcccagag aggagcagta caacagcacc 900
 tacagggtgg tgtccgtgct gaccgtgctg caccaggact ggctgaacgg caaggagtac 960
 aagtgtaaag tgtccaacaa ggccctgcc gcccgaatcg aaaagaccat cagcaaggcc 1020
 aagggccagc caagagagcc ccaggtgtac accctgccac ccagcagggga ggagatgacc 1080
 aagaaccagg tgtccctgac ctgtctggtg aagggcttct acccaagcga catcgccgtg 1140
 gagtgggaga gcaacggcca gcccgagaac aactacaaga ccaccccccc agtgctggac 1200
 agcgacggca gcttcttctct gtacagcaag ctgaccgtgg acaagagcag atggcagcag 1260
 ggcaacgtgt tcagctgctc cgtgatgcac gaggccctgc acaaccacta caccagaag 1320
 agcctgagcc tgtccccagg caagtga 1347

10

<210> 110
 <211> 1341
 <212> ADN
 <213> Mus musculus

15

<400> 110

gaggtccagc tgcagcagag cgggccagaa ctggttaaac ctggcgccag cgtgaagatt	60
agctgtaaga ccagcggtta catctttaca gcatatacca tgcactgggt gaggcagagt	120
ctgggggaat ctctggactg gatcggaggt attaagccca acaatggcct ggctaactat	180
aatcaaaaat tcaagggcaa agccacactg accgtcgata agtcctcttc cacagcttac	240
atggatctga gaagcctgac atccgaggac agtgcagtgt actactgcgc ccggtctgag	300
atcactaccg agttcgacta ttggggacag ggcactgcac tgaccgtctc ctccgccagc	360
accaagggcc caagcgtggt cccgctagcc cccagcagca agagcaccag cggcggcaca	420
gccgccctgg gctgcctggt gaaggactac ttccccgagc ccgtgaccgt gtcctggaac	480
agcggagccc tgacctccgg cgtgcacaca ttccccgccg tgctgcagag cagcggcctg	540
tacagcctga gcagcgtggt gaccgtgcct agcagcagcc tgggcaccca gacctacatc	600
tgcaacgtga accacaagcc cagcaacacc aagggtggaca agcgggtgga gaagtgcgac	660
aagaccacaca cctgtcccc ctgccctgcc cctgaactgc tgggcggacc cagcgtgttc	720
ctgttcccc ccaagcccaa ggacaccctg atgatcagca gaacccccga ggtgacctgt	780
gtggtggtgg acgtgtccca cgaggaccca gaggtgaagt tcaactggta cgtggacggc	840
gtggaggtgc acaacgccaa gaccaagccc agagaggagc agtacaacag cacctacagg	900
gtggtgtccg tgctgaccgt gctgcaccag gactggctga acggcaagga gtacaagtgt	960
aaggtgtcca acaaggcctt gccagcccca atcgaaaaga ccatcagcaa ggccaagggc	1020
cagccaagag agccccaggt gtacaccctg ccaccagca gggaggagat gaccaagaac	1080
caggtgtccc tgacctgtct ggtgaagggc ttctacccaa gcgacatcgc cgtggagtgg	1140
gagagcaacg gccagcccga gaacaactac aagaccacc cccagtgct ggacagcgac	1200
ggcagcttct tcctgtacag caagctgacc gtggacaaga gcagatggca gcagggcaac	1260
gtgttcagct gctccgtgat gcacgaggcc ctgcacaacc actacacca gaagagcctg	1320
agcctgtccc caggcaagtg a	1341

5

<210> 111
 <211> 1344
 <212> ADN
 <213> Mus musculus

10

<400> 111

gaggtccagc tgcagcagag cgggccagaa ctggttaaac ctggcgccag cgtgaagatt	60
agctgtaaga ccagcggtta catctttaca gcatatacca tgcactgggt gaggcagagt	120
ctgggggaat ctctggactg gatcggaggt attaagccca acaatggcct ggctaactat	180

ES 2 582 038 T3

aatcaaaaat tcaagggcaa agccacactg accgtcgata agtcctcttc cacagcttac 240
atggatctga gaagcctgac atccgaggac agtgcagtgt actactgcgc ccggtctgag 300
atcactaccg agttcgacta ttggggacag ggcactgcac tgaccgtctc ctccgccagc 360
accaagggcc caagcgtggt cccgctagcc cccagcagca agagcaccag cggcggcaca 420
gccgccctgg gctgcctggt gaaggactac ttccccgagc ccgtgaccgt gtctctggaac 480
agcggagccc tgacctcggg cgtgcacaca ttccccgccg tgctgcagag cagcggcctg 540
tacagcctga gcagcgtggt gaccgtgect agcagcagcc tgggcaccca gacctacatc 600
tgcaacgtga accacaagcc cagcaacacc aaggtggaca agagagtgga gcccaagagc 660
tgcgactgcc acacctgtcc cccctgccct gccctgaac tgctgggcgg acccagcgtg 720
ttctgttcc cccccaagcc caaggacacc ctgatgatca gcagaacccc cgaggtgacc 780
tgtgtggtgg tggacgtgtc ccacgaggac ccagaggtga agttcaactg gtacgtggac 840
ggcgtggagg tgcacaacgc caagaccaag cccagagagg agcagtacaa cagcacctac 900
aggggtggtg ccgtgctgac cgtgctgcac caggactggc tgaacggcaa ggagtacaag 960
tgtaaggtgt ccaacaaggc cctgccagcc ccaatcgaaa agaccatcag caaggccaag 1020
ggccagccaa gagagcccca ggtgtacacc ctgccaccca gcagggagga gatgaccaag 1080
aaccaggtgt cctgacctg tctggtgaag ggcttctacc caagcgacat cgccgtggag 1140
tgggagagca acggccagcc cgagaacaac tacaagacca cccccccagt gctggacagc 1200
gacggcagct tcttctgta cagcaagctg accgtggaca agagcagatg gcagcagggc 1260
aacgtgttca gctgctcgt gatgcacgag gccctgcaca accactacac ccagaagagc 1320
ctgagcctgt cccagggcaa gtga 1344

<210> 112
<211> 1344
5 <212> ADN
<213> Mus musculus

<400> 112

gaggtccagc tgcagcagag cgggccagaa ctggttaaac ctggcgcag cgtgaagatt 60
agctgtaaga ccagcggtta catctttaca gcatatacca tgactgggt gagcagagt 120
ctgggggaat ctctggactg gatcggagggt attaagccca acaatggcct ggctaactat 180
aatcaaaaat tcaagggcaa agccacactg accgtcgata agtcctcttc cacagcttac 240
atggatctga gaagcctgac atccgaggac agtgcagtgt actactgcgc ccggtctgag 300
atcactaccg agttcgacta ttggggacag ggcactgcac tgaccgtctc ctccgccagc 360
accaagggcc caagcgtggt cccgctagcc cccagcagca agagcaccag cggcggcaca 420
gccgccctgg gctgcctggt gaaggactac ttccccgagc ccgtgaccgt gtctctggaac 480
10 agcggagccc tgacctcggg cgtgcacacc ttccccgccg tgctgcagag cagcggcctg 540

ES 2 582 038 T3

tacagcctga gcagcgtggt gaccgtgcct agcagcagcc tgggcaccca gacctacatc 600
 tgcaacgtga accacaagcc cagcaacacc aaggtggaca agagagtgga gcccaagagc 660
 tgcgactgca cccactgccc ccctgcct gccctgaac tgctggcgg acccagcgtg 720
 ttctgttcc ccccaagcc caaggacacc ctgatgatca gcagaacccc cgaggtgacc 780
 tgtgtggtgg tggacgtgtc ccacgaggac ccagaggtga agttcaactg gtacgtggac 840
 ggcgtggagg tgcacaacgc caagaccaag ccagagagg agcagtacaa cagcacctac 900
 aggggtggtg ccgtgctgac cgtgctgac caggactggc tgaacggcaa ggagtacaag 960
 tgtaaggtg ccaacaagcc cctgccagcc ccaatcgaaa agaccatcag caaggccaag 1020
 ggccagccaa gagagcccca ggtgtacacc ctgccaccca gcagggagga gatgaccaag 1080
 aaccaggtg ccctgacctg tctggtgaag ggcttctacc caagcgacat cgccgtggag 1140
 tgggagagca acggccagcc cgagaacaac tacaagacca cccccccagt gctggacagc 1200
 gacggcagct tcttctgtg cagcaagctg accgtggaca agagcagatg gcagcagggc 1260
 aacgtgttca gctgctccgt gatgcacgag gccctgcaca accactacac ccagaagagc 1320
 ctgagcctgt cccagggcaa gtga 1344

<210> 113
 <211> 1341
 <212> ADN
 <213> Mus musculus

5

<400> 113

gaggtccagc tgacgagag cgggccagaa ctggttaaac ctggcgccag cgtgaagatt 60
 agctgtaaga ccagcggtta catctttaca gcatatacca tgcactgggt gaggcagagt 120
 ctgggggaat ctctggactg gatcggaggt attaagccca acaatggcct ggctaactat 180
 aatcaaaaat tcaagggcaa agccacactg accgtcgata agtcctcttc cacagcttac 240
 atggatctga gaagcctgac atccgaggac agtgcagtgt actactgctc ccggtctgag 300
 atcactaccg agttcgacta ttggggacag ggcactgcac tgaccgtctc ctccgccagc 360
 accaagggcc caagcgtggt cccgctagcc ccagcagca agagcaccag cggcggcaca 420
 gccgccctgg gctgcctggt gaaggactac ttccccgagc ccgtgaccgt gtccctggaac 480
 agcggagccc tgacctccgg cgtgcacaca ttccccgccc tgctgcagag cagcggcctg 540
 tacagcctga gcagcgtggt gaccgtgcct agcagcagcc tgggcaccca gacctacatc 600
 tgcaacgtga accacaagcc cagcaacacc aaggtggaca agagagtgga gccctgcagc 660
 tgcaagcaca cctgtcccc ctgccctgcc cctgaactgc tgggcggacc cagcgtgttc 720
 ctgttcccc ccaagcccaa ggacaccctg atgatcagca gaacccccga ggtgacctgt 780
 gtggtggtgg acgtgtccca cgaggacca gaggtgaagt tcaactggta cgtggacggc 840
 gtggaggtgc acaacgcaa gaccaagccc agagaggagc agtacaacag cacctacagg 900

10

ES 2 582 038 T3

gtggtgtccg tgctgaccgt gctgcaccag gactggctga acggcaagga gtacaagtgt 960
 aaggtgtcca acaaggccct gccagcccca atcgaaaaga ccatcagcaa ggccaagggc 1020
 cagccaagag agccccaggt gtacaccctg ccaccagca gggaggagat gaccaagaac 1080
 caggtgtccc tgacctgtct ggtgaagggc ttctaccca gcgacatcgc cgtggagtgg 1140
 gagagcaacg gccagcccga gaacaactac aagaccacc cccagtgct ggacagcgac 1200
 ggcagcttct tcctgtacag caagctgacc gtggacaaga gcagatggca gcagggcaac 1260
 gtgttcagct gctccgtgat gcacgaggcc ctgcacaacc actacacca gaagagcctg 1320
 agcctgtccc caggcaagtg a 1341

<210> 114
 <211> 1341
 <212> ADN
 <213> Mus musculus

5

<400> 114

gaggtccagc tgcagcagag cgggccagaa ctggttaaac ctggcgccag cgtgaagatt 60
 agctgtaaga ccagcggtta catctttaca gcatatacca tgcactgggt gaggcagagt 120
 ctgggggaat ctctggactg gatcggaggt attaagccca acaatgcct ggctaactat 180
 aatcaaaaat tcaagggcaa agccacactg accgtcgata agtcctcttc cacagcttac 240
 atggatctga gaagcctgac atccgaggac agtgacagtgt actactgccc ccggtctgag 300
 atcactaccg agttcgacta ttggggacag ggcactgac tgaccgtctc ctccgccagc 360
 accaagggcc caagcgtggt cccgctagcc cccagcagca agagcaccag cggcggcaca 420
 gccgccctgg gctgcctggt gaaggactac ttccccgagc ccgtgaccgt gtccctggaac 480
 agcggagccc tgacctccgg cgtgcacaca ttccccgccg tgctgcagag cagcggcctg 540
 tacagcctga gcagcgtggt gaccgtgcct agcagcagcc tgggcaccca gacctacatc 600
 tgcaacgtga accacaagcc cagcaacacc aaggtggaca agagagtgga gcctagctgc 660
 tgcaccaca cctgtcccc ctgccctgcc cctgaactgc tggcgggacc cagcgtgttc 720
 ctgttcccc ccaagcccaa ggacaccctg atgatcagca gaacccccga ggtgacctgt 780
 gtggtggtgg acgtgtccca cgaggaccca gaggtgaagt tcaactggtc cgtggacggc 840
 gtggaggtgc acaacgcca gaccaagccc agagaggagc agtacaacag cacctacagg 900
 gtggtgtccg tgctgaccgt gctgcaccag gactggctga acggcaagga gtacaagtgt 960
 aaggtgtcca acaaggccct gccagcccca atcgaaaaga ccatcagcaa ggccaagggc 1020
 cagccaagag agccccaggt gtacaccctg ccaccagca gggaggagat gaccaagaac 1080
 caggtgtccc tgacctgtct ggtgaagggc ttctaccca gcgacatcgc cgtggagtgg 1140
 gagagcaacg gccagcccga gaacaactac aagaccacc cccagtgct ggacagcgac 1200
 ggcagcttct tcctgtacag caagctgacc gtggacaaga gcagatggca gcagggcaac 1260
 gtgttcagct gctccgtgat gcacgaggcc ctgcacaacc actacacca gaagagcctg 1320
 agcctgtccc caggcaagtg a 1341

10

<210> 115

ES 2 582 038 T3

<211> 1341
 <212> ADN
 <213> Mus musculus

5 <400> 115

```

gaggtccagc tgcagcagag cgggccagaa ctggttaaac ctggcgccag cgtgaagatt    60
agctgtaaga ccagcgggta catctttaca gcatatacca tgcactgggt gaggcagagt    120
ctgggggaat ctctggactg gatcggaggt attaagccca acaatggcct ggctaactat    180
aatcaaaaat tcaagggcaa agccacactg accgtcgata agtcctcttc cacagcttac    240
atggatctga gaagcctgac atccgaggac agtgcagtgt actactgcgc ccggtctgag    300
atcactaccg agttcgacta ttggggacag ggcactgcac tgaccgtctc ctcccaccagc    360
accaagggcc caagcgtggt cccgctagcc cccagcagca agagcaccag cggcggcaca    420
gccgccctgg gctgcctggt gaaggactac ttccccgagc ccgtgaccgt gtccctggaac    480
agcggagccc tgacctccgg cgtgcacacc ttccccgccc tgctgcagag cagcggcctg    540
tacagcctga gcagcgtggt gaccgtgcct agcagcagcc tgggcaccca gacctacatc    600
tgcaacgtga accacaagcc cagcaacacc aaggtggaca agagagtgga gcccaagctgc    660
gacaagcaact gctgcccccc ctgccctgcc cctgaactgc tgggcggacc cagcgtgttc    720
ctgttcccc ccaagcccaa ggacaccctg atgatcagca gaacccccga ggtgacctgt    780
gtggtggtgg acgtgtccca cgaggaccca gaggtgaagt tcaactggta cgtggacggc    840
gtggaggtgc acaacgccaa gaccaagccc agagaggagc agtacaacag cacctacagg    900
gtggtgtccg tgctgaccgt gctgcaccag gactggctga acggcaagga gtacaagtgt    960
aaggtgtcca acaaggccct gccagcccca atcgaaaaga ccatcagcaa ggccaagggc   1020
cagccaagag agccccaggt gtacaccctg ccaccagca gggaggagat gaccaagaac   1080
caggtgtccc tgacctgtct ggtgaagggc ttctacceaa gcgacatcgc cgtggagtgg   1140
gagagcaacg gccagcccga gaacaactac aagaccacc ccccagtgct ggacagcgac   1200
ggcagcttct tcctgtacag caagctgacc gtggacaaga gcagatggca gcagggcaac   1260
gtgttcagct gctccgtgat gcacgaggcc ctgcacaacc actacacca gaagagcctg   1320
agcctgtccc caggcaagtg a                                     1341
    
```

10 <210> 116
 <211> 1335
 <212> ADN
 <213> Mus musculus

15 <400> 116

ES 2 582 038 T3

gaggtccagc tgcagcagag cgggccagaa ctggttaaac ctggcgccag cgtgaagatt 60
 agctgtaaga ccagcgggta catctttaca gcatatacca tgcactgggt gaggcagagt 120
 ctgggggaat ctctggactg gatcggaggt attaagccca acaatggcct ggctaactat 180
 aatcaaaaat tcaagggcaa agccacactg accgtcgata agtcctcttc cacagcttac 240
 atggatctga gaagcctgac atccgaggac agtgcagtgt actactgctc ccggtctgag 300
 atcactaccg agttcgacta ttggggacag ggcactgcac tgaccgtctc ctccgccagc 360
 accaagggcc caagcgtgtt cccgctagcc cccagcagca agagcacaag cggcggaaaca 420
 gccgccctgg gctgcctggt gaaggactac ttccccgagc ccgtgaccgt gtcttggaac 480
 agcggagccc tgaccagcgg cgtgcacacc tttccagccg tgctgcagag cagcggcctg 540
 tacagcctga gcagcgtggt gaccgtgcct agcagcagcc tgggcaccca gacctacatc 600
 tgcaactgta accacaagcc cagcaacacc aaggtggaca agagagtgga gcccaagagc 660
 tgcacctgtc ccccttgctc tgcccctgag ctgctgggag gaccagcgt gttcctgttc 720
 ccccccaagc ccaaggacac cctgatgatc agcagaaccc ccgaggtgac ctgtgtggtg 780
 gtggacgtgt cccacgagga cccagaggtg aagttcaact ggtacgtgga cggcgtggag 840
 gtgcacaacg ccaagaccaa gccagagag gagcagtaca acagcaccta cagggtggtg 900
 tccgtgctga ccgtgctgca ccaggactgg ctgaacggca aggagtacaa gtgtaagggtg 960
 tccaacaagg ccctgccagc cccaatcgaa aagaccatca gcaaggccaa gggccagcca 1020
 agagagcccc aggtgtacac cctgccaccc agcagggag agatgaccaa gaaccaggtg 1080
 tcctgacct gtctggtgaa gggcttctac ccaagcgaca tcgccgtgga gtgggagagc 1140
 aacggccagc ccgagaacaa ctacaagacc accccccag tgctggacag cgacggcagc 1200
 ttcttctgt acagcaagct gaccgtggac aagagcagat ggcagcaggg caacgtgttc 1260
 agctgctccg tgatgcacga ggcctgcac aaccactaca cccagaagag cctgagcctg 1320
 tccccaggca agtga 1335

<210> 117
 <211> 1347
 <212> ADN
 <213> Mus musculus

5

<400> 117

gaggtccagc tgcagcagag cgggccagaa ctggttaaac ctggcgccag cgtgaagatt 60
 agctgtaaga ccagcgggta catctttaca gcatatacca tgcactgggt gaggcagagt 120
 ctgggggaat ctctggactg gatcggaggt attaagccca acaatggcct ggctaactat 180
 aatcaaaaat tcaagggcaa agccacactg accgtcgata agtcctcttc cacagcttac 240
 atggatctga gaagcctgac atccgaggac agtgcagtgt actactgctc ccggtctgag 300
 atcactaccg agttcgacta ttggggacag ggcactgcac tgaccgtctc ctccgccagc 360

10

ES 2 582 038 T3

accaagggcc caagcgtgtt cccgctagcc cccagcagca agagcacaag cggcggaaaca	420
gccgccctgg gctgcctggt gaaggactac ttccccgagc cCGtgaccgt gtcttggAAC	480
agcggagccc tgaccagcgg cgtgcacacc tttccagccg tgctgcagag cagcggcctg	540
tacagcctga gcagcgtggt gaccgtgcct agcagcagcc tgggcaccca gacctacatc	600
tgcaacgtga accacaagcc cagcaacacc aaggtggaca agagagtgga gcccaagagc	660
tgcgataagt gCGtgagtg ccccccttgt cctgccccctg agctgctggg cggaccCagc	720
gtgttcctgt tccccccaa gcccaaggac accctgatga tcagcagaac ccccgaggtg	780
acctgtgtgg tggTggacgt gtcccacgag gaccCagag tgaagtcaa ctggtacgtg	840
gacggcgtgg aggtgcacaa cgcCaagacc aagcccagag aggagcagta caacagcacc	900
tacagggTgg tgtccgtgct gaccgtgctg caccaggaCt ggctgaacgg caaggagtac	960
aagtgtAagG tgtccaacaa ggcCctgcca gccccaatcg aaaagaccat cagcaaggcc	1020
aagggccagc caagagagcc ccaggtgtac accctgccac ccagcagggA ggagatgacc	1080
aagaaccagg tgtccctgac ctgtctggtg aagggcttct acccaagcga catcgccgtg	1140
gagTgggaga gcaacggcca gcccgagaac aactacaaga ccaccccccc agtgctggac	1200
agcGacggca gcttcttCct gtacagcaag ctgaccgtgg acaagagcag atggcagcag	1260
ggcaacgtgt tcagctgctc cgtgatgcac gaggccctgc acaaccacta caccCagaag	1320
agcctgagcc tgtccccagg caagtga	1347

REIVINDICACIONES

5 1. Anticuerpo monoclonal, o fragmento funcional divalente del mismo que contiene por lo menos sus 6 CDR y su región bisagra, que puede inhibir la dimerización de c-Met, comprendiendo dicho anticuerpo una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos SEC ID nº 37 y una cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos SEC ID nº 40,

10 para su utilización para la prevención o el tratamiento de un cáncer caracterizado por que presenta la sobreexpresión de c-Met que resulta de la amplificación génica de c-Met, y
en el que dicho cáncer es seleccionado de entre el grupo que consiste en carcinoma de células renales y cáncer gástrico.

15 2. Composición que comprende como principio activo un compuesto que consiste en un anticuerpo monoclonal, o un fragmento funcional divalente del mismo que contiene por lo menos sus 6 CDR y su región bisagra, que puede inhibir la dimerización de c-Met, comprendiendo dicho anticuerpo una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos SEC ID nº 37 y una cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos SEC ID nº 40,

20 para su utilización para la prevención o el tratamiento de un cáncer caracterizado por que presenta una sobreexpresión de c-Met que resulta de la amplificación génica de c-Met, y
en la que dicho cáncer es seleccionado de entre el grupo que consiste en carcinoma de células renales y cáncer gástrico.

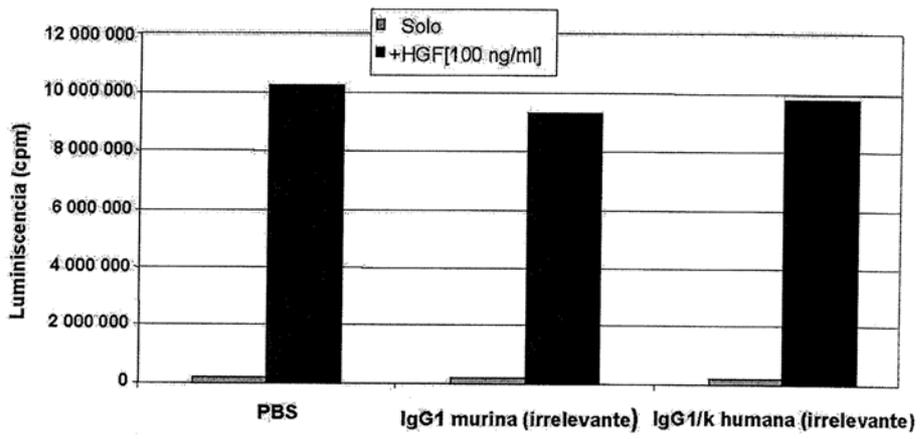


FIG. 1

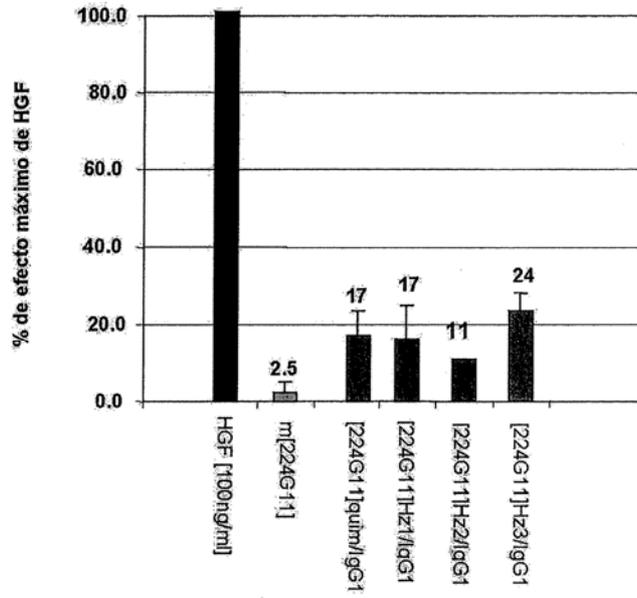


FIG. 2A

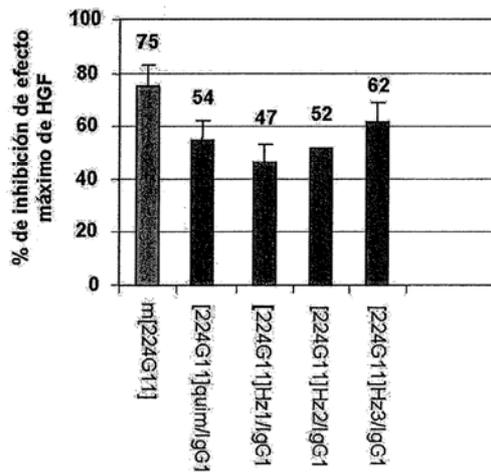


FIG. 2B

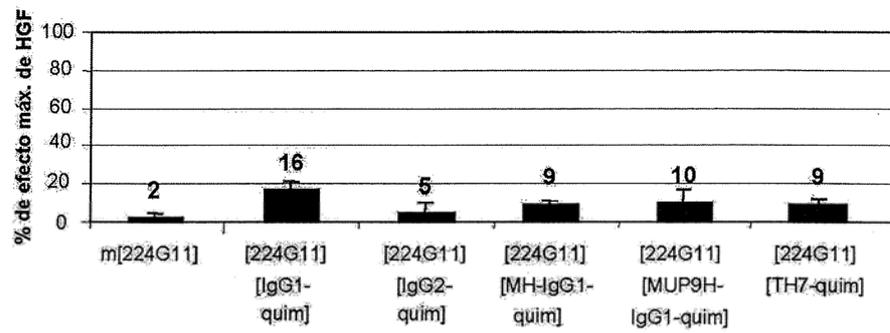


FIG. 3A

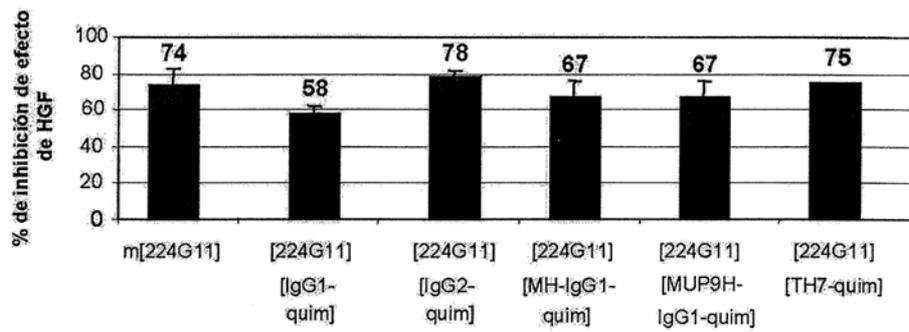


FIG. 3B

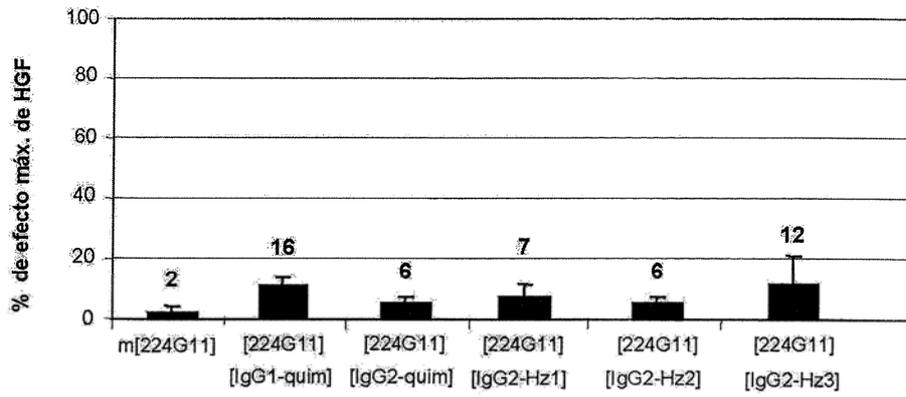


FIG. 4A

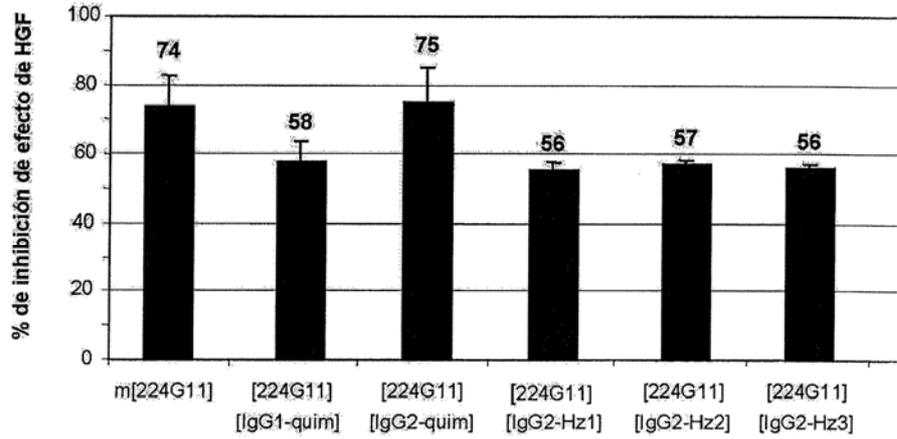


FIG. 4B

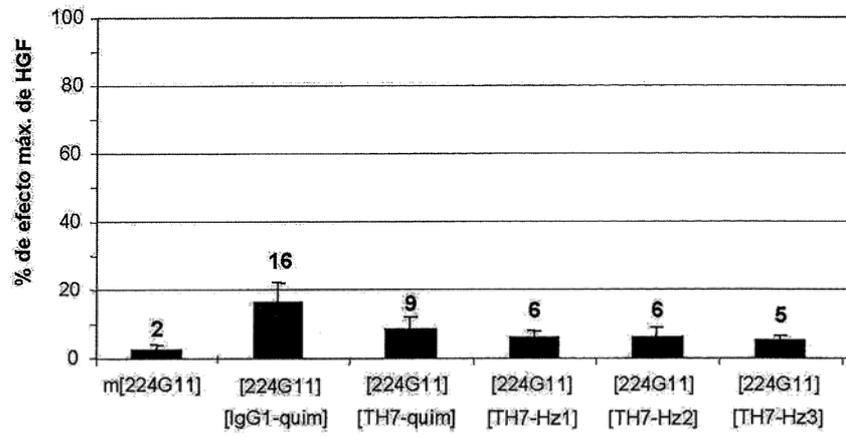


FIG. 5A

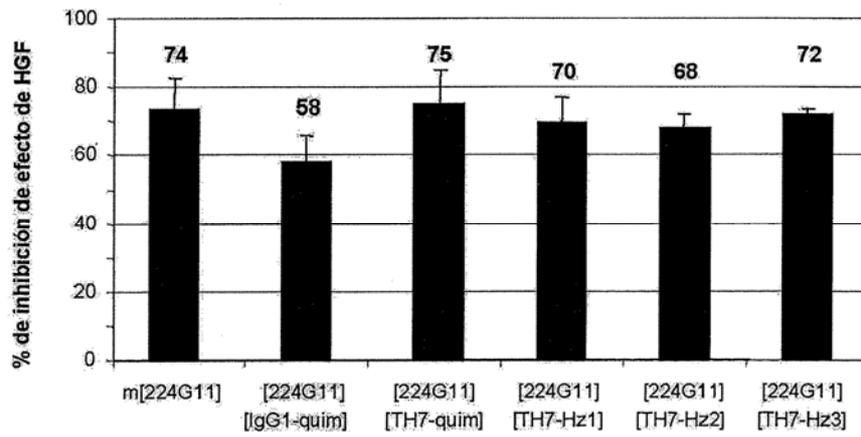


FIG. 5B

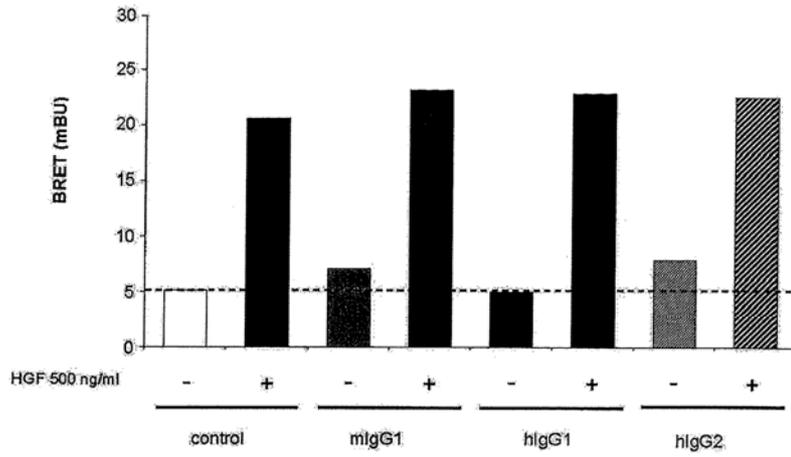


FIG. 6A

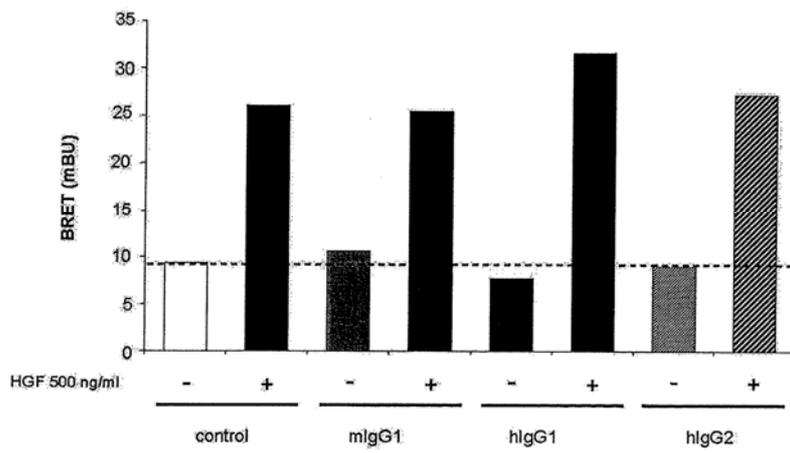


FIG. 6B

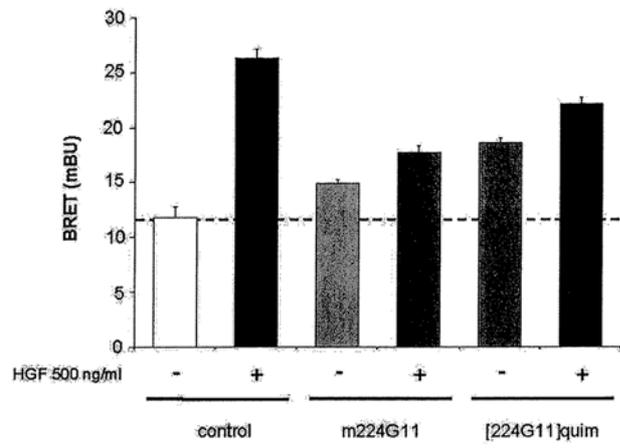


FIG. 7A

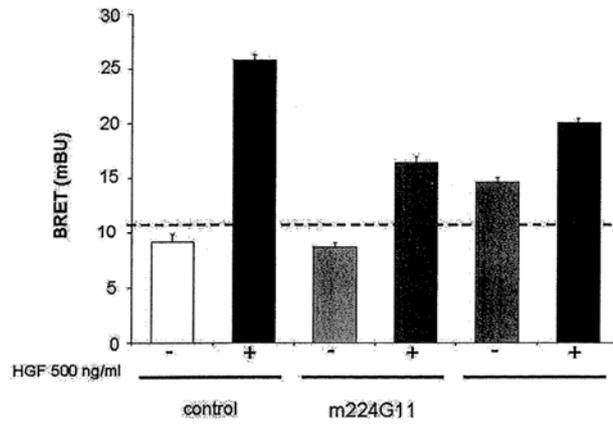


FIG. 7B

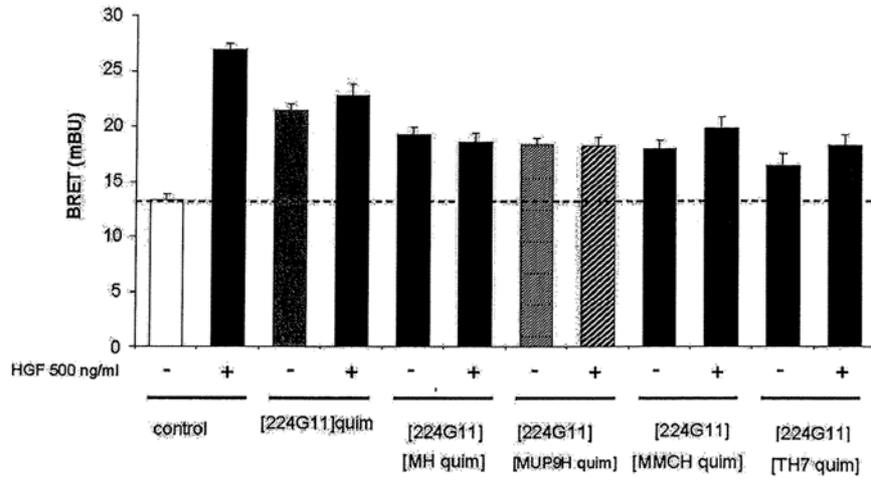


FIG. 8A

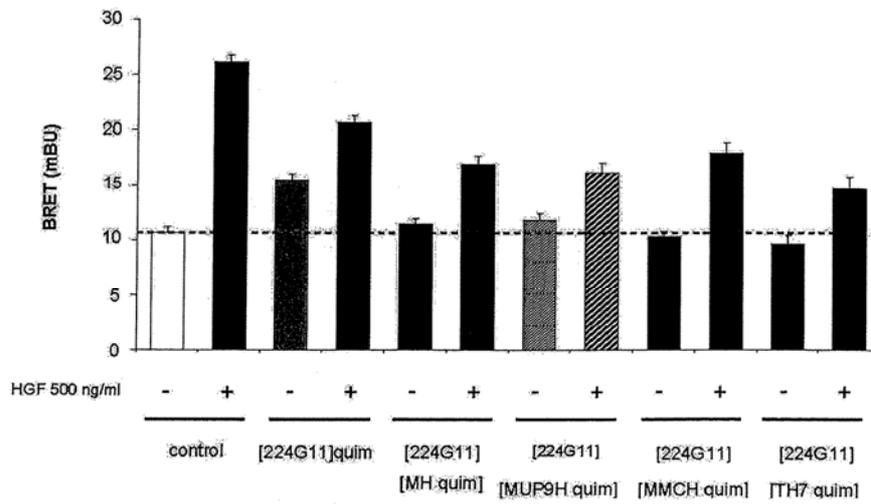


FIG. 8B

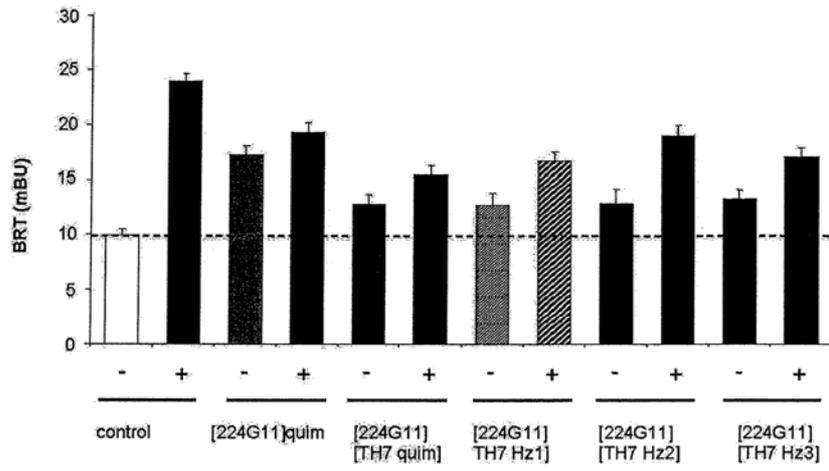


FIG. 9A

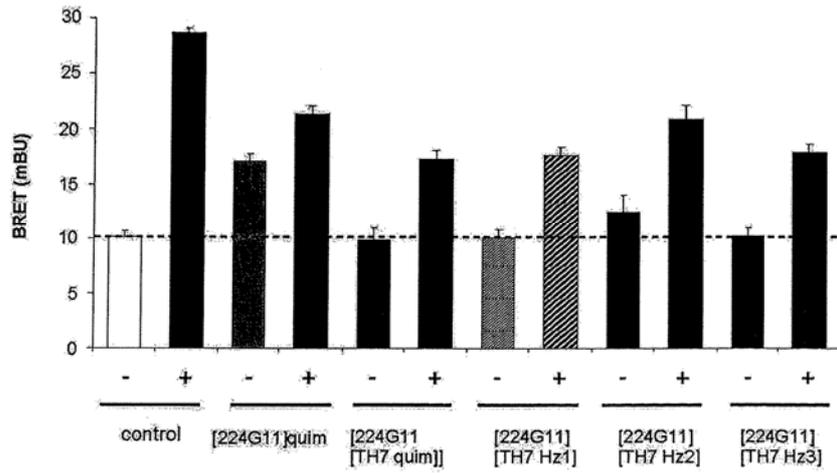


FIG. 9B

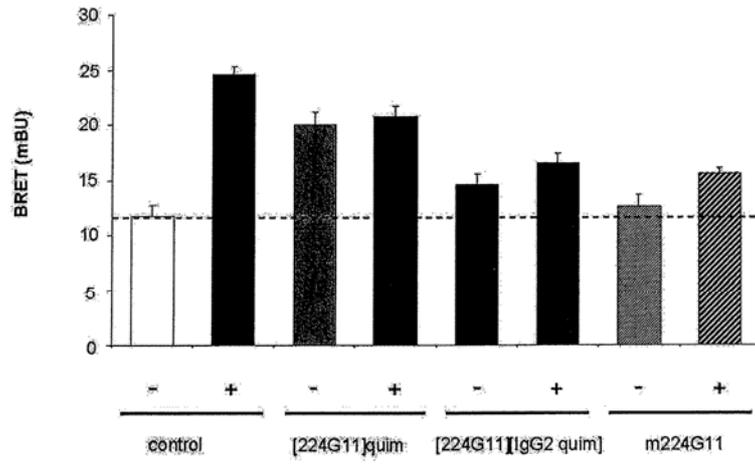


FIG. 10A

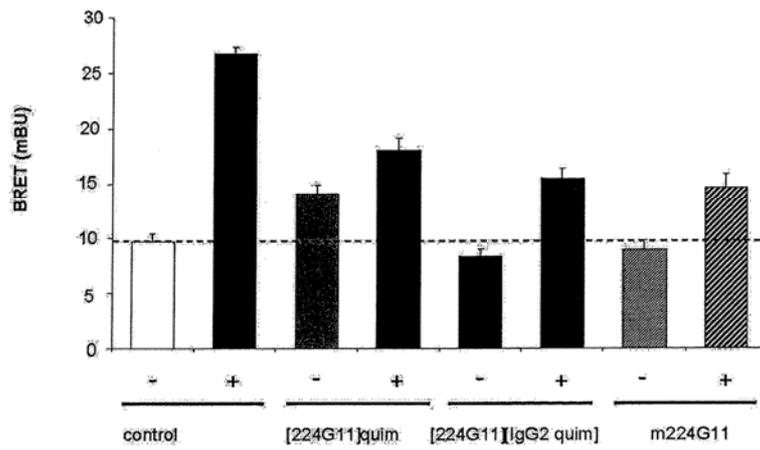


FIG. 10B

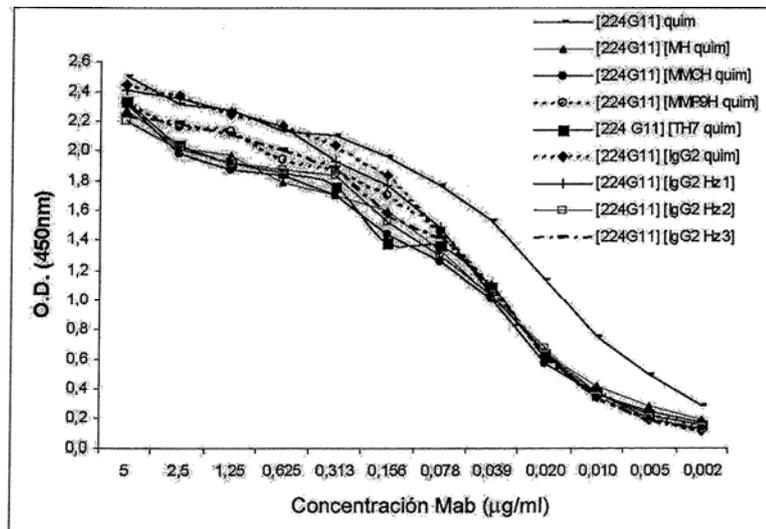
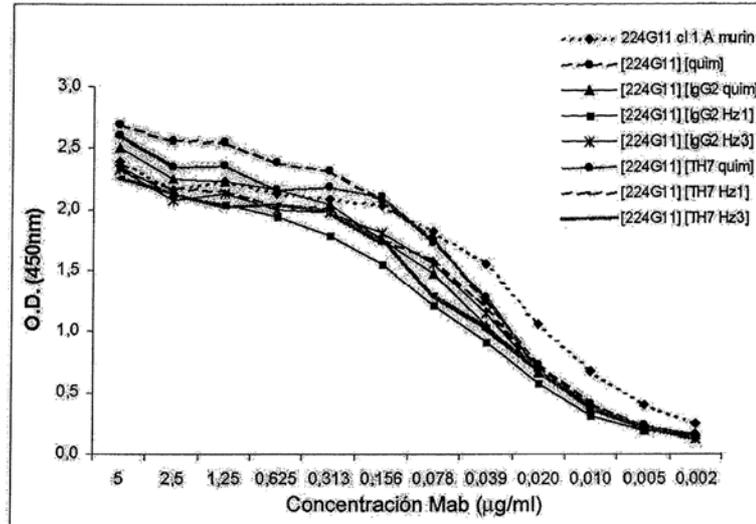


FIG. 11

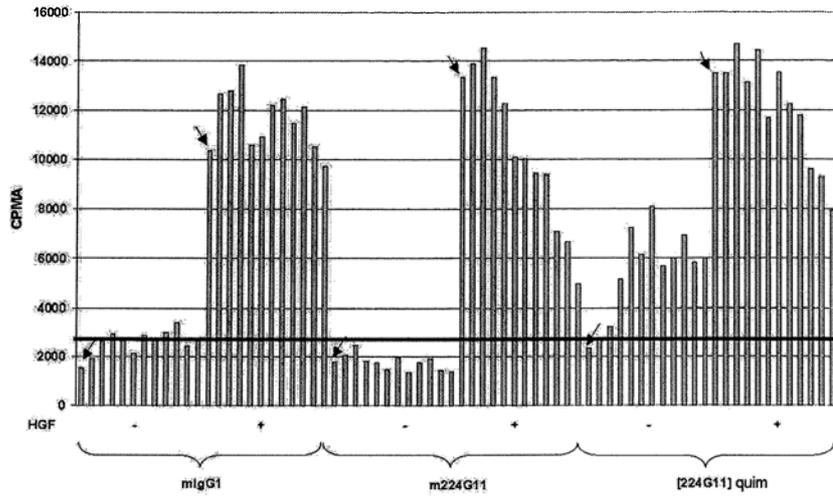


FIG. 12

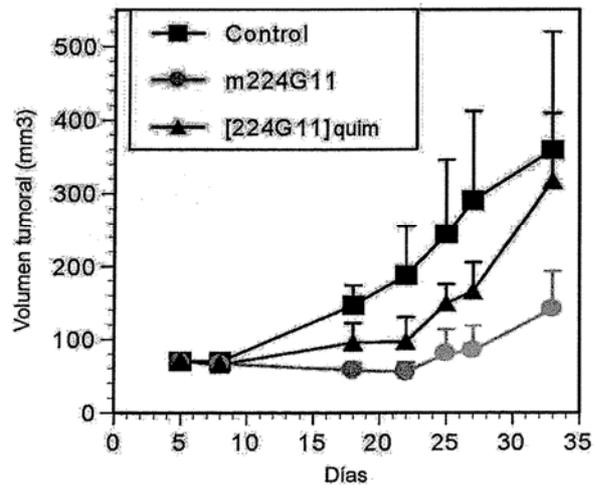


FIG. 13

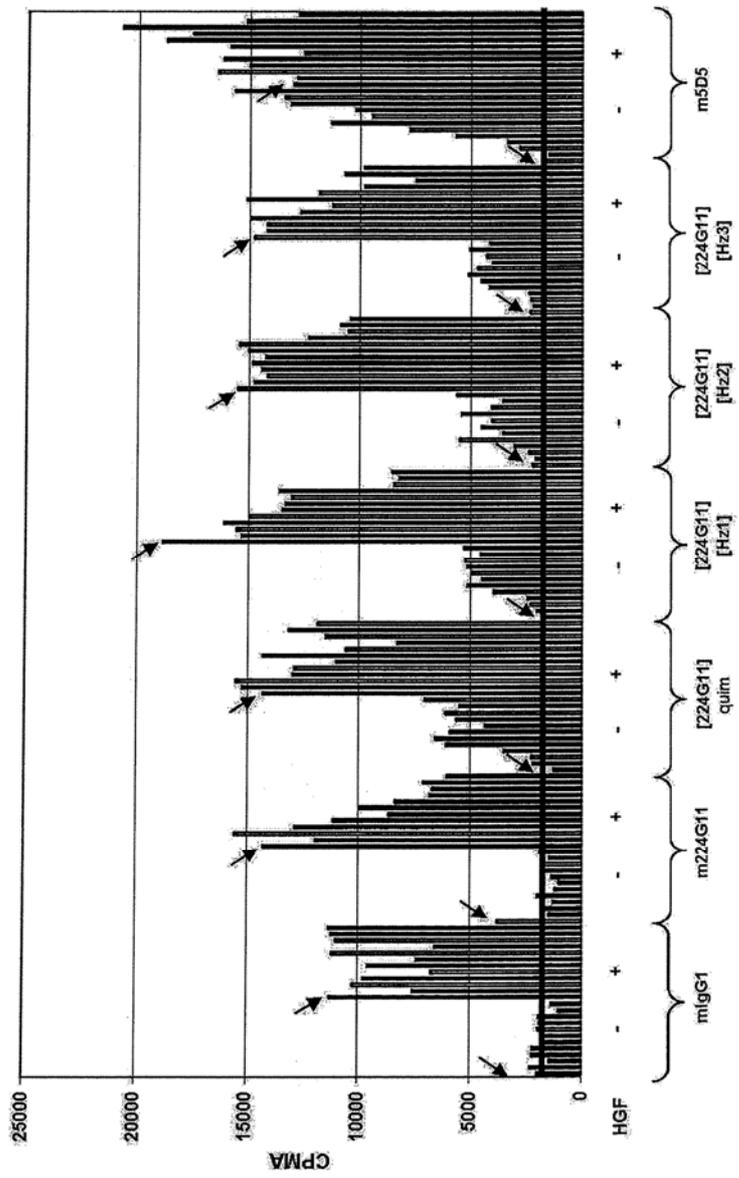


FIG. 14A

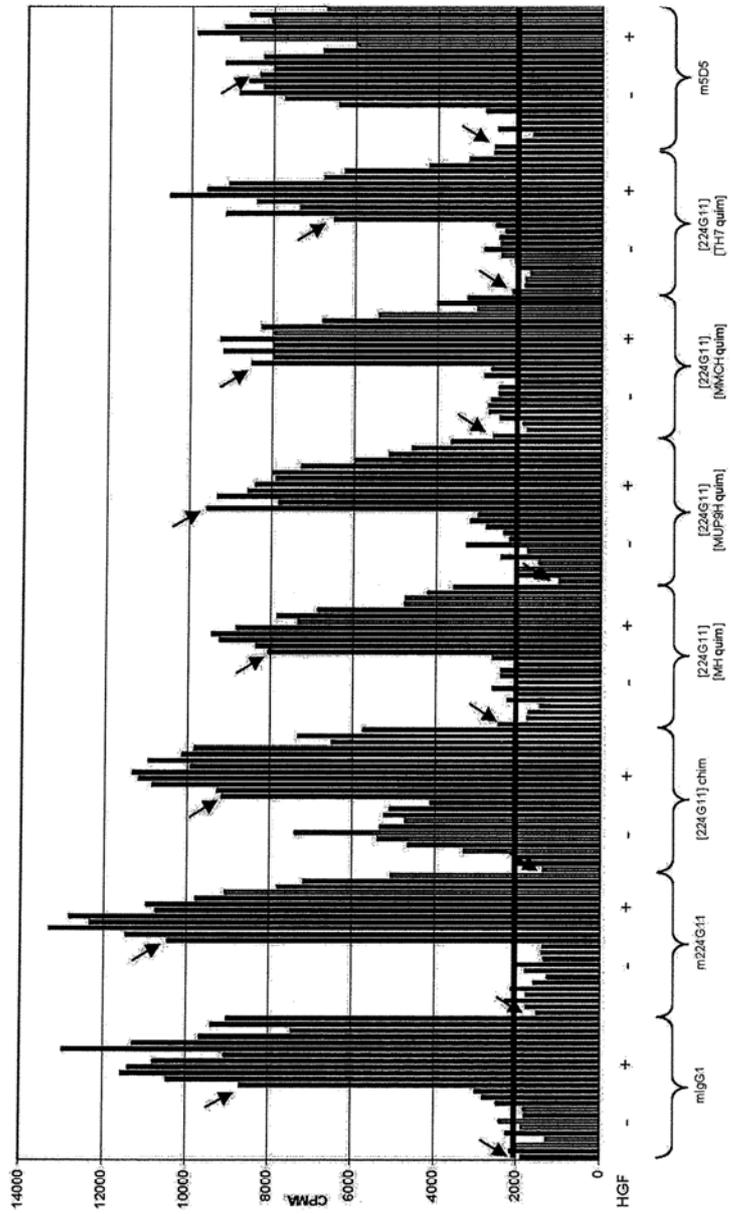


FIG. 14B

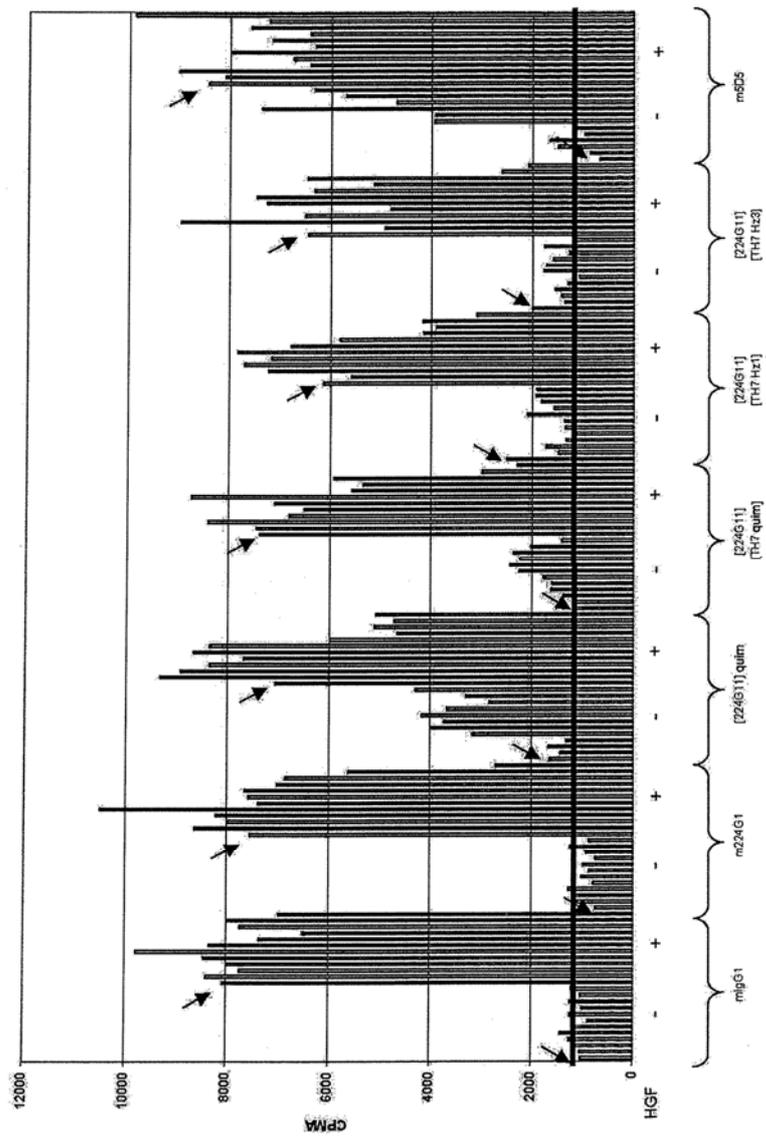


FIG. 15

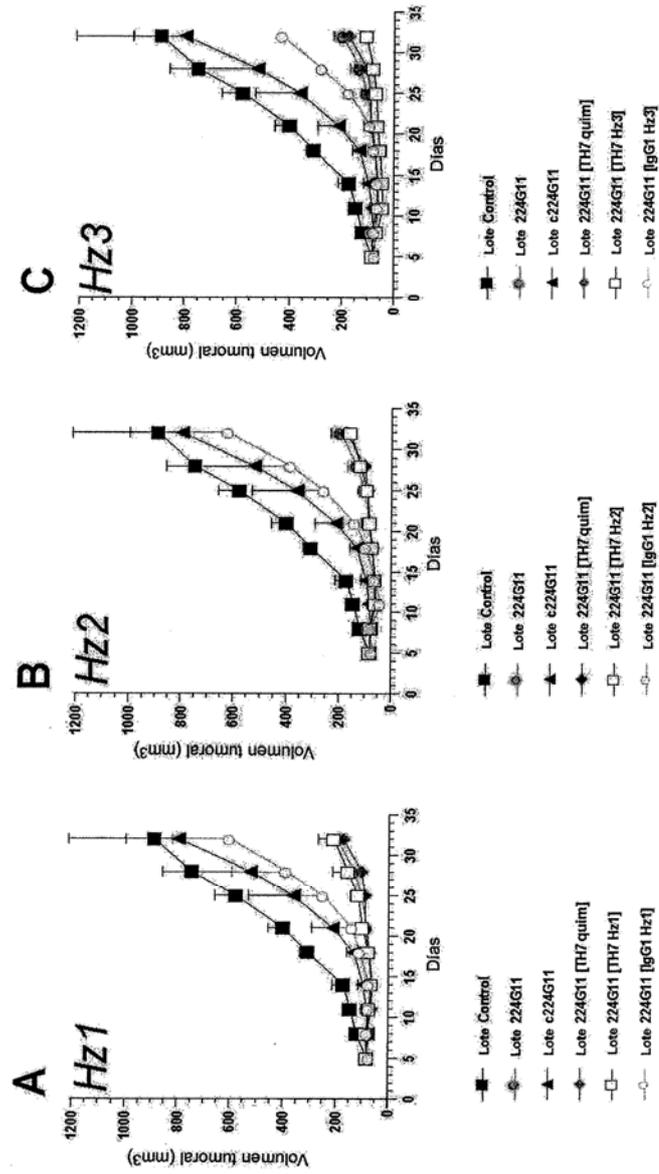


FIG. 16

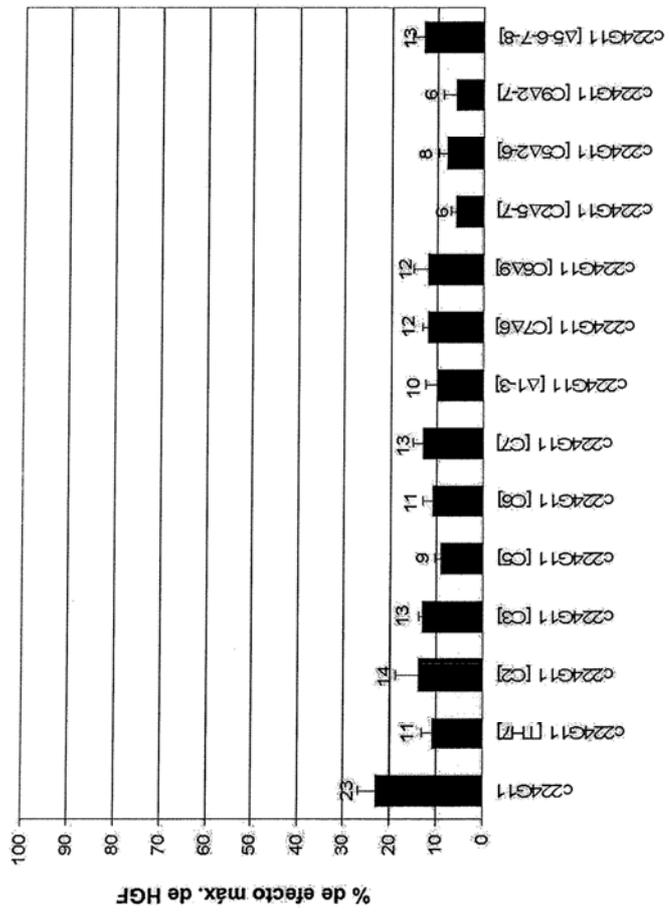


FIG. 17A

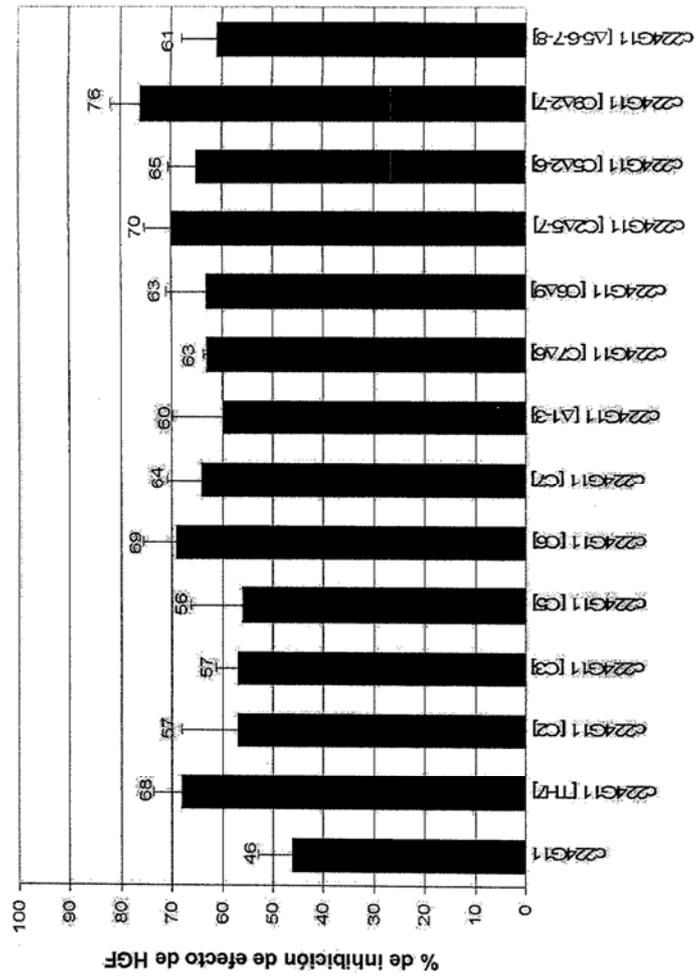


FIG. 17B

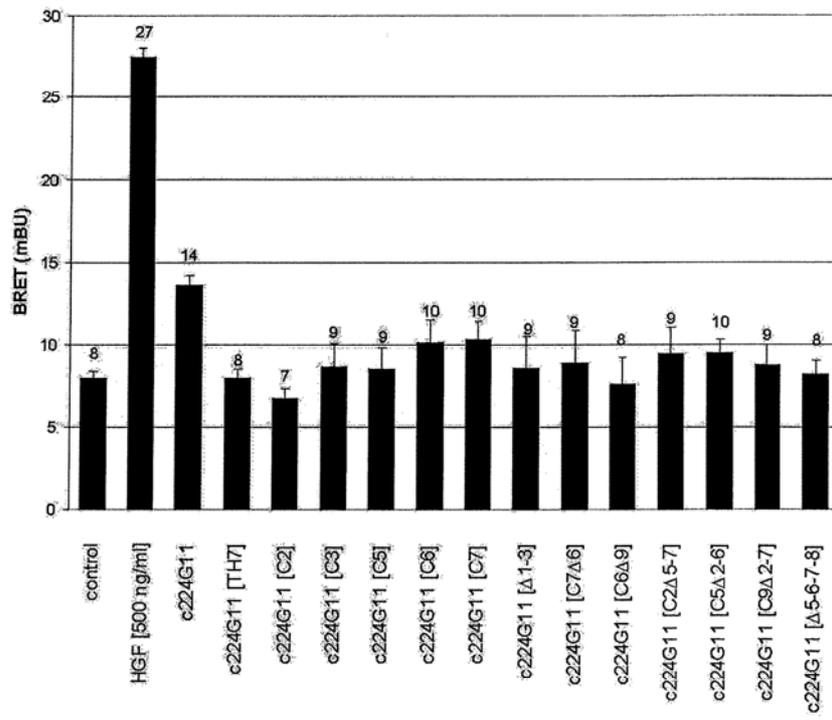
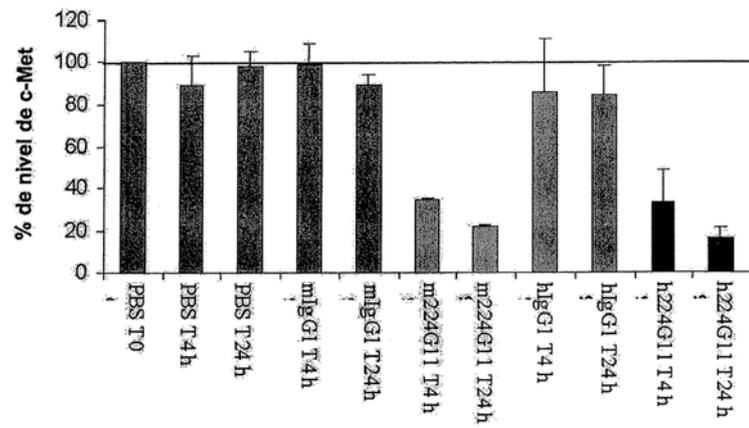


FIG. 18

A



B

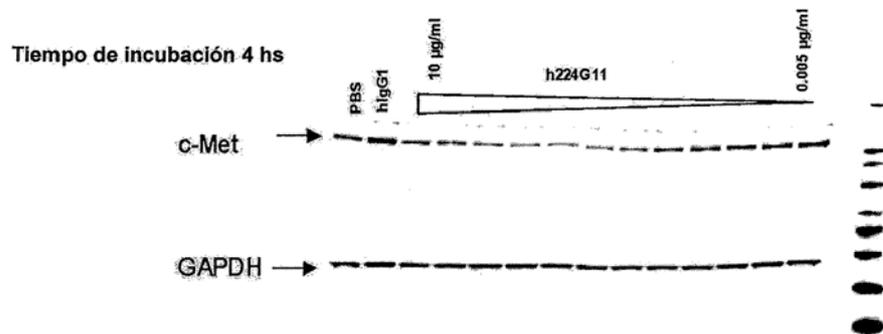


FIG. 19

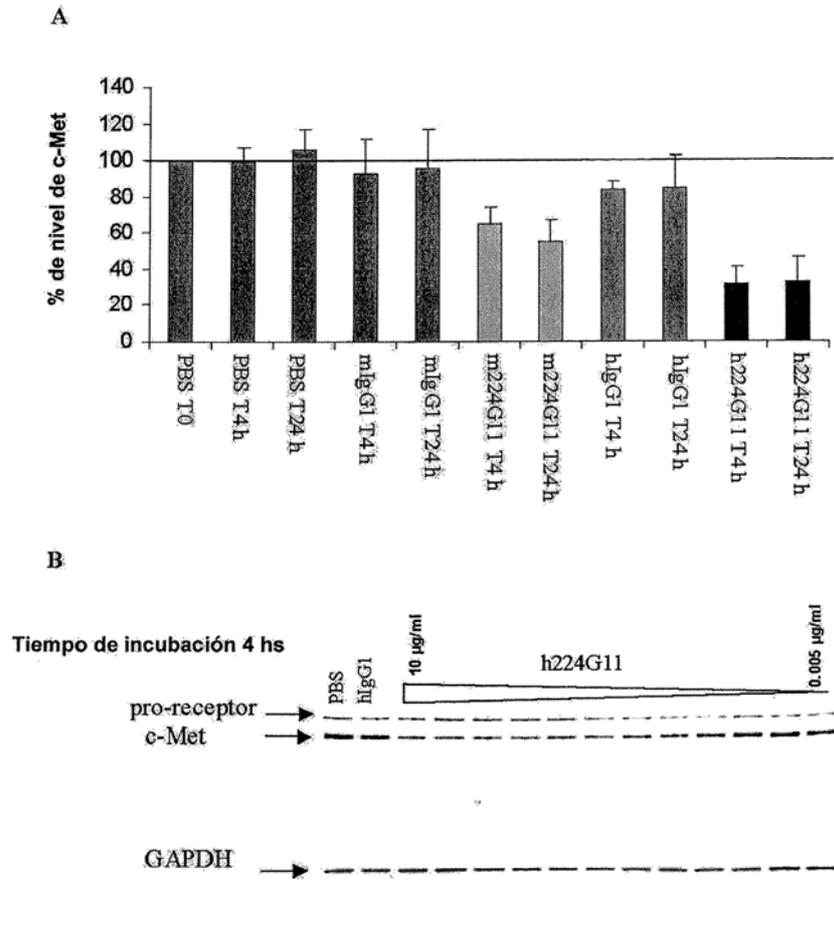


FIG. 20

ELISA

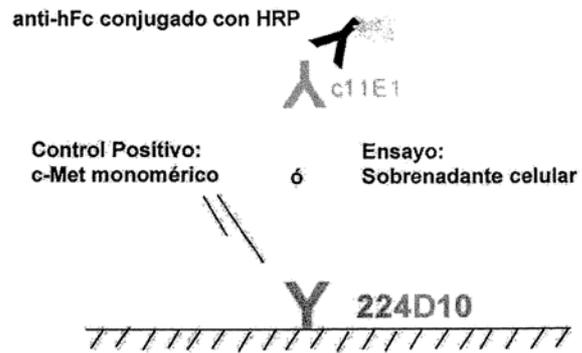


FIG. 21

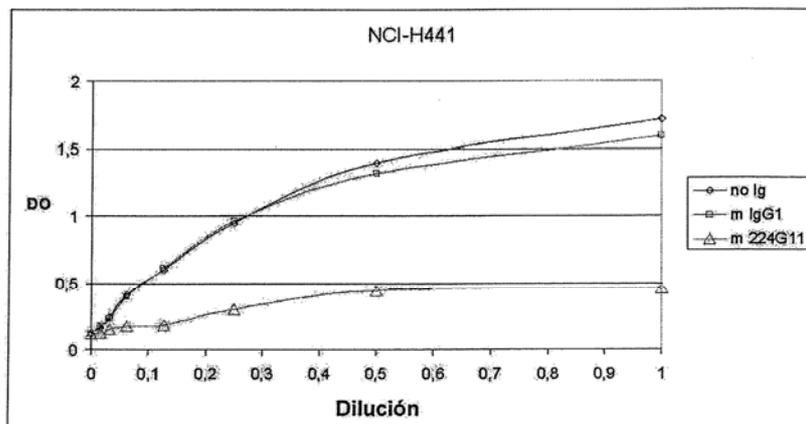


FIG. 22

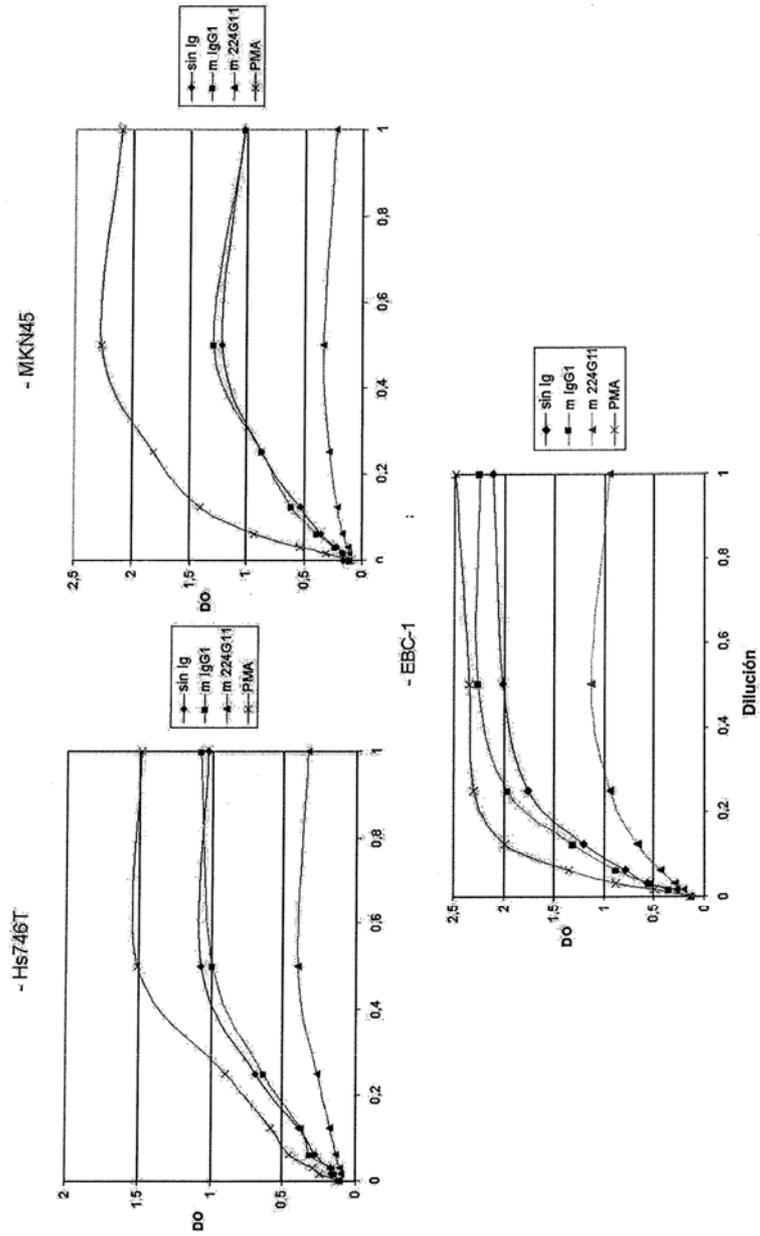


FIG. 23

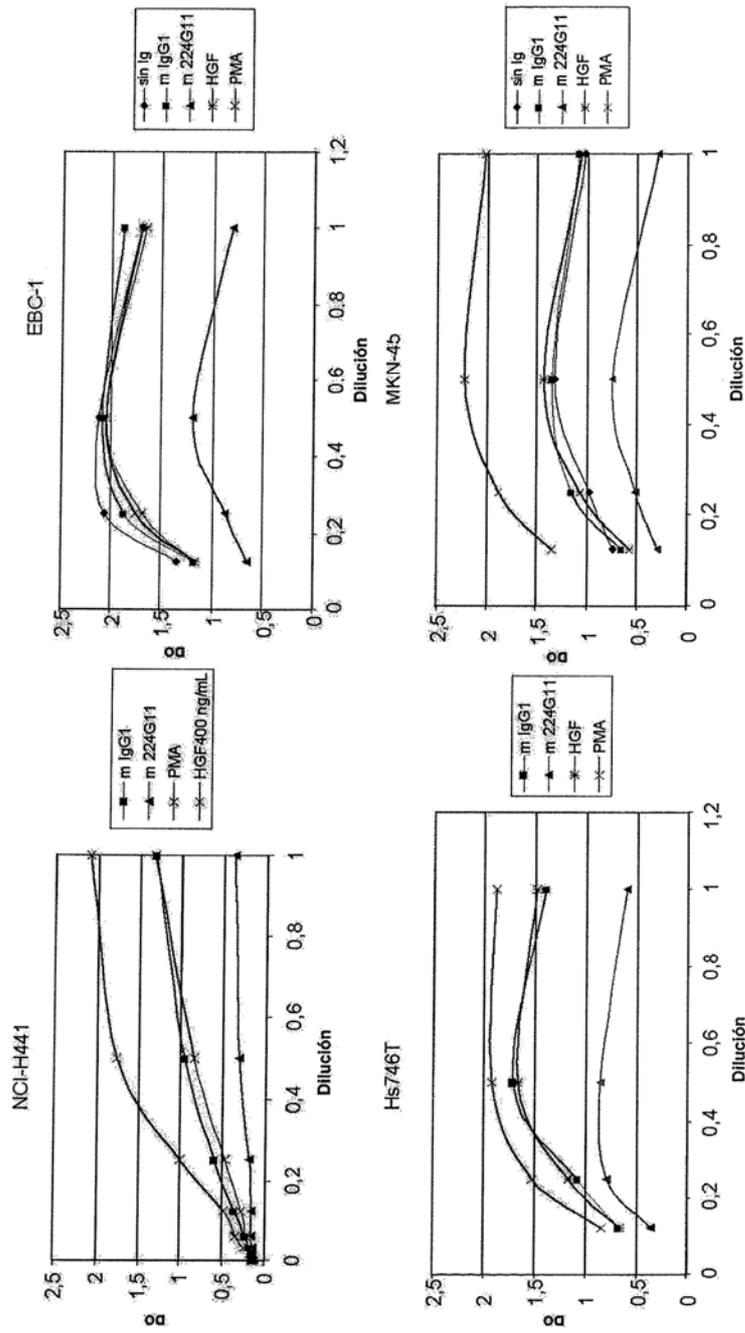


FIG. 24

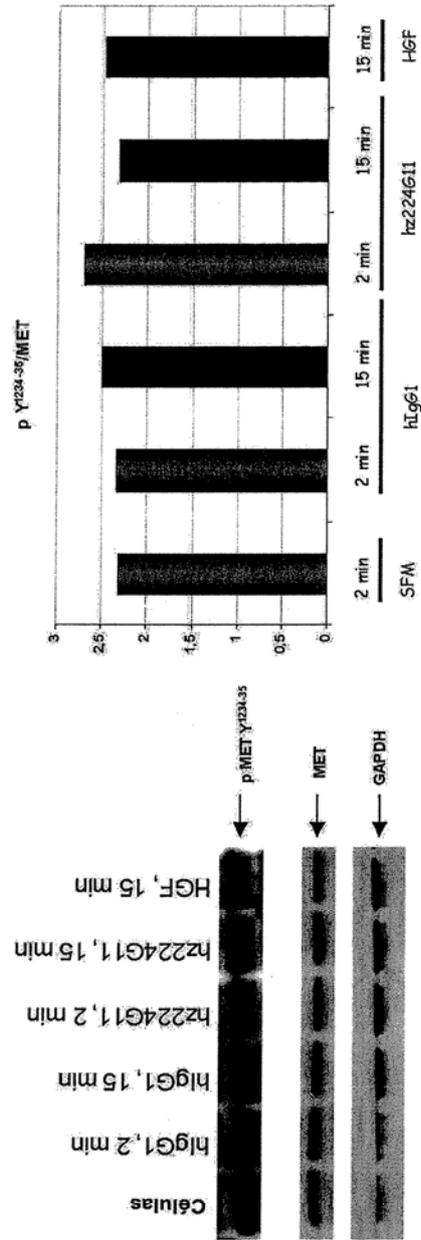


FIG. 25

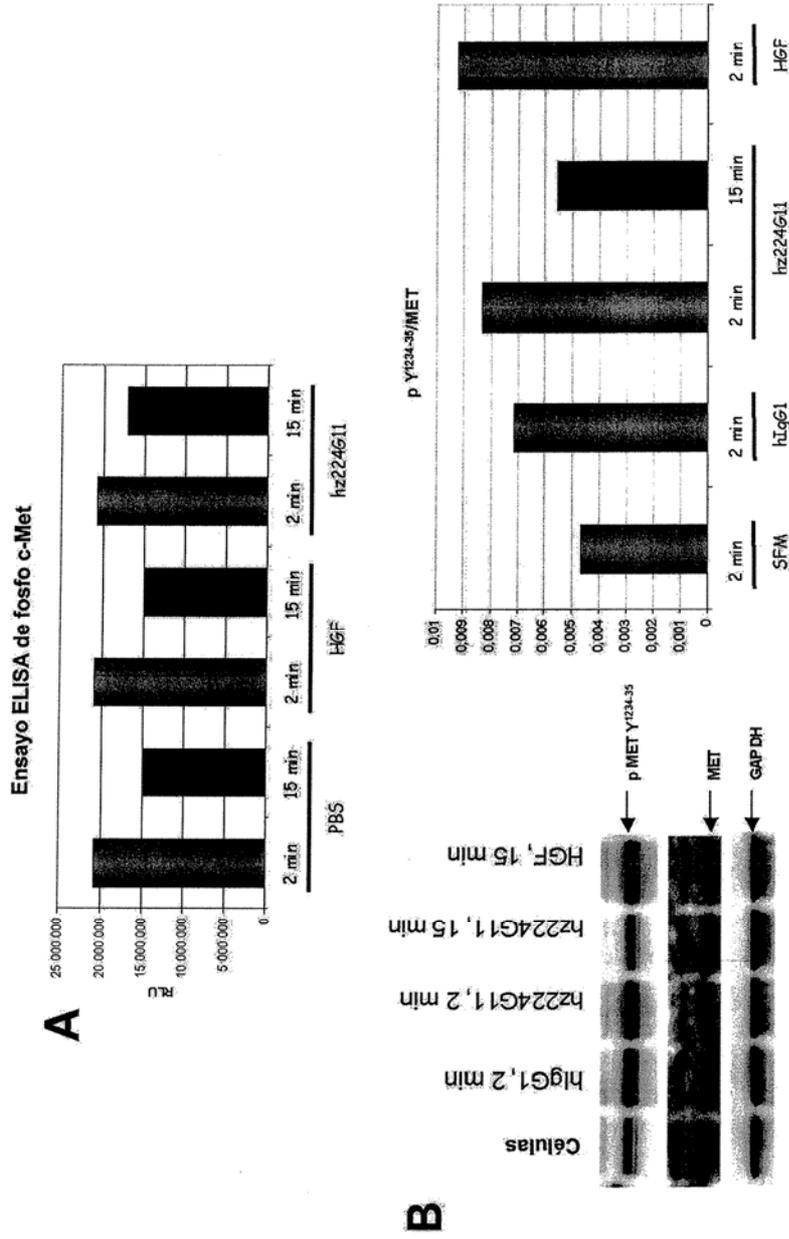


FIG. 26

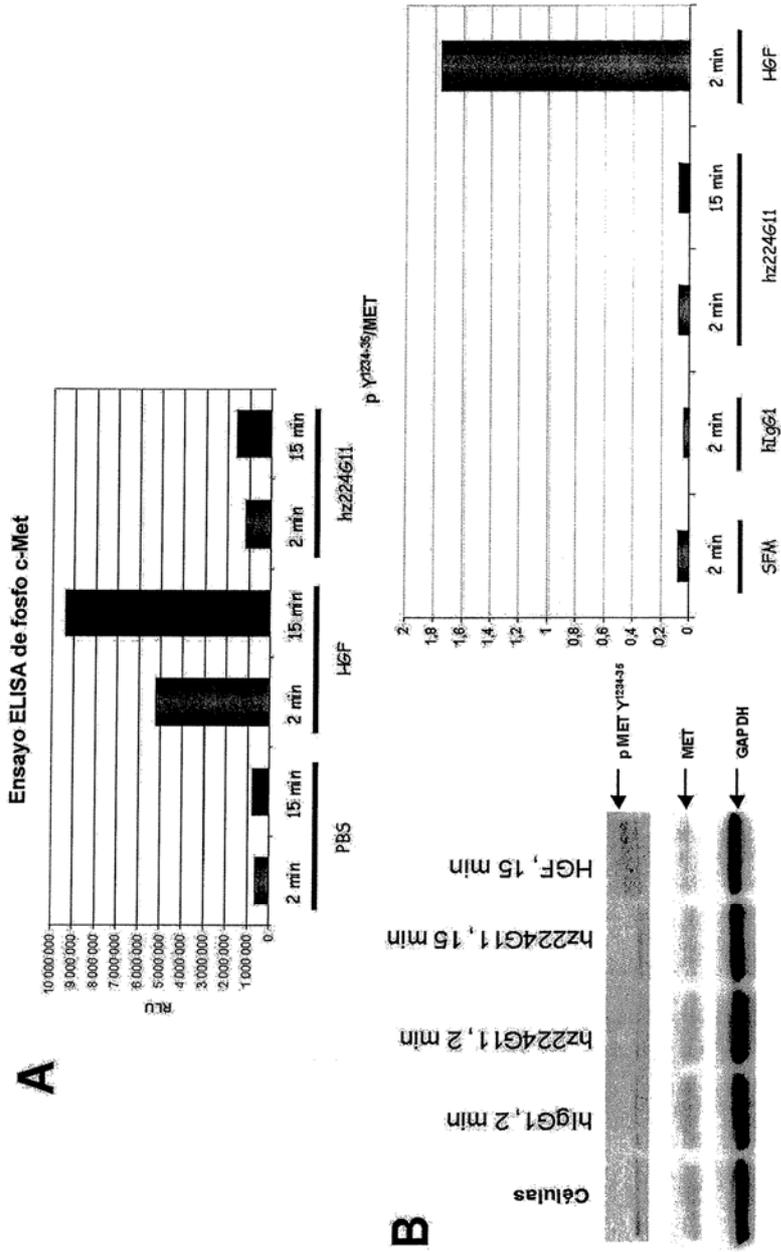


FIG. 28

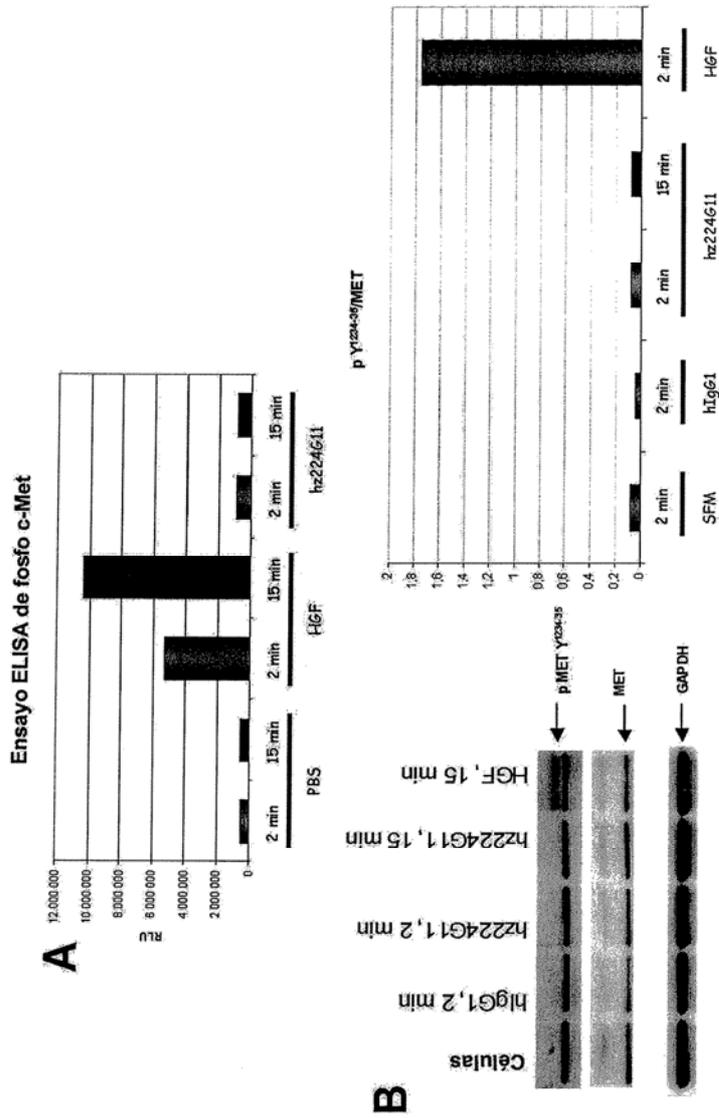


FIG. 29

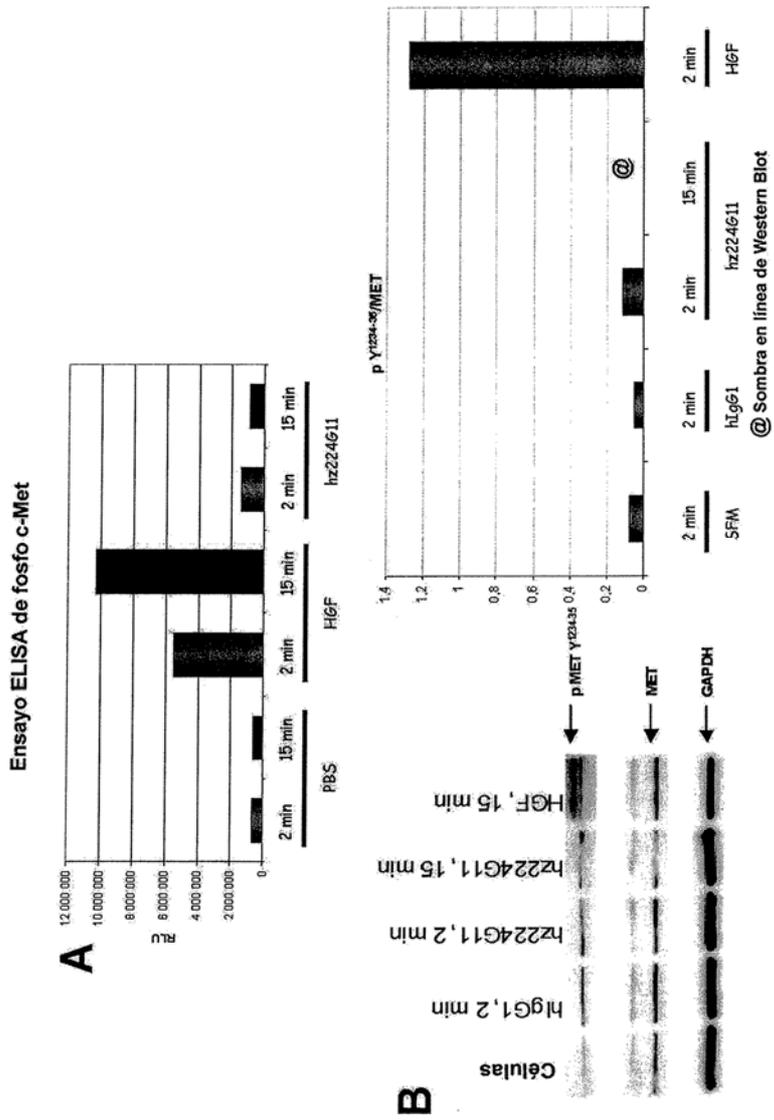
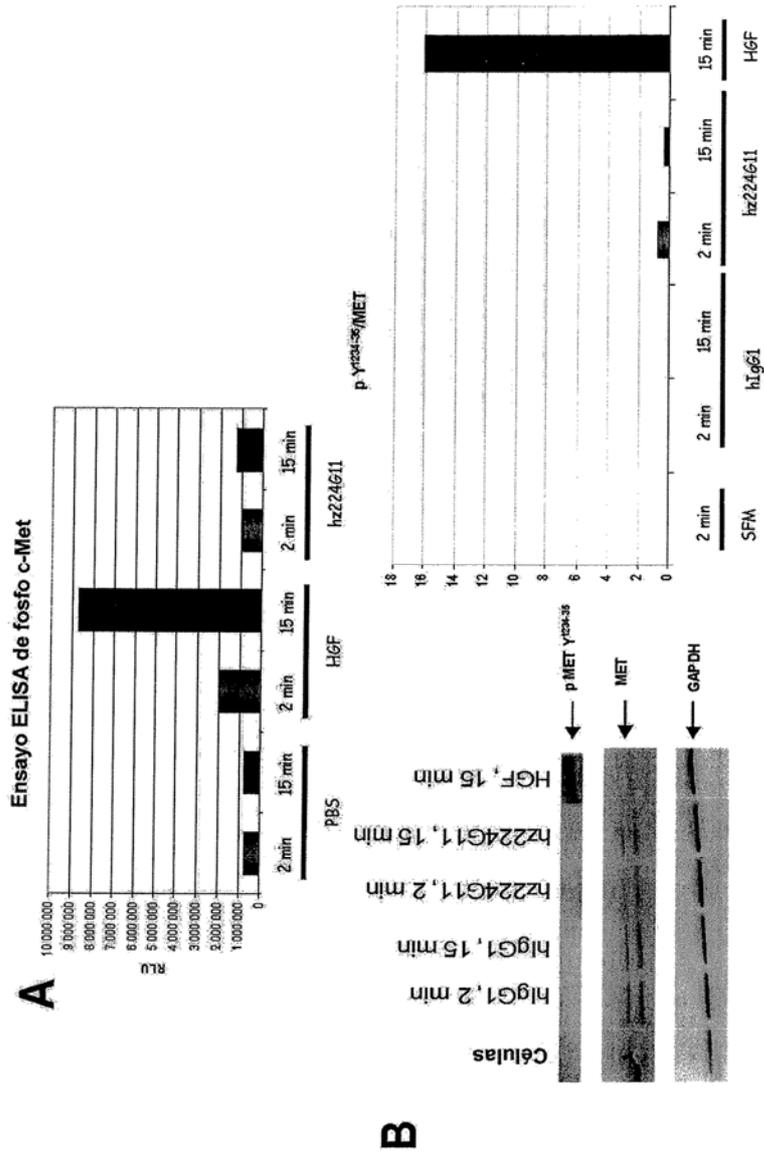


FIG. 30



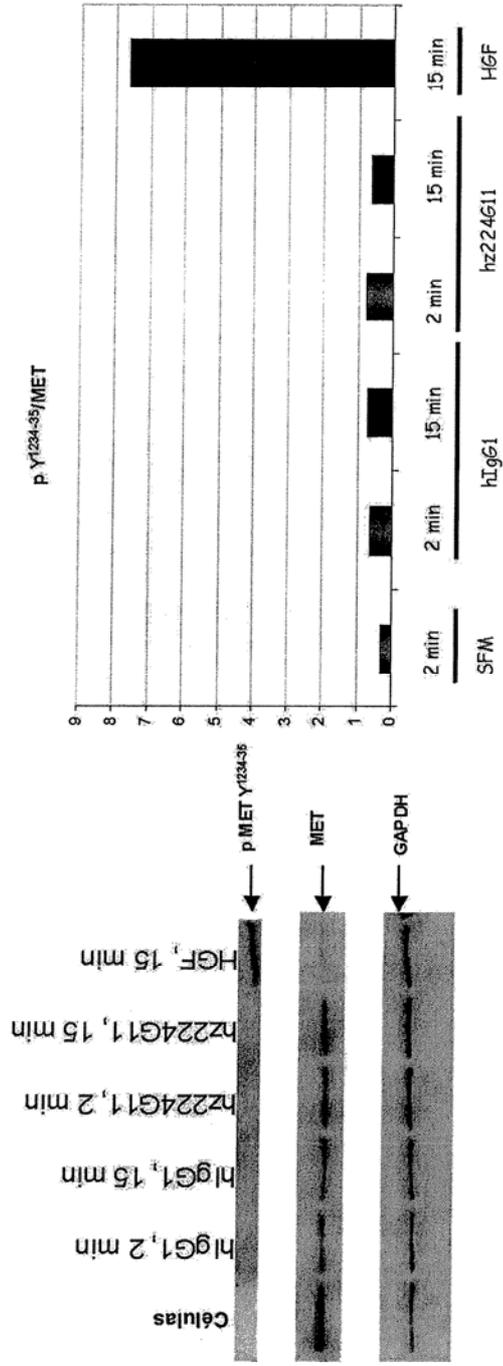


FIG. 32

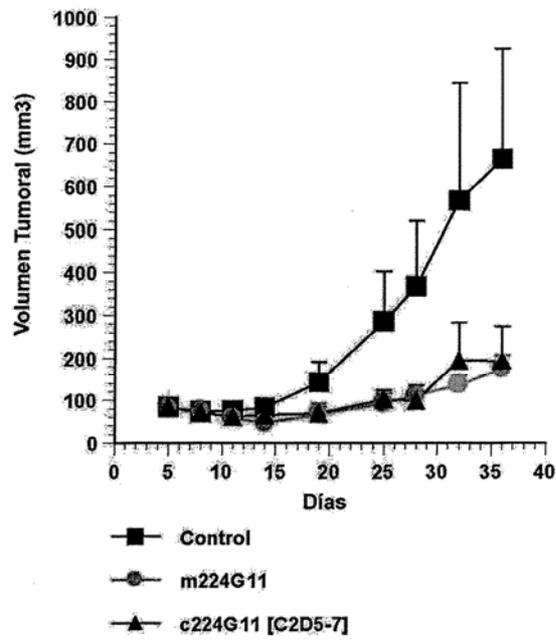


FIG. 33

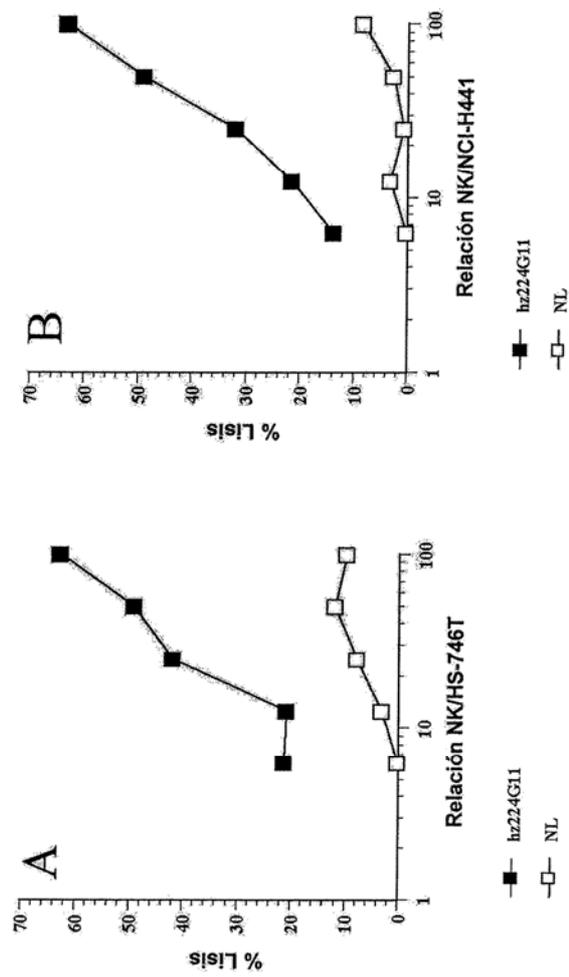


FIG. 34

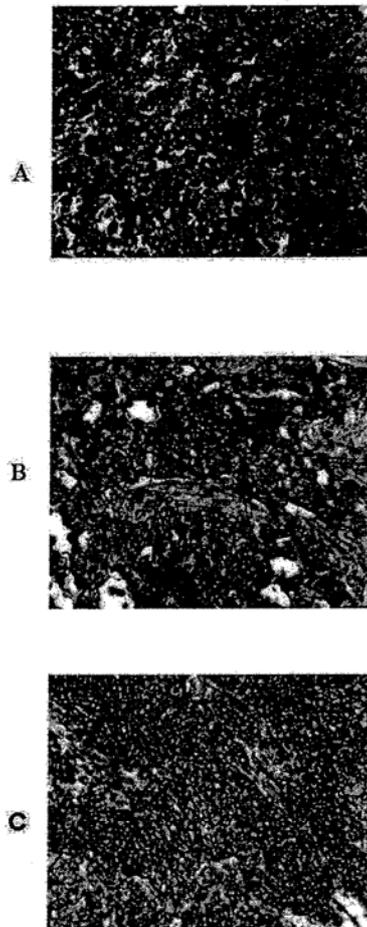


FIG. 35

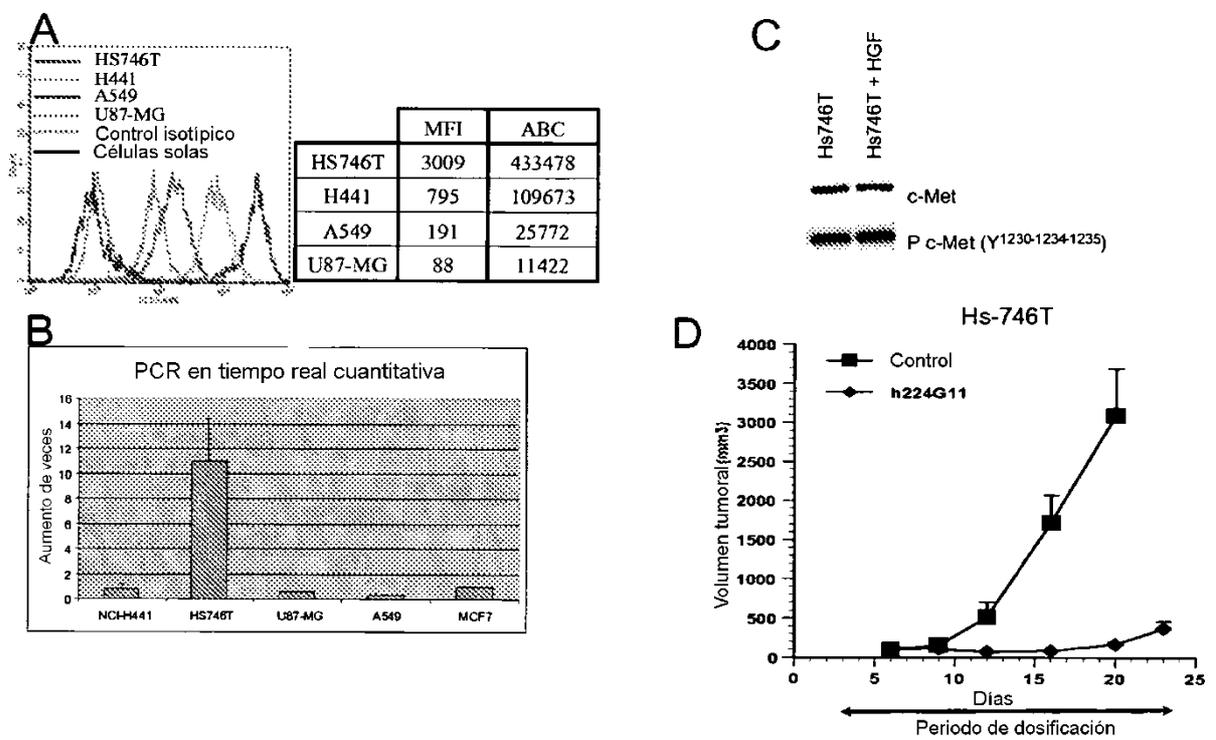


Figura 36

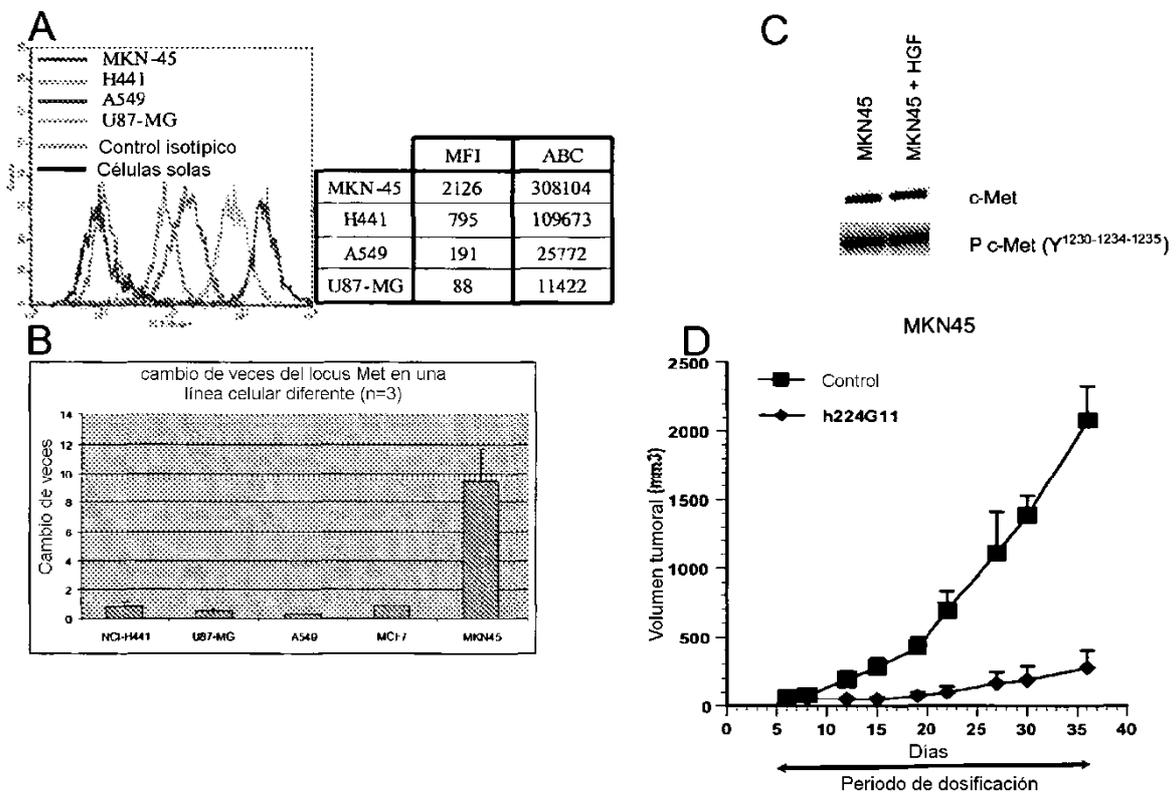


Figura 37

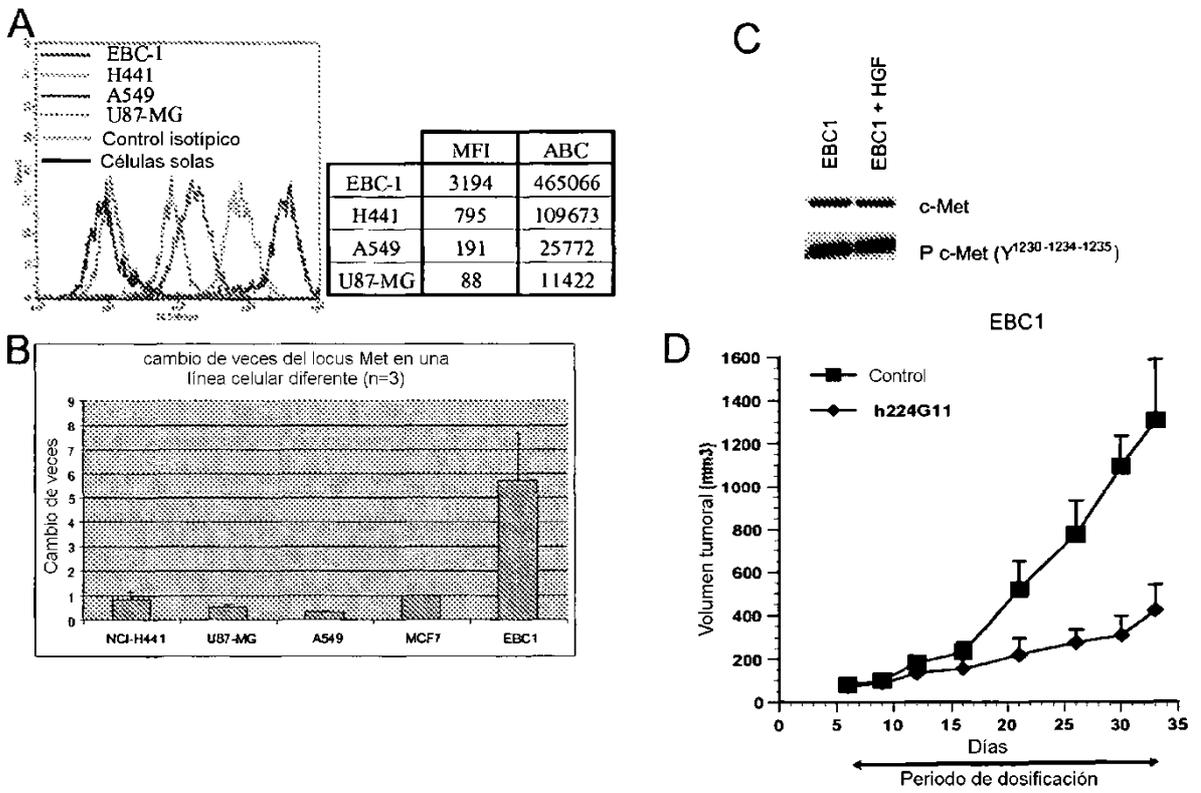


Figura 38

Figura 39

