

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 668 895**

51 Int. Cl.:

C07K 16/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **15.03.2012 PCT/US2012/029271**

87 Fecha y número de publicación internacional: **20.09.2012 WO12125850**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **15.03.2012 E 12711513 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **25.04.2018 EP 2686345**

54 Título: **Variantes de Fc**

30 Prioridad:

16.03.2011 US 201161453433 P

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

23.05.2018

73 Titular/es:

**AMGEN INC. (100.0%)
One Amgen Center Drive
Thousand Oaks, CA 91320-1799, US**

72 Inventor/es:

**LIU, ZHI;
KANNAN, GUNASEKARAN y
YAN, WEI**

74 Agente/Representante:

TEMIÑO CENICEROS, Ignacio

ES 2 668 895 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

Variantes de Fc

5 **Campo**

La invención se refiere a polipéptidos que comprenden regiones Fc variantes que son heterodiméricas y contienen sustituciones de aminoácidos. La invención además se refiere a métodos de producción y uso de tales polipéptidos.

10 **Antecedentes**

Los anticuerpos monoclonales terapéuticos se han usado con éxito en diversas indicaciones oncológicas. Véase, por ejemplo, Reichert y col. (2007), *Nature Rev. Drug Discovery* 6:349-356.

15 La eficacia puede ser dependiente de funciones efectoras del anticuerpo, tales como citotoxicidad dependiente de complemento (CDC), citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo (ADCC), y/o fagocitosis mediada por célula dependiente de anticuerpo (ADCP) o de la formación inducida por anticuerpo de complejos del antígeno sobre la superficie celular tumoral, la cual, puede, en algunos casos, inducir apoptosis. Véase, por ejemplo, Deans y col. (2002), *Immunology* 107:176-182. La actividad antitumoral de algunos anticuerpos es dependiente de las interacciones entre el anticuerpo terapéutico y los receptores Fc gama (FcγR) de Haij y col. (2010), *Cancer Res.* 70(8):3.209-3.217. Hay un número de diferentes FcγR, algunos de los cuales median los sucesos de señalización intracelular que conducen a la activación celular, lo cual conduce a la citotoxicidad, liberación de citoquina y fagocitosis/endocitosis seguido de presentación de antígeno. Otros FcγR median tales actividades a través de las proteínas accesoria.

25 El documento US 2004/132101 describe variantes de Fc en las que las modificaciones de aminoácidos se pueden realizar para generar variantes de Fc optimizadas, por ejemplo, respecto a la unión a FcγRIIIA.

30 El documento WO 2004/063351 describe polipéptidos, más particularmente inmunoglobulinas (por ejemplo, anticuerpos), que comprenden una región Fc variante, en los que la región Fc variante comprende al menos una modificación de aminoácidos relativa a una región Fc tipo silvestre, dicha región Fc variante se une a FcγRIIIA y/o FcγRIIA con una mayor afinidad, en relación con una molécula comparable que comprende la región Fc tipo silvestre.

35 El documento WO 2006/104989 también describe regiones Fc de anticuerpo alteradas que contienen una o más sustituciones de aminoácidos y tienen una o más propiedades que difieren de una correspondiente región Fc no alterada tal como la unión incrementada a uno o más receptores Fc.

40 Hay una necesidad en la técnica de anticuerpos que puedan suscitar más eficazmente funciones efectoras incluyendo ADCC, CDC y/o ADCP.

Compendio

45 En el presente documento se describe una proteína que contiene Fc que contiene una región Fc heterodimérica alterada que puede tener función efectora aumentada en comparación con una proteína similar que tiene una región Fc no alterada. En alguna realización, la invención proporciona una proteína que contiene Fc que comprende una región Fc de IgG1 o IgG3 humana heterodimérica y una región de unión, en la que la región Fc comprende una cadena A y una cadena B, las cuales cada una comprende de 1 a 10 sustituciones de aminoácidos relativas a una cadena polipeptídica de Fc humana tipo silvestre, seleccionadas de las siguientes, las cuales se numeran según el sistema de UE: E233L, L234I, L234Y, L235S, G236Y, S239D, S239E, S239N, S239T, F243M, F243L, F243V, F243I, K246W, K246E, K246S, K246V, K248Y, K248L, M252D, I253V, I253K, R255S, R255N, T256V, T256Q, E258S, E258V, H268E, H268K, A287F, K288T, K288I, K290G, K290F, K290S, K290W, K290Q, K290Y, E294L, Y296W, Y296L, S298A, S298C, S298T, V302Q, T307P, T307S, T307E, T307G, L309C, L309S, L309K, L309E, Q311M, N315A, N315S, A330H, A330F, A330M, I332E, K334L, K334V, K334A, K334M y A339T, en las que al menos uno de estos sitios de sustitución de aminoácidos difiere entre las cadenas A y B, en la que la proteína que contiene Fc se une a FcγRIIIA-158F y/o FcγRIIIA-158V humano con una K_D de menos de o igual a una quinta parte de la K_D con la cual se une una segunda proteína a FcγRIIIA-158F y/o FcγRIIIA-158V humano, y en la que la segunda proteína es la misma que la proteína que contiene Fc excepto que contiene una región Fc de IgG1 o IgG3 humana tipo silvestre sin sustituciones.

65 En algunas realizaciones la proteína que contiene Fc puede unirse a FcγRIIIA-158V y/o FcγRIIIA-158F humano con una K_D de menos de o igual a una quinta o veintésima parte de la K_D con la cual la segunda proteína se une a FcγRIIIA-158V y/o FcγRIIIA-158F humano. La región Fc de IgG de la proteína que contiene Fc puede ser una región Fc de IgG1, y la región Fc puede estar defucosilada. En algunas realizaciones, la cadena A y la cadena B de la proteína que contiene Fc cada una comprende de 1 a 6 sustituciones de aminoácidos relativas a una cadena

polipeptídica de Fc humana tipo silvestre. Al menos una de estas sustituciones puede ser una alteración de heterodimerización. La cadena A y la cadena B cada una pueden contener al menos dos sustituciones de aminoácidos que son alteraciones de heterodimerización y pueden, por ejemplo, contener dos o tres sustituciones que son alteraciones de heterodimerización. Las alteraciones de heterodimerización pueden ser mutaciones de par de carga, tales como las sustituciones K392D y K409D en la cadena A y las sustituciones E356K y D399K en la cadena B, o viceversa. Alternativamente, las alteraciones de heterodimerización pueden ser pares de sustituciones protuberancias y agujeros.

5

10

15

20

25

30

35

40

45

En aspectos adicionales, la proteína que contiene Fc puede comprender una región Fc en la que las siguientes sustituciones están presentes: (a) la cadena A comprende las sustituciones Q311M y K334V y la cadena B comprende las sustituciones L234Y, E294L y Y296W o viceversa; (b) la cadena A comprende las sustituciones E233L, Q311M y K334V y la cadena B comprende las sustituciones L234Y, E294L y Y296W o viceversa; (c) la cadena A comprende las sustituciones L2341, Q311M y K334V y la cadena B comprende las sustituciones L234Y, E294L y Y296W o viceversa; (d) la cadena A comprende las sustituciones S298T y K334V y la cadena B comprende las sustituciones L234Y, K290Y y Y296W o viceversa; (e) la cadena A comprende las sustituciones A330M y K334V y la cadena B comprende las sustituciones L234Y, K290Y y Y296W o viceversa; (f) la cadena A comprende las sustituciones A330F y K334V y la cadena B comprende las sustituciones L234Y, K290Y y Y296W o viceversa; (g) la cadena A comprende las sustituciones Q311M, A330M y K334V y la cadena B comprende las sustituciones L234Y, E294L y Y296W o viceversa; (h) la cadena A comprende las sustituciones Q311M, A330F y K334V y la cadena B comprende las sustituciones L234Y, E294L y Y296W o viceversa; (i) la cadena A comprende las sustituciones S298T, A330M y K334V y la cadena B comprende las sustituciones L234Y, K290Y y Y296W o viceversa; (j) la cadena A comprende las sustituciones S298T, A330F y K334V y la cadena B comprende las sustituciones L234Y, K290Y y Y296W o viceversa; (k) la cadena A comprende las sustituciones S239D, A330M y K334V y la cadena B comprende las sustituciones L234Y, K290Y y Y296W o viceversa; (l) la cadena A comprende las sustituciones S239D, S298T y K334V y la cadena B comprende las sustituciones L234Y, K290Y y Y296W o viceversa; (m) la cadena A comprende una sustitución K334V y la cadena B comprende las sustituciones Y296W y S298C o viceversa; (n) la cadena A comprende una sustitución K334V y la cadena B comprende las sustituciones L234Y, Y296W y S298C o viceversa; (o) la cadena A comprende las sustituciones L235S, S239D y K334V y la cadena B comprende las sustituciones L234Y, K290Y y Y296W, o viceversa; (p) la cadena A comprende las sustituciones L235S, S239D y K334V y la cadena B comprende las sustituciones L234Y, Y296W y S298C o viceversa; (q) la cadena A comprende las sustituciones Q311M y K334V y la cadena B comprende las sustituciones L234Y, F243V y Y296W o viceversa; (r) la cadena A comprende las sustituciones Q311M y K334V y la cadena B comprende las sustituciones L234Y, K296W y S298C o viceversa; (s) la cadena A comprende las sustituciones S239D y K334V y la cadena B comprende las sustituciones L234Y, K290Y y Y296W o viceversa; (t) la cadena A comprende las sustituciones S239D y K334V y la cadena B comprende L234Y, Y296W y S298C sustituciones o viceversa; (u) la cadena A comprende las sustituciones F243V y K334V y la cadena B comprende las sustituciones L234Y, K290Y y Y296W, o viceversa; (v) la cadena A comprende las sustituciones F243V y K334V y la cadena B comprende las sustituciones L234Y, Y296W y S298C o viceversa; (w) la cadena A comprende las sustituciones E294L y K334V y la cadena B comprende las sustituciones L234Y, K290Y y Y296W o viceversa; (x) la cadena A comprende las sustituciones E294L y K334V y la cadena B comprende las sustituciones L234Y, Y296W y S298C o viceversa; (y) la cadena A comprende las sustituciones A330M y K334V y la cadena B comprende las sustituciones L234Y y Y296W o viceversa; o (z) la cadena A comprende las sustituciones A330M y K334V y la cadena B comprende las sustituciones K290Y y Y296W o viceversa. En algunas realizaciones, la cadena A puede comprender la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:8, 12, 14, 16, 20, 22, 24, 26, 28, 30, 32, 34 o 37 y la cadena B puede comprender la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 10, 18, 39 o 41. En algunas realizaciones, la cadena B puede comprender la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:8, 12, 14, 16, 20, 22, 24, 26, 28, 30, 32 o 34, y la cadena A puede comprender la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:8, 10, o 18.

50

Cualquiera de las proteínas que contienen Fc descritas anteriormente o más adelante pueden estar defucosiladas.

55

La proteína que contiene Fc puede comprender una de las siguientes combinaciones de secuencias de aminoácidos: SEQ ID NO: 8 y SEQ ID NO:10; SEQ ID NO: 16 y SEQ ID NO:18; SEQ ID NO: 12 y SEQ ID NO:10; SEQ ID NO: 14 y SEQ ID NO:10; SEQ ID NO: 20 y SEQ ID NO:18; SEQ ID NO: 22 y SEQ ID NO:18; SEQ ID NO: 24 y SEQ ID NO:10; SEQ ID NO: 26 y SEQ ID NO:10; SEQ ID NO: 28 y SEQ ID NO:18; SEQ ID NO: 30 y SEQ ID NO:18; SEQ ID NO: 32 y SEQ ID NO:18; SEQ ID NO: 34 y SEQ ID NO:18; SEQ ID NO:37 y SEQ ID NO:39; o SEQ ID NO:37 y SEQ ID NO:41.

60

65

Cualquiera de las proteínas que contienen Fc descritas en el presente documento pueden ser un anticuerpo o una proteína de fusión Fc y pueden estar producidas en una célula CHO, una célula HEK 293 o célula NS0. Dicho anticuerpo puede ser un anticuerpo IgG1 humano entero, el cual puede ser monoespecífico, biespecífico, triespecífico o multiespecífico y/o puede ser monovalente o multivalente, incluyendo bivalente o tetravalente. La proteína que contiene Fc se puede unir a una o más moléculas diana seleccionadas del grupo que consiste en WT1, MUC1, LMP2, EGFRvIII, HER-2/neu, MAGE-A3, NY-ESO-1, PSMA, GM2/GD2 sintasa, CEA, MLANA/MART1, gp100, survivin, antígeno específico a próstata (PSA), telomerasa transcriptasa inversa (hTERT), puntos de ruptura de translocación de sarcoma, EPHA2, fosfatasa ácido prostático (PAP), inhibidor de apoptosis de melanoma (ML-IAP), α -fetoproteína (AFP), molécula de adhesión celular epitelial (EpCAM), ERG, péptido NA17.A2 (VLPDVFIRC),

genes Pax 3 (PAX3), quinasa de linfoma anaplásico (ALK), receptor andrógeno, claudina 3, claudina 4, claudina 6, claudina 9, ciclina B1, ácido polisiálico, proteína de unión a GTP relacionado con rho RhoC, v-myc oncogen relacionado con mielocitomatosis viral (MYCN), TRP-2, GD3 gangliosido, fucosil GM1, mesotelina, antígeno de célula madre de próstata (PSCA), MAGE-A1, CYP1B1, PLAC1, GM3, BORIS, tetranectina (TN), ETV6-AML1 (especialmente péptidos que incluyen el punto de ruptura), NY-BR-1, RGS5, SART3, STn, anhidrasa carbónica IX, PAX5, precursor de la proteína de unión proacrosina sp32 (OY-TES-1), proteína de esperma 17 (Sp17), LCK, antígeno asociado a melanoma de alto peso molecular (HMWMAA, también conocido como proteoglicano condroitin sulfato de melanoma), AKAP-4, SSX2, XAGE-1, B7H3 (también conocida como CD276), legumaina, TIE2, proteína de gen asociado a próstata 4 (PAGE-4), receptor del factor de crecimiento endotelial vascular 2 (VEGFR2), protamina 2 (también conocida como MAD-CT-1), glomulina (también conocida como FAP), PDGFR- β , SSX2, SSX5, antígeno relacionado con Fos 1, CD20, integrina $\alpha\beta$ 3, antígeno oncofetal 5T4, CA IX, CD5, CD19, CD22 (también conocida como Siglec-2), CD30 (también conocida como TNFRSF8), CD33 (también conocida como Siglec-3), CD38, CD138, CD40, CD44V6, CD55, CD56 (también conocida como NCAM), CTLA-4 (también conocida como CD152), EGFR, GD2, HER2, HLA-DR10 (MHC II), IGF1R, IL-6, sialil Lewis Y, Mesotelina, TAG-72, TAL6, TRAILR2, VEGF, CD52 (también conocida como CAMPATH-1), CD4, CD73, CA125 (también conocida como MUC16), CD66e, CD80 (también conocida como B7-1), PDGFR β , antígeno de membrana específico de próstata (PSMA, también conocido como glutamato carboxipeptidasa 2, entre muchos otros nombres), la proteína del virus del herpes 4 LMP2, las proteínas del papilomavirus humano E6 y E7, y la glicoceramida globo H, la subunidad α 4 de las integrinas α 4 β 1 y α 4 β 7, la integrina α 4 β 7, BAFF, APRIL, CD2, CD3, CD20, CD52, CD80, CD86, la proteína complemento C₅, IgE, IL-1 β , IL-5, IL-6R, IL-12, IL-23, y el factor de necrosis tumoral α (TNF α). En realizaciones particulares, las proteínas que contienen Fc descritas en el presente documento se pueden unir a HER-2/neu o mesotelina o se pueden unir a tanto CD38 como CD138. CDH19, CDH3, BCMA y IL13RA2.

En una realización adicional, la invención incluye una composición farmacéutica que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de cualquiera de las proteínas que contienen Fc descritas anteriormente y más adelante más un vehículo farmacéuticamente aceptable.

En otra realización, en el presente documento se describen ácidos nucleicos que codifican cualquiera de las proteínas que contienen Fc descritas anteriormente y más adelante más una célula hospedadora que contiene tales ácidos nucleicos. En algunas realizaciones, una cadena A y una cadena B están codificadas por moléculas de ácidos nucleicos separadas, mientras que en otras realizaciones una cadena A y una cadena B se pueden codificar sobre la misma molécula de ácido nucleico. La célula hospedadora puede ser una célula CHO, una célula HEK o una célula NS0. Además, en el presente documento se describe un método de producción de una proteína que contiene Fc que comprende una región Fc heterodimérica que comprende cultivar la célula hospedadora bajo condiciones de modo que se expresará la proteína que contiene Fc, en algunas realizaciones, recuperar el polipéptido de la masa celular o el medio de cultivo.

En el presente documento también se describe un método de producción de una composición farmacéutica que comprende una proteína que contiene Fc que contiene una región Fc heterodimérica que comprende las siguientes etapas: (a) cultivar una célula hospedadora que contiene uno o más ácidos nucleicos que codifican una proteína que contiene Fc heterodimérica como se describe en el presente documento bajo condiciones de modo que se expresará la proteína que contiene Fc; (b) recuperar la proteína que contiene Fc de la masa celular o del medio de cultivo; y (c) formular la proteína que contiene Fc con un vehículo farmacéuticamente aceptable.

En el presente documento también se describe un método de producción de una proteína que contiene Fc que contiene una región Fc heterodimérica que comprende las siguientes etapas: (a) proporcionar una célula hospedadora que contiene uno o más ácidos nucleicos que codifican una proteína que contiene Fc que comprende una región Fc de IgG humana heterodimérica y una región de unión, en la que la región Fc comprende una cadena A y una cadena B, las cuales cada una comprende de 1 a 10 sustituciones de aminoácidos relativas a una cadena polipeptídica de Fc humana tipo silvestre, en la que la proteína que contiene Fc se une a Fc γ R11A-158F y/o Fc γ R11A-158V humano con una K_D de menos de o igual a una quinta parte de la K_D con la cual una segunda proteína se une a Fc γ R11A-158F y/o Fc γ R11A-158V humano, en la que la segunda proteína es la misma que la proteína que contiene Fc excepto que contiene una región Fc de IgG humana tipo silvestre sin sustituciones; (b) cultivar la célula hospedadora que contiene uno o más ácidos nucleicos que contienen la proteína que contiene Fc heterodimérica bajo condiciones de modo que se expresará la proteína que contiene Fc; y (c) recuperar la proteína que contiene Fc de la masa celular o el medio de cultivo. Además, la proteína que contiene Fc se puede formular con un vehículo farmacéuticamente aceptable para producir una composición farmacéutica.

En otro aspecto, en el presente documento se describe un uso médico para tratar cáncer que comprende administrar a un paciente en necesidad del mismo una cantidad terapéuticamente eficaz de la proteína que contiene Fc o composición farmacéutica descrita anteriormente o más adelante, en el que la proteína que contiene Fc se une a una molécula que se expone sobre las células cancerosas. Se puede administrar al paciente un agente quimioterapéutico o un agente antineoplásico no quimioterapéutico antes, después o simultáneamente con la administración de la proteína que contiene Fc. El cáncer se puede seleccionar del grupo que consiste en mesotelioma, carcinoma de célula escamosa, mieloma, osteosarcoma, glioblastoma, glioma, carcinoma, adenocarcinoma, melanoma, sarcoma, leucemia aguda y crónica, linfoma, meningioma, enfermedad de Hodgkin,

síndrome de Sézary, mieloma múltiple, y cánceres de pulmón, pulmón de célula no pequeña, pulmón de célula pequeña, laringe, pecho, cabeza y cuello, vejiga, ovario, piel, próstata, cervicales, vaginales, gástricos, de célula renal, riñón, pancreáticos, colorrectales, endometriales, esofágicos, hepatobiliares, de hueso, piel y hematológicos, así como cánceres de la cavidad nasal y senos paranasales, la nasofaringe, la cavidad oral, la orofaringe, la laringe, la hipofaringe, las glándulas salivares, el mediastino, el estómago, el intestino delgado, el colon, el recto y la región anal, el útero, la uretra, el pene, los testículos, la vulva, el sistema endocrino, el sistema nervioso central y células de plasma.

En otro aspecto, en el presente documento se describen usos de la proteína que contiene Fc o composición farmacéutica descrita anteriormente o más adelante en el tratamiento de una enfermedad humana, por ejemplo, enfermedades autoinmunes, asma, lupus eritematoso sistémico, enfermedades infecciosas, o enfermedades proliferativas celulares tales como cáncer, o en la producción de un medicamento, en la que el medicamento puede ser para tratar cáncer, asma, lupus eritematoso sistémico, o una enfermedad infecciosa.

Breve descripción de las figuras

Figura 1: Diagrama de la estructura terciaria de FcγRIIIB unido a una región Fc. Esta figura es una representación de la estructura de cristal por rayos X del complejo Fc-FcγRIIIB (código del "Protein Data Bank": 1T83), la cual incluye la región extracelular de FcγRIIIB y una región Fc dimérica. La estructura de FcγRIIIB se muestra en un modelo de alambre anterior. La cadena A de Fc y la cadena B de Fc se muestran más adelante en modelos de cinta. Las estructuras terciarias de las regiones extracelulares de FcγRIIIA y FcγRIIIB se espera que sean similares puesto que solamente difieren cinco de los 176 aminoácidos en estas dos regiones extracelulares. Una estructura determinada posterior de un complejo de Fc-FcγRIIIA (código del "Protein Data Bank": 3SGK) es muy similar a esta estructura del complejo Fc-FcγRIIIB.

Figura 2: La secuencia de aminoácidos de un polipéptido de Fc de IgG1 humano. La secuencia de aminoácidos de una región Fc de IgG1 humana, que comienza con una región bisagra y que termina con el terminal carboxilo de la región CH3, se muestra en la notación de una letra y se numera según el sistema de UE de Edelman y col. (1969), *Proc. Natl. Acad. Sci.* 63:78-85. Los aminoácidos subrayados y en negrita se distribuyeron al azar en la construcción de las genotecas como se describe en el Ejemplo 1. Por debajo de cada uno de estos aminoácidos es un "1," un "2," o un "3," lo cual indica que los ADN que codifican las variantes en el correspondiente sitio se incluyeron en una genoteca de Tier 1, 2, o 3 como se describe en el Ejemplo 1.

Figura 3: Diagrama que muestra el cribado primario y el cribado combinatorio inicial para sustituciones que aumentan la unión a FcγRIIIA. "SIG" marcado con rectángulo representa una polinucleótido que codifica una secuencia señal, que facilita la secreción de proteína a partir de células mamíferas. Una región que codifica una región bisagra está representada por una "bisagra" marcada con línea horizontal. Un "polipéptido Fc" marcado con rectángulo representa una polinucleótido que codifica una cadena polipeptídica de Fc. Las estrellas de cinco puntas y de cuatro puntas significan que los polinucleótidos que codifican las cadenas polipeptídicas de Fc contienen un codón aleatorio en cada molécula en posiciones seleccionadas como se explica en el Ejemplo 1. Los "VH" y "VL" marcados con círculos representan regiones que codifican una región variable de cadena pesada y una región variable de cadena ligera, respectivamente. Las señales "++" y "--" en el "polipéptido Fc" marcado con rectángulos significa que estas regiones incluyen mutaciones de modo que la cadena polipeptídica de Fc codificada tendrá las sustituciones E356K, D399K y K392D, K409D, respectivamente.

Figura 4: Inhibición en porcentaje de la señal AlphaLISA® por anticuerpos IgG1 enteros que contienen regiones Fc variantes. La gráfica muestra la inhibición en porcentaje de una señal AlphaLISA® en función de la concentración del competidor. Los diversos competidores, los cuales son anticuerpos IgG1 humanos, están indicados en la gráfica por el alias, y las sustituciones contenidas en cada competidor están indicadas en la Tabla 3.

Figura 5: Inhibición en porcentaje de la señal AlphaLISA® por anticuerpos IgG1 enteros que contienen regiones Fc variantes. La gráfica muestra la inhibición en porcentaje de una señal AlphaLISA® en función de la concentración del competidor. Los diversos competidores, los cuales son anticuerpos IgG1 humanos, están indicados en la gráfica por el alias, y las sustituciones contenidas en cada competidor están indicadas en la Tabla 3.

Figura 6: Inhibición en porcentaje de la señal AlphaLISA® por anticuerpos IgG1 enteros que contienen regiones Fc variantes. La gráfica muestra la inhibición en porcentaje de una señal AlphaLISA® en función de la concentración del competidor. Los diversos competidores, los cuales son anticuerpos IgG1 humanos, están indicados en la gráfica por el alias, y las sustituciones contenidas en cada competidor están indicadas en la Tabla 3.

Figura 7: Destrucción celular en porcentaje por anticuerpos IgG1 enteros que contienen regiones Fc. La gráfica muestra el porcentaje de células destruidas en un ensayo para la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo (% ADCC) frente a la concentración de anticuerpo. Los diversos anticuerpos IgG1 humanos usados en estos ensayos están indicados en la gráfica por el alias, y las sustituciones contenidas en cada anticuerpo están indicadas en la Tabla 3.

Figura 8: Destrucción celular en porcentaje por anticuerpos IgG1 enteros que contienen regiones Fc. La gráfica muestra el porcentaje de células destruidas en un ensayo para la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo (% ADCC) frente a la concentración de anticuerpo. Los diversos anticuerpos IgG1 humanos usados en estos ensayos están indicados en la gráfica por el alias, y las sustituciones contenidas en cada anticuerpo

están indicadas en la Tabla 3.

Figura 9: Destrucción celular en porcentaje por anticuerpos IgG1 enteros que contienen regiones Fc. La gráfica muestra el porcentaje de células destruidas en un ensayo para la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo (% ADCC) frente a la concentración de anticuerpo. Los diversos anticuerpos IgG1 humanos usados en estos ensayos están indicados en la gráfica por el alias, y las sustituciones contenidas en cada anticuerpo están indicadas en la Tabla 3.

Figura 10: Inhibición en porcentaje de la señal AlphaLISA® para la unión a la variante alélica de FcγRIIIA (158F) humano por anticuerpos IgG1 enteros que contienen regiones Fc variantes. La gráfica muestra la inhibición en porcentaje de una señal AlphaLISA® en función del logaritmo de la concentración de competidor. Los diversos competidores, los cuales son anticuerpos IgG1 humanos, están indicados en la gráfica por el alias, y las sustituciones contenidas en cada competidor están indicadas en las Tablas 3 y 4. La denominación "AFUCO" que precede a un alias significa que el anticuerpo carece de fucosa.

Figura 11: Inhibición en porcentaje de la señal AlphaLISA® para la unión a la variante alélica de FcγRIIIA (158V) humano por anticuerpos IgG1 enteros que contienen regiones Fc variantes. La gráfica muestra la inhibición en porcentaje de una señal AlphaLISA® en función del logaritmo de la concentración del competidor. Los diversos competidores, los cuales son anticuerpos IgG1 humanos, están indicados en la gráfica por el alias, y las sustituciones contenidas en cada competidor están indicadas en las Tablas 3 y 4. La denominación "AFUCO" que precede a un alias significa que el anticuerpo carece de fucosa.

Figura 12: Lisis celular en porcentaje de células que expresan altos niveles de antígeno por anticuerpos IgG1 enteros que contienen regiones Fc variantes. La gráfica muestra el porcentaje de células destruidas en un ensayo para la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo (% lisis específica) frente al logaritmo de la concentración de anticuerpo (pM). Los diversos anticuerpos IgG1 humanos usados en estos ensayos están indicados en la gráfica por el alias, y las sustituciones contenidas en cada competidor están indicadas en las Tablas 3 y 4.

Figura 13: Lisis celular en porcentaje de células que expresan niveles moderados de antígeno por anticuerpos IgG1 enteros que contienen regiones Fc variantes. La gráfica muestra el porcentaje de células destruidas en un ensayo para la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo (% lisis específica) frente al logaritmo de la concentración de anticuerpo (pM). Los diversos anticuerpos IgG1 humanos usados en estos ensayos están indicados en la gráfica por el alias, y las sustituciones contenidas en cada competidor están indicadas en las Tablas 3 y 4.

Figura 14: Comparaciones de la actividad de ADCC de preparaciones fucosiladas y defucosiladas de anticuerpos IgG1 que contienen una región Fc variante o una de tipo silvestre. Las gráficas muestran el porcentaje de células destruidas en un ensayo para la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo (% lisis específica) frente al logaritmo de la concentración de anticuerpo [pM]. En el panel superior, una línea celular que expresa altos niveles del antígeno al que se une el anticuerpo se usó como célula diana (SKBR3). En el panel inferior, una línea celular que expresa niveles moderados del antígeno se usó como célula diana (JIMT1). Los diversos anticuerpos IgG1 humanos usados en estos ensayos se indican en el gráfico como sigue: "M01" indica un anticuerpo IgG1 que contiene una región Fc tipo silvestre que se une al antígeno "AFUCO-M01" indica una preparación del mismo anticuerpo IgG1 que contiene no fucosa; "W117" indica un anticuerpo IgG1 que se une al antígeno y contiene una región Fc variante W117; "AFUCO-W117" indica una preparación de W117 que no contiene fucosa; "W125" indica un anticuerpo IgG1 que se une al antígeno y contiene una región Fc variante W125; y "AFUCO-W125" indica una preparación de "W125" que no contiene fucosa.

Breve descripción del listado de secuencia

Número listado de secuencia	Descripción de la secuencia
SEQ ID NO:1	Secuencia de nucleótidos que codifica una cadena polipeptídica de Fc de IgG1 humana
SEQ ID NO:2	Secuencia de aminoácidos de una cadena polipeptídica de Fc de IgG1 humana
SEQ ID NO:3	Secuencia de nucleótidos que codifica una cadena polipeptídica de Fc de IgG1 humana que contiene las sustituciones K392D y K409D (que codifica un polipéptido de Fc de la variante M04)
SEQ ID NO:4	Secuencia de aminoácidos de la cadena polipeptídica de Fc codificada por la SEQ ID NO:3
SEQ ID NO:5	Secuencia de nucleótidos que codifica una cadena polipeptídica de Fc de IgG1 humana que contiene las sustituciones E356K y D399K (que codifica un polipéptido de Fc de la variante M04)
SEQ ID NO:6	Secuencia de aminoácidos de la cadena polipeptídica de Fc codificada por la SEQ ID NO:5
SEQ ID NO:7	Secuencia de nucleótidos que codifica una cadena polipeptídica de Fc de IgG1 humana que contiene las sustituciones K392D, K409D, Q311M y K334V (que codifica un polipéptido de Fc de las variantes M75, M77 y M78)
SEQ ID NO:8	Secuencia de aminoácidos de la cadena polipeptídica de Fc codificada por la SEQ ID NO:7
SEQ ID NO:9	Secuencia de nucleótidos que codifica una cadena polipeptídica de Fc de IgG1 humana

ES 2 668 895 T3

Número listado de secuencia	Descripción de la secuencia
	que contiene las sustituciones E356K, D399K, L234Y, E294L y Y296W (que codifica un polipéptido de Fc de las variantes M77, M138, M142, W157 y W160)
SEQ ID NO:10	Secuencia de aminoácidos de la cadena polipeptídica de Fc codificada por la SEQ ID NO:9
SEQ ID NO:11	Secuencia de nucleótidos que codifica una cadena polipeptídica de Fc de IgG1 humana que contiene las sustituciones K392D, K409D, E233L, Q311M y K334V (que codifica un polipéptido de Fc de la variante M138)
SEQ ID NO:12	Secuencia de aminoácidos de la cadena polipeptídica de Fc codificada por la SEQ ID NO:11
SEQ ID NO:13	Secuencia de nucleótidos que codifica una cadena polipeptídica de Fc de IgG1 humana que contiene las sustituciones K392D, K409D, L234I, Q311M y K334V (que codifica un polipéptido de Fc de la variante M142)
SEQ ID NO:14	Secuencia de aminoácidos de la cadena polipeptídica de Fc codificada por la SEQ ID NO:13
SEQ ID NO:15	Secuencia de nucleótidos que codifica una cadena polipeptídica de Fc de IgG1 humana que contiene las sustituciones K392D, K409D, S298T y K334V (que codifica un polipéptido de Fc de la variante W23)
SEQ ID NO:16	Secuencia de aminoácidos de la cadena polipeptídica de Fc codificada por la SEQ ID NO:15
SEQ ID NO:17	Secuencia de nucleótidos que codifica una cadena polipeptídica de Fc de IgG1 humana que contiene las sustituciones E356K, D399K, L234Y, K290Y y Y296W (que codifica un polipéptido de Fc de las variantes W23, W141, W144, W165, W168, W187 y W189)
SEQ ID NO:18	Secuencia de aminoácidos de la cadena polipeptídica de Fc codificada por la SEQ ID NO:17
SEQ ID NO:19	Secuencia de nucleótidos que codifica una cadena polipeptídica de Fc de IgG1 humana que contiene las sustituciones K392D, K409D, A330M y K334V (que codifica un polipéptido de Fc de la variante W141)
SEQ ID NO:20	Secuencia de aminoácidos de la cadena polipeptídica de Fc codificada por la SEQ ID NO:19
SEQ ID NO:21	Secuencia de nucleótidos que codifica una cadena polipeptídica de Fc de IgG1 humana que contiene las sustituciones K392D, K409D, A330F y K334V (que codifica un polipéptido de Fc de la variante W144)
SEQ ID NO:22	Secuencia de aminoácidos de la cadena polipeptídica de Fc codificada por la SEQ ID NO:21
SEQ ID NO:23	Secuencia de nucleótidos que codifica una cadena polipeptídica de Fc de IgG1 humana que contiene las sustituciones K392D, K409D, Q311M, A330M y K334V (que codifica un polipéptido de Fc de la variante W157)
SEQ ID NO:24	Secuencia de aminoácidos de la región Fc codificada por la SEQ ID NO:23
SEQ ID NO:25	Secuencia de nucleótidos que codifica una cadena polipeptídica de Fc de IgG1 humana que contiene las sustituciones K392D, K409D, Q311M, A330F y K334V (que codifica un polipéptido de Fc de la variante W160)
SEQ ID NO:26	Secuencia de aminoácidos de la cadena polipeptídica de Fc codificada por la SEQ ID NO:25
SEQ ID NO:27	Secuencia de nucleótidos que codifica una cadena polipeptídica de Fc de IgG1 humana que contiene las sustituciones K392D, K409D, S298T, A330M y K334V (que codifica un polipéptido de Fc de la variante W165)
SEQ ID NO:28	Secuencia de aminoácidos de la cadena polipeptídica de Fc codificada por la SEQ ID NO:27
SEQ ID NO:29	Secuencia de nucleótidos que codifica una cadena polipeptídica de Fc de IgG1 humana que contiene las sustituciones K392D, K409D, S298T, A330F y K334V (que codifica un polipéptido de Fc de la variante W168)
Número listado de secuencia	Descripción de la secuencia
SEQ ID NO:30	Secuencia de aminoácidos de la cadena polipeptídica de Fc codificada por la SEQ ID NO:29
SEQ ID NO:31	Secuencia de nucleótidos que codifica una cadena polipeptídica de Fc de IgG1 humana que contiene las sustituciones K392D, K409D, S239D, A330M y K334V (que codifica un polipéptido de Fc de la variante W187)
SEQ ID NO:32	Secuencia de aminoácidos de la cadena polipeptídica de Fc codificada por la SEQ ID NO:31
SEQ ID NO:33	Secuencia de nucleótidos que codifica una cadena polipeptídica de Fc de IgG1 humana que contiene las sustituciones K392D, K409D, S239D, S298T y K334V (que codifica un

Número listado de secuencia	Descripción de la secuencia
	polipéptido de Fc de la variante W189)
SEQ ID NO:34	Secuencia de aminoácidos de la cadena polipeptídica de Fc codificada por la SEQ ID NO:33
SEQ ID NO:35	Secuencia de aminoácidos de la proteína FcγRIIIA-158V humana madura
SEQ ID NO:36	Secuencia de nucleótidos que codifica una cadena polipeptídica de Fc de IgG1 humana que contiene las sustituciones A330M, K334V, K392D y K409D (que codifica una cadena polipeptídica de Fc variante que es parte de tanto W117 como W125)
SEQ ID NO:37	Secuencia de aminoácidos de la cadena polipeptídica de Fc codificada por la SEQ ID NO:36
SEQ ID NO:38	Secuencia de nucleótidos que codifica una cadena polipeptídica de Fc de IgG1 humana que contiene las sustituciones L234Y, Y296W, E356K y D399K (que codifica un polipéptido de Fc de la variante W117)
SEQ ID NO:39	Secuencia de aminoácidos de la cadena polipeptídica de Fc codificada por la SEQ ID NO:38
SEQ ID NO:40	Secuencia de nucleótidos que codifica una cadena polipeptídica de Fc de IgG1 humana que contiene las sustituciones K290Y, Y296W, E356K y D399K (que codifica un polipéptido de Fc de la variante W125)
SEQ ID NO:41	Secuencia de aminoácidos de la cadena polipeptídica de Fc codificada por la SEQ ID NO:40

Descripción detallada

Hay una necesidad en la técnica de polipéptidos terapéuticos que se unan a una molécula diana y que tengan actividad mejorada como compuestos terapéuticos debido a las funciones efectoras aumentadas asociadas con las proteínas que contienen Fc, tales como ADCC, CDC y/o ADCP. Tales proteínas pueden ser particularmente útiles en el tratamiento del cáncer, enfermedades autoinmunes e infecciosas, y/o cualquier afección en la que es beneficioso la destrucción selectiva de células que expresan una molécula diana particular. ADCC depende de la interacción de los receptores Fcγ (FcγR), especialmente FcγRIIIA en humanos, con la región Fc de un anticuerpo o la proteína que contiene Fc. Como se muestra en la Figura 1, la interacción del FcγRIIIA humano con una región Fc humana es asimétrica, es decir, FcγRIIIA se pone en contacto con diferentes residuos de aminoácidos sobre las dos cadenas polipeptídicas de Fc que componen la región Fc. Véase también Sondermann y col. (2000), *Nature* 406:267-273. Los sitios de unión de los FcγR sobre una región Fc de IgG han sido mapeados en detalle. Shields y col. (2001), *J. Biol. Chem.* 276(9):6591-6604. Especialmente, las porciones de FcγRIIIA están dentro de 5,0 Å de residuos de aminoácidos L235, S239, D265, L328, P329, A330 y I332 en una cadena polipeptídica de Fc y los residuos de aminoácidos L235, P238, S239, D265, S267, D270, Y296, N297, S298, T299 y A327 en la otra como se determina por cristalografía de rayos X. Por tanto, las alteraciones asimétricas en la región Fc pueden ser necesarias para aumentar máximamente la interacción de FcγRIIIA con la región Fc de una proteína que contiene Fc y, por tanto, aumentar la ADCC. En otro aspecto, tales regiones Fc heterodiméricas también pueden tener diferentes regiones de unión unidas a cada cadena polipeptídica de Fc, creando así una molécula que puede tener diferentes especificidades de unión en cada uno de sus dos brazos de unión. La presente invención proporciona proteínas que contienen Fc que comprenden tales sustituciones asimétricas en sus regiones Fc y que tienen unión incrementada a FcγRIIIA y actividad ADCC aumentada. En algunos casos, tales polipéptidos también pueden ser biespecíficos, o multiespecíficos, es decir, pueden unirse a dos o más moléculas diana diferentes.

Definiciones

Toda la numeración de los residuos de aminoácidos en una región constante de IgG está hecha según el sistema de numeración de UE como se usa en Edelman y col. (1969), *Proc. Natl. Acad. Sci.* 63:78-85. Este sistema es una numeración secuencial de los aminoácidos de un anticuerpo IgG1 humano. La Figura 2 muestra la secuencia de la región Fc de un anticuerpo IgG1 humano numerado según el sistema de UE. Los residuos de aminoácidos particulares en una región constante de IgG1 de un anticuerpo se indican usando el código de una letra para los aminoácidos y el sistema de numeración de UE. Por ejemplo, “**D399**” se refiere a un ácido aspártico que está presente en IgG tipo silvestre en la posición 399. Las mutaciones en un residuo particular se indican de manera similar. Por ejemplo, “**D399K**” significa que el ácido aspártico que está presente en el IgG1 tipo silvestre en la posición 399 se ha cambiado a una lisina.

“**ADCC**” se refiere a un proceso denominado citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo, que es una respuesta inmune mediada principalmente por linfocitos citolíticos naturales (NK) en seres humanos. En ADCC, FcγRIII sobre la superficie de una célula NK reconoce la región Fc del anticuerpo que se une a antígeno expuesto sobre la superficie de una célula diana. Esto activa la célula NK, que libera perforinas y granzimas, conduciendo a lisis y apoptosis de las células diana.

“**CDC**” se refiere a un proceso complejo denominado citotoxicidad dependiente de complemento que puede

conducir a destrucción celular a través de la acción de una cascada de proteínas que pueden actuar a través de cualquiera de las dos rutas principales. Véase, por ejemplo, Liszewski and Atkinson, Cap. 26 en FUNDAMENTAL IMMUNOLOGY, 3º ed., Paul, ed., Raven Press, Nueva York, 1993, pp. 917-940.

5 “ADCP” se refiere a un proceso denominado fagocitosis mediada por célula dependiente de anticuerpo. En este proceso mediado por receptor Fc, las células diana a las cuales se unen los anticuerpos son tragadas por células fagocíticas, tales como macrófagos, monocitos, neutrófilos y células dendríticas. Los receptores Fc múltiples están implicados en este proceso. Richards y col., *Mol. Cancer Ther.* 7(8):2.517-2.527 (2008) describen un ensayo *in vitro* para ADCP.

10 Un “**anticuerpo**”, como significa en el presente documento, es una proteína que contiene al menos una región variable de inmunoglobulina de cadena pesada o ligera, en muchos casos una región variable de cadena pesada o ligera. Por tanto, el término “anticuerpo” abarca anticuerpos Fv de cadena única (scFv, que contiene regiones variables de cadena pesada y ligera unidas a un enlazador), anticuerpos Fab, F(ab)₂, Fab’, scFv:Fc (como se describe en Carayannopoulos and Capra, Cap. 9 en FUNDAMENTAL IMMUNOLOGY, 3º ed., Paul, ed., Raven Press, Nueva York, 1993, pp. 284-286) o anticuerpos enteros que contienen dos cadenas pesadas enteras y dos cadenas ligeras enteras, tales como anticuerpos IgG de origen natural encontrados en mamíferos. *Id.* Tales anticuerpos IgG pueden ser del isótopo de IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4 y pueden ser anticuerpos humanos. Además, el término “anticuerpo” incluye anticuerpos diméricos que contienen dos cadenas pesadas y no cadenas ligeras tales como los anticuerpos de origen natural encontrados en camellos y otras especies de dromedarios y tiburones. Véase, por ejemplo, Muldermans y col., 2001, *J. Biotechnol.* 74:277-302; Desmyter y col., 2001, *J. Biol. Chem.* 276:26.285-90; Streltsov y col. (2005), *Protein Science* 14:2.901-2.909. Un anticuerpo puede ser monoespecífico (es decir, que se une a solamente un tipo de antígeno) o multiespecífico (es decir, que se une a más de un tipo de antígeno). En algunas realizaciones, un anticuerpo puede ser biespecífico (es decir, que se une a dos tipos diferentes de antígeno). Además, un anticuerpo puede ser monovalente, bivalente o multivalente, significando que se puede unir a una o dos o más moléculas de antígeno a la vez. Algunos de los posibles formatos para tales anticuerpos incluyen anticuerpos enteros monoespecíficos o biespecíficos, anticuerpos monovalentes monoespecíficos (como se describe en la Solicitud Internacional WO 2009/089004 y la publicación americana 2007/0105199) que pueden inhibir o activar la molécula a la que se unen, Fv-Fc dimérico monoespecífico o biespecífico bivalente, scFv-Fc o Fc diacuerpo, scFv-Fc/Fc monovalentes monoespecíficos, y las proteínas de unión multiespecíficas e inmunoglobulinas de dominio variables duales descritas en la publicación americana 2009/0311253, entre muchos otros formatos de anticuerpo posibles.

35 Una “**proteína de fusión Fc**”, como significa en el presente documento, es una proteína que contiene una cadena polipeptídica de Fc fusionada a otro polipéptido, que comprende una región de unión que se une a una molécula diana, y que no comprende una región variable de cadena pesada o ligera de un anticuerpo. La región de unión de una proteína de fusión Fc puede comprender un polipéptido de no inmunoglobulina tal como una porción soluble de un receptor o uno o más péptidos que se unen a una molécula diana (tal como, por ejemplo, un “dominio monómero” como se define en el documento de patente americana 7.820.790 que se une a una proteína diana, la cual se puede seleccionar como se discute en el documento de patente americana 7.820.790), u otros polipéptidos. Otros polipéptidos que pueden ser parte de una región de unión de una proteína de fusión Fc incluyen polipéptidos que comprenden dominios andamio que se han distribuido al azar en ciertas posiciones y se someten a selección para la unión a una cierta molécula diana. Tales dominios andamio incluyen, por ejemplo, proteína 4 asociada a linfocito T (CTLA-4; *Nuttall* y col. (1999), *Proteins* 36:217-227), el dominio Z de la proteína 1 de estafilococo (Nord y col. (1995), *Protein Eng.* 8:601-608), proteína verde fluorescente, y el décimo dominio tipo III de la fibronectina humana (FN3; Koide y col. (1998), *J. Mol. Biol.* 284:1.141-1.151; Karatan y col. (2004), *Chem. & Biol.* 11:835-844). Las proteínas de fusión Fc, como otras proteínas que contienen cadenas polipeptídicas de Fc generalmente forman multímeros, los cuales pueden ser dímeros. Puesto que las regiones Fc descritas en el presente documento son generalmente heterodiméricas, tales proteínas de fusión Fc pueden formar heterodímeros. En tal caso, el polipéptido fusionado a la cadena polipeptídica de Fc puede ser diferente en cada una de las cadenas polipeptídicas que, juntas forman el heterodímero. Por tanto, una proteína de fusión Fc puede ser heterodimérica y biespecífica o monoespecífica o multiespecífica.

55 Una “**región de unión**”, como significa en el presente documento, es una región de una proteína que contiene Fc como se describe en el presente documento que se une a una molécula diana, tal como, por ejemplo, una proteína que se expresa a niveles altos sobre una célula cancerosa, sobre una célula que media una afección autoinmune o inflamatoria, sobre una célula infectada, sobre un agente infeccioso, o sobre una célula que media una función efectora inmune, por ejemplo, una célula NK. Una región de unión puede contener una región variable de inmunoglobulina de cadena pesada o ligera o un polipéptido de no inmunoglobulina.

60 Un “**scFv-Fc**”, como significa en el presente documento, es un polipéptido que consiste en una región variable de cadena pesada y una ligera de un anticuerpo unido por un enlazador, que está seguido por una cadena polipeptídica de Fc de un anticuerpo, opcionalmente la región Fc de un anticuerpo IgG humano, tal como un anticuerpo IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4.

65 Una “**cadena pesada**” entera, como significa en el presente documento, comprende una región variable de cadena

pesada (V_H), un primer dominio constante de cadena pesada (C_{H1}), un dominio bisagra, un segundo dominio constante de cadena pesada (C_{H2}) y un tercer dominio constante de cadena pesada (C_{H3}).

5 Una “**cadena ligera**” entera, como significa en el presente documento, comprende una región variable de la cadena ligera (V_L) y un dominio constante de la cadena ligera (C_L).

10 Como significa en el presente documento, una “**región Fc**” es un dímero que consiste en dos cadenas polipeptídicas unidas por uno o más enlaces disulfuros, comprendiendo cada cadena parte o todo de un dominio bisagra más un dominio C_{H2} y un C_{H3} . Cada una de las cadenas polipeptídicas se refieren como una “**cadena polipeptídica de Fc**”. Para distinguir las dos cadenas polipeptídicas de Fc, una se refiere en el presente documento como una “**cadena A**” y la otra se refiere como una “**cadena B**”. Más específicamente, las regiones Fc contempladas para su uso con la presente invención son regiones Fc de IgG, las cuales pueden ser regiones Fc de IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4 de mamífero o ser humano. Entre las regiones Fc de IgG humanas, al menos se conocen dos tipos alélicos. Un tipo alélico tiene la secuencia como se muestra en la Figura 2 (SEQ ID NO:2). Otro tiene dos sustituciones relativas a la secuencia en la Figura 2, principalmente E356D y M358L. En otra IgG1 humana de origen natural, la alanina en la posición 431 (correspondiente a la posición 216 en la SEQ ID NO:2) es una glicina. Una región Fc de IgG1 humana como significa en el presente documento puede contener cualquiera de estas variaciones de secuencia de aminoácidos.

20 Una “**proteína que contiene Fc**”, como significa en el presente documento, es una proteína que comprende una región Fc como se describe en el presente documento y una región de unión que se une a una molécula diana. El término “proteína que contiene Fc” abarca un anticuerpo o una proteína de fusión Fc que contiene una región Fc.

25 “**Fc γ R111A-158V**” se refiere a la variante alélica de Fc γ R111A humano que tiene una valina en la posición 158 en la secuencia de aminoácidos de un Fc γ R111A como se muestra en la SEQ ID NO:35. Igualmente “**Fc γ R111A-158F**” se refiere a la variante alélica de Fc γ R111A humano que tiene una fenilalanina en la posición 158 en la secuencia de aminoácidos de Fc γ R111A. La secuencia de Fc γ R111A-158F humano, incluyendo el péptido señal de 17 aminoácidos, está publicada en el número de acceso de NCBI NP_001121065. Puesto que esta secuencia incluye el péptido señal, que está ausente en la proteína madura, la posición 158 es equivalente al aminoácido 176. La SEQ ID NO:35 contiene la secuencia de aminoácidos de la forma madura de Fc γ R111A-158V.

35 Una región Fc “**heterodimérica**”, como significa en el presente documento, es una en la que la cadena A y la cadena B de la región Fc tienen diferentes secuencias de aminoácidos en vez de las secuencias de aminoácidos idénticas.

40 Un “**scFv-Fc/Fc**” es una proteína dimerica que consiste básicamente en una scFv-Fc más una cadena polipeptídica de Fc (referida en el presente documento como un “Fc simulado”). El scFv-Fc se puede unir al Fc simulado (*dummy*) por uno o más puentes disulfuros. Además, la región Fc puede contener “alteraciones de heterodimerización” en los dominios C_{H3} , tales como uno, dos, tres o más pares de sustituciones de par de carga, como se describe más adelante.

45 La “**interfaz C_{H3} - C_{H3}** ” consiste en aquellos aminoácidos en la región C_{H3} que se ponen en contacto cercano con residuos de la otra región C_{H3} en el contexto de una región Fc y/o un anticuerpo entero. Más específicamente, estos residuos están dentro de 4,5 Å de un residuo de aminoácidos en la otra región C_{H3} en el contexto de una región Fc. En un anticuerpo IgG1, estos son los residuos en las siguientes posiciones (con el número de residuo de UE seguido por la posición en la SEQ ID NO:2 entre paréntesis): 347 (132), 349 (134), 350 (135), 351 (136), 352 (137), 353 (138), 354 (139), 355 (140), 356 (141), 357 (142), 360 (145), 364 (149), 366 (151), 368 (153), 370 (155), 390 (175), 392 (177), 393 (178), 394 (179), 395 (180), 397 (182), 398 (183), 399 (184), 400 (185), 405 (190), 407 (192), 408 (193), 409 (194) y 439 (224).

50 “**Quimioterapia**”, como se usa en el presente documento, significa el tratamiento de un paciente de cáncer con un “**agente quimioterapéutico**” que tiene efectos citotóxicos o citostáticos sobre las células cancerosas. Un “**agente quimioterapéutico**” específicamente dirige células involucradas en la división celular y no células que no están involucradas en la división celular. Los agentes quimioterapéuticos directamente interfieren con los procesos que están íntimamente unidos a la división celular tales como, por ejemplo, replicación de ADN, síntesis de ARN, síntesis de proteína, el ensamble, desensamble, o función del huso mitótico, y/o la síntesis o estabilidad de moléculas que juegan un papel en estos procesos, tales como nucleótidos o aminoácidos. Por lo tanto, un agente quimioterapéutico tiene efectos citotóxicos o citostáticos sobre tanto células cancerosas como otras células que están involucradas en la división celular. Los agentes quimioterapéuticos son bien conocidos en la técnica e incluyen, por ejemplo: agentes de alquilación (por ejemplo, busulfán, temozolomida, ciclofosfamida, lomustina (CCNU), metilomustina, estreptozotocina, *cis*-diaminadi-cloroplatino, aziridinilbenzo-quinona, y tiotepa); iones inorgánicos (por ejemplo, cisplatina y carboplatina); mostazas de nitrógeno (por ejemplo, clorhidruro de melfalan, ifosfamida, clorambucilo y HCl de mecloretamina); nitrosoureas (por ejemplo, carmustina (BCNU)); anticuerpos antineoplásicos (por ejemplo, adriamicina (doxubicina), daunomicina, mitomicina C, daunorubicina, idarubicina, mitramicina y bleomicina); derivados vegetales (por ejemplo, vincristina, vinblastina, vinorelbina, paclitaxel, docetaxel, vindesina, VP-16, y VM-26); antimetabolitos (por ejemplo, metotrexato con o sin leucovorina, 5-fluorouracilo con o sin leucovorina, 5-

5 fluorodeoxiuridina, 6-mercaptopurina, 6-tioguanina, citarabina, 5-azacitidina, hidroxiourea, deoxicoformicina, gemcitabina y fludarabina); podofilotoxinas (por ejemplo, etopósido, irinotecan y topotecan); así como actinomicina D, dacarbazina (DTIC), mAMSA, procarbazona, hexametilmelamina, pentametilmelamina, L-asparaginasa, y mitoxantrona, entre muchos conocidos en la técnica. Véase, por ejemplo, *Cancer: Principles and Practice of*
 10 *Oncology*, 4ª Edition, DeVita y col., eds., J.B. Lippincott Co., Philadelphia, PA (1993). Los agentes de alquilación y la mostaza de nitrógeno actúan por ADN de alquilación, que restringe el desenrollamiento y la replicación de las hebras. Metotrexato, citarabina, 6-mercaptopurina, 5-fluorouracilo y gemcitabina interfieren con la síntesis de nucleótidos. Los derivados vegetales tales como paclitaxel y vinblastina son venenos del huso mitótico. Las podofilotoxinas inhiben las topoisomerasas, interfiriendo así con la replicación del ADN. Los antibióticos doxorubicina, bleomicina y mitomicina interfieren con la síntesis de ADN intercalando entre las bases de ADN (inhibiendo el desenrollamiento), causando rotura de hebra, y alquilación de ADN, respectivamente. Otros mecanismos de acción incluyen carbamoylación de aminoácidos (lomustina, carmustina), y reducción de los grupos de asparagina (asparaginasa). “Merck Manual of Diagnosis and Therapy”, 17ª Edición, Sección 11, *Hematology and Oncology*, 144. “Principles of Cancer Therapy”, Tabla 144-2 (1999). Específicamente incluidos entre los agentes quimioterapéuticos son aquellos que afectan directamente los mismos procesos celulares que están afectados directamente por los agentes quimioterapéuticos enumerados anteriormente.

Los “agentes antineoplásicos no quimioterapéuticos” son agentes químicos, compuestos, o moléculas que tienen efectos citotóxicos o citostáticos sobre células cancerosas distintos de los agentes quimioterapéuticos. Los agentes antineoplásicos no quimioterapéuticos pueden, sin embargo, estar dirigidos a interactuar directamente con las moléculas que afectan indirectamente a la división celular tales como receptores de superficie celular, incluyendo receptores para hormonas o factores de crecimiento. Sin embargo, los agentes antineoplásicos no quimioterapéuticos no interfieren directamente con los procesos que están íntimamente ligados a la división celular tales como, por ejemplo, replicación de ADN, síntesis de ARN, síntesis de proteína, o función del huso mitótico, ensamble, o desensamble. Ejemplos de agentes antineoplásicos no quimioterapéuticos incluyen inhibidores de Bcl2, inhibidores de farnesiltransferasa, agentes antiestrogénicos tales como tamoxifen, compuestos antiandrogénicos, interferón, ácido arsénico, retinoico, derivados del ácido retinoico, anticuerpos dirigidos a antígenos específicos a tumor, e inhibidores de la tirosina quinasa Bcr-Abl (por ejemplo, la pequeña molécula STI-571 comercializada bajo el nombre comercial GLEEVEC™ por Novartis, Nueva York y New Jersey, EE.UU y Basel, Suiza), entre muchos agentes antineoplásicos no quimioterapéuticos posibles.

“Alteraciones de heterodimerización” generalmente se refieren a alteraciones en las cadenas A y B de una región Fc que facilitan la formación de las regiones Fc heterodiméricas, es decir, las regiones Fc en las que la cadena A y la cadena B de la región Fc no tienen secuencias de aminoácidos idénticas. Las alteraciones de heterodimerización pueden ser asimétricas, es decir, una cadena A que tiene una cierta alteración puede emparejarse con una cadena B que tiene una alteración diferente. Estas alteraciones facilitan la heterodimerización la homodimerización desfavorable. Si se han formado los hetero- u homodímeros se puede valorar por las diferencias de tamaño como se determina por electroforesis en gel de poliacrilamida en situaciones en las que una cadena polipeptídica es un Fc simulado y la otra es un scFv-Fc. Un ejemplo de tales alteraciones de heterodimerización emparejadas son las denominadas sustituciones de “protuberancias y agujeros”. Véase, por ejemplo, el documento de patente americana 7.695.936 y la publicación de solicitud de patente americana 2003/0078385. Como significa en el presente documento, una región Fc que contiene un par de sustituciones de protuberancias y agujeros, contiene una sustitución en la cadena A y otra en la cadena B. Por ejemplo, se ha encontrado que las siguientes sustituciones protuberancias y agujeros en las cadenas A y B de una región Fc de IgG1 incrementan la formación de heterodímero en comparación con la encontrada con las cadenas A y B no modificadas: 1) Y407T en una cadena y T366Y en la otra; 2) Y407A en una cadena y T366W en la otra; 3) F405A en una cadena y T394W en la otra; 4) F405W en una cadena y T394S en la otra; 5) Y407T en una cadena y T366Y en la otra; 6) T366Y y F405A en una cadena y T394W y Y407T en la otra; 7) T366W y F405W en una cadena y T394S y Y407A en la otra; 8) F405W y Y407A en una cadena y T366W y T394S en la otra; y 9) T366W en un polipéptido del Fc y T366S, L368A y Y407V en el otro. Alternativamente o además de tales alteraciones, las sustituciones que crean nuevos puentes disulfuro pueden facilitar la formación de heterodímero. Véase, por ejemplo, la publicación de solicitud de patente americana 2003/0078385. Tales alteraciones en una región Fc de IgG1 incluyen, por ejemplo, las siguientes sustituciones: Y349C en una cadena polipeptídica de Fc y S354C en la otra; Y349C en una cadena polipeptídica de Fc y E356C en la otra; Y349C en una cadena polipeptídica de Fc y E357C en la otra; L351C en una cadena polipeptídica de Fc y S354C en la otra; T394C en una cadena polipeptídica de Fc y E397C en la otra; o D399C en una cadena polipeptídica de Fc y K392C en la otra. Igualmente, las sustituciones que cambian la carga de uno o más residuos, por ejemplo, en la interfaz C_H3-C_H3, pueden aumentar la formación de heterodímero como se explica en el documento WO 2009/089004. Tales sustituciones se refieren en el presente documento como “sustituciones de par de carga”, y una región Fc que contiene un par de sustituciones de par de carga contiene una sustitución en la cadena A y una sustitución diferente en la cadena B. Ejemplos generales de sustituciones de par de carga incluyen los siguientes: 1) K409D o K409E en una cadena más D399K o D399R en la otra; 2) K392D o K392E en una cadena más D399K o D399R en la otra; 3) K439D o K439E en una cadena más E356K o E356R en la otra; y 4) K370D o K370E en una cadena más E357K o E357R en la otra. Además, las sustituciones R355D, R355E, K360D o K360R en ambas cadenas pueden estabilizar los heterodímeros cuando se usan otras alteraciones de heterodimerización. Las sustituciones de par de carga específicas se pueden usar o bien solas o con otras sustituciones de par de carga. Ejemplos específicos de pares únicos de sustituciones de par de carga y combinaciones de los mismos incluyen los

siguientes: 1) K409E en una cadena más D399K en la otra; 2) K409E en una cadena más D399R en la otra; 3) K409D en una cadena más D399K en la otra; 4) K409D en una cadena más D399R en la otra; 5) K392E en una cadena más D399R en la otra; 6) K392E en una cadena más D399K en la otra; 7) K392D en una cadena más D399R en la otra; 8) K392D en una cadena más D399K en la otra; 9) K409D y K360D en una cadena más D399K y E356K en la otra; 10) K409D y K370D en una cadena más D399K y E357K en la otra; 11) K409D y K392D en una cadena más D399K, E356K y E357K en la otra; 12) K409D y K392D en una cadena y D399K en la otra; 13) K409D y K392D en una cadena más D399K y E356K en la otra; 14) K409D y K392D en una cadena más D399K y D357K en la otra; 15) K409D y K370D en una cadena más D399K y D357K en la otra; 16) D399K en una cadena más K409D y K360D en la otra; y 17) K409D y K439D en una cadena más D399K y E356K en la otra. Cualquiera de estas alteraciones de heterodimerización se pueden usar en polipéptidos que comprenden las regiones F variantes descritas en el presente documento, que se unen a FcγRIIIA con una K_D inferior de un polipéptido similar con una región Fc no alterada.

Una “**molécula diana**”, como significa en el presente documento, es una molécula a la que se une la región de unión de una proteína que contiene Fc descrita en el presente documento. En algunas realizaciones, una molécula diana es una proteína que se expresa a altos niveles, por ejemplo, sobre una célula cancerosa, sobre una célula que media una afección autoinmune o inflamatoria, sobre una célula infectada, sobre un agente infeccioso, o sobre una célula que media una función efectora inmune, por ejemplo, una célula NK.

“**Carga tumoral**” se refiere al número de células cancerosas viables, el número de sitios de tumor, y/o el tamaño del(de los) tumor(es) en un paciente que padece de un cáncer. Una reducción en la carga tumoral se puede observar, por ejemplo, como una reducción en la cantidad de un antígeno o proteína asociada a tumor en la sangre u orina de un paciente, una reducción en el número de células tumorales o sitios tumorales, y/o una reducción en el tamaño de uno o más tumores.

Una “**cantidad terapéuticamente eficaz**” de una proteína que comprende una región Fc variante como se describe en el presente documento es una cantidad que tiene el efecto de, por ejemplo, reducir o eliminar la carga tumoral de un paciente de cáncer o reducir o eliminar los síntomas de cualquier enfermedad que se trata con la proteína. Una cantidad terapéuticamente eficaz no necesita eliminar completamente todos los síntomas de la afección, pero pueden reducir la gravedad de uno o más síntomas o retrasar el comienzo de síntomas más serios o una enfermedad más seria que se puede dar con alguna frecuencia después de la afección tratada.

“**Tratamiento**” de cualquier enfermedad mencionada en el presente documento abarca un alivio de al menos un síntoma de la enfermedad, una reducción de la gravedad de la enfermedad, o el retraso o prevención de la progresión de la enfermedad a síntomas más serios que pueden, en algunos casos, acompañar la enfermedad o conducir a al menos otra enfermedad. El tratamiento no necesita significar que la enfermedad está totalmente curada. Un agente terapéutico útil solamente necesita reducir la gravedad de una enfermedad, reducir la gravedad de uno o más síntomas asociados con la enfermedad o su tratamiento, o retrasar el comienzo de síntomas más serios o una enfermedad más seria que se pueden dar con alguna frecuencia después de la afección tratada.

Proteínas que contienen regiones Fc variantes

La presente invención abarca proteínas que contienen Fc que comprenden una región de unión que se une a una molécula diana y una región Fc variante. Estas incluyen anticuerpos y proteínas de fusión Fc, que contienen regiones Fc de IgG1 o IgG3 humanas, que están alteradas en los residuos de aminoácidos seleccionados en comparación con una región Fc humana sin cambiar y que se unen a FcγRIIIA con afinidad aumentada en comparación con la región Fc humana o no humana sin cambiar. Puesto que FcγRIIIA interactúa con una región Fc de una manera asimétrica, es decir, poniendo en contacto diferentes residuos de aminoácidos en las dos cadenas polipeptídicas de Fc que componen la región Fc, las regiones Fc alteradas asimétricas descritas en el presente documento pueden ser particularmente eficaces en la afinidad refuerzo a FcγRIIIA y, por tanto, ADCC. Las regiones Fc humanas alteradas descritas en el presente documento están alteradas de modo que las secuencias de las dos cadenas polipeptídicas de Fc que componen una región Fc, es decir, la cadena A y la cadena B, difieren. Para facilitar la formación de tales regiones Fc alteradas asimétricamente, estas regiones Fc también pueden contener alteraciones de heterodimerización, las cuales son diferentes de las cadenas A y B, que rechazan la formación de proteínas que contienen Fc homodiméricas y fomentan la formación de proteínas que contienen Fc heterodiméricas. Las proteínas que contienen las regiones Fc alteradas pueden ser más eficaces en la unión a FcγRIIIA y en la suscitación de ADCC en comparación con las proteínas que comprenden una región Fc no alterada, o a una región Fc que contiene solamente alteraciones de heterodimerización, y pueden tener eficacia incrementada como compuestos terapéuticos *in vivo*, por ejemplo, en indicaciones oncológicas o neoplásicas y/o en tratamiento de afecciones autoinmunes o infecciosas. En el presente documento entre los anticuerpos y las proteínas de fusión Fc descritas se incluyen los heterodímeros en los que cada cadena polipeptídica de Fc se fusiona a una proteína diferente. Tales proteínas de fusión Fc son bivalentes y biespecíficas. También se incluyen proteínas de fusión Fc bivalentes y monoespecíficas. Igualmente, los anticuerpos enteros monoespecíficos o biespecíficos, anticuerpos monovalentes y scFv-Fc biespecíficos o monoespecíficos están entre los muchos tipos de proteínas que podrían contener las regiones Fc alteradas descritas en el presente documento. La invención también abarca ácidos nucleicos que codifican las cadenas polipeptídicas de Fc en las regiones Fc alteradas y las proteínas que contienen

estas cadenas polipeptídicas de Fc. También se proporcionan métodos de producción de estas proteínas y métodos de uso de estas proteínas para tratar diversas afecciones humanas.

5 Hay tres diferentes clases de receptores Fc gamma (FcγR) humanos para anticuerpos IgG, FcγRI, FcγRII y FcγRIII. Abès y col. (2009), *Expert Rev. Clin. Immunol.* 5(6):735-747. Se han caracterizado siete subclases, es decir, FcγRIA, FcγRIB, FcγRIIA, FcγRIIB, FcγRIIC, FcγRIIIA, y FcγRIIIB. *Id.* Estas subclases además se pueden dividir en isoformas resultantes del empalme alternativo, y también se han encontrado diversas variantes alélicas que tienen capacidades diferentes para unir diversas subclases de IgG y desencadenar funciones efectoras. *Id.* La mayoría de estos receptores activan células después de su activación por anticuerpos IgG, especialmente anticuerpos IgG1 o 10 IgG3, que conducen a citotoxicidad, liberación de citoquina y fagocitosis/endocitosis seguido de presentación de antígeno. La activación se mide a través de un motivo de activación basado en tirosina inmunoreceptor (ITAM) presente o bien en el dominio intracelular del FcγR o en la parte intracelular de una proteína de señalización accesoria. *Id.* Los receptores FcγRIIB son el único FcγR inhibidor humano conocido y contienen un motivo inhibidor basado en tirosina inmunoreceptor (ITIM) en el dominio intracelular que media la inhibición de la activación celular. 15 *Id.*

La afinidad aumentada de un anticuerpo para FcγRIIIA puede ser indicativo de eficacia clínica aumentada en indicaciones oncológicas. Las variantes alélicas de FcγRIIIA que tienen o bien una valina o una fenilalanina en el aminoácido 158 se han asociado con mayor o menor afinidad de unión a IgG, respectivamente. Koene y col. (1997), 20 *Blood* 90(3):1.109-1.114. Estas diferencias alélicas también se correlacionan significativamente con la eficacia clínica observada en pacientes con linfoma folicular tratado con rituximab (un anticuerpo monoclonal anti-CD20 de IgG1) y en pacientes con tumores sólidos tratados con o bien cetuximab (un anticuerpo monoclonal anti-receptor del factor de crecimiento epidérmico de IgG1 quimérico) o trastuzumab (un anticuerpo monoclonal anti-receptor 2 del factor de crecimiento epidérmico de IgG1 quimérico). Abes y col. (2009), *Expert Rev. Clin. Immunol.* 5(6):735-747. 25 En el presente documento se proporcionan proteínas que contienen Fc que tienen afinidad aumentada para ambos alelos de FcγRIIIA y, por lo tanto, también podría tener eficacia aumentada como compuestos terapéuticos en las indicaciones oncológicas.

Cada una de las cadenas polipeptídicas de Fc, es decir, la cadena A y la cadena B que juntas componen una región 30 Fc alterada de la invención, tienen secuencias de aminoácidos que difieren debido a las sustituciones de aminoácidos relativas a la secuencia de una cadena polipeptídica de Fc de IgG humana. La cadena polipeptídica de Fc es de un polipéptido de Fc de IgG1 o IgG3 humana. En algunas realizaciones, cada cadena polipeptídica de Fc comprende una, dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve o diez sustituciones de aminoácidos relativas a una cadena polipeptídica de Fc humana de origen natural. Como se describe y/o reivindica en el presente documento, 35 las sustituciones se pueden dar, por ejemplo, en uno o más de los siguientes sitios en una cadena polipeptídica de Fc: E233, L234, L235, S239, F241, F243, K246, K248, D249, L251, M252, I253, S254, R255, T256, E258, T260, V264, D265, S267, H268, E269, D270, E272, K274, F275, N276, Y278, V279, D280, V282, E283, V284, H285, N286, A287, K288, T289, K290, R292, E293, E294, Q295, Y296, S298, Y300, R301, V302, V303, V305, T307, L309, H310, Q311, D312, W313, L314, N315, K317, E318, K320, K322, S324, K326, A327, L328, A330, I332, E333, K334, 40 T335, I336, S337, K338, A339, K340, R355, E356, D356, E357, K360, K362, K370, K392, D399, K409, D413 y/o K439. Se pueden usar diferentes sustituciones individuales o las mismas enumeradas anteriormente o combinaciones de estas sustituciones en una cadena A y una cadena B de una región Fc. Una región Fc variante puede comprender alteraciones en sitios además de los anteriormente enumerados.

45 En particular, las proteínas que contienen Fc reivindicadas en el presente documento cada una comprende de 1 a 10 sustituciones de aminoácidos en una o ambas de la cadena A y la cadena B que componen la región Fc, seleccionadas de las siguientes, que se numeran según el sistema de UE: E233L, L2341, L234Y, L235S, G236Y, S239D, S239E, S239N, S239T, F243M, F243L, F243V, F243I, K246W, K246E, K246S, K246V, K248Y, K248L, M252D, I253V, I253K, R255S, R255N, T256V, T256Q, E258S, E258V, H268E, H268K, A287F, K288T, K288I, K288L, K290G, K290F, K290S, K290W, K290Q, K290Y, E294L, Y296W, Y296L, S298A, S298C, S298T, V302Q, T307P, T307S, T307E, T307G, L309C, L309S, L309K, L309E, Q311M, N315A, N315S, A330H, A330F, A330M, I332E, K334L, K334V, K334A, K334M y A339T, en las que al menos uno de estos sitios de sustitución de aminoácidos difiere entre las cadenas A y B. 50

55 Los anticuerpos o proteínas de fusión Fc descritas en el presente documento, que comprenden una región Fc, pueden contener una o más de las siguientes sustituciones de aminoácidos particulares en una o ambas de la cadena A y la cadena B que componen la región Fc: E233L, L2341, L234Y, L235S, G236Y, S239D, S239E, S239N, S239T, F243M, F243L, F243V, F243I, K246W, K246E, K246S, K246V, K248Y, K248L, M252D, I253V, I253K, R255S, R255N, T256V, T256Q, E258S, E258V, H268E, H268K, A287F, K288T, K288I, K290G, K290F, K290S, K290W, K290Q, K290Y, E294L, Y296W, Y296L, S298A, S298C, S298T, V302Q, T307P, T307S, T307E, T307G, L309C, L309S, L309K, L309E, Q311M, N315A, N315S, A330H, A330F, A330M, I332E, K334L, K334V, K334A, K334M, A339T, K340N, R355D, R355E, E356K, E356R, D356K, D356R, E357K, E357R, K360D, K360E, K370D, K370E, K392D, K392E, D399K, D399R, K409D, K409E, D413N, K439D y K439E. Además, cualquiera de las proteínas anteriores descritas y/o reivindicadas en el presente documento puede comprender alteraciones 60 adicionales tales como alteraciones de heterodimerización. Por ejemplo, pueden comprender K392D y K409D en una cadena polipeptídica de Fc y E356K y D399K en la otra.

Más particularmente, las proteínas de la invención pueden comprender una región Fc en la que las cadenas A y B comprenden las siguientes sustituciones: (1) K334V en una cadena polipeptídica de Fc y Y296W más S298C en la otra; (2) K334V en una cadena polipeptídica de Fc y L234Y, Y296W y S298C en la otra; (3) L235S, S239D y K334V en una cadena polipeptídica de Fc y L234Y, K290Y y Y296W en la otra; (4) L235S, S239D y K334V en una cadena polipeptídica de Fc y L234Y, Y296W y S298C en la otra; (5) Q311M y K334V en una cadena polipeptídica de Fc y L234Y, F243V y Y296W en la otra; (6) Q311M y K334V en una cadena polipeptídica de Fc y L234Y, E294L y Y296W en la otra, como en, por ejemplo, la SEQ ID NO:8 y la SEQ ID NO:10, respectivamente; (7) Q311M y K334V en una cadena polipeptídica de Fc y L234Y, Y296W y S298C en la otra; (8) S239D y K334V en una cadena polipeptídica de Fc y L234Y, K290Y y Y296W en la otra; (9) S239D y K334V en una cadena polipeptídica de Fc y L234Y, Y296W y S298C en la otra; (10) F243V y K334V en una cadena polipeptídica de Fc y L234Y, K290Y y Y296W en la otra; (11) F243V y K334V en una cadena polipeptídica de Fc y L234Y, Y296W y S298C en la otra; (12) E294L y K334V en una cadena polipeptídica de Fc y L234Y, K290Y y Y296W en la otra; (13) E294L y K334V en una cadena polipeptídica de Fc y L234Y, Y296W y S298C en la otra; (14) K334V en una cadena polipeptídica de Fc y L234Y y Y296W en la otra; (15) K334V en una cadena polipeptídica de Fc y L234Y y S298C en la otra; (16) K334V en una cadena polipeptídica de Fc y E294L y Y296W en la otra; (17) K334V y S298C en una cadena polipeptídica de Fc y L234Y y Y296W en la otra; (18) K334V y S298I en una cadena polipeptídica de Fc y L234Y y Y296W en la otra; (19) K334V y S298T en una cadena polipeptídica de Fc y L234Y y Y296W en la otra; (20) K334V y S298V en una cadena polipeptídica de Fc y L234Y y Y296W en la otra; (21) K334V y S298C en una cadena polipeptídica de Fc y L234Y, Y296W y K290Y en la otra; (22) K334V y S298I en una cadena polipeptídica de Fc y L234Y, Y296W y K290Y en la otra; (23) K334V y S298T en una cadena polipeptídica de Fc y L234Y, Y296W y K290Y en la otra; (24) K334V y S298V en una cadena polipeptídica de Fc y L234Y, Y296W y K290Y en la otra; (25) S298T y K334V en una cadena polipeptídica de Fc y L234Y, K290Y y Y296W en la otra, como en, por ejemplo, la SEQ ID NO:16 y la SEQ ID NO:18, respectivamente; (26) A330M y K334V en una cadena polipeptídica de Fc y L234Y, K290Y y Y296W en la otra; (27) A330F y K334V en una cadena polipeptídica de Fc y L234Y, K290Y y Y296W en la otra; (28) Q311M y A330M y K334V en una cadena polipeptídica de Fc y L234Y, E294L y Y296W en la otra; (29) Q311M y A330F y K334V en una cadena polipeptídica de Fc y L234Y, E294L y Y296W en la otra; (30) S298T y A330M y K334V en una cadena polipeptídica de Fc y L234Y, K290Y y Y296W en la otra; (31) S298T y A330F y K334V en una cadena polipeptídica de Fc y L234Y, K290Y y Y296W en la otra; (32) S239D y A330M y K334V en una cadena polipeptídica de Fc y L234Y, K290Y y Y296W en la otra; (33) S239D y S298T y K334V en una cadena polipeptídica de Fc y L234Y, K290Y y Y296W en la otra; (34) A330M y K334V en una cadena polipeptídica de Fc y K290Y y Y296W en la otra; (35) A330M y K334V en una cadena polipeptídica de Fc y E294L y Y296W en la otra; (36) A330M y K334V en una cadena polipeptídica de Fc y L234Y y Y296W en la otra; (37) E233L y Q311M y K334V en una cadena polipeptídica de Fc y L234Y, E294L y Y296W en la otra; (38) L234I y Q311M y K334V en una cadena polipeptídica de Fc y L234Y, E294L y Y296W en la otra; (39) E233L y A330M y K334V en una cadena polipeptídica de Fc y L234Y, K290Y y Y296W en la otra; (40) L234I y Q311M y K334V en una cadena polipeptídica de Fc y L234Y, K290Y y Y296W en la otra; (41) A330M y K334V en una cadena polipeptídica de Fc y L234Y y Y296W en la otra; o (42) A330M y K334V en una cadena polipeptídica de Fc y K290Y y Y296W en la otra. Cualquiera de las proteínas anteriores también puede comprender alteración de heterodimerización como se describió anteriormente. En algunas realizaciones, además pueden comprender K392D y K409D en una cadena polipeptídica de Fc y E356K y D399K en la otra.

Ejemplos de secuencias de aminoácidos de cadenas polipeptídicas de Fc, como se describe en el presente documento, incluyen las SEQ ID NO:8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26, 28, 30, 32, 34, 37, 39 y 41. Estas secuencias contienen alteraciones de heterodimerización y sustituciones que aumentan la unión a FcγRIIIA.

Las proteínas que contienen Fc de la invención pueden contener regiones Fc de IgG1 humana heterodimérica. Es decir, las dos cadenas polipeptídicas de Fc que, juntas, componen la región Fc cada una tiene una secuencia de aminoácidos diferente. En algunas realizaciones una región Fc heterodimérica de la invención contiene alteraciones de heterodimerización (como se definió anteriormente), facilitando así mucho la producción de proteínas que contienen el Fc heterodiméricas.

Una región Fc de IgG generalmente está glicosilada en N297 cuando es producida por una célula de mamífero, y la ausencia de fucosa en este carbohidrato puede incrementar la unión a FcγRIIIA y la capacidad de un anticuerpo IgG de suscitar ADCC. Malphettes y col. (2010), *Biotechnol. Bioeng.* 106(5):774-783. Se han explorado un número de planteamientos para la producción de anticuerpos desfucosilados que incluyen el uso de la línea celular CHO Lec13 para producir anticuerpos, el uso de una línea celular para la producción de anticuerpo en la cual se ha alterado el gen de la alfa-1,6-fucosiltransferasa (*FUT8*) o el gen del transportador de GDP-fucosa (*GFT*), el uso de una línea celular para la producción de anticuerpo que contiene un pequeño ARN interferente frente al gen *FUT8* o el gen de la GDP-manosa 4,6-deshidratasa, o expresión conjunta en una línea celular productora de anticuerpo de β-1,4-N-acetilglucosaminiltransferasa III (*GnT-III*) y α-manosidasa de Golgi II (*ManII*). Ishiguro y col. (2010), *Cancer Sci* 101:2.227-2.233. Las proteínas que contienen Fc, incluyendo anticuerpos y proteínas de fusión Fc, descritas en el presente documento pueden estar "desfucosiladas", es decir, básicamente libres de fucosa o conteniendo solamente cantidades menores de fucosa. Como significa en el presente documento, al menos aproximadamente 85 %, 90 % o 95 % de los glicanos liberados de una preparación de proteína desfucosilada no contiene fucosa. Los términos "desfucosilado" y "afucosilado" se usan intercambiamente en el presente documento. Tales proteínas se pueden producir como se describió anteriormente, por ejemplo, en células *FUT8^{-/-}* o *GFT^{-/-}*. Los contenidos de fucosa de una

proteína se pueden determinar por lo descrito por Ishiguro y col. (2010), *Cancer Sci* 101:2.227-2.233, en 2228-2229.

Se conocen muchas proteínas que se expresan a niveles altos sobre células cancerosas, sobre células que median una afección autoinmune o inflamatoria, o sobre agentes infecciosos o células infectadas. Tales proteínas son moléculas diana potenciales para proteínas que contienen Fc terapéuticas descritas en el presente documento. Anticuerpos o proteínas de fusión Fc que se unen a tales proteínas diana potenciales son particularmente apropiadas para su uso con la presente invención. Las proteínas diana potenciales que se sabe que se expresan sobre células cancerosas humanas incluyen las siguientes proteínas humanas: WT1, MUC1, LMP2, EGFRvIII, HER-2/neu, MAGE-A3, NY-ESO-1, PSMA, GM2/GD2 sintasa, CEA, MLANA/MART1, gp100, survinin, antígeno específico de próstata (PSA), telomerasa transcriptasa inversa (hTERT), puntos de rotura de la translocación del sarcoma, EPHA2, ácido prostático fosfatasa (PAP), inhibidor de melanoma de apoptosis (ML-IAP), α -fetoproteína (AFP), molécula de adhesión celular epitelial (EpCAM), ERG, péptido NA17.A2 (VLPDVFIRC), genes Pax 3 (PAX3), linfoma anaplásico quinasa (ALK), receptor andrógeno, ciclina B1, ácido polisialílico, proteína de unión a GTP relacionada con rho RhoC, oncogen relacionado con mielocitomatosis viral v-myc (MYCN), TRP-2, gangliósido GD3, fucosil GM1, mesotelina, antígeno de célula madre de próstata (PSCA), MAGE-A1, CYP1B1, PLAC1, GM3, BORIS, tetranectina (TN), ETV6-AML1 (especialmente péptidos que incluyen el punto de rotura), NY-BR-1, RGS5, SART3, STn, anhidrasa carbónica IX, PAX5, precursor de la proteína de unión a proacrosina sp32 (OY-TES-1), proteína de esperma 17 (Sp17), LCK, antígeno asociado a melanoma de alto peso molecular (HMWMAA, también conocido como proteoglicano condroitin sulfato de melanoma, AKAP-4, SSX2, XAGE-1, B7H3 (también conocida como CD276), legumaina, TIE2, proteína del gen 4 asociada a próstata (PAGE-4), receptor del factor de crecimiento endotelial vascular 2 (VEGFR2), protamina 2 (también conocida como MAD-CT-1), glomulina (también conocida como FAP), PDGFR- β , SSX2, SSX5, antígeno relacionado con Fos 1, CD20, integrina α v β 3, antígeno oncofetal 5T4, CA IX, CD5, CD19, CD22 (también conocida como Siglec-2), CD30 (también conocida como TNFRSF1), CD33 (también conocida como Siglec-3), CD40, CD44V6, CD55, CD56 (también conocida como NCAM), CTLA-4 (también conocida como CD152), EGFR, GD2, HER2, HLA-DR10 (MHC II), IGF1R, IL-6, sialil Lewis Y, TAG-72, TAL6, TRAILR2, VEGF, CD52 (también conocida como CAMPATH-1), CD4, CD73, CA125 (también conocida como MUC16), CD66e, CD80 (también conocida como B7-1), PDGFR β , antígeno de membrana específica de próstata (PSMA, también conocido como glutamato carboxipeptidasa 2, entre muchos otros nombres). Los antígenos cancerosos también incluyen la proteína del virus del herpes 4 LMP2, las proteínas del papilomavirus humano E6 y E7, y la glicoceramida globo H (como se describe en Gilewski y col. (2001), *Proc. Natl. Acad. Sci.* 98(6):3.270-3.275), la subunidad α 4 de las integrinas α 4 β 1 y α 4 β 7, la integrina α 4 β 7, BAFF, APRIL, CD2, CD3, CD20, CD52, CD73, CD80, CD86, la proteína complemento C₅, IgE, IL-1 β , IL-5, IL-6R, IL-12, IL-23, y el factor de necrosis tumoral α (TNF α).

Otras dianas incluyen proteínas u otras moléculas expuestas sobre la superficie de organismos patógenos incluyendo virus, bacterias (incluyendo las especies *Borrelia*, *Staphylococcus*, *Escherichia*, entre muchas otras especies), hongos (incluyendo levadura), giardia, ameba, protistas eucariotas del género *Plasmodium*, ciliados, tripanosomas, nematodos y otros parásitos eucariotas.

En realizaciones en las que la proteína que contiene Fc es mono-específica o biespecífica o multiespecífica, la proteína que contiene Fc puede unir uno o dos o múltiples moléculas diana, las cuales pueden ser moléculas diana idénticas o diferentes y pueden ser monómeros o multímeros, sobre las mismas células o diferentes tipos de células, para antagonizar o agonizar la ruta de señalización; o para incrementar la avidéz o especificidad de una interacción entre una molécula diana y otra molécula (que puede o no puede ser una molécula diana). En otro aspecto, una proteína que contiene Fc biespecífica o multiespecífica se puede unir a una molécula diana, tal como las mencionadas en los párrafos anteriores, y otra molécula, que también puede ser una molécula diana, expresada a altos niveles sobre una célula implicada en la mediación de una respuesta citotóxica por el sistema inmune, tal como, por ejemplo, NKG2D sobre células NK o CD3 o receptor de linfocito T sobre linfocitos T. Como se explicó anteriormente, la molécula diana podría ser, por ejemplo, una de las siguientes: (1) una proteína humana que se expresa selectivamente sobre células cancerosas; (2) una proteína de un virus u otro patógeno que se expresa altamente sobre la superficie del patógeno o sobre la superficie de una célula hospedadora infectada con patógeno; o (3) una proteína humana que se expresa selectivamente sobre la superficie de un tipo de célula humana que mide una afección tal como una enfermedad autoinmune o inflamatoria.

55 **Ácidos nucleicos que codifican proteínas que contienen regiones Fc alteradas**

También se proporcionan los ácidos nucleicos que codifican las cadenas polipeptídicas de Fc de las proteínas que contienen Fc descritas en el presente documento. En un aspecto, se proporcionan ácidos nucleicos que codifican polipéptidos Fc, y/o proteínas que contienen Fc que los comprenden, que comprenden una o más de las siguientes secuencias de aminoácidos: SEQ ID NO:8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26, 28, 30, 32, 34, 37, 39 o 41. Ejemplos de secuencias que codifican tales cadenas polipeptídicas de Fc incluyen las SEQ ID NO:7, 9, 11, 13, 15, 17, 19, 21, 23, 25, 27, 29, 31, 33, 36, 38 y 40. Estos ácidos nucleicos codifican las secuencias de aminoácidos de las SEQ ID NO:8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26, 28, 30, 32, 34, 37, 39 y 41, respectivamente. La presente invención también abarca muchas secuencias de ácidos nucleicos adicionales que codifican las muchas cadenas polipeptídicas de Fc variantes descritas en el presente documento. Estos ácidos nucleicos son útiles para, entre otros, la producción de proteínas recombinantes que contienen cadenas polipeptídicas de Fc alteradas, como se describe en el presente

documento. Estas cadenas polipeptídicas de Fc alteradas pueden ser parte de una región Fc heterodimérica que se une a FcγRIIIA con afinidad aumentada, como se muestra mediante la unión con una K_D menor que una región Fc tipo silvestre. Tales ácidos nucleicos también pueden codificar una secuencia señal que facilita la secreción de una proteína en células mamíferas y/o una región de unión que se une a una molécula diana. Se entiende en la técnica que las secuencias señal se escinden del resto de una proteína durante la maduración y no son parte de una proteína madura, aunque estén codificadas en un ácido nucleico que codifica la proteína. Las secuencias señal se pueden identificar fácilmente, por ejemplo, como se describe en Kertein y col. (2000), *Bioinformatics* 16(8):741-742, Nielsen and Krogh (1998), *Proc. Sixth Int. Conf. on Intelligent Systems for Molecular Biol* (AAAI Press): 122-130, Nielsen y col. (1997), *Protein Eng.* 10(1):1-6, y Nielsen y col. (1997), *Int. J. Neural Systems* 8(5&6):581-599. Los ácidos nucleicos de la invención incluyen ADN y ARN en formas de una o doble cadena. En algunas realizaciones, tanto las cadenas polipeptídicas de una proteína que contiene Fc heterodimérica se codifican sobre una molécula de ácido nucleico única. En otras realizaciones, se pueden codificar una proteína que contiene Fc heterodimérica sobre dos, tres o más moléculas de ácidos nucleicos.

Un “ácido nucleico aislado”, como significa en el presente documento, es un ácido nucleico que se ha separado de secuencias adyacentes presentes en el genoma del organismo del cual se aisló inicialmente el ácido nucleico. Por ejemplo, si el ácido nucleico codifica una región Fc de IgG1 humana alterada, las secuencias adyacentes serían las secuencias adyacentes a las secuencias que codifican un Fc de IgG1 en el genoma humano. Hay que entender que los ácidos nucleicos sintetizados químicamente o producidos enzimáticamente por PCR son “ácidos nucleicos aislados”, como significa en el presente documento. Una molécula de ácido nucleico aislado se refiere a una molécula de ácido nucleico en la forma de un fragmento separado o como un componente de una construcción de ácido nucleico mayor.

Métodos de producción de proteínas que contienen Fc con regiones Fc variantes

Las proteínas que contienen Fc, tales como anticuerpos y proteínas de fusión, abarcadas por la invención se pueden producir por métodos conocidos en la técnica. Más específicamente, un ácido nucleico que codifica una proteína que contiene Fc incluyendo una cadena polipeptídica de Fc alterada, como se describe en el presente documento, se puede introducir en un vector, el cual se puede introducir en una célula hospedadora. Puesto que las proteínas que contienen Fc heterodiméricas descritas en el presente documento contienen necesariamente al menos dos cadenas polipeptídicas, ácidos nucleicos que codifican estas cadenas pueden estar presentes sobre o bien un vector único o dos o más vectores. Si se usa más de un vector, estos vectores se pueden introducir juntos en una célula hospedadora. Los vectores y las células hospedadoras que comprenden los ácidos nucleicos que codifican tal proteína están abarcados por la invención. La célula hospedadora que contiene los ácidos nucleicos que codifican la proteína que contiene Fc se puede cultivar bajo condiciones de modo que se puede expresar la proteína. La proteína expresada, a continuación, se puede obtener del medio en el que las células se cultivan o de las propias células y se purifican por cualquiera de los muchos medios apropiados conocidos en la técnica. Además, los métodos de ingeniería genética para la producción de proteínas incluyen la expresión de las moléculas de polinucleótido en sistemas de expresión libre de célula, en hospedadores celulares, en tejidos y en modelos animales, según los métodos conocidos.

El vector puede incluir un marcador seleccionable y un origen de replicación, para la propagación en un hospedador. El vector además puede incluir secuencias reguladoras transcripcionales o de traducción adecuadas, tales como las derivadas de genes de mamífero, aves, microbios, virales, vegetales o de insecto, unidas de manera operable al ácido nucleico que codifica la proteína. Ejemplos de tales secuencias reguladoras incluyen promotores transcripcionales, operadores, o potenciadores, sitios de unión ribosómica a ARNm, y secuencias apropiadas que controlan la transcripción y la traducción. Las secuencias de nucleótidos están unidas de manera operable cuando la secuencia reguladora se relaciona funcionalmente al ADN que codifica la proteína diana. Por tanto, una secuencia de nucleótidos promotora está unida de manera operable a una secuencia de ácidos nucleicos si la secuencia de nucleótidos promotora dirige la transcripción de la secuencia de ácidos nucleicos.

Las células hospedadoras adecuadas para la expresión de los anticuerpos o proteínas de fusión Fc descritas en el presente documento incluyen células procariotas, células de levadura, células vegetales, células de insecto y células eucariotas superiores, incluyendo células de mamífero o de ave. Las secuencias reguladoras en el vector se elegirán de modo que sean operables en la célula hospedadora. Las células hospedadoras procariotas adecuadas incluyen bacterias del género *Escherichia*, *Bacillus* y *Salmonella*, así como miembros del género *Pseudomonas*, *Streptomyces* y *Staphylococcus*. Para la expresión en células procariotas, por ejemplo, en *E. coli*, la molécula de polinucleótido que codifica la proteína preferiblemente incluye un residuo de metionina N-terminal para facilitar la expresión del polipéptido recombinante. La metionina N-terminal se puede escindir opcionalmente del polipéptido expresado. Las células hospedadoras de levadura adecuadas incluyen células de los géneros incluyendo *Saccharomyces*, *Pichia* y *Kluveromyces*. Hospedadores de levadura preferidos son *S. cerevisiae* y *P. pastoris*. Un sistema adecuado para la expresión en una célula hospedadora de insecto se describe, por ejemplo, en la reseña de Luckow and Summers ((1988), *BioTechnology* 6:47). Las células hospedadoras de mamífero adecuadas incluyen la línea COS-7 de células de riñón de mono (Gluzman y col. (1981), *Cell* 23:175-182), células de riñón de hámster bebe (BHK), células de ovario de hámster chino (CHO) (Puck y col. (1958), PNAS USA 60:1.275-1.281), CV-1 (Fischer y col. (1970), *Int. J. Cancer* 5: 21-27), células HEK 293 de riñón embrionario humano (“American Type

Culture Collection" (ATCC®) n° de catálogo. CRL-1573), y células de carcinoma cervical humano (HELA) (ATCC® CCL2). Muchas otras células hospedadoras son conocidas en la técnica.

5 Los vectores de expresión para su uso en los hospedadores celulares generalmente comprenden uno o más genes
 marcadores seleccionables fenotípicos. Tales genes codifican, por ejemplo, una proteína que confiere resistencia
 antibiótica o que suministra un requerimiento auxótrofo. Una amplia diversidad de tales vectores está fácilmente
 disponible de fuentes comerciales. Ejemplos incluyen vectores pGEM® (Promega), vectores pSPORT, y vectores
 pPROEX™ (Invitrogen, Life Technologies, Carlsbad, CA), vectores Bluescript (Stratagene), y vectores pQE
 10 (Qiagen). Los vectores de levadura con frecuencia contendrán un origen de secuencia de replicación de un plásmido
 de levadura de 2 μ, una secuencia autónomamente replicativa (ARS), una región promotora, secuencias para
 poliadenilación, secuencias para la terminación de la transcripción, y un gen marcador seleccionable. También se
 pueden usar vectores replicables en tanto levadura como *E. coli* (vectores lanzadera terminados). Además de las
 características anteriormente mencionadas de los vectores de levadura, un vector lanzadera también incluirá
 15 secuencias para la replicación y la selección en *E. coli*. La secreción directa de los polipéptidos diana expresados
 en hospedadores de levadura se pueden conseguir mediante la inclusión de la secuencia de nucleótidos que codifica la
 secuencia líder de α-factor de levadura en el extremo 5' de la proteína que contiene Fc. Brake (1989), *Biotechnology*
 13:269-280.

20 Ejemplos de vectores de expresión adecuados para su uso en células hospedadoras de mamífero incluyen
 pcDNA3.1/Hygro+ (Invitrogen), pDC409 (McMahan y col. (1991), *EMBO J.* 10:2.821-2.832), y pSVL (Pharmacia
 Biotech). Vectores de expresión para su uso en células hospedadoras de mamífero pueden incluir las secuencias
 control transcripcionales y de traducción derivadas de genomas virales. Secuencias promotoras comúnmente
 usadas y secuencias potenciadoras que se pueden usar para promover la transcripción de ARN que codifica las
 25 proteínas descritas en el presente documento, pero no se limitan a, las derivadas del citomegalovirus (CMV),
 Adenovirus 2, virus de polio, y virus del simio 40 (SV40). Se describen métodos para la construcción de vectores
 de expresión de mamífero, por ejemplo, en Okayama and Berg ((1982) *Mol. Cell. Biol.* 2:161-170), Cosman y col.
 ((1986) *Mol. Immunol.* 23:935-941), Cosman y col. ((1984) *Nature* 312:768-771), los documentos EP-A-0 367 566, y
 WO 91/18982.

30 **Usos para proteínas que contienen Fc con unión a FcγRIIIA aumentada**

Las proteínas que contienen Fc de la invención, tales como anticuerpos y proteínas de fusión Fc, se pueden usar
 como compuestos terapéuticos, particularmente en contextos de enfermedad donde la destrucción selectiva de las
 células sobre la cual se expone la molécula diana particular es deseable. Sin embargo, las proteínas que contienen
 35 Fc de la invención también pueden ser útiles para eliminar ligandos solubles, virus o células patógenas extrañas. Por
 ejemplo, en pacientes con cáncer, es deseable destruir las células cancerosas, que pueden expresar selectivamente
 ciertas proteínas que pueden estar dirigidas por las proteínas que contienen Fc descritas en el presente documento.
 Por consiguiente, los anticuerpos o las proteínas de fusión Fc que se unen a tales proteínas diana cancerosas y
 tienen propiedades de destrucción celular aumentadas pueden ser compuestos terapéuticos deseables en
 40 indicaciones cancerosas. Además, también puede ser útil alinear células cancerosas y células citotóxicas en
 proximidad cercana unas a otras usando proteínas que contienen Fc biespecíficas como se describe en el presente
 documento que se unen a una proteína diana cancerosa, es decir, una proteína expresada sobre una célula
 cancerosa, y una proteína expresada sobre una célula citotóxica. Por ejemplo, CD16, que se expresa sobre células
 NK, o NKG2D, que se expresa sobre linfocitos T citotóxicos y células NK, son proteínas expresadas sobre células
 45 citotóxicas que pueden ser proteínas diana. En el asma, una afección inflamatoria, puede ser útil destruir eosinófilos,
 los cuales median el daño de las células en las vías aéreas e inducen la hiperreactividad y la hipersecreción de
 moco. Kolbeck y col. (2010), *J. Allergy Clin. Immunol.* 125:1.344-1.353. Por tanto, las proteínas que contienen Fc
 con propiedades de destrucción celular aumentada frente a antígenos preferiblemente expresados sobre eosinófilos
 pueden ser útiles en el asma. Igualmente, los virus, las células patógenas extrañas o las células hospedadoras
 50 infectadas también pueden estar dirigidas por los anticuerpos o proteínas de Fusión Fc descritas en el presente
 documento.

La invención contempla usos médicos para tratar pacientes que padecen una enfermedad proliferativa celular,
 incluyendo diversas formas de cáncer, con las proteínas que contienen Fc descritas en el presente documento o con
 55 combinaciones que incluyen proteínas que contienen Fc que comprenden una región Fc alterada más otros agentes
 terapéuticos. El paciente puede ser un ser humano, pero los usos médicos se pueden aplicar a cualquier mamífero,
 incluyendo animales domésticos tales como mascotas y animales de granja. También se proporcionan
 composiciones para su uso en tales usos médicos que incluyen una cantidad terapéuticamente eficaz de una
 proteína que contiene una región Fc alterada y, en algunos casos, una cantidad eficaz de otro agente terapéutico,
 60 más un diluyente, excipiente o vehículo adecuado.

Las proteínas que contienen Fc descritas en el presente documento se pueden administrar con una diversidad de
 fármacos y tratamientos que se han empleado mucho en el tratamiento de cáncer tales como, por ejemplo, agentes
 65 quimioterapéuticos, no quimioterapéuticos, agentes antineoplásicos, y/o de radiación. Por ejemplo, la quimioterapia
 y/o la radiación se puede dar antes, durante y/o después de cualquiera de los tratamientos descritos en el presente
 documento. Ejemplos de agentes quimioterapéuticos incluyen, pero no se limitan a, cisplatina, taxol, etopósido,

mitoxantrona (Novantrone®), actinomicina D, cicloheximida, camptotecina (o sus derivados solubles en agua), metotrexato, mitomicina (por ejemplo, mitomicina C), dacarbazina (DTIC), anticuerpos antineoplásicos tales como adriamicina (doxorubicina) y daunomicina, y todos los agentes quimioterapéuticos anteriormente mencionados.

- 5 Entre los textos que proporcionan orientación para la terapia cancerosa es “Cancer, Principles and Practice of Oncology”, 4ª Edición, DeVita y col., Eds. J. B. Lippincott Co., Philadelphia, PA (1993). Se elige un planteamiento terapéutico apropiado según el tipo particular de cáncer, y otros factores tales como la condición general del paciente, como se reconoce en el campo pertinente. Los tratamientos descritos en el presente documento que usan los anticuerpos o proteínas de fusión Fc descritas en el presente documento se pueden añadir a un régimen de
10 terapia que usa otros agentes antineoplásicos en el tratamiento de una paciente con cáncer.

Las proteínas que contienen Fc descritas en el presente documento se pueden usar para tratar enfermedades proliferativas celulares, incluyendo cáncer, que implican la proliferación no regulada y/o inapropiada de células, algunas veces acompañadas de destrucción de tejido adyacente y crecimiento de nuevos vasos sanguíneos, que
15 pueden permitir la invasión de células cancerosas en nuevas áreas, es decir, metástasis. Incluidas dentro de las afecciones tratables con las proteínas descritas en el presente documento están las afecciones no malignas que implican crecimiento celular inapropiado, incluyendo pólipos colorrectales, isquemia cerebral, enfermedad cística ordinaria, enfermedad de riñón poliquístico, hiperplasia prostática benigna y endometriosis. Otras enfermedades proliferativas celulares que se pueden tratar usando las proteínas de la presente invención son, por ejemplo,
20 cánceres que incluyen mesoteliomas, carcinomas de célula escamosa, mielomas, osteosarcomas, glioblastomas, gliomas, carcinomas, adenocarcinomas, melanomas, sarcomas, leucemias agudas y crónicas, linfomas y meningiomas, enfermedad de Hodgkin, síndrome de Sézary, mieloma múltiple, y cánceres de pulmón, pulmón de célula no pequeña, pulmón de célula pequeña, laringe, pecho, cabeza y cuello, vejiga, ovario, piel, próstata, cervical, vaginal, gástricos, de célula renal, riñón, pancreáticos, colorrectales, endometriales y esofágicos, hepatobiliares, de
25 hueso, piel y hematológicos, así como cánceres de la cavidad nasal y senos paranasales, la nasofaringe, la cavidad oral, la orofaringe, la laringe, la hipofaringe, las glándulas salivares, el mediastino, el estómago, el intestino delgado, el colon, el recto y la región anal, el útero, la uretra, el pene, los testículos, la vulva, el sistema endocrino, el sistema nervioso central y las células de plasma.

30 Las proteínas que contienen Fc descritas en el presente documento pueden encontrar uso adicional en otros tipos de afecciones en las que es beneficioso reducir ciertos tipos celulares. Por ejemplo, puede ser beneficioso la reducción de eosinófilos humanos en asma, linfocitos B humanos en exceso en lupus eritematoso sistémico, linfocitos T Th2 humanos en exceso en afecciones autoinmunes, o células infectadas por patógeno en enfermedades infecciosas.

35

Composiciones farmacéuticas

La invención incluye composiciones farmacéuticas que comprenden las proteínas que contienen Fc descritas en el presente documento, tales como anticuerpos o proteínas de fusión Fc. Tales composiciones comprenden una
40 cantidad terapéuticamente eficaz de una proteína que contiene Fc que tiene una región Fc alterada con uno o más componentes adicionales tales como un vehículo, excipiente o diluyente fisiológicamente aceptable. Tales componentes adicionales pueden incluir tampones, carbohidratos, polioles, aminoácidos, agentes quelantes, estabilizadores y/o conservantes, entre muchas posibilidades.

Dosis y métodos de administración

Las composiciones que comprenden proteínas que contienen Fc que comprenden una región Fc alterada descrita anteriormente se pueden administrar por cualquier medio apropiado que incluye, pero no se limita a, administración parenteral, tópica, oral, nasal, vaginal, rectal o pulmonar (por inhalación). Si se inyecta, la(s) composición(es) se
50 pueden administrar intraarticularmente, intravenosamente, intraarterialmente, intramuscularmente, intraarticularmente, intraperitonealmente, subcutáneamente por inyección de bolo o infusión continua. Se contempla la administración localizada, es decir, en el sitio de la enfermedad, tal como inyección directa en un tumor, como son la administración transdérmica y liberación sostenida a partir de implantes o parches de piel. La administración por inhalación incluye, por ejemplo, inhalación nasal u oral, el uso de un nebulizador, inhalación en forma aerosol, y
55 similares. La administración por un supositorio insertado en una cavidad corporal se puede conseguir, por ejemplo, insertando una forma sólida de la composición en una cavidad corporal elegida y permitiéndole que se disuelva. Otras alternativas incluyen gotas de ojos, preparaciones orales tales como píldoras, pastillas para chupar, jarabes y goma de mascar, y preparaciones tópicas tales como lociones, geles, aerosoles y pomadas. En la mayoría de los casos, las moléculas terapéuticas que son polipéptidos tales como los descritos en el presente documento se
60 pueden administrar de manera tópica o por inyección o inhalación.

Las proteínas que contienen Fc descritas en el presente documento se pueden administrar en cualquier dosis, frecuencia y duración que puedan ser eficaz para tratar la afección a tratar. La dosis terapéuticamente eficaz depende de la naturaleza molecular de la proteína que contiene Fc y la naturaleza del trastorno a tratar. El
65 tratamiento puede ser continuado mientras que sea necesario alcanzar los resultados deseados. La proteína que contiene Fc se puede administrar como una dosis única o como una serie de dosis dadas periódicamente,

incluyendo múltiples veces por día, diaria, cada dos días, dos veces a la semana, tres veces a la semana, semanalmente, cada dos semanas, mensualmente, cada seis semanas, cada dos meses, cada tres, cuatro, cinco o seis meses, entre otros posibles regímenes de dosis. La periodicidad del tratamiento puede o no puede ser constante a lo largo de la duración del tratamiento. Por ejemplo, el tratamiento se puede dar inicialmente en intervalos semanales y después darse cada dos semanas o en intervalos más largos como se mencionó anteriormente. Los tratamientos que tienen duraciones de días, semanas, meses o años son abarcados por la invención. El tratamiento puede ser discontinuo y, a continuación, reiniciado. La dosis de mantenimiento se puede administrar después de un tratamiento inicial.

La dosis se puede medir como miligramos por kilogramo de peso corporal (mg/kg) o como miligramos por metro cuadrado de superficie de piel (mg/m²) o como una dosis fijada, independientemente de la altura o el peso. Todas estas son unidades de dosis estándar en la técnica. El área superficial de piel de una persona se calcula a partir de su altura y peso usando una fórmula estándar. Con respecto a las proteínas que contienen una región Fc alterada descritas en el presente documento, la dosis puede oscilar de aproximadamente 0,01 mg/kg a aproximadamente 70 mg/kg, opcionalmente de aproximadamente 0,1 mg/kg a aproximadamente 20 mg/kg, de aproximadamente 0,1 mg/kg a aproximadamente 5 mg/kg, de aproximadamente 0,3 mg/kg a aproximadamente 3 mg/kg, o aproximadamente 2,5 mg/kg. Alternativamente, los pacientes de todos los tamaños pueden recibir la misma dosis, que oscila de aproximadamente 1 mg a aproximadamente 500 mg, opcionalmente de aproximadamente 10 mg a aproximadamente 100 mg, de aproximadamente 25 mg a aproximadamente 50 mg, de aproximadamente 100 mg a aproximadamente 300 mg, o de aproximadamente 100 mg a aproximadamente 200 mg. Alternativamente, la dosis puede ser de aproximadamente 5 mg/m² a aproximadamente 800 mg/m², de aproximadamente 10 mg/m² a aproximadamente 600 mg/m², o de aproximadamente 25 mg/m² a aproximadamente 500 mg/m². La dosis puede o no puede ser constante a lo largo de la duración del tratamiento. Por ejemplo, la dosis puede intensificarse continuamente a lo largo de la duración del tratamiento. Alternativamente, una primera dosis puede ser mayor que las dosis posteriores. Como alternativa adicional, la dosis se puede reducir en fases posteriores del tratamiento.

La descripción anterior de las realizaciones específicas revela la naturaleza general de la invención de manera que otros pueden modificar fácilmente y/o adaptar tales realizaciones para diversas aplicaciones sin desviarse de los conceptos genéricos presentados en el presente documento. Cualquiera de tales adaptaciones o modificaciones se pretende que estén aceptadas dentro del significado y el intervalo de los equivalentes de las realizaciones descritas. Los siguientes ejemplos pretenden ser ejemplares y no pretenden limitar el alcance de la invención. La fraseología y la terminología empleada en estos ejemplos son con el propósito de descripción y no limitación.

Ejemplos

Ejemplo 1: Construcción y cribado de genotecas de regiones Fc alteradas como heterodímeros de Fc

Construcción de genoteca y cribado primario

Las genotecas de ácidos nucleicos que codifican o bien un scFv-Fc que contiene las sustituciones de par de carga E356K y D399K o una cadena polipeptídica de Fc ("Fc simulado") que contiene las sustituciones de par de carga K392D y K409D, con alteraciones adicionales en sitios seleccionados dentro de las regiones codificantes de Fc, se crearon usando PCR. Para cada sitio dentro de la Fc seleccionada para la sustitución, el ácido nucleico se cambió de modo que se generarían las regiones Fc con todos los veintes aminoácidos diferentes en el sitio seleccionado. Cada codón en el ácido nucleico se distribuyó al azar independientemente de manera que las moléculas de ácido nucleico en la genoteca resultante se modificaron potencialmente cada una dentro de solamente un codón. Un grupo de sitios estaban enteramente dentro de la región bisagra inferior (residuos 230, 231, 232, 233, 234, 235, 236, 237 y 238; véase la Figura 2). La genoteca que contiene los ácidos nucleicos con mutaciones en los sitios codificantes de estos residuos se refirió como la genoteca "Tier 1". Otro grupo de sitios estaban dentro de la región C_H2 y o bien estaban cerca o eran parte del área que contacta con FcγRIIIA (239, 241, 255, 256, 258, 264, 265, 267, 268, 269, 270, 272, 276, 280, 285, 286, 290, 294, 295, 296, 298, 300, 307, 309, 315, 326, 327, 328, 330, 332, 333, 334, 337 y 339; véase la figura 2). La genoteca que contiene ácidos nucleicos con mutaciones en sitios codificantes de estos residuos se refirió como la genoteca "Tier 2". Un tercer grupo incluía sitios dentro de la región C_H2 que estaban expuestos a disolvente, pero no estaban cerca de o eran parte del área que contacta con FcγRIIIA (243, 246, 248, 249, 251, 252, 253, 254, 260, 274, 275, 278, 279, 282, 283, 284, 287, 288, 289, 292, 293, 301, 302, 303, 305, 310, 311, 312, 313, 314, 317, 318, 320, 322, 324, 335, 336, 338 y 340; véase la Figura 2). La genoteca que contiene ácidos nucleicos con mutaciones en los sitios codificantes de estos residuos se refirió como la genoteca "Tier 3". La Figura 2 muestra las posiciones de estos sitios dentro de una región Fc de IgG1 humana.

A más detalle, se subclonó un fragmento de ADN que codifica el scFv del anticuerpo M315 (un anticuerpo anti NKG2D de ratón de rata) fusionado a un polipéptido de Fc de IgG1 humana con las mutaciones de par de carga E356K y D399K en el dominio C_H3 en el vector de expresión de mamífero pTT5. Zhang y col. (2009), *Protein Expression and Purification* 65(1):77-82. Un fragmento de ADN que codifica un polipéptido de Fc de hulgG1 con las mutaciones de par de carga K392D y K409D en el dominio C_H3 también se subclonó en pTT5. Las seis genotecas de Fc pequeñas anteriormente descritas se produjeron usando empalme por extensión de solapamiento por la reacción en cadena de polimerasa (SOE por PCR) como se describe más adelante. Véase, por ejemplo, Warrens y

col. (1997), *Gene* 186:29-35.

Las genotecas se produjeron como sigue. Para cada uno de los 82 codones seleccionados dentro de cada región codificante de Fc, se produjo un oligonucleótido distribuido al azar en las primeras dos posiciones del codón y que tenía o bien una G o una C en la tercera posición (un "codón NNG/C") (un "oligonucleótido NNG/C"). Este codón NNG/C se colocó en la mitad del oligonucleótido NNG/C con aproximadamente 21 bases que se extienden en dirección 5' y dirección 3'. El oligonucleótido NNG/C se orientó de modo que su extremo 5' estaba en dirección 5' de su extremo 3' en la región codificante de Fc. Por consiguiente, los "oligonucleótidos inversos" que emparejan las 21 bases en dirección 5' de los oligonucleótidos NNG/C se sintetizaron individualmente. Un cebador en dirección 3' universal se combinó con cada uno de los oligonucleótidos NNG/C y se sometió a reacción en cadena de polimerasa (PCR) para producir fragmentos en dirección 3'. Igualmente, un oligonucleótido en dirección 5' universal y cada uno de los oligonucleótidos inversos se combinaron y se sometieron a reacciones de PCR para producir fragmentos de ADN en dirección 5'. Alternativamente, el oligonucleótido NNG/C puede apuntar en dirección 5', y el cebador inverso puede apuntar en dirección 3'. En este caso las reacciones de PCR iniciales anteriormente descritas incluirían el oligonucleótido NNG/C más el oligonucleótido en dirección 5' en una reacción de PCR para producir un fragmento en dirección 5' y el oligonucleótido inverso y el oligonucleótido en dirección 3' en otra reacción PCR para producir un fragmento en dirección 3'. Los fragmentos de PCR en dirección 5' y en dirección 3' se purificaron usando geles de agarosa, y las cantidades de estos productos de PCR se cuantificaron. Las mismas cantidades molares de fragmentos de ADN en dirección 5' y en dirección 3' individuales se combinaron con los cebadores en dirección 5' y en dirección 3' universales para una segunda ronda de reacción de PCR para ensamblar el producto de PCR entero. A continuación, los fragmentos de PCR enteros se purificaron a partir de los geles de agarosa, y se combinaron cantidades iguales de fragmentos enteros individuales de un tier, se digirieron con enzimas de restricción Sal I y BamH I, y se insertaron en un vector de expresión.

Se produjeron un total de seis genotecas. Se produjeron tres genotecas, una genoteca Tier 1, una Tier 2 y una Tier 3, que tenían mutaciones en un ácido nucleico que codifica un scFv-Fc. Igualmente se produjo una genoteca Tier 1, una Tier 2 y una Tier 3 que tenían mutaciones en las mismas posiciones dentro de la región codificante de Fc en un ácido nucleico que codifica un Fc simulado. Como se ilustra gráficamente en la Figura 3, se realizó el cribado inicial como sigue. Las genotecas se introdujeron en *Escherichia coli*, y se recogieron suficientes colonias individuales de modo que al menos tres veces como muchas colonias se recogieron ya que había diferentes variantes en la genoteca. Por ejemplo, cada genoteca Tier 1 contenía veinte aminoácidos diferentes en cada uno de los nueve sitios, para un total de 180 variantes diferentes. En este caso, se recogieron diez placas de microtitulación de colonias (96 pocillos/placa para un total de aproximadamente 960) y se cultivaron. El ADN plásmido se aisló. Cada genoteca Tier 2 y Tier 3 contenía veinte aminoácidos diferentes en cada uno de los 34 y 39 sitios para un total de 680 y 780 variantes diferentes, respectivamente. Por consiguiente, se recogieron 45 placas de colonias (para un total de 4.320) para cada genoteca Tier 2 y Tier 3, y se aisló el ADN plásmido. Estos ADN plásmidos mutados se combinaron con ADN no alterados (si el ADN alterado era un scFv-Fc, el ADN no alterado era un Fc simulado, y viceversa, como se muestra en la Figura 2) y se usa para someter a transfección células HEK 293 (una línea celular de riñón embrionaria humana transformada). Los transfectantes se cultivaron, y el medio de cultivo se valoró usando un ensayo AlphaLISA® usando reactivos comprados de Perkin Elmer (números de catálogo 6760002 y AL109M).

En resumen, el ensayo AlphaLISA® se realizó como sigue. El medio de cultivo celular de las células HEK 293 transfectadas se añadió a pocillos que contenían perlas donadoras revestidas con estreptavidina (número de catálogo de Perkin Elmer 6760002), un anticuerpo IgG humano biotinilado (que se une a las perlas donadoras por la interacción de estreptavidina-biotina), perlas receptoras (número de catálogo de Perkin Elmer AL109M) conjugadas con un anticuerpo antiglutatona S-transferasa (GST), una versión etiquetada con GST de FcγRIIIA humano (que se une a las perlas receptoras por la interacción GST-anticuerpo anti-GST y que se une a las perlas donadoras por la interacción de FcγRIIIA con el anticuerpo IgG humano biotinilado). En ausencia de un competidor (tal como un scFv-Fc/Fc), cuando los pocillos son iluminados con luz a 680 nm, las perlas donadoras se activan. Si las perlas receptoras están en proximidad física cercana a las células donadoras activadas, serán activadas por las perlas donadoras para emitir fluorescencia a aproximadamente 615 nm. En presencia de un competidor que se une a FcγRIIIA (tal como un scFv-Fc/Fc), esta señal será disminuida puesto que se permitirá que las perlas donadoras y receptoras se separen poco a poco cuando el competidor, distinto del anticuerpo IgG humano biotinilado, se une a FcγRIIIA, particularmente si el competidor se une más eficazmente a FcγRIIIA que el anticuerpo IgG humano biotinilado.

Los sobrenadantes de cultivo celular que inhibieron la señal a un mayor alcance que los sobrenadantes de las células transfectadas con versiones no mutadas (excepto por las mutaciones de par de carga que también estaban incluidas en las genotecas) del scFv-Fc y Fc simulado se ensayaron de nuevo dos veces más para confirmar que eran positivos. En la tercera ronda de ensayo, los ensayos se realizaron por duplicado. Se secuenciaron las regiones codificantes de Fc de los plásmidos que codificaban estos scFv-Fc o Fc simulado que produjeron una señal positiva.

A continuación, las Tablas 1 y 2 muestran los datos solamente de estos transfectantes positivos resultantes de las genotecas Tier 1, 2 y 3 que se mutaron en los ácidos nucleicos codificantes de scFv-Fc y Fc simulado, respectivamente.

Tabla 1: Aciertos (*hits*) positivos primarios de genotecas de scFv-Fv

Tier	Sustitución	1ª ronda de cribado primario		2ª ronda de cribado		1ª ronda de cribado	
		Señal alfa	% inhibición	Señal alfa	% inhibición	Señal alfa	% inhibición
	No sustitución	76003	0,0	80429	0,0	78582	0,0
1	L234Y	55075	27,5	45915	42,9	50495	35,7
1	L235S	7789	89,8	6262	92,2	7025	91,1
1	G236Y	64581	15,0	61733	23,2	62157	20,9
2	S239D	24347	68,0	16863	79,0	21421	72,7
2	S239N	31926	58,0	26111	67,5	24500	68,8
3	F243L	46048	39,4	57412	28,6	55205	29,7
3	F243V	41730	45,1	42089	47,7	40375	48,6
3	F243I	29972	60,6	21670	73,1	21364	72,8
3	I253K	57394	24,5	52131	35,2	51343	34,7
2	T256Q	26517	65,1	19094	76,3	20846	73,5
2	E258V	23310	69,3	19494	75,8	22403	71,5
2	H268E	54810	27,9	56630	29,6	57069	27,4
2	H268K	60627	20,2	62217	22,6	61602	21,6
3	A287F	39907	47,5	33473	58,4	25468	67,6
3	K288I	56406	25,8	57487	28,5	57289	27,1
2	K290G	52396	31,1	53843	33,1	55724	29,1
2	K290S	57139	24,8	55906	30,5	54625	30,5
2	K290W	53869	29,1	52574	34,6	59537	24,2
2	K290Q	37430	50,8	36682	54,4	40252	48,8
2	K290Y	9168	87,9	7893	90,2	10215	87,0
2	E294L	24347	68,0	22911	71,5	18221	76,8
2	Y296W	25317	66,7	21765	72,9	24756	68,5
2	Y296L	58469	23,1	60581	24,7	64317	18,2
2	S298A	17868	76,5	25331	68,5	27486	65,0
2	S298C	12163	84,0	10352	87,1	13443	82,9
2	T307S	44581	41,3	46542	42,1	51427	34,6
2	T307E	21667	71,5	18943	76,4	25776	67,2
2	T307G	32517	57,2	36732	54,3	38498	51,0
2	L309S	60518	20,4	61549	23,5	63542	19,1
2	L309K	23426	69,2	18876	76,5	27215	65,4
2	L309E	25050	67,0	21115	73,7	25441	67,6
2	N315A	23792	68,7	19723	75,5	28619	63,6
2	N315S	25958	65,8	19461	75,8	28793	63,4
2	A330M	55444	27,1	50996	36,6	57992	26,2
2	I332E	18900	75,1	20396	74,6	18450	76,5
2	K334A	51677	32,0	54810	31,9	56456	28,2
2	K334M	22262	70,7	19782	75,4	24376	69,0

Tabla 2: Aciertos positivos primarios de genotecas de Fc simulado

5

Tier	Sustitución	1ª ronda de cribado primario		2ª ronda de cribado		3ª ronda de cribado	
		Señal alfa	% inhibición	Señal alfa	% inhibición	Señal alfa	% inhibición
	No sustitución	76003	0,0	80429	0,0	78582	0,0
2	S239D	6120	91,9	6155	92,3	9874	87,4
2	S239E	32510	57,2	34836	56,7	33673	57,1
2	S239E+K340N	11484	84,9	11757	85,4	26132	66,7
3	F243M	43121	43,3	37720	53,1	32424	58,7
3	F243L	20563	72,9	18203	77,4	18794	76,1
3	F243V	38776	49,0	32101	60,1	29266	62,8
3	F243I	29808	60,8	25768	68,0	23762	69,8
3+2	F243V+S239T	11564	84,8	13705	83,0	12525	84,1
3	K246W	60773	20,0	57107	29,0	51701	34,2
3	K246E	58947	22,4	62557	22,2	53343	32,1
3	K246S	45132	40,6	42377	47,3	37902	51,8

Tier	Sustitución	1ª ronda de cribado primario		2ª ronda de cribado		3ª ronda de cribado	
		Señal alfa	% inhibición	Señal alfa	% inhibición	Señal alfa	% inhibición
3	K246V	43826	42,3	44452	44,7	42791	45,5
3	K248Y	52092	31,5	51035	36,5	46986	40,2
3	K248L	24674	67,5	23108	71,3	24831	68,4
3	M252D	60526	20,4	58066	27,8	60269	23,3
3	I253V	58498	23,0	61503	23,5	58403	25,7
2	R255S	59331	21,9	49837	38,0	61045	22,3
2	R255N	47547	37,4	48542	39,6	44532	43,3
2	T256V	30486	59,9	31764	60,5	28809	63,3
2	E258S	60338	20,6	57893	28,0	61591	21,6
3	K288T	55695	26,7	53102	34,0	50325	36,0
2	K290G	20557	73,0	20088	75,0	38478	51,0
2	K290F	58476	23,1	55435	31,1	60116	23,5
2	E294L	30129	60,4	35365	56,0	32178	59,1
3	V302Q	40294	47,0	35937	55,3	33446	57,4
2	T307P	18993	75,0	20019	75,1	14102	82,1
2	L309C	59701	21,4	55632	30,8	61787	21,4
3	Q311M	13143	82,7	11115	86,2	9798	87,5
2	A330V	56425	25,8	54114	32,7	58445	25,6
2	I332E	10781	85,8	9879	87,7	11532	85,3
2	K334L	26701	64,9	23400	70,9	25092	68,1
2	K334V	27080	64,4	26926	66,5	30164	61,6
2	K334V+D413N	20192	73,4	21412	73,4	25438	67,6
2	A339T	56391	25,8	58448	27,3	49783	36,6

Mediante el cálculo, se incluyeron un total de aproximadamente 1.640 variantes diferentes en las genotecas Tier 1, 2 y 3 codificantes de scFv-Fc combinadas. El mismo número de variantes estaban incluidas en las genotecas Tier 1, 2 y 3 codificantes de Fc simulado combinadas. Dado el número de variantes ensayadas, era probable que todas las variantes estuvieran representadas al menos una vez entre los transfectantes ensayados. Sin embargo, solamente 37 scFv-Fc diferentes y 34 Fc simulados diferentes dieron una señal positiva en este primer cribado. Muchas de estas variantes se recuperaron múltiples veces. Por tanto, en total, solamente aproximadamente el 2 % de las 1.640 variantes diferentes incluidas en las genotecas produjeron una señal positiva.

10 Cribado combinatorio de aciertos positivos

Todas las sustituciones identificadas en el cribado primario en las genotecas de Fc simulado (como se muestra en la Tabla 2) se combinaron con todas las sustituciones identificadas en el cribado primario de las genotecas de scFc-Fc (como se muestra en la Tabla 1) para identificar combinaciones que se podrían unir a FcyRIIIA más eficazmente. Por tanto, se ensayaron $37 \times 34 = 1.258$ combinaciones en total. Sorprendentemente, solamente las siguientes 21 de las 1.258 combinaciones ensayadas mostraron competición fuerte a la interacción biotina-hulgG1/FcyRIIIA en un ensayo AlphaLISA®: (1) E294L en el Fc simulado y E294L en el scFv-Fc; (2) E294L en el Fc simulado y Y296L en el scFv-Fc; (3) E294L en el Fc simulado y K290G en el scFv-Fc; (4) E294L en el Fc simulado y K290S en el scFv-Fc; (5) E294L en el Fc simulado y S298A en el scFv-Fc; (6) E294L en el Fc simulado y T307G en el scFv-Fc; (7) T307P en el Fc simulado y T307G en el scFv-Fc; (8) T307P en el Fc simulado y K290G en el scFv-Fc; (9) T307P en el Fc simulado y Y296L en el scFv-Fc; (10) T307P en el Fc simulado y K290S en el scFv-Fc; (11) R255S en el Fc simulado y S298C en el scFv-Fc; (12) T307P en el Fc simulado y S298C en el scFv-Fc; (13) E294L en el Fc simulado y S298C en el scFv-Fc; (14) K334V en el Fc simulado y K290Y en el scFv-Fc; (15) T307P en el Fc simulado y L309E en el scFv-Fc; (16) E294L en el Fc simulado y L309E en el scFv-Fc; (17) T307P en el Fc simulado y L234Y en el scFv-Fc; (18) E294L en el Fc simulado y L234Y en el scFv-Fc; (19) Q311M en el Fc simulado y Y296W en el scFv-Fc; (20) Q311M en el Fc simulado y L234Y en el scFv-Fc; y (21) K334V en el Fc simulado y Y296W en el scFv-Fc. Por tanto, solamente un muy pequeño número de las combinaciones de mutantes de Fc ensayados mostraron una unión altamente sinérgica a FcyRIIIA.

30 Ejemplo 2: Construcción y caracterización de variantes de combinación en formato IgG

Para determinar si los anticuerpos enteros que contienen sustituciones en sus regiones Fc funcionarían para unirse más eficazmente a FcyRIIIA, se realizaron combinaciones de sustituciones en un anticuerpo IgG1 anti-proteína X humana entero usando las técnicas anteriormente descritas. Todos los aciertos primarios (véase las Tablas 1 y 2) se mapearon sobre la estructura de cocrystal de Fc:FcyRIIIB usando el "Molecular Operating Environment" (MOE), un programa de modelado molecular de Chemical Computing Group, Inc. Montreal CA. Véase el código 1T83 del "Protein Data Bank". Como se indica en la leyenda de la Figura 1 anterior, la región extracelular de FcyRIIIB que está en esta estructura (mostrada en la Figura 1) es muy similar en la secuencia de aminoácidos primaria a

FcγRIIIA, de modo que se consideró probable que la información de la estructura de cocrystal Fc:FcγRIIIB sería relevante a la interacción Fc:FcγRIIIA. Las sustituciones candidatas que tenían mutaciones en la interfaz Fc:FcγRIIIB (es decir, en las posiciones Tier 2 mostradas en la Figura 2) se seleccionaron para adicional modificación por ingeniería genética basada en los resultados del cribado primario y/o modelado molecular asistido por ordenador. En un esfuerzo para aumentar más la interacción Fc:FcγRIIIA, se añadieron sustituciones adicionales en otras partes del polipéptido de Fc a las sustituciones Tier 2. Específicamente, las sustituciones dentro del sitio de N-glicosilación (N297-S298-T299), y/o cerca del sitio P329 en cualquier cadena Fc se exploraron usando modelado molecular. Se han encontrado sustituciones dentro de ambas de estas áreas (es decir, S298C, S298A, A330M y A330V) en el cribado primario. Las combinaciones que parecían ser favorables basadas en el modelado molecular discutidas más adelante se construyeron y ensayaron para la unión a FcγRIIIA y, en algunos casos, para la actividad en un ensayo de ADCC.

Para conseguir las combinaciones candidatas de sustituciones y para eliminar las sustituciones que podrían crear asuntos de productibilidad (por ejemplo, reemplazando otros aminoácidos por una cisteína), se realizaron análisis estructurales usando las estructuras de cristal de Fc-FcγRIIIB (códigos del "Protein Data Bank": 1T83, 1T89 y 1E4K), y los cálculos de energía de unión se llevaron a cabo usando el "Genetic Algorithm for Protein Design" (EGAD). Pokala, N and Handel, TM, *J Mol Biol.* 347(1):203-227. (2005). EGAD es un algoritmo de diseño de proteína computacional que predice los cambios en la estabilidad de la proteína tras la sustitución de uno o más residuos de aminoácidos en una proteína.

Se identificaron que las sustituciones en las posiciones S298, A327 y A330 podrían mejorar la unión de Fc a FcγRIIIA usando EGAD. Cada una de las tres posiciones se cambiaron a todos los otros 19 aminoácidos *in silico*, y se predijo el cambio en la estabilidad de la interacción Fc-FcγRIII. EGAD también se usó para analizar algunas de las combinaciones de las mutaciones que se unieron bien a FcγR según los datos anteriormente publicados. Ejemplos de sustituciones que EGAD predijo que podrían aumentar la unión a FcγRIIIA incluyen S298C, S298I, S298V, S298T, A327Y, A327W, A327F, A327H, A330H, A330F y A330M. El ensayo AlphaLISA® confirmó que algunas de las mutaciones predichas en las posiciones S298 y A330 mostraban unión mejorada al FcγR. Por ejemplo, la combinación designada "W23", la cual tiene mutaciones L234Y, K290Y y Y296W en una cadena y mutaciones S298T y K334V en la otra cadena resultó de este planteamiento.

Las combinaciones beneficiosas se seleccionaron e incorporaron en ADN que codificaba una cadena pesada de hulgG1 anti Proteína X humana usando la técnica SOE por PCR anteriormente descrita. HulgG1 heterodiméricos se produjeron sometiendo transitoriamente a transfección las células HEK 293 a pequeña escala. Los sobrenadantes crudos se concentraron, y se intercambió el tampón. De esta manera, se creó un panel de anticuerpos hulgG1 heterodiméricos que contenían variantes de Fc que tenían sustituciones múltiples.

Se ensayó la capacidad de estos anticuerpos sustituidos de mediar la ADCC *in vitro* y de unirse a FcγRIIIA usando el ensayo AlphaLISA® en una diversidad de concentraciones. Las figuras 4 a 6 muestran la inhibición en porcentaje de la señal AlphaLISA® en función de la concentración del anticuerpo competidor. En las Tablas 3 y 4 de a continuación, tales datos se presentan como una "CE₅₀", que es la concentración de anticuerpo a la cual se alcanza la mitad de la inhibición máxima de la señal AlphaLISA®.

Los ensayos de ADCC se realizaron como sigue. Se usaron líneas celulares que tenían alta (línea celular tumoral SKBR3), media (línea celular tumoral JIMT1), y baja (línea celular tumoral MCF7) expresión de Proteína X. Estas células diana que expresaban Proteína X se marcaron con carboxifluorescein succinimidil éster (CFSE) y, a continuación, se lavaron una vez con solución salina tamponada con fosfato (PBS) antes de depositarse en placas de microtitulación de 96 pocillos con pocillos en forma V. Se añadieron células NK purificadas de un donador de FcγRIIIA 158F/158F a cada pocillo. Los anticuerpos IgG1 anti Proteína X humana heterodimérica y un anticuerpo control emparejado con isótopo se diluyeron en una serie 1:3 y se añadieron a cada pocillo. Las células se incubaron a 37 °C con CO₂ al 5 % durante 3,5 horas. Las células se centrifugaron y se resuspendieron en 1x tampón FACs (1x solución salina tamponada con fosfato (PBS) que contenía suero fetal bovino al 0,5 % (FBS)) con el colorante TO-PRO®-3 yoduro (Molecular Probes, Inc. Corporation, Oregon, EE.UU), que tiñe las células muertas, antes del análisis por clasificación celular activada por fluorescencia (FACS). El porcentaje de destrucción celular se calculó dividiendo el número de células muertas (teñidas con TO-PRO®-3 yoduro) por el número de células totales (teñidas con CFSE).

Las figuras 7 a 9 muestran el porcentaje de células destruidas en función de la concentración del anticuerpo. Las CE₅₀ determinadas a partir de tales datos se muestran en la Tabla 3. Estos datos indicaron que todos los catorce anticuerpos que contenían regiones Fc variantes eran muy potentes en la destrucción de células tumorales, teniendo cada uno CE₅₀ de aproximadamente 1 pM, que era mucho menor que la CE₅₀ de un anticuerpo no alterado o un anticuerpo que contenía solamente mutaciones de par de carga. Tabla 3. Además, las CE₅₀ inferiores para la ADCC generalmente se correlacionaron con menor CE₅₀ para la unión a FcγRIIIA, lo cual se esperaría puesto que la unión a FcγRIIIA es un prerrequisito para la actividad en este ensayo de ADCC.

Tabla 3: unión a FcγRIIIA y actividad de ADCC de anticuerpos IgG1 humanos que contienen variantes de Fc

Alias	Cadena negativa/negativa (K392D, K409D)	Cadena positiva/positiva (E356K, D399K)	FcγRIIIA (158F) CE ₅₀ (nM)	ADCC CE ₅₀ (pM)
M01	Tipo silvestre (no sustituciones de par de carga)	Tipo silvestre (no sustitución de par de carga)	103,2	75,00
M04	solamente sustituciones de par de carga	solamente sustituciones de par de carga	86,97	55,50
M64	K334V	Y296W+S298C	18,3	0,75
M68	K334V	L234Y+Y296W+S298C	5,44	0,82
M70	L235S+S239D+K334V	L234Y+K290Y+Y296W	5,28	1,54
M71	L235S+S239D+K334V	L234Y+Y296W+S298C	4,82	0,63
M75	Q311M+K334V (SEQ ID NO:8)	L234Y+F243V+Y296W	7,94	1,01
M77	Q311M+K334V (SEQ ID NO:8)	L234Y+E294L+Y296W (SEQ ID NO:10)	7,07	1,47
M78	Q311M+K334V (SEQ ID NO:8)	L234Y+Y296W+S298C	5,84	0,53
M79	S239D+K334V	L234Y+K290Y+Y296W	5,04	0,97
M81	S239D+K334V	L234Y+Y296W+S298C	4,25	0,31
M83	F243V+K334V	L234Y+K290Y+Y296W	7,85	2,42
M84	F243V+K334V	L234Y+Y296W+S298C	5,77	0,79
M85	E294L+K334V	L234Y+K290Y+Y296W	5,66	1,71
M86	E294L+K334V	L234Y+Y296W+S298C	5,57	0,79
W23	S298T+K334V (SEQ ID NO:16)	L234Y+K290Y+Y296W (SEQ ID NO:18)	5,23	0,68

Tabla 4: unión a FcγRIIIA de anticuerpos IgG1 humanos que contienen variantes de Fc

5

Alias	Cadena negativa/negativa (K392D, K409D)	Cadena positiva/positiva (E356K, D399K)	FcγRIIIA (158F) CE ₅₀ (nM)	FcγRIIIA (158V) CE ₅₀ (nM)
M77	Q311M+K334V (SEQ ID NO:8)	L234Y+E294L+Y296W (SEQ ID NO:10)	13,2	10,87
M138	E233L+Q311M+K334V (SEQ ID NO:12)	L234Y+E294L+Y296W (SEQ ID NO:10)	12,74	8,45
M142	L234I+Q311M+K334V (SEQ ID NO:14)	L234Y+E294L+Y296W (SEQ ID NO:10)	10,37	8,25
W23	S298T+K334V (SEQ ID NO:16)	L234Y+K290Y+Y296W (SEQ ID NO:18)	5,94	6,80
W117	A330M+K334V (SEQ ID NO:37)	L234Y+Y296W (SEQ ID NO:39)	28,92	40,04
W125	A330M+K334V (SEQ ID NO:37)	K290Y+Y296W (SEQ ID NO:41)	59,32	76,92
W141	A330M+K334V (SEQ ID NO:20)	L234Y+K290Y+Y296W (SEQ ID NO:18)	4,30	7,02
W144	A330F+K334V (SEQ ID NO:22)	L234Y+K290Y+Y296W (SEQ ID NO:18)	4,44	6,77
W157	Q311M+A330M+K334V (SEQ ID NO:24)	L234Y+E294L+Y296W (SEQ ID NO:10)	6,76	9,10
W160	Q311M+A330F+K334V (SEQ ID NO:26)	L234Y+E294L+Y296W (SEQ ID NO:10)	7,04	8,42
W165	S298T+A330M+K334V (SEQ ID NO:28)	L234Y+K290Y+Y296W (SEQ ID NO:18)	5,24	7,56
W168	S298T+A330F+K334V (SEQ ID NO:30)	L234Y+K290Y+Y296W (SEQ ID NO:18)	5,54	8,41
W187	S239D+A330M+K334V (SEQ ID NO:32)	L234Y+K290Y+Y296W (SEQ ID NO:18)	2,25	4,69
W189	S239D+S298T+K334V (SEQ ID NO:34)	L234Y+K290Y+Y296W (SEQ ID NO:18)	4,14	5,41

La unión de alguna de las variantes de Fc a FcγR humanos y murinos recombinantes se ensayó usando la tecnología Biacore™ capturando FcγR etiquetados con His usando un anticuerpo anti-His murino unido a un Chip Sensor CM5 (Biacore). En experimentos separados, se ensayaron FcγRIIIA con una histidina en la posición 131, FcγRIIIA con una valina en la posición 158, y FcγRIIIA con una fenilalanina en la posición 158. Se inyectaron anticuerpos IgG1 humanos que contenían regiones Fc variantes sobre la superficie del Chip Sensor CM5 al cual se une el receptor Fcγ y se dejó asociarse y disociarse del receptor Fcγ por veces definidas. Estos datos se usaron para determinar las constantes de unión, es decir, k_{on} (1/Ms), k_{off} (1/s) y K_D (nM), las cuales se calcularon a partir de pruebas globales usando el modelo de unión de cinética 1:1 en el programa informático BIAevaluation™. Generalmente, los anticuerpos que contienen regiones Fc alteradas tenían valores de K_D en el dígito doble bajo nM para tanto los alelos 158F como 158V de FcγRIIIA.

Tabla 5: Datos de unión cinética y de equilibrio

Alias	cadena -/-(K392D, K409D)	cadena +/- (E356K, D399K)	FcγRIIA (131H)		FcγRIIA (131R)		FcγRIIIA (158V)			FcγRIIIA (158F)		
			K _D (nM)	K _D (nM)	K _D (nM)	K _D (nM)	K _{on} (1/Ms)	K _{off} (1/s)	K _D (nM)	K _{on} # (1/Ms)	K _{off} # (1/s)	K _D (nM)
M01	Tipo silvestre	Tipo silvestre	>1000	>1000	>1000	>1000	ND*	ND	>500	ND	ND	>1000
M04	Sustituciones de par de carga solamente	Sustituciones de par de carga solamente	>1000	>1000	>1000	>1000	ND	ND	>500	ND	ND	>1000
M70	L235S+ S239D+K334V	L234Y+K290Y+Y296W	>1000	>1000	>1000	>1000	2,0 x 10 ⁵	4,0 x 10 ⁻³	20	1,7 x 10 ⁵	6,8 x 10 ⁻³	40
M75	Q311+K334V	L234Y+F243V+Y296W	>500	>1000	>1000	>1000	1,5 x 10 ⁵	3,8 x 10 ⁻³	25	1,3 x 10 ⁵	7,6 x 10 ⁻³	60
M77	Q311M+K334V	L234Y+E294L+Y296W	>500	>1000	>1000	>1000	1,8 x 10 ⁵	4,5 x 10 ⁻³	26	1,3 x 10 ⁵	7,9 x 10 ⁻³	62
M81	S239D+K334V	L234Y+Y296W+S298C	>500	>1000	>1000	>1000	2,7 x 10 ⁵	3,1 x 10 ⁻³	11	2,1 x 10 ⁵	4,1 x 10 ⁻³	19
M85	E294L+K334V	L234Y+K290Y+Y296W	>500	>1000	>1000	>1000	1,6 x 10 ⁵	5,1 x 10 ⁻³	32	1,1 x 10 ⁵	7,9 x 10 ⁻³	76
M86	E294L+K334V	L234Y+Y296+S298C	320	>500	>1000	>1000	2,2 x 10 ⁵	4,3 x 10 ⁻³	20	1,7 x 10 ⁵	5,0 x 10 ⁻³	32

**"ND" significa no determinado

Todas estas tasas se determinaron independientemente dos veces excepto aquellas para M75, los cuales se determinaron solamente una vez. Los valores mostrados para todas las otras muestras son el promedio de las dos medidas.

Estos datos indican que la introducción de las sustituciones de par de carga no produjo diferencia detectable en la constante de disociación de equilibrio (K_D) para la unión a cualquiera de los Fc γ R ensayados. Comparar fila M01 con fila M04. Además, las diversas alteraciones de Fc asimétricas ensayadas redujeron drásticamente (más de diez veces en todos los casos) la K_D para la unión a ambas variantes alélicas de Fc γ R11A, pero tenían poco o no efecto sobre la K_D para la unión a Fc γ R11A o Fc γ R11B. Por tanto, las sustituciones en las regiones Fc de los anticuerpos IgG1 variantes enumerados en la Tabla 5 incrementaron drásticamente la avidez de unión de estas regiones Fc a Fc γ R11A.

Ejemplo 3: Ensayos de competición de variantes de Fc adicionales

Para determinar la relativa afinidad de unión a las variantes alélicas 158V y 158L de Fc γ R11A de un número de variantes de Fc adicionales, se realizaron ensayos AlphaLISA® básicamente como se describió anteriormente en el Ejemplo 1. Los anticuerpos IgG1 anti Proteína X humana enteros ensayados se purificaron a partir de sobrenadantes de células HEK 293 transfectadas. En algunos casos las preparaciones de anticuerpo carecían de fucosa. Los resultados se muestran en las Figuras 10 (para la variante alélica 158F de Fc γ R11A) y 11 (para la variante alélica 158V de Fc γ R11A).

Estos datos indican que todos los anticuerpos ensayados que comprenden variantes de Fc compitieron con IgG1 biotinilada para la unión a Fc γ R11A más eficazmente que un anticuerpo que comprende un Fc tipo silvestre. Por ejemplo, la Figura 10 muestra que un Fc de IgG1 tipo silvestre humana (M01) inhibe la unión de IgG1 a Fc γ R11A (158F) mediante solamente aproximadamente 25 % a la concentración más alta ensayada (360 nM). M04, un anticuerpo IgG1 que contiene alteraciones de heterodimerización (K392D+K409D en una cadena polipeptídica de Fc y E356K+D399K en otra), era solamente ligeramente más eficaz que M01. En comparación con M01 y M04, W117, W125 y una IgG1 humana tipo silvestre afucosilada compitió mucho más fuertemente, como se evidencia por un desplazamiento a la izquierda en las curvas. Véase W117, W125 y AFUCO-M01 en la Figura 10. Las preparaciones afucosiladas de W117 y W125 (AFUCO-W117 y AFUCO-W125) mostraron una afinidad muy alta para el Fc γ R11A 158F humano, puesto que estas dos preparaciones produjeron las curvas más a la izquierda en la Figura 10. Las variantes de Fc W157 y W165 también mostraron fuerte competición.

En la Figura 11 se muestran resultados similares para la unión a Fc γ R11A (158V). M01 y M04 presentaron competición débil para la unión a Fc γ R11A (158V). Como en la Figura 10, AFUCO-W117 y AFUCO-W125 eran los competidores más eficaces, seguido de W157 y W165. W117 y AFUCO-IgG1, seguido de W125, eran menos eficaces, pero aún más eficaces que M01 y M04. Estos datos muestran que se puede alcanzar un mejoramiento sinérgico de unión a Fc γ R11A usando preparaciones defucosiladas de variantes heterodiméricas de IgG1.

Ejemplo 4: Ensayo de ADCC de anticuerpos que contienen regiones Fc variantes

Para determinar la actividad de ADCC de los anticuerpos anti Proteína X humana enteros que contienen regiones Fc variantes adicionales, los ensayos de ADCC basados en célula se llevaron a cabo usando dos líneas celulares diferentes anteriormente mencionadas como células diana, una que expresa altos niveles de Proteína X (SKBR3) y la otra que expresa niveles moderados de Proteína X (JIMT1). Los ensayos se realizaron como se describe en el Ejemplo 2. Las Figuras 12 y 13 muestran los resultados obtenidos usando células SKBR3.

Los anticuerpos control M01 (que tienen una región Fc tipo silvestre) y M04 (que tienen una región Fc que contiene solamente alteraciones de heterodimerización) presentaron aproximadamente 60 % y 75 % de destrucción a la concentración más alta de anticuerpo ensayado (2.667 pM). La destrucción celular descendió muchísimo a concentraciones de anticuerpo inferiores de M01 y M04. Sin embargo, los anticuerpos que contienen regiones Fc variantes, incluyendo W23, W117, W125, W141, W144, W165, W168 y W187, presentaron niveles más altos de destrucción celular que o bien M01 o M04 a las mayores concentraciones de anticuerpo. La variante W187 presentó la actividad más alta en este ensayo, que se correlaciona con el hecho de que también presenta la afinidad más alta a Fc γ R11A humano. Tabla 4. Las variantes W117, W125, W165 y W168 también suscitaron potente actividad de ADCC en este ensayo.

La Figura 14 muestra los resultados (porcentaje lisis celular específica) de un ensayo de ADCC hecho usando anticuerpos anti Proteína X de IgG1 humana enteros y células JIMT1, que expresan niveles moderados de Proteína X. Los anticuerpos M01 (que contienen una región Fc tipo silvestre) alcanzaron solamente aproximadamente el 64 por ciento de lisis celular a la mayor concentración de anticuerpo ensayada, y la CE_{50} de un anticuerpo M01 en este ensayo era de 98 pM. Una preparación defucosilada de un anticuerpo M01 alcanzó el 86 % de lisis celular específica a la mayor concentración ensayada y tenía una CE_{50} de 0,274 pM en este ensayo. Un anticuerpo que contenía la variante de Fc W117 presentó destrucción por ADCC aumentada en comparación con el anticuerpo M01, alcanzando una lisis específica máxima de aproximadamente 85 % y unas 85,5 veces menor de CE_{50} (1,15 pM). Una preparación defucosilada del mismo anticuerpo (AFUCOW117) mostró incluso mayor actividad de destrucción y tenía una CE_{50} muy baja (0,015 pM) en este ensayo. Figura 14, panel superior.

Se observó un incremento similar en la actividad de ADCC en una preparación defucosilada de un anticuerpo que contenía una región Fc variante W125 (CE_{50} era de 0,061 pM) en comparación con una preparación fucosilada (CE_{50}

era de 3,99 pM). Figura 14, panel inferior. Puesto que las versiones defucosiladas de los anticuerpos IgG1 que contenían o bien una región Fc W117 o una W125 ambas tenían actividad mucho mayor que las versiones fucosiladas de estos anticuerpos, estos datos indican un mejoramiento sinérgico en la actividad de ADCC cuando la región Fc de un anticuerpo IgG1 está defucosilada y también contiene cambios de aminoácidos que incrementan su afinidad a FcγRIIIA.

Ejemplo 5: Constantes de unión de anticuerpos que contienen regiones Fc variantes adicionales

Las tasas de asociación (*on*) y disociación (*off*) para la unión de un número de anticuerpos IgG1 humanos que tienen regiones Fc variantes adicionales a las variantes alélicas 158V y 158F de FcγRIIIA humano y a FcγRIV murino se determinaron usando la tecnología de Biacore™ como se describe en el Ejemplo 2. En resumen, los FcγR, los cuales se etiquetaron con poli histidina, se capturaron sobre un Chip Sensor CM5 (Biacore™). Los anticuerpos IgG1 humanos se inyectaron sobre la superficie del chip CM5 al cual se unen los FcγR y se dejan asociarse y disociarse de los Fcγ por veces definidas. Los datos resultantes se usaron para determinar las constantes de unión publicadas en la Tabla 6 a partir del programa informático BIAevaluation™. Estos datos se muestran en la Tabla 6 de a continuación.

Tabla 6: Tasas de asociación y disociación de anticuerpos IgG1 humanos que contienen regiones Fc variantes

Afinidad cinética Muestra	huFcγRIIIA-158V			huFcγRIIIA-158F			muFcγR IV		
	K _{on} (1/Ms)	K _d (1/s)	K _D (nM)	K _{on} (1/Ms)	K _d (1/s)	K _D (nM)	K _{on} (1/Ms)	K _d (1/s)	K _D (nM)
hulgG1 (W23 Fc)	1,6 x 10 ⁵	4,8 x 10 ⁻³	30	1,3 x 10 ⁵	7,7 x 10 ⁻³	61	1,8 x 10 ⁵	1,4 x 10 ⁻²	75
hulgG1 (W141 Fc)	1,4 x 10 ⁵	4,8 x 10 ⁻³	34	1,1 x 10 ⁵	6,4 x 10 ⁻³	59	1,6 x 10 ⁵	1,2 x 10 ⁻²	72
hulgG1 (W144 Fc)	1,5 x 10 ⁵	4,6 x 10 ⁻³	32	1,0 x 10 ⁵	6,3 x 10 ⁻³	62	1,0 x 10 ⁵	1,3 x 10 ⁻²	128
hulgG1 (W157 Fc)	1,2 x 10 ⁵	4,3 x 10 ⁻³	35	9,8 x 10 ⁴	5,5 x 10 ⁻³	56	1,1 x 10 ⁵	8,4 x 10 ⁻³	78
hulgG1 (W165 Fc)	1,6 x 10 ⁵	4,8 x 10 ⁻³	30	1,1 x 10 ⁵	6,1 x 10 ⁻³	54	1,7 x 10 ⁵	1,2 x 10 ⁻²	69
hulgG1 (W168 Fc)	1,7 x 10 ⁵	4,5 x 10 ⁻³	27	1,2 x 10 ⁵	6,0 x 10 ⁻³	48	1,2 x 10 ⁵	1,1 x 10 ⁻²	97
hulgG1 (W187 Fc)	2,9 x 10 ⁵	4,8 x 10 ⁻³	16	2,2 x 10 ⁵	4,9 x 10 ⁻³	22	2,9 x 10 ⁵	8,0 x 10 ⁻³	28
hulgG1 (B50 Fc)*	1,0 x 10 ⁵	4,5 x 10 ⁻³	44	8,2 x 10 ⁴	6,4 x 10 ⁻³	78	4,9 x 10 ⁴ 1,5	1,5 x 10 ⁻²	301
hulgG1 (W117 Fc)	1,5 x 10 ⁵	6,6 x 10 ⁻³	43	1,1 x 10 ⁵	1,1 x 10 ⁻²	105	2,5 x 10 ⁵	2,2 x 10 ⁻²	90
hulgG1 (W125 Fc)	1,3 x 10 ⁵	7,1 x 10 ⁻³	57	5,5 x 10 ⁴	7,9 x 10 ⁻³	143	1,4 x 10 ⁵	1,3 x 10 ⁻²	89
hulgG1 (afuco W117 Fc)	3,9 x 10 ⁵	2,5 x 10 ⁻³	6,4	3,5 x 10 ⁵	3,2 x 10 ⁻³	9,0	3,1 x 10 ⁵	4,6 x 10 ⁻³	15
hulgG1 (afuco W125 Fc)	3,6 x 10 ⁵	3,1 x 10 ⁻³	8,8	3,0 x 10 ⁵	4,4 x 10 ⁻³	15	2,7 x 10 ⁵	4,9 x 10 ⁻³	18

* La región Fc variante B50 tiene las alteraciones K392D, K409D, L234I, A330M y K334V en un polipéptido de Fc y E356K, D399K, L234Y, K290Y y Y296W en el otro.

Los anticuerpos que contienen regiones Fc variantes tenían valores K_D para la unión a FcγRIIIA humano, incluyendo las variantes alélicas 158F y 158V, que oscilaban de 6,4 nM a 143 nM. Estos datos, combinados con el ensayo de ADCC anteriormente discutido, muestran que la destrucción celular incrementada en un ensayo de ADCC por preparaciones defucosiladas de anticuerpos que contenían una región Fc W125 o una W117, en comparación con las preparaciones fucosiladas, se correlacionan con tasas de asociación incrementadas y tasas de disociación disminuidas, es decir, una K_D disminuida. Tomándolo junto con los datos en el Ejemplo 4, un descenso de aproximadamente 10 veces en K_D para la unión a FcγRIIIA humano (158F) para anticuerpo W125 defucosilado en comparación con fucosilado (comparar 15,0 nM con 143 nM) se correlacionó con un descenso de aproximadamente 50 veces en CE₅₀ en el ensayo de ADCC descrito en el Ejemplo 4 (comparar 0,061 pM con 3,99 pM). Igualmente, para un anticuerpo W117, una preparación defucosilada tenía una K_D para la unión a FcγRIIIA humano (158F) aproximadamente once veces menor que la de una preparación fucosilada (comparar 9,0 nM con 105 nM) y tenía una CE₅₀ en el ensayo de ADCC descrito en el Ejemplo 4 que era aproximadamente 100 veces menor (comparar

0,015 pM con 1,15 pM). Por tanto, los incrementos en la actividad en el ensayo de ADCC de las preparaciones defucosiladas frente a fucosiladas de los anticuerpos W117 y W125 eran sinérgicos puesto que superaban las expectativas basadas en los incrementos en la afinidad de unión a FcγRIIIA (158F). Igualmente, el hecho de que las preparaciones defucosiladas de W117 y W125 tenían actividad mucho mayor en el ensayo de ADCC descrito en el Ejemplo 4 que las preparaciones fucosiladas de estos anticuerpos o una preparación defucosilada de un anticuerpo que tenía una región Fc tipo silvestre (M01), era un indicio más de actividad sinérgica.

LISTADO DE SECUENCIAS

10 <110> Amgen Inc.
Liu, Zhi
Kannan, Gunasekaran
Yan, Wei

15 <120> VARIANTES DE Fc

<130> A-1618-WO-PCT

20 <140> --A asignar—
<141> 15-03-2012

<150> 61/453.433
<151> 16-03-2011

25 <160> 41

<170> PatentIn versión 3.5

30 <210> 1
<211> 699
<212> ADN
<213> *Homo sapiens*

35 <220>
<221> CDS
<222> (1)..(699)

<400> 1

ES 2 668 895 T3

gag ccc aaa tct tgt gac aaa act cac aca tgc cca ccg tgc cca gca 48
 Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala
 1 5 10 15

cct gaa ctc ctg ggg gga ccg tca gtc ttc ctc ttc ccc cca aaa ccc 96
 Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro
 20 25 30

aag gac acc ctc atg atc tcc cgg acc cct gag gtc aca tgc gtg gtg 144
 Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val
 35 40 45

gtg gac gtg agc cac gaa gac cct gag gtc aag ttc aac tgg tac gtg 192
 Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val
 50 55 60

gac ggc gtg gag gtg cat aat gcc aag aca aag ccg cgg gag gag cag 240
 Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln
 65 70 75 80

tac aac agc acg tac cgt gtg gtc agc gtc ctc acc gtc ctg cac cag 288
 Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln
 85 90 95

gac tgg ctg aat ggc aag gag tac aag tgc aag gtc toc aac aaa gcc 336
 Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala
 100 105 110

ctc cca gcc ccc atc gag aaa acc atc tcc aaa gcc aaa ggg cag ccc 384
 Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro
 115 120 125

cga gaa cca cag gtg tac acc ctg ccc cca tcc cgg gag gag atg acc 432
 Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr
 130 135 140

aag aac cag gtc agc ctg acc tgc ctg gtc aaa ggc ttc tat ccc agc 480
 Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser
 145 150 155 160

gac atc gcc gtg gag tgg gag agc aat ggg cag ccg gag aac aac tac 528
 Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr
 165 170 175

aag acc acg cct ccc gtg ctg gac tcc gac ggc tcc ttc ttc ctc tat 576
 Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr
 180 185 190

agc aag ctc acc gtg gac aag agc agg tgg cag cag ggg aac gtc ttc 624
 Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe
 195 200 205

tca tgc tcc gtg atg cat gag gct ctg cac aac cac tac acg cag aag 672
 Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys
 210 215 220

agc ctc tcc ctg tct ccg ggt aaa tga 699
 Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 225 230

<210> 2
 <211> 232
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

5

<400> 2

ES 2 668 895 T3

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

<210> 3
<211> 699
<212> ADN
<213> *Homo sapiens*

5

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(699)

10

<220>
<221> mutación
<222> (529)..(529)

15

<220>
<221> mutación
<222> (531)..(531)

20

<220>
<221> mutación
<222> (580)..(580)

25

<220>
<221> mutación
<222> (582)..(582)

<400> 3

gag ccc aaa tct tgt gac aaa act cac aca tgc cca ccg tgc cca gca	48			
Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala				
1	5	10	15	
cct gaa ctc ctg ggg gga ccg tca gtc ttc ctc ttc ccc cca aaa ccc	96			
Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro				
20	25	30		
aag gac acc ctc atg atc tcc ccg acc cct gag gtc aca tgc gtg gtg	144			
Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val				
35	40	45		
gtg gac gtg agc cac gaa gac cct gag gtc aag ttc aac tgg tac gtg	192			
Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val				
50	55	60		
gac ggc gtg gag gtg cat aat gcc aag aca aag ccg ccg gag gag cag	240			
Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln				
65	70	75	80	
tac aac agc acg tac cgt gtg gtc agc gtc ctc acc gtc ctg cac cag	288			
Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln				
85	90	95		
gac tgg ctg aat ggc aag gag tac aag tgc aag gtc tcc aac aaa gcc	336			
Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala				
100	105	110		
ctc cca gcc ccc atc gag aaa acc atc tcc aaa gcc aaa ggg cag ccc	384			
Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro				
115	120	125		
cga gaa cca cag gtg tac acc ctg ccc cca tcc ccg gag gag atg acc	432			
Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr				
130	135	140		
aag aac cag gtc agc ctg acc tgc ctg gtc aaa ggc ttc tat ccc agc	480			
Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser				
145	150	155	160	
gac atc gcc gtg gag tgg gag agc aat ggg cag ccg gag aac aac tac	528			
Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr				
165	170	175		
gac acc acg cct ccc gtg ctg gac tcc gac ggc tcc ttc ttc ctc tat	576			
Asp Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr				
180	185	190		
agc gac ctc acc gtg gac aag agc agg tgg cag cag ggg aac gtc ttc	624			
Ser Asp Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe				
195	200	205		
tca tgc tcc gtg atg cat gag gct ctg cac aac cac tac acg cag aag	672			
Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys				
210	215	220		
agc ctc tcc ctg tct ccg ggt aaa tga	699			
Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys				
225	230			

<210> 4
<211> 232
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

5

<400> 4

ES 2 668 895 T3

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

<210> 5
 <211> 699

<212> ADN
 <213> *Homo sapiens*

5 <220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(699)

10 <220>
 <221> mutación
 <222> (421)..(421)

15 <220>
 <221> mutación
 <222> (550)..(550)

20 <220>
 <221> mutación
 <222> (552)..(552)

<400> 5

gag ccc aaa tct tgt gac aaa act cac aca tgc cca ccg tgc cca gca	48
Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala	
1 5 10 15	
cct gaa ctc ctg ggg gga ccg tca gtc ttc ctc ttc ccc cca aaa ccc	96
Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro	
20 25 30	
aag gac acc ctc atg atc tcc cgg acc oct gag gtc aca tgc gtg gtg	144
Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val	
35 40 45	
gtg gac gtg agc cac gaa gac oct gag gtc aag ttc aac tgg tac gtg	192
Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val	
50 55 60	
gac ggc gtg gag gtg cat aat gcc aag aca aag ccg cgg gag gag cag	240
Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln	
65 70 75 80	
tac aac agc acg tac cgt gtg gtc agc gtc ctc acc gtc ctg cac cag	288
Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln	
85 90 95	
gac tgg ctg aat ggc aag gag tac aag tgc aag gtc tcc aac aaa gcc	336
Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala	
100 105 110	
ctc cca gcc ccc atc gag aaa acc atc tcc aaa gcc aaa ggg cag ccc	384
Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro	
115 120 125	
cga gaa cca cag gtg tac acc ctg ccc oca tcc cgg aag gag atg acc	432
Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Lys Glu Met Thr	
130 135 140	
aag aac cag gtc agc ctg acc tgc ctg gtc aaa ggc ttc tat ccc agc	480
Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser	
145 150 155 160	

ES 2 668 895 T3

gac atc gcc gtg gag tgg gag agc aat ggg cag ccg gag aac aac tac	528
Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr	
165 170 175	
aag acc acg cct ccc gtg ctg aag tcc gac ggc tcc ttc ttc ctc tat	576
Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Lys Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr	
180 185 190	
agc aag ctc acc gtg gac aag agc agg tgg cag cag ggg aac gtc ttc	624
Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe	
195 200 205	
tca tgc tcc gtg atg cat gag gct ctg cac aac cac tac acg cag aag	672
Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys	
210 215 220	
agc ctc tcc ctg tct ccg ggt aaa tga	699
Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys	
225 230	

<210> 6
 <211> 232
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

5

<400> 6

ES 2 668 895 T3

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

<211> 699
<212> ADN
<213> *Homo sapiens*

5 <220>
<221> CDS
<222> (1)..(699)

10 <220>
<221> mutación
<222> (286)..(286)

15 <220>
<221> mutación
<222> (287)..(287)

20 <220>
<221> mutación
<222> (355)..(355)

25 <220>
<221> mutación
<222> (357)..(357)

30 <220>
<221> mutación
<222> (529)..(529)

35 <220>
<221> mutación
<222> (531)..(531)

40 <220>
<221> mutación
<222> (580)..(580)

45 <220>
<221> mutación
<222> (582)..(582)

<400> 7

gag ccc aaa tct tgt gac aaa act cac aca tgc cca ccg tgc cca gca	48
Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala	
1 5 10 15	
cct gaa ctc ctg ggg gga ccg tca gtc ttc ctc ttc ccc cca aaa ccc	96
Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro	
20 25 30	
aag gac acc ctc atg atc tcc egg acc cct gag gtc aca tgc gtg gtg	144
Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val	
35 40 45	
gtg gac gtg agc cac gaa gac cct gag gtc aag ttc aac tgg tac gtg	192
Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val	
50 55 60	
gac ggc gtg gag gtg cat aat gcc aag aca aag ccg cgg gag gag cag	240
Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln	
65 70 75 80	
tac aac agc acg tac cgt gtg gtc agc gtc ctc acc gtc ctg cac atg	288
Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Met	
85 90 95	
gac tgg ctg aat ggc aag gag tac aag tgc aag gtc tcc aac aaa gcc	336
Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala	
100 105 110	
ctc cca gcc ccc atc gag gtg acc atc tcc aaa gcc aaa ggg cag ccc	384
Leu Pro Ala Pro Ile Glu Val Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro	
115 120 125	
cga gaa cca cag gtg tac acc ctg ccc cca tcc ccg gag gag atg acc	432
Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr	
130 135 140	
aag aac cag gtc agc ctg acc tgc ctg gtc aaa ggc ttc tat ccc agc	480
Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser	
145 150 155 160	
gac atc gcc gtg gag tgg gag agc aat ggg cag ccg gag aac aac tac	528
Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr	
165 170 175	
gac acc acg cct ccc gtg ctg gac tcc gac ggc tcc ttc ttc ctc tat	576
Asp Thr Thr Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr	
180 185 190	
agc gac ctc acc gtg gac aag agc agg tgg cag cag ggg aac gtc ttc	624
Ser Asp Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe	
195 200 205	
tca tgc tcc gtg atg cat gag gct ctg cac aac cac tac acg cag aag	672
Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys	
210 215 220	
agc ctc tcc ctg tct ccg ggt aaa tga	699
Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys	
225 230	

ES 2 668 895 T3

<210> 8
 <211> 232
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

5

<400> 8

Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala
 1 5 10 15

Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro
 20 25 30

Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val
 35 40 45

Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val
 50 55 60

Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln
 65 70 75 80

Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Met
 85 90 95

Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala
 100 105 110

Leu Pro Ala Pro Ile Glu Val Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro
 115 120 125

Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr
 130 135 140

Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser
 145 150 155 160

Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr
 165 170 175

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

Ser Asp Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe

ES 2 668 895 T3

195

200

205

Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys
 210 215 220

Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 225 230

5 <210> 9
 <211> 699
 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*

10 <220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(699)

15 <220>
 <221> mutación
 <222> (55)..(55)

<220>
 <221> mutación
 <222> (56)..(56)

20 <220>
 <221> mutación
 <222> (57)..(57)

25 <220>
 <221> mutación
 <222> (235)..(235)

30 <220>
 <221> mutación
 <222> (236)..(236)

35 <220>
 <221> mutación
 <222> (242)..(242)

<220>
 <221> mutación
 <222> (243)..(243)

40 <220>
 <221> mutación
 <222> (421)..(421)

45 <220>
 <221> mutación
 <222> (550)..(550)

50 <220>
 <221> mutación
 <222> (552)..(552)

<400> 9

gag ccc aaa tct tgt gac aaa act cac aca tgc cca ccg tgc cca gca 48

Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala
 1 5 10 15

cct gaa tat ctg ggg gga ccg tca gtc ttc ctc ttc ccc cca aaa ccc 96
 Pro Glu Tyr Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro
 20 25 30

aag gac acc ctc atg atc tcc cgg acc cct gag gtc aca tgc gtg gtg 144
 Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val
 35 40 45

gtg gac gtg agc cac gaa gac cct gag gtc aag ttc aac tgg tac gtg 192
 Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val
 50 55 60

gac ggc gtg gag gtg cat aat gcc aag aca aag ccg cgg gag ctg cag 240
 Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Leu Gln
 65 70 75 80

tgg aac agc acg tac cgt gtg gtc agc gtc ctc acc gtc ctg cac cag 288
 Trp Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln
 85 90 95

gac tgg ctg aat ggc aag gag tac aag tgc aag gtc tcc aac aaa gcc 336
 Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala
 100 105 110

ctc cca gcc ccc atc gag aaa acc atc tcc aaa gcc aaa ggg cag ccc 384
 Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro
 115 120 125

cga gaa cca cag gtg tac acc ctg ccc cca tcc cgg aag gag atg acc 432
 Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Lys Glu Met Thr
 130 135 140

aag aac cag gtc agc ctg acc tgc ctg gtc aaa ggc ttc tat ccc agc 480
 Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser
 145 150 155 160

gac atc gcc gtg gag tgg gag agc aat ggg cag ccg gag aac aac tac 528
 Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr
 165 170 175

aag acc acg cct ccc gtg ctg aag tcc gac ggc tcc ttc ttc ctc tat 576
 Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Lys Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr
 180 185 190

agc aag ctc acc gtg gac aag agc agg tgg cag cag ggg aac gtc ttc 624
 Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe
 195 200 205

tca tgc tcc gtg atg cat gag gct ctg cac aac cac tac acg cag aag 672
 Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys
 210 215 220

agc ctc tcc ctg tct ccg ggt aaa tga 699
 Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 225 230

<210> 10
<211> 232
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

5

<400> 10

ES 2 668 895 T3

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

<210> 11
 <211> 699

<212> ADN
 <213> *Homo sapiens*

 5 <220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(699)

 10 <220>
 <221> mutación
 <222> (52)..(52)

 15 <220>
 <221> mutación
 <222> (53)..(53)

 20 <220>
 <221> mutación
 <222> (54)..(54)

 25 <220>
 <221> mutación
 <222> (286)..(286)

 30 <220>
 <221> mutación
 <222> (287)..(287)

 35 <220>
 <221> mutación
 <222> (355)..(355)

 40 <220>
 <221> mutación
 <222> (356)..(356)

 45 <220>
 <221> mutación
 <222> (357)..(357)

 50 <220>
 <221> mutación
 <222> (529)..(529)

 55 <220>
 <221> mutación
 <222> (531)..(531)

 <220>
 <221> mutación
 <222> (580)..(580)

 <220>
 <221> mutación
 <222> (582)..(582)
 <400> 11

ES 2 668 895 T3

gag ccc aaa tct tgt gac aaa act cac aca tgc cca ccg tgc cca gca	48
Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala	
1 5 10 15	
cct ctg ctc ctg ggg gga ccg tca gtc ttc ctc ttc ccc cca aaa ccc	96
Pro Leu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro	
20 25 30	
aag gac acc ctc atg atc tcc cgg acc cct gag gtc aca tgc gtg gtg	144
Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val	
35 40 45	
gtg gac gtg agc cac gaa gac cct gag gtc aag ttc aac tgg tac gtg	192
Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val	
50 55 60	
gac ggc gtg gag gtg cat aat gcc aag aca aag ccg cgg gag gag cag	240
Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln	
65 70 75 80	
tac aac agc acg tac cgt gtg gtc agc gtc ctc acc gtc ctg cac atg	288
Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Met	
85 90 95	
gac tgg ctg aat ggc aag gag tac aag tgc aag gtc tcc aac aaa gcc	336
Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala	
100 105 110	
ctc cca gcc ccc atc gag gtg acc atc tcc aaa gcc aaa ggg cag ccc	384
Leu Pro Ala Pro Ile Glu Val Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro	
115 120 125	
cga gaa cca cag gtg tac acc ctg ccc cca tcc cgg gag gag atg acc	432
Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr	
130 135 140	
aag aac cag gtc agc ctg acc tgc ctg gtc aaa ggc ttc tat ccc agc	480
Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser	
145 150 155 160	
gac atc gcc gtg gag tgg gag agc aat ggg cag ccg gag aac aac tac	528
Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr	
165 170 175	
gac acc acg cct ccc gtg ctg gac tcc gac ggc tcc ttc ttc ctc tat	576
Asp Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr	
180 185 190	
agc gac ctc acc gtg gac aag agc agg tgg cag cag ggg aac gtc ttc	624
Ser Asp Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe	
195 200 205	
tca tgc tcc gtg atg cat gag gct ctg cac aac cac tac acg cag aag	672
Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys	
210 215 220	
agc ctc tcc ctg tct ccg ggt aaa tga	699
Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys	
225 230	

<210> 12
 <211> 232
 <212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 12

ES 2 668 895 T3

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

<210> 13
<211> 699

<212> ADN
<213> *Homo sapiens*

5 <220>
<221> CDS
<222> (1)..(699)

10 <220>
<221> mutación
<222> (55)..(55)

15 <220>
<221> mutación
<222> (286)..(286)

20 <220>
<221> mutación
<222> (287)..(287)

25 <220>
<221> mutación
<222> (355)..(355)

30 <220>
<221> mutación
<222> (356)..(356)

35 <220>
<221> mutación
<222> (357)..(357)

40 <220>
<221> mutación
<222> (529)..(529)

45 <220>
<221> mutación
<222> (531)..(531)

<220>
<221> mutación
<222> (580)..(580)

<220>
<221> mutación
<222> (582)..(582)

<400> 13

ES 2 668 895 T3

gag ccc aaa tct tgt gac aaa act cac aca tgc cca ccg tgc cca gca	48
Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala	
1 5 10 15	
cct gaa atc ctg ggg gga ccg tca gtc ttc ctc ttc ccc cca aaa ccc	96
Pro Glu Ile Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro	
20 25 30	
aag gac acc ctc atg atc tcc cgg acc cct gag gtc aca tgc gtg gtg	144
Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val	
35 40 45	
gtg gac gtg agc cac gaa gac cct gag gtc aag ttc aac tgg tac gtg	192
Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val	
50 55 60	
gac ggc gtg gag gtg cat aat gcc aag aca aag ccg cgg gag gag cag	240
Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln	
65 70 75 80	
tac aac agc acg tac cgt gtg gtc agc gtc ctc acc gtc ctg cac atg	288
Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Met	
85 90 95	
gac tgg ctg aat ggc aag gag tac aag tgc aag gtc tcc aac aaa gcc	336
Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala	
100 105 110	
ctc cca gcc ccc atc gag gtg acc atc tcc aaa gcc aaa ggg cag ccc	384
Leu Pro Ala Pro Ile Glu Val Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro	
115 120 125	
cga gaa cca cag gtg tac acc ctg ccc cca tcc cgg gag gag atg acc	432
Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr	
130 135 140	
aag aac cag gtc agc ctg acc tgc ctg gtc aaa ggc ttc tat ccc agc	480
Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser	
145 150 155 160	
gac atc gcc gtg gag tgg gag agc aat ggg cag ccg gag aac aac tac	528
Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr	
165 170 175	
gac acc acg cct ccc gtg ctg gac tcc gac ggc tcc ttc ttc ctc tat	576
Asp Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr	
180 185 190	
agc gac ctc acc gtg gac aag agc agg tgg cag cag ggg aac gtc ttc	624
Ser Asp Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe	
195 200 205	
tca tgc tcc gtg atg cat gag gct ctg cac aac cac tac acg cag aag	672
Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys	
210 215 220	
agc ctc tcc ctg tct ccg ggt aaa tga	699
Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys	
225 230	

<210> 14
<211> 232

ES 2 668 895 T3

<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 14

5

Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala
1 5 10 15

Pro Glu Ile Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro
20 25 30

ES 2 668 895 T3

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

<210> 15
 <211> 699
 5 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*

<220>
 10 <221> CDS
 <222> (1)..(699)

<220>
 <221> mutación

<222> (248)..(248)

5 <220>
<221> mutación
<222> (355)..(355)

10 <220>
<221> mutación
<222> (356)..(356)

<220>
<221> mutación
<222> (357)..(357)

15 <220>
<221> mutación
<222> (529)..(529)

20 <220>
<221> mutación
<222> (531)..(531)

25 <220>
<221> mutación
<222> (580)..(580)

30 <220>
<221> mutación
<222> (582)..(582)

<400> 15

ES 2 668 895 T3

gag ccc aaa tct tgt gac aaa act cac aca tgc cca ccg tgc cca gca	48
Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala	
1 5 10 15	
cct gaa ctc ctg ggg gga ccg tca gtc ttc ctc ttc ccc cca aaa ccc	96
Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro	
20 25 30	
aag gac acc ctc atg atc tcc cgg acc cct gag gtc aca tgc gtg gtg	144
Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val	
35 40 45	
gtg gac gtg agc cac gaa gac cct gag gtc aag ttc aac tgg tac gtg	192
Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val	
50 55 60	
gac ggc gtg gag gtg cat aat gcc aag aca aag ccg cgg gag gag cag	240
Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln	
65 70 75 80	
tac aac acc acg tac cgt gtg gtc agc gtc ctc acc gtc ctg cac cag	288
Tyr Asn Thr Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln	
85 90 95	
gac tgg ctg aat ggc aag gag tac aag tgc aag gtc tcc aac aaa gcc	336
Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala	
100 105 110	
ctc cca gcc ccc atc gag gtg acc atc tcc aaa gcc aaa ggg cag ccc	384
Leu Pro Ala Pro Ile Glu Val Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro	
115 120 125	
cga gaa cca cag gtg tac acc ctg ccc cca tcc cgg gag gag atg acc	432
Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr	
130 135 140	
aag aac cag gtc agc ctg acc tgc ctg gtc aaa ggc ttc tat ccc agc	480
Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser	
145 150 155 160	
gac atc gcc gtg gag tgg gag agc aat ggg cag ccg gag aac aac tac	528
Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr	
165 170 175	
gac acc acg cct ccc gtg ctg gac tcc gac ggc tcc ttc ttc ctc tat	576
Asp Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr	
180 185 190	
agc gac ctc acc gtg gac aag agc agg tgg cag cag ggg aac gtc ttc	624
Ser Asp Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe	
195 200 205	
tca tgc tcc gtg atg cat gag gct ctg cac aac cac tac acg cag aag	672
Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys	
210 215 220	
agc ctc tcc ctg tct ccg ggt aaa tga	699
Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys	
225 230	

<210> 16
 <211> 232
 <212> PRT

ES 2 668 895 T3

<213> *Homo sapiens*

<400> 16

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

5

ES 2 668 895 T3

Leu Pro Ala Pro Ile Glu Val Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro
 115 120 125
 Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr
 130 135 140
 Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser
 145 150 155 160
 Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr
 165 170 175
 Asp Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr
 180 185 190
 Ser Asp Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe
 195 200 205
 Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys
 210 215 220
 Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 225 230

- 5 <210> 17
- <211> 699
- <212> ADN
- <213> *Homo sapiens*
- 10 <220>
- <221> CDS
- <222> (1)..(699)
- 15 <220>
- <221> mutación
- <222> (55)..(55)
- 20 <220>
- <221> mutación
- <222> (56)..(56)
- 25 <220>
- <221> mutación
- <222> (223)..(223)
- 30 <220>
- <221> mutación
- <222> (225)..(225)
- <220>
- <221> mutación

<222> (242)..(242)

5 <220>
<221> mutación
<222> (243)..(243)

10 <220>
<221> mutación
<222> (421)..(421)

15 <220>
<221> mutación
<222> (550)..(550)

20 <220>
<221> mutación
<222> (552)..(552)

<400> 17

ES 2 668 895 T3

gag ccc aaa tct tgt gac aaa act cac aca tgc cca ccg tgc cca gca	48
Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala	
1 5 10 15	
cct gaa tat ctg ggg gga ccg tca gtc ttc ctc ttc ccc cca aaa ccc	96
Pro Glu Tyr Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro	
20 25 30	
aag gac acc ctc atg atc tcc ccg acc cct gag gtc aca tgc gtg gtg	144
Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val	
35 40 45	
gtg gac gtg agc cac gaa gac cct gag gtc aag ttc aac tgg tac gtg	192
Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val	
50 55 60	
gac ggc gtg gag gtg cat aat gcc aag aca tat ccg ccg gag gag cag	240
Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Tyr Pro Arg Glu Glu Gln	
65 70 75 80	
tgg aac agc acg tac cgt gtg gtc agc gtc ctc acc gtc ctg cac cag	288
Trp Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln	
85 90 95	
gac tgg ctg aat ggc aag gag tac aag tgc aag gtc tcc aac aaa gcc	336
Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala	
100 105 110	
ctc cca gcc ccc atc gag aaa acc atc tcc aaa gcc aaa ggg cag ccc	384
Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro	
115 120 125	
cga gaa cca cag gtg tac acc ctg ccc cca tcc ccg aag gag atg acc	432
Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Lys Glu Met Thr	
130 135 140	
aag aac cag gtc agc ctg acc tgc ctg gtc aaa ggc ttc tat ccc agc	480
Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser	
145 150 155 160	
gac atc gcc gtg gag tgg gag agc aat ggg cag ccg gag aac aac tac	528
Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr	
165 170 175	
aag acc acg cct ccc gtg ctg aag tcc gac ggc tcc ttc ttc ctc tat	576
Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Lys Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr	
180 185 190	
agc aag ctc acc gtg gac aag agc agg tgg cag cag ggg aac gtc ttc	624
Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe	
195 200 205	
tca tgc tcc gtg atg cat gag gct ctg cac aac cac tac acg cag aag	672
Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys	
210 215 220	
agc ctc tcc ctg tct ccg ggt aaa tga	699
Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys	
225 230	

<210> 18
<211> 232

ES 2 668 895 T3

<212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

<400> 18

5

Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala
 1 5 10 15

Pro Glu Tyr Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro
 20 25 30

Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val
 35 40 45

Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val
 50 55 60

Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Tyr Pro Arg Glu Glu Gln
 65 70 75 80

Trp Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln
 85 90 95

Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala
 100 105 110

Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro
 115 120 125

Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Lys Glu Met Thr
 130 135 140

ES 2 668 895 T3

Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser
 145 150 155 160

Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr
 165 170 175

Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Lys Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr
 180 185 190

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

Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys
 210 215 220

Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 225 230

5 <210> 19
 <211> 699
 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*

10 <220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(699)

15 <220>
 <221> mutación
 <222> (343)..(343)

<220>
 <221> mutación
 <222> (344)..(344)

20 <220>
 <221> mutación
 <222> (345)..(345)

25 <220>
 <221> mutación
 <222> (355)..(355)

30 <220>
 <221> mutación
 <222> (356)..(356)

35 <220>
 <221> mutación
 <222> (357)..(357)

<220>
 <221> mutación
 <222> (529)..(529)

40 <220>
 <221> mutación
 <222> (531)..(531)

<220>
<221> mutación
<222> (580)..(580)

5 <220>
<221> mutación
<222> (582)..(582)

10 <400> 19

ES 2 668 895 T3

gag ccc aaa tct tgt gac aaa act cac aca tgc cca ccg tgc cca gca 48
 Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala
 1 5 10 15

cct gaa ctc ctg ggg gga ccg tca gtc ttc ctc ttc ccc cca aaa ccc 96
 Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro
 20 25 30

aag gac acc ctc atg atc tcc cgg acc cct gag gtc aca tgc gtg gtg 144
 Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val
 35 40 45

gtg gac gtg agc cac gaa gac cct gag gtc aag ttc aac tgg tac gtg 192
 Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val
 50 55 60

gac ggc gtg gag gtg cat aat gcc aag aca aag ccg cgg gag gag cag 240
 Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln
 65 70 75 80

tac aac agc acg tac cgt gtg gtc agc gtc ctc acc gtc ctg cac cag 288
 Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln
 85 90 95

gac tgg ctg aat ggc aag gag tac aag tgc aag gtc tcc aac aaa gcc 336
 Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala
 100 105 110

ctc cca atg ccc atc gag gtg acc atc tcc aaa gcc aaa ggg cag ccc 384
 Leu Pro Met Pro Ile Glu Val Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro
 115 120 125

cga gaa coa cag gtg tac acc ctg ccc coa toc cgg gag gag atg acc 432
 Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr
 130 135 140

aag aac cag gtc agc ctg acc tgc ctg gtc aaa ggc ttc tat ccc agc 480
 Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser
 145 150 155 160

gac atc gcc gtg gag tgg gag agc aat ggg cag ccg gag aac aac tac 528
 Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr
 165 170 175

gac acc acg cct ccc gtg ctg gac tcc gac ggc tcc ttc ttc ctc tat 576
 Asp Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr
 180 185 190

agc gac ctc acc gtg gac aag agc agg tgg cag cag ggg aac gtc ttc 624
 Ser Asp Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe
 195 200 205

tca tgc tcc gtg atg cat gag gct ctg cac aac cac tac acg cag aag 672
 Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys
 210 215 220

agc ctc tcc ctg tct ccg ggt aaa tga 699
 Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 225 230

<210> 20
 <211> 232
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

ES 2 668 895 T3

<400> 20

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

<210> 21
<211> 699
<212> AND
<213> *Homo sapiens*

5

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(699)

10

<220>
<221> mutación
<222> (343)..(343)

15

<220>
<221> mutación
<222> (344)..(344)

20

<220>
<221> mutación
<222> (355)..(355)

25

<220>
<221> mutación
<222> (356)..(356)

30

<220>
<221> mutación
<222> (357)..(357)

35

<220>
<221> mutación
<222> (529)..(529)

40

<220>
<221> mutación
<222> (531)..(531)

45

<220>
<221> mutación
<222> (580)..(580)

<220>
<221> mutación
<222> (582)..(582)

<400> 21

ES 2 668 895 T3

	gag ccc aaa tct tgt gac aaa act cac aca tgc cca ccg tgc cca gca	48		
	Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala			
1	5	10	15	
	cct gaa ctc ctg ggg gga ccg tca gtc ttc ctc ttc ccc cca aaa ccc	96		
	Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro			
	20	25	30	
	aag gac acc ctc atg atc tcc ccg acc cct gag gtc aca tgc gtg gtg	144		
	Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val			
	35	40	45	
	gtg gac gtg agc cac gaa gac cct gag gtc aag ttc aac tgg tac gtg	192		
	Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val			
	50	55	60	
	gac ggc gtg gag gtg cat aat gcc aag aca aag ccg ccg gag gag cag	240		
	Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln			
	65	70	75	80
	tac aac agc acg tac cgt gtg gtc agc gtc ctc acc gtc ctg cac cag	288		
	Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln			
	85	90	95	
	gac tgg ctg aat ggc aag gag tac aag tgc aag gtc tcc aac aaa gcc	336		
	Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala			
	100	105	110	
	ctc cca ttc ccc atc gag gtg acc atc tcc aaa gcc aaa ggg cag ccc	384		
	Leu Pro Phe Pro Ile Glu Val Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro			
	115	120	125	
	cga gaa cca cag gtg tac acc ctg ccc cca tcc ccg gag gag atg acc	432		
	Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr			
	130	135	140	
	aag aac cag gtc agc ctg acc tgc ctg gtc aaa ggc ttc tat ccc agc	480		
	Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser			
	145	150	155	160
	gac atc gcc gtg gag tgg gag agc aat ggg cag ccg gag aac aac tac	528		
	Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr			
	165	170	175	
	gac acc acg cct ccc gtg ctg gac tcc gac ggc tcc ttc ttc ctc tat	576		
	Asp Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr			
	180	185	190	
	agc gac ctc acc gtg gac aag agc agg tgg cag cag ggg aac gtc ttc	624		
	Ser Asp Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe			
	195	200	205	
	tca tgc tcc gtg atg cat gag gct ctg cac aac cac tac acg cag aag	672		
	Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys			
	210	215	220	
	agc ctc tcc ctg tct ccg ggt aaa tga	699		
	Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys			
	225	230		

<210> 22

<211> 232

<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 22

5

ES 2 668 895 T3

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

<210> 23
 <211> 699

<212> ADN
 <213> *Homo sapiens*

 5 <220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(699)

 10 <220>
 <221> mutación
 <222> (286)..(286)

 15 <220>
 <221> mutación
 <222> (287)..(287)

 20 <220>
 <221> mutación
 <222> (343)..(343)

 25 <220>
 <221> mutación
 <222> (344)..(344)

 30 <220>
 <221> mutación
 <222> (345)..(345)

 35 <220>
 <221> mutación
 <222> (355)..(355)

 40 <220>
 <221> mutación
 <222> (356)..(356)

 45 <220>
 <221> mutación
 <222> (357)..(357)

 50 <220>
 <221> mutación
 <222> (529)..(529)

 55 <220>
 <221> mutación
 <222> (531)..(531)

 <220>
 <221> mutación
 <222> (580)..(580)

 <220>
 <221> mutación
 <222> (582)..(582)

 <400> 23

ES 2 668 895 T3

gag ccc aaa tct tgt gac aaa act cac aca tgc cca ccg tgc cca gca	48
Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala	
1 5 10 15	
cct gaa ctc ctg ggg gga cgg tca gtc ttc ctc ttc ccc cca aaa ccc	96
Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro	
20 25 30	
aag gac acc ctc atg atc tcc cgg acc cct gag gtc aca tgc gtg gtg	144
Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val	
35 40 45	
gtg gac gtg agc cac gaa gac cct gag gtc aag ttc aac tgg tac gtg	192
Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val	
50 55 60	
gac ggc gtg gag gtg cat aat gcc aag aca aag cgg cgg gag gag cag	240
Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln	
65 70 75 80	
tac aac agc acg tac cgt gtg gtc agc gtc ctc acc gtc ctg cac atg	288
Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Met	
85 90 95	
gac tgg ctg aat ggc aag gag tac aag tgc aag gtc tcc aac aaa gcc	336
Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala	
100 105 110	
ctc cca atg ccc atc gag gtg acc atc tcc aaa gcc aaa ggg cag ccc	384
Leu Pro Met Pro Ile Glu Val Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro	
115 120 125	
cga gaa cca cag gtg tac acc ctg ccc cca tcc cgg gag gag atg acc	432
Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr	
130 135 140	
aag aac cag gtc agc ctg acc tgc ctg gtc aaa ggc ttc tat ccc agc	480
Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser	
145 150 155 160	
gac atc gcc gtg gag tgg gag agc aat ggg cag cgg gag aac aac tac	528
Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr	
165 170 175	
gac acc acg cct ccc gtg ctg gac tcc gac ggc tcc ttc ttc ctc tat	576
Asp Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr	
180 185 190	
agc gac ctc acc gtg gac aag agc agg tgg cag cag ggg aac gtc ttc	624
Ser Asp Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe	
195 200 205	
tca tgc tcc gtg atg cat gag gct ctg cac aac cac tac acg cag aag	672
Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys	
210 215 220	
agc ctc tcc ctg tct cgg ggt aaa tga	699
Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys	
225 230	

<210> 24

<211> 232
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

5 <400> 24

ES 2 668 895 T3

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

<210> 25
 <211> 699

<212> ADN
 <213> *Homo sapiens*

 5 <220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(699)

 10 <220>
 <221> mutación
 <222> (286)..(286)

 15 <220>
 <221> mutación
 <222> (287)..(287)

 20 <220>
 <221> mutación
 <222> (343)..(343)

 25 <220>
 <221> mutación
 <222> (344)..(344)

 30 <220>
 <221> mutación
 <222> (355)..(355)

 35 <220>
 <221> mutación
 <222> (356)..(356)

 40 <220>
 <221> mutación
 <222> (357)..(357)

 45 <220>
 <221> mutación
 <222> (529)..(529)

 50 <220>
 <221> mutación
 <222> (531)..(531)

 <220>
 <221> mutación
 <222> (531)..(531)

 45 <220>
 <221> mutación
 <222> (580)..(580)

 50 <220>
 <221> mutación
 <222> (582)..(582)

 <400> 25

ES 2 668 895 T3

gag	ccc	aaa	tct	tgt	gac	aaa	act	cac	aca	tgc	cca	ccg	tgc	cca	gca	48
Glu	Pro	Lys	Ser	Cys	Asp	Lys	Thr	His	Thr	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	
1				5					10					15		
cct	gaa	ctc	ctg	ggg	gga	ccg	tca	gtc	ttc	ctc	ttc	ccc	cca	aaa	ccc	96
Pro	Glu	Leu	Leu	Gly	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	
			20					25					30			
aag	gac	acc	ctc	atg	atc	tcc	cgg	acc	cct	gag	gtc	aca	tgc	gtg	gtg	144
Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	
		35						40					45			
gtg	gac	gtg	agc	cac	gaa	gac	cct	gag	gtc	aag	ttc	aac	tgg	tac	gtg	192
Val	Asp	Val	Ser	His	Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Lys	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	
	50						55				60					
gac	ggc	gtg	gag	gtg	cat	aat	gcc	aag	aca	aag	ccg	cgg	gag	gag	cag	240
Asp	Gly	Val	Glu	Val	His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	
65					70					75					80	
tac	aac	agc	acg	tac	cgt	gtg	gtc	agc	gtc	ctc	acc	gtc	ctg	cac	atg	288
Tyr	Asn	Ser	Thr	Tyr	Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu	His	Met	
				85					90					95		
gac	tgg	ctg	aat	ggc	aag	gag	tac	aag	tgc	aag	gtc	tcc	aac	aaa	gcc	336
Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Ala	
			100					105					110			
ctc	cca	ttc	ccc	atc	gag	gtg	acc	atc	tcc	aaa	gcc	aaa	ggg	cag	ccc	384
Leu	Pro	Phe	Pro	Ile	Glu	Val	Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly	Gln	Pro	
		115						120				125				
cga	gaa	cca	cag	gtg	tac	acc	ctg	ccc	cca	tcc	cgg	gag	gag	atg	acc	432
Arg	Glu	Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro	Ser	Arg	Glu	Glu	Met	Thr	
	130					135					140					
aag	aac	cag	gtc	agc	ctg	acc	tgc	ctg	gtc	aaa	ggc	ttc	tat	ccc	agc	480
Lys	Asn	Gln	Val	Ser	Leu	Thr	Cys	Leu	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser	
145					150					155					160	
gac	atc	gcc	gtg	gag	tgg	gag	agc	aat	ggg	cag	ccg	gag	aac	aac	tac	528
Asp	Ile	Ala	Val	Glu	Trp	Glu	Ser	Asn	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn	Asn	Tyr	
				165					170					175		
gac	acc	acg	cct	ccc	gtg	ctg	gac	tcc	gac	ggc	tcc	ttc	ttc	ctc	tat	576
Asp	Thr	Thr	Pro	Pro	Val	Leu	Asp	Ser	Asp	Gly	Ser	Phe	Phe	Leu	Tyr	
			180					185					190			
agc	gac	ctc	acc	gtg	gac	aag	agc	agg	tgg	cag	cag	ggg	aac	gtc	ttc	624
Ser	Asp	Leu	Thr	Val	Asp	Lys	Ser	Arg	Trp	Gln	Gln	Gly	Asn	Val	Phe	
		195					200					205				
tca	tgc	tcc	gtg	atg	cat	gag	gct	ctg	cac	aac	cac	tac	acg	cag	aag	672
Ser	Cys	Ser	Val	Met	His	Glu	Ala	Leu	His	Asn	His	Tyr	Thr	Gln	Lys	
	210					215					220					
agc	ctc	tcc	ctg	tct	ccg	ggt	aaa	tga								699
Ser	Leu	Ser	Leu	Ser	Pro	Gly	Lys									
225					230											

ES 2 668 895 T3

<210> 26
<211> 232
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

5

<400> 26

Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala
1 5 10 15

Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro

ES 2 668 895 T3

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

5
 <210> 27
 <211> 699
 <212> AND
 <213> *Homo sapiens*
 <220>

<221> CDS
 <222> (1)..(699)

5 <220>
 <221> mutación
 <222> (248)..(248)

10 <220>
 <221> mutación
 <222> (343)..(343)

15 <220>
 <221> mutación
 <222> (344)..(344)

20 <220>
 <221> mutación
 <222> (345)..(345)

25 <220>
 <221> mutación
 <222> (356)..(356)

30 <220>
 <221> mutación
 <222> (357)..(357)

35 <220>
 <221> mutación
 <222> (529)..(529)

40 <220>
 <221> mutación
 <222> (580)..(580)

45 <220>
 <221> mutación
 <222> (582)..(582)

<400> 27

gag ccc aaa tct tgt gac aaa act cac aca tgc cca ccg tgc cca gca	48
Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala	
1 5 10 15	
cct gaa ctc ctg ggg gga ccg tca gtc ttc ctc ttc ccc cca aaa ccc	96
Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro	
20 25 30	
aag gac acc ctc atg atc tcc ccg acc cct gag gtc aca tgc gtg gtg	144
Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val	
35 40 45	
gtg gac gtg agc cac gaa gac cct gag gtc aag ttc aac tgg tac gtg	192
Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val	
50 55 60	
gac ggc gtg gag gtg cat aat gcc aag aca aag ccg ccg gag gag cag	240
Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln	
65 70 75 80	
tac aac acc acg tac cgt gtg gtc agc gtc ctc acc gtc ctg cac cag	288
Tyr Asn Thr Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln	
85 90 95	
gac tgg ctg aat ggc aag gag tac aag tgc aag gtc tcc aac aaa gcc	336
Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala	
100 105 110	
ctc cca atg ccc atc gag gtg acc atc tcc aaa gcc aaa ggg cag ccc	384
Leu Pro Met Pro Ile Glu Val Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro	
115 120 125	
cga gaa cca cag gtg tac acc ctg ccc cca tcc ccg gag gag atg acc	432
Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr	
130 135 140	
aag aac cag gtc agc ctg acc tgc ctg gtc aaa ggc ttc tat ccc agc	480
Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser	
145 150 155 160	
gac atc gcc gtg gag tgg gag agc aat ggg cag ccg gag aac aac tac	528
Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr	
165 170 175	
gac acc acg cct ccc gtg ctg gac tcc gac ggc tcc ttc ttc ctc tat	576
Asp Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr	
180 185 190	
agc gac ctc acc gtg gac aag agc agg tgg cag cag ggg aac gtc ttc	624
Ser Asp Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe	
195 200 205	
tca tgc tcc gtg atg cat gag gct ctg cac aac cac tac acg cag aag	672
Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys	
210 215 220	
agc ctc tcc ctg tct ccg ggt aaa tga	699
Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys	
225 230	

ES 2 668 895 T3

<210> 28
<211> 232
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

5

<400> 28

Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala
1 5 10 15

Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro
20 25 30

Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val
35 40 45

ES 2 668 895 T3

Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val
50 55 60

Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln
65 70 75 80

Tyr Asn Thr Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln
85 90 95

Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala
100 105 110

Leu Pro Met Pro Ile Glu Val Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro
115 120 125

Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr
130 135 140

Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser
145 150 155 160

Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr
165 170 175

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

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

Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys
210 215 220

Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
225 230

<210> 29
<211> 699
5 <212> AND
<213> *Homo sapiens*

<220>
10 <221> CDS
<222> (1)..(699)

<220>
15 <221> mutación
<222> (248)..(248)

<220>
<221> mutación

5 <222> (343)..(343)
<220>
<221> mutación
<222> (344)..(344)

10 <220>
<221> mutación
<222> (355)..(355)

15 <220>
<221> mutación
<222> (356)..(356)

20 <220>
<221> mutación
<222> (357)..(357)

25 <220>
<221> mutación
<222> (529)..(529)

30 <220>
<221> mutación
<222> (531)..(531)

35 <220>
<221> mutación
<222> (580)..(580)

<220>
<221> mutación
<222> (582)..(582)

<400> 29

ES 2 668 895 T3

gag ccc aaa tct tgt gac aaa act cac aca tgc cca ccg tgc cca gca	48
Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala	
1 5 10 15	
cct gaa ctc ctg ggg gga ccg tca gtc ttc ctc ttc ccc cca aaa ccc	96
Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro	
20 25 30	
aag gac acc ctc atg atc tcc cgg acc cct gag gtc aca tgc gtg gtg	144
Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val	
35 40 45	
gtg gac gtg agc cac gaa gac cct gag gtc aag ttc aac tgg tac gtg	192
Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val	
50 55 60	
gac ggc gtg gag gtg cat aat gcc aag aca aag ccg cgg gag gag cag	240
Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln	
65 70 75 80	
tac aac acc acg tac cgt gtg gtc agc gtc ctc acc gtc ctg cac cag	288
Tyr Asn Thr Thr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln	
85 90 95	
gac tgg ctg aat ggc aag gag tac aag tgc aag gtc tcc aac aaa gcc	336
Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala	
100 105 110	
ctc cca ttc ccc atc gag gtg acc atc tcc aaa gcc aaa ggg cag ccc	384
Leu Pro Phe Pro Ile Glu Val Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro	
115 120 125	
cga gaa cca cag gtg tac acc ctg ccc oca tcc cgg gag gag atg acc	432
Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr	
130 135 140	
aag aac cag gtc agc ctg acc tgc ctg gtc aaa ggc ttc tat ccc agc	480
Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser	
145 150 155 160	
gac atc gcc gtg gag tgg gag agc aat ggg cag ccg gag aac aac tac	528
Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr	
165 170 175	
gac acc acg cct ccc gtg ctg gac tcc gac ggc tcc ttc ttc ctc tat	576
Asp Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr	
180 185 190	
agc gac ctc acc gtg gac aag agc agg tgg cag cag ggg aac gtc ttc	624
Ser Asp Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe	
195 200 205	
tca tgc tcc gtg atg cat gag gct ctg cac aac cac tac acg cag aag	672
Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys	
210 215 220	
agc ctc tcc ctg tct ccg ggt aaa tga	699
Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys	
225 230	

ES 2 668 895 T3

<210> 30
 <211> 232
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

5

<400> 30

Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala
 1 5 10 15

Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro
 20 25 30

Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val
 35 40 45

Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val
 50 55 60

Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln
 65 70 75 80

Tyr Asn Thr Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln

<220>
<221> mutación
<222> (344)..(344)

5 <220>
<221> mutación
<222> (345)..(345)

10 <220>
<221> mutación
<222> (355)..(355)

15 <220>
<221> mutación
<222> (356)..(356)

20 <220>
<221> mutación
<222> (357)..(357)

25 <220>
<221> mutación
<222> (529)..(529)

30 <220>
<221> mutación
<222> (531)..(531)

35 <220>
<221> mutación
<222> (580)..(580)

<220>
<221> mutación
<222> (582)..(582)

<400> 31

ES 2 668 895 T3

gag ccc aaa tct tgt gac aaa act cac aca tgc cca ccg tgc cca gca	48
Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala	
1 5 10 15	
cct gaa ctc ctg ggg gga cgg gac gtc ttc ctc ttc ccc cca aaa ccc	96
Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Asp Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro	
20 25 30	
aag gac acc ctc atg atc tcc cgg acc cct gag gtc aca tgc gtg gtg	144
Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val	
35 40 45	
gtg gac gtg agc cac gaa gac cct gag gtc aag ttc aac tgg tac gtg	192
Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val	
50 55 60	
gac ggc gtg gag gtg cat aat gcc aag aca aag ccg cgg gag gag cag	240
Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln	
65 70 75 80	
tac aac agc acg tac cgt gtg gtc agc gtc ctc acc gtc ctg cac cag	288
Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln	
85 90 95	
gac tgg ctg aat ggc aag gag tac aag tgc aag gtc tcc aac aaa gcc	336
Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala	
100 105 110	
ctc cca atg ccc atc gag gtg acc atc tcc aaa gcc aaa ggg cag ccc	384
Leu Pro Met Pro Ile Glu Val Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro	
115 120 125	
cga gaa cca cag gtg tac acc ctg ccc cca tcc cgg gag gag atg acc	432
Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr	
130 135 140	
aag aac cag gtc agc ctg acc tgc ctg gtc aaa ggc ttc tat ccc agc	480
Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser	
145 150 155 160	
gac atc gcc gtg gag tgg gag agc aat ggg cag ccg gag aac aac tac	528
Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr	
165 170 175	
gac acc acg cct ccc gtg ctg gac tcc gac ggc tcc ttc ttc ctc tat	576
Asp Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr	
180 185 190	
agc gac ctc acc gtg gac aag agc agg tgg cag cag ggg aac gtc ttc	624
Ser Asp Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe	
195 200 205	
tca tgc tcc gtg atg cat gag gct ctg cac aac cac tac acg cag aag	672
Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys	
210 215 220	
agc ctc tcc ctg tct ccg ggt aaa tga	699
Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys	
225 230	

<210> 32
 <211> 232
 <212> PRT

ES 2 668 895 T3

<213> *Homo sapiens*

<400> 32

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

5

ES 2 668 895 T3

Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln
 85 90 95
 Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala
 100 105 110
 Leu Pro Met Pro Ile Glu Val Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro
 115 120 125
 Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr
 130 135 140
 Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser
 145 150 155 160
 Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr
 165 170 175
 Asp Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr
 180 185 190
 Ser Asp Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe
 195 200 205
 Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys
 210 215 220
 Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 225 230

- 5 <210> 33
- <211> 699
- <212> AND
- <213> *Homo sapiens*
- 10 <220>
- <221> CDS
- <222> (1)..(699)
- 15 <220>
- <221> mutación
- <222> (70)..(70)
- 20 <220>
- <221> mutación
- <222> (71)..(71)
- 25 <220>
- <221> mutación

<222> (248)..(248)

5 <220>
<221> mutación
<222> (355)..(355)

10 <220>
<221> mutación
<222> (356)..(356)

15 <220>
<221> mutación
<222> (529)..(529)

20 <220>
<221> mutación
<222> (531)..(531)

25 <220>
<221> mutación
<222> (580)..(580)

30 <220>
<221> mutación
<222> (582)..(582)

<400> 33

gag ccc aaa tct tgt gac aaa act cac aca tgc cca ccg tgc cca gca	48
Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala	
1 5 10 15	
cct gaa ctc ctg ggg gga ccg gac gtc ttc ctc ttc ccc cca aaa ccc	96
Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Asp Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro	
20 25 30	
aag gac acc ctc atg atc tcc cgg acc cct gag gtc aca tgc gtg gtg	144
Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val	
35 40 45	
gtg gac gtg agc cac gaa gac cct gag gtc aag ttc aac tgg tac gtg	192
Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val	
50 55 60	
gac ggc gtg gag gtg cat aat gcc aag aca aag ccg cgg gag gag cag	240
Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln	
65 70 75 80	
tac aac acc acg tac cgt gtg gtc agc gtc ctc acc gtc ctg cac cag	288
Tyr Asn Thr Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln	
85 90 95	
gac tgg ctg aat ggc aag gag tac aag tgc aag gtc tcc aac aaa gcc	336
Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala	
100 105 110	
ctc cca gcc ccc atc gag gtg acc atc tcc aaa gcc aaa ggg cag ccc	384
Leu Pro Ala Pro Ile Glu Val Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro	
115 120 125	
cga gaa cca cag gtg tac acc ctg ccc cca tcc ccg gag gag atg acc	432
Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr	
130 135 140	
aag aac cag gtc agc ctg acc tgc ctg gtc aaa ggc ttc tat ccc agc	480
Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser	
145 150 155 160	
gac atc gcc gtg gag tgg gag agc aat ggg cag ccg gag aac aac tac	528
Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr	
165 170 175	
gac acc acg cct ccc gtg ctg gac tcc gac ggc tcc ttc ttc ctc tat	576
Asp Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr	
180 185 190	
agc gac ctc acc gtg gac aag agc agg tgg cag cag ggg aac gtc ttc	624
Ser Asp Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe	
195 200 205	
tca tgc tcc gtg atg cat gag gct ctg cac aac cac tac acg cag aag	672
Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys	
210 215 220	
agc ctc tcc ctg tct ccg ggt aaa tga	699
Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys	
225 230	

ES 2 668 895 T3

<211> 232
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

5 <400> 34

Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala
 1 5 10 15

Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Asp Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro
 20 25 30

Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val
 35 40 45

Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val
 50 55 60

Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln
 65 70 75 80

Tyr Asn Thr Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln
 85 90 95

Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala

ES 2 668 895 T3

	100		105		110														
Leu	Pro	Ala	Pro	Ile	Glu	Val	Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly	Gln	Pro				
		115					120					125							
Arg	Glu	Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro	Ser	Arg	Glu	Glu	Met	Thr				
	130					135					140								
Lys	Asn	Gln	Val	Ser	Leu	Thr	Cys	Leu	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser				
145					150					155					160				
Asp	Ile	Ala	Val	Glu	Trp	Glu	Ser	Asn	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn	Asn	Tyr				
				165					170					175					
Asp	Thr	Thr	Pro	Pro	Val	Leu	Asp	Ser	Asp	Gly	Ser	Phe	Phe	Leu	Tyr				
			180					185						190					
Ser	Asp	Leu	Thr	Val	Asp	Lys	Ser	Arg	Trp	Gln	Gln	Gly	Asn	Val	Phe				
		195					200					205							
Ser	Cys	Ser	Val	Met	His	Glu	Ala	Leu	His	Asn	His	Tyr	Thr	Gln	Lys				
	210					215					220								
Ser	Leu	Ser	Leu	Ser	Pro	Gly	Lys												
225					230														

<210> 35
 <211> 176
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

5

<400> 35

ES 2 668 895 T3

Arg Thr Glu Asp Leu Pro Lys Ala Val Val Phe Leu Glu Pro Gln Trp
 1 5 10 15

Tyr Ser Val Leu Glu Lys Asp Ser Val Thr Leu Lys Cys Gln Gly Ala
 20 25 30

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

Ile Ser Ser Gln Ala Ser Ser Tyr Phe Ile Asp Ala Ala Thr Val Asn
 50 55 60

Asp Ser Gly Glu Tyr Arg Cys Gln Thr Asn Leu Ser Thr Leu Ser Asp
 65 70 75 80

Pro Val Gln Leu Glu Val His Ile Gly Trp Leu Leu Leu Gln Ala Pro
 85 90 95

Arg Trp Val Phe Lys Glu Glu Asp Pro Ile His Leu Arg Cys His Ser
 100 105 110

Trp Lys Asn Thr Ala Leu His Lys Val Thr Tyr Leu Gln Asn Gly Lys
 115 120 125

Asp Arg Lys Tyr Phe His His Asn Ser Asp Phe His Ile Pro Lys Ala
 130 135 140

Thr Leu Lys Asp Ser Gly Ser Tyr Phe Cys Arg Gly Leu Val Gly Ser
 145 150 155 160

Lys Asn Val Ser Ser Glu Thr Val Asn Ile Thr Ile Thr Gln Gly Leu
 165 170 175

5 <210> 36
 <211> 699
 <212> AND
 <213> *Homo sapiens*

10 <220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(699)

15 <220>
 <221> mutación
 <222> (343)..(343)

<220>
 <221> mutación
 <222> (344)..(344)

<220>
<221> mutación
<222> (345)..(345)

5 <220>
<221> mutación
<222> (355)..(355)

10 <220>
<221> mutación
<222> (356)..(356)

15 <220>
<221> mutación
<222> (357)..(357)

20 <220>
<221> mutación
<222> (529)..(529)

<220>
<221> mutación
<222> (531)..(531)

25 <220>
<221> mutación
<222> (580)..(580)

30 <220>
<221> mutación
<222> (582)..(582)

<400> 36

gag ccc aaa tct tgt gac aaa act cac aca tgc cca ccg tgc cca gca	48
Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala	
1 5 10 15	
cct gaa ctc ctg ggg gga ccg tca gtc ttc ctc ttc ccc cca aaa ccc	96
Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro	
20 25 30	
aag gac acc ctc atg atc tcc cgg acc cct gag gtc aca tgc gtg gtg	144
Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val	
35 40 45	
gtg gac gtg agc cac gaa gac cct gag gtc aag ttc aac tgg tac gtg	192
Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val	
50 55 60	
gac ggc gtg gag gtg cat aat gcc aag aca aag ccg ccg gag gag cag	240
Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln	
65 70 75 80	
tac aac agc acg tac cgt gtg gtc agc gtc ctc acc gtc ctg cac cag	288
Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln	
85 90 95	
gac tgg ctg aat ggc aag gag tac aag tgc aag gtc tcc aac aaa gcc	336
Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala	
100 105 110	
ctc cca atg ccc atc gag gtg acc atc tcc aaa gcc aaa ggg cag ccc	384
Leu Pro Met Pro Ile Glu Val Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro	
115 120 125	
cga gaa cca cag gtg tac acc ctg ccc cca tcc ccg gag gag atg acc	432
Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr	
130 135 140	
aag aac cag gtc agc ctg acc tgc ctg gtc aaa ggc ttc tat ccc agc	480
Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser	
145 150 155 160	
gac atc gcc gtg gag tgg gag agc aat ggg cag ccg gag aac aac tac	528
Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr	
165 170 175	
gac acc acg cct ccc gtg ctg gac tcc gac ggc tcc ttc ttc ctc tat	576
Asp Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr	
180 185 190	
agc gac ctc acc gtg gac aag agc agg tgg cag cag ggg aac gtc ttc	624
Ser Asp Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe	
195 200 205	
tca tgc tcc gtg atg cat gag gct ctg cac aac cac tac acg cag aag	672
Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys	
210 215 220	
agc ctc tcc ctg tct ccg ggt aaa tga	699
Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys	
225 230	

ES 2 668 895 T3

<211> 232
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

5 <400> 37

Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala
 1 5 10 15

Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro
 20 25 30

Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val
 35 40 45

Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val
 50 55 60

Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln
 65 70 75 80

Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln
 85 90 95

Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala
 100 105 110

Leu Pro Met Pro Ile Glu Val Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro
 115 120 125

Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr
 130 135 140

Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser
 145 150 155 160

Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr
 165 170 175

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

ES 2 668 895 T3

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

Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys
 210 215 220

Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 225 230

5 <210> 38
 <211> 699
 <212> AND
 <213> *Homo sapiens*

10 <220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(699)

15 <220>
 <221> mutación
 <222> (55)..(55)

20 <220>
 <221> mutación
 <222> (56)..(56)

25 <220>
 <221> mutación
 <222> (57)..(57)

30 <220>
 <221> mutación
 <222> (242)..(242)

35 <220>
 <221> mutación
 <222> (243)..(243)

40 <220>
 <221> mutación
 <222> (421)..(421)

45 <220>
 <221> mutación
 <222> (550)..(550)

50 <220>
 <221> mutación
 <222> (552)..(552)

55 <400> 38

gag ccc aaa tct tgt gac aaa act cac aca tgc cca ccg tgc cca gca	48
Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala	
1 5 10 15	
cct gaa tat ctg ggg gga ccg tca gtc ttc ctc ttc ccc cca aaa ccc	96
Pro Glu Tyr Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro	
20 25 30	
aag gac acc ctc atg atc tcc cgg acc cct gag gtc aca tgc gtg gtg	144
Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val	
35 40 45	
gtg gac gtg agc cac gaa gac cct gag gtc aag ttc aac tgg tac gtg	192
Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val	
50 55 60	
gac ggc gtg gag gtg cat aat gcc aag aca aag ccg cgg gag gag cag	240
Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln	
65 70 75 80	
tgg aac agc acg tac cgt gtg gtc agc gtc ctc acc gtc ctg cac cag	288
Trp Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln	
85 90 95	
gac tgg ctg aat ggc aag gag tac aag tgc aag gtc tcc aac aaa gcc	336
Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala	
100 105 110	
ctc cca gcc ccc atc gag aaa acc atc tcc aaa gcc aaa ggg cag ccc	384
Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro	
115 120 125	
cga gaa cca cag gtg tac acc ctg ccc cca tcc cgg aag gag atg acc	432
Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Lys Glu Met Thr	
130 135 140	
aag aac cag gtc agc ctg acc tgc ctg gtc aaa ggc ttc tat ccc agc	480
Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser	
145 150 155 160	
gac atc gcc gtg gag tgg gag agc aat ggg cag ccg gag aac aac tac	528
Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr	
165 170 175	
aag acc acg cct ccc gtg ctg aag tcc gac ggc tcc ttc ttc ctc tat	576
Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Lys Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr	
180 185 190	
agc aag ctc acc gtg gac aag agc agg tgg cag cag ggg aac gtc ttc	624
Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe	
195 200 205	
tca tgc tcc gtg atg cat gag gct ctg cac aac cac tac acg cag aag	672
Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys	
210 215 220	
agc ctc tcc ctg tct ccg ggt aaa tga	699
Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys	
225 230	

ES 2 668 895 T3

<210> 39
<211> 232
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

5

<400> 39

Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala
1 5 10 15

ES 2 668 895 T3

Pro Glu Tyr Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro
 20 25 30

Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val
 35 40 45

Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val
 50 55 60

Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln
 65 70 75 80

Trp Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln
 85 90 95

Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala
 100 105 110

Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro
 115 120 125

Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Lys Glu Met Thr
 130 135 140

Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser
 145 150 155 160

Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr
 165 170 175

Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Lys Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr
 180 185 190

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

Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys
 210 215 220

Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 225 230

<210> 40
 <211> 699
 <212> AND
 <213> *Homo sapiens*

5

<220>

<221> CDS
<222> (1)..(699)

5 <220>
<221> mutación
<222> (223)..(223)

10 <220>
<221> mutación
<222> (225)..(225)

15 <220>
<221> mutación
<222> (242)..(242)

20 <220>
<221> mutación
<222> (243)..(243)

25 <220>
<221> mutación
<222> (421)..(421)

30 <220>
<221> mutación
<222> (550)..(550)

<220>
<221> mutación
<222> (552)..(552)

<400> 40

ES 2 668 895 T3

gag ccc aaa tct tgt gac aaa act cac aca tgc cca ccg tgc cca gca	48
Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala	
1 5 10 15	
cct gaa ctc ctg ggg gga ccg tca gtc ttc ctc ttc ccc cca aaa ccc	96
Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro	
20 25 30	
aag gac acc ctc atg atc tcc ccg acc cct gag gtc aca tgc gtg gtg	144
Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val	
35 40 45	
gtg gac gtg agc cac gaa gac cct gag gtc aag ttc aac tgg tac gtg	192
Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val	
50 55 60	
gac ggc gtg gag gtg cat aat gcc aag aca tat ccg ccg gag gag cag	240
Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Tyr Pro Arg Glu Glu Gln	
65 70 75 80	
tgg aac agc acg tac cgt gtg gtc agc gtc ctc acc gtc ctg cac cag	288
Trp Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln	
85 90 95	
gac tgg ctg aat ggc aag gag tac aag tgc aag gtc tcc aac aaa gcc	336
Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala	
100 105 110	
ctc cca gcc ccc atc gag aaa acc atc tcc aaa gcc aaa ggg cag ccc	384
Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro	
115 120 125	
oga gaa cca cag gtg tac acc ctg ccc cca tcc ccg aag gag atg acc	432
Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Lys Glu Met Thr	
130 135 140	
aag aac cag gtc agc ctg acc tgc ctg gtc aaa ggc ttc tat ccc agc	480
Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser	
145 150 155 160	
gac atc gcc gtg gag tgg gag agc aat ggg cag ccg gag aac aac tac	528
Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr	
165 170 175	
aag acc acg cct ccc gtg ctg aag tcc gac ggc tcc ttc ttc ctc tat	576
Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Lys Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr	
180 185 190	
agc aag ctc acc gtg gac aag agc agg tgg cag cag ggg aac gtc ttc	624
Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe	
195 200 205	
tca tgc tcc gtg atg cat gag gct ctg cac aac cac tac acg cag aag	672
Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys	
210 215 220	
agc ctc tcc ctg tct ccg ggt aaa tga	699
Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys	
225 230	

<210> 41
<211> 232

ES 2 668 895 T3

<212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

<400> 41

5

```

Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala
1          5          10          15

Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro
          20          25          30

Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val
          35          40          45

Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val
          50          55          60

Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Tyr Pro Arg Glu Glu Gln
65          70          75          80

Trp Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln
          85          90          95
    
```

ES 2 668 895 T3

Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala
 100 105 110

Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro
 115 120 125

Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Lys Glu Met Thr
 130 135 140

Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser
 145 150 155 160

Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr
 165 170 175

Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Lys Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr
 180 185 190

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

Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys
 210 215 220

Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 225 230

REIVINDICACIONES

1. Una proteína que contiene Fc que comprende una región Fc de IgG1 o IgG3 humana y una región de unión, en la que la región Fc comprende una cadena A y una cadena B, que cada una comprende de 1 a 10 sustituciones de aminoácidos relativas a una cadena polipeptídica de Fc humano tipo silvestres, seleccionadas de las siguientes, las cuales se numeran según el sistema de UE: E233L, L234I, L234Y, L235S, G236Y, S239D, S239E, S239N, S239T, F243M, F243L, F243V, F243I, K246W, K246E, K246S, K246V, K248Y, K248L, M252D, I253V, I253K, R255S, R255N, T256V, T256Q, E258S, E258V, H268E, H268K, A287F, K288T, K288I, K290G, K290F, K290S, K290W, K290Q, K290Y, E294L, Y296W, Y296L, S298A, S298C, S298T, V302Q, T307P, T307S, T307E, T307G, L309C, L309S, L309K, L309E, Q311M, N315A, N315S, A330H, A330F, A330M, I332E, K334L, K334V, K334A, K334M y A339T, en la que al menos uno de estos sitios de sustitución de aminoácidos difiere entre las cadenas A y B,
- 5 en la que la proteína que contiene Fc se une a FcγRIIIA-158F y/o FcγRIIIA-158V humano con una K_D de menos de o igual a una quinta parte de la K_D con la cual una segunda proteína se une a FcγRIIIA-158F y/o FcγRIIIA-158V humano, y en la que la segunda proteína es la misma que la proteína que contiene Fc excepto que contiene una región Fc de IgG1 o IgG3 humana tipo silvestre sin sustituciones.
- 15 2. La proteína que contiene Fc de la reivindicación 1, en la que las sustituciones de aminoácidos son una o más de las siguientes, las cuales están numeradas según el sistema de UE: L234I, L234Y, K290G, K290F, K290S, K290W, K290Q, K290Y, Y296W, Y296L, S298A, S298C, S298T, A330H, A330F, A330M, K334L, K334V, K334A y K334M.
- 20 3. La proteína que contiene Fc de la reivindicación 1 o 2, en la que las sustituciones de aminoácidos son una o más de las siguientes, las cuales están numeradas según el sistema de UE: L234Y, K290Y, Y296W, S298T, A330F, A330M y K334V.
- 25 4. La proteína que contiene Fc de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en la que la proteína que contiene Fc se une a FcγRIIIA-158F y/o FcγRIIIA-158V humano con una K_D de menos de o igual a una décima parte de la K_D con la cual la segunda proteína se une a FcγRIIIA-158F y/o FcγRIIIA-158V humano.
- 30 5. La proteína que contiene Fc de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en la que la cadena A y la cadena B cada una comprende de 1 a 6 sustituciones de aminoácidos relativas a una cadena polipeptídica de Fc humana tipo silvestre.
- 35 6. La proteína que contiene Fc de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, que comprende además sustituciones de par de carga.
7. La proteína que contiene Fc de la reivindicación 6, en la que la cadena A comprende las sustituciones K392D y K409D y la cadena B comprende las sustituciones E356K y D399K o viceversa.
- 40 8. La proteína que contiene Fc de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en la que la región Fc de IgG es una región Fc de IgG1.
9. La proteína que contiene Fc de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en la que
- 45 (a) la cadena A comprende las sustituciones Q311M y K334V y la cadena B comprende las sustituciones L234Y, E294L y Y296W o viceversa;
- (b) la cadena A comprende las sustituciones E233L, Q311M y K334V y la cadena B comprende las sustituciones L234Y, E294L y Y296W o viceversa;
- 50 (c) la cadena A comprende las sustituciones L234I, Q311M y K334V y la cadena B comprende las sustituciones L234Y, E294L y Y296W o viceversa;
- (d) la cadena A comprende las sustituciones S298T y K334V y la cadena B comprende las sustituciones L234Y, K290Y y Y296W o viceversa;
- (e) la cadena A comprende las sustituciones A330M y K334V y la cadena B comprende las sustituciones L234Y, K290Y y Y296W o viceversa;
- 55 (f) la cadena A comprende las sustituciones A330F y K334V y la cadena B comprende las sustituciones L234Y, K290Y y Y296W o viceversa;
- (g) la cadena A comprende las sustituciones Q311M, A330M y K334V y la cadena B comprende las sustituciones L234Y, E294L y Y296W o viceversa;
- 60 (h) la cadena A comprende las sustituciones Q311M, A330F y K334V y la cadena B comprende las sustituciones L234Y, E294L y Y296W o viceversa;
- (i) la cadena A comprende las sustituciones S298T, A330M y K334V y la cadena B comprende las sustituciones L234Y, K290Y y Y296W o viceversa;
- (j) la cadena A comprende las sustituciones S298T, A330F y K334V y la cadena B comprende las sustituciones L234Y, K290Y y Y296W o viceversa;
- 65 (k) la cadena A comprende las sustituciones S239D, A330M y K334V y la cadena B comprende las sustituciones L234Y, K290Y y Y296W o viceversa;

- (l) la cadena A comprende las sustituciones S239D, S298T y K334V y la cadena B comprende las sustituciones L234Y, K290Y y Y296W o viceversa;
- (m) la cadena A comprende una sustitución K334V y la cadena B comprende las sustituciones Y296W y S298C o viceversa;
- 5 (n) la cadena A comprende una sustitución K334V y la cadena B comprende las sustituciones L234Y, Y296W y S298C o viceversa;
- (o) la cadena A comprende las sustituciones L235S, S239D, y K334V y la cadena B comprende las sustituciones L234Y, K290Y y Y296W o viceversa;
- 10 (p) la cadena A comprende las sustituciones L235S, S239D y K334V y la cadena B comprende las sustituciones L234Y, Y296W y S298C o viceversa;
- (q) la cadena A comprende las sustituciones Q311M y K334V y la cadena B comprende las sustituciones L234Y, F243V y Y296W o viceversa;
- (r) la cadena A comprende las sustituciones Q311M y K334V y la cadena B comprende las sustituciones L234Y, K296W y S298C o viceversa;
- 15 (s) la cadena A comprende las sustituciones S239D y K334V y la cadena B comprende las sustituciones L234Y, K290Y y Y296W o viceversa;
- (t) la cadena A comprende las sustituciones S239D y K334V y la cadena B comprende las sustituciones L234Y, Y296W y S298C o viceversa;
- 20 (u) la cadena A comprende las sustituciones F243V y K334V y la cadena B comprende las sustituciones L234Y, K290Y y Y296W, o viceversa;
- (v) la cadena A comprende las sustituciones F243V y K334V y la cadena B comprende las sustituciones L234Y, Y296W y S298C o viceversa;
- (w) la cadena A comprende las sustituciones E294L y K334V y la cadena B comprende las sustituciones L234Y, K290Y y Y296W o viceversa;
- 25 (x) la cadena A comprende las sustituciones E294L y K334V y la cadena B comprende las sustituciones L234Y, Y296W y S298C o viceversa;
- (y) la cadena A comprende las sustituciones A330M y K334V y la cadena B comprende las sustituciones L234Y y Y296W o viceversa; o
- 30 (z) la cadena A comprende las sustituciones A330M y K334V y la cadena B comprende las sustituciones K290Y y Y296W o viceversa.

10. La proteína que contiene Fc de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en la que

- 35 (a) la cadena A comprende las sustituciones S298T, A330M y K334V y la cadena B comprende las sustituciones L234Y, K290Y y Y296W o viceversa;
- (b) la cadena A comprende las sustituciones S298T, A330F y K334V y la cadena B comprende las sustituciones L234Y, K290Y y Y296W o viceversa; o
- (c) la cadena A comprende las sustituciones A330M y K334V y la cadena B comprende las sustituciones L234Y y Y296W o viceversa.

40 11. La proteína que contiene Fc de las reivindicaciones 9 o 10, en la que la cadena A comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 8, 12, 14, 16, 20, 22, 24, 26, 28, 30, 32, 34 o 37 y la cadena B comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 10, 18, 39 o 41 o viceversa.

45 12. La proteína que contiene Fc de la reivindicación 11 que comprende un par de secuencias de aminoácidos seleccionadas del grupo que consiste en: SEQ ID NO: 8 y SEQ ID NO:10; SEQ ID NO: 16 y SEQ ID NO:18; SEQ ID NO: 12 y SEQ ID NO:10; SEQ ID NO: 14 y SEQ ID NO:10; SEQ ID NO: 20 y SEQ ID NO:18; SEQ ID NO: 22 y SEQ ID NO:18; SEQ ID NO: 24 y SEQ ID NO:10; SEQ ID NO: 26 y SEQ ID NO:10; SEQ ID NO: 28 y SEQ ID NO:18; SEQ ID NO: 30 y SEQ ID NO:18; SEQ ID NO: 32 y SEQ ID NO:18; SEQ ID NO: 34 y SEQ ID NO:18; SEQ NO:37 y SEQ ID NO:39; y SEQ NO:37 y SEQ ID NO:41.

50 13. La proteína que contiene Fc de la reivindicación 11 o 12, la cual está defucosilada, la cual se produce en una célula CHO, la cual es un anticuerpo, la cual es una proteína de fusión Fc, la cual es un anticuerpo biespecífico, la cual es un anticuerpo IgG1 humano entero, la cual se une a HER-2/neu, la cual es un anticuerpo biespecífico que se une a CD38 y CD138, y/o la cual se une a mesotelina.

55 14. Una composición farmacéutica que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de la proteína que contiene Fc de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13 y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

60 15. Uno o más ácidos nucleicos que codifican la proteína que contiene Fc de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13.

16. Una célula hospedadora que comprende los uno o más ácidos nucleicos de la reivindicación 15.

65 17. Un método de producción de una proteína que contiene Fc de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13 que comprende las siguientes etapas:

- (a) proporcionar una célula hospedadora que contiene los uno o más ácidos nucleicos de la reivindicación 15;
- (b) cultivar la célula hospedadora bajo condiciones de modo que se expresará la proteína que contiene Fc; y
- (c) recuperar la proteína que contiene Fc de la masa celular o el medio de cultivo.

5 18. La proteína que contiene Fc de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13 o la composición farmacéutica de la reivindicación 14 para su uso en el tratamiento del cáncer.

10 19. La proteína que contiene Fc para su uso o la composición farmacéutica para su uso según la reivindicación 18, en la que se usa quimioterapia y/o radiación antes, después o simultáneamente con el uso de la proteína que contiene Fc.

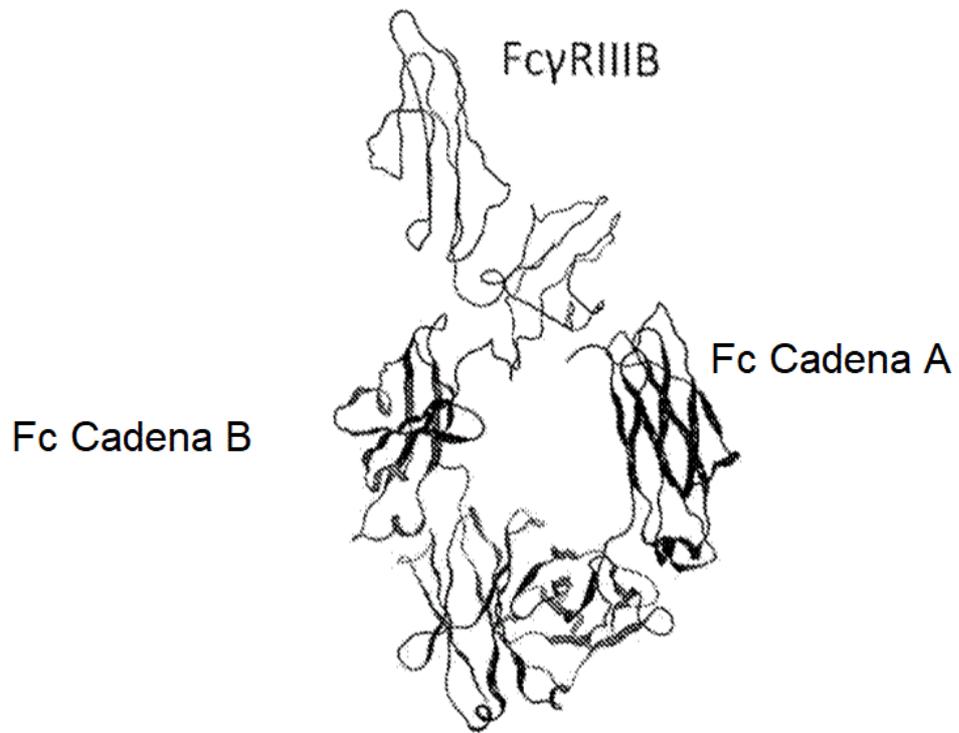


Figura 1

216	226	236	246	256
EPKSCDKTHT	CPPCP <u>PAP</u> ELL	GGPSV <u>FLE</u> PP	KPKDTLMISR	TPEVTCVVVD
	111111	1112 2 3	3 33 33332	2 2 3 22
266	276	286	296	306
VSHED <u>PEV</u> KF	NWYVDGVEVH	NAKTKEREEQ	YNSTYRVVSV	LTVLHQDWLN
2222 2 33	2 332 3332	23332 3322	2 2 2333 3	2 2333332
316	326	336	346	356
GKEYKCKVSN	KALPAPIEKT	ISKAKGQPRE	PQVYTLPPSR	EEMTKNQVSL
33 3 3 3	222 2 2223	32323		
366	376	386	396	406
TCLVKGFYPS	DIAVEWESNG	QPENNYKTP	PVLDSGDSFF	LYSKLTVDKS
416	426	436	446	
RWQQGNVFSC	SVMHEALHNNH	YTQKSLSLSP	GK	

Figura 2

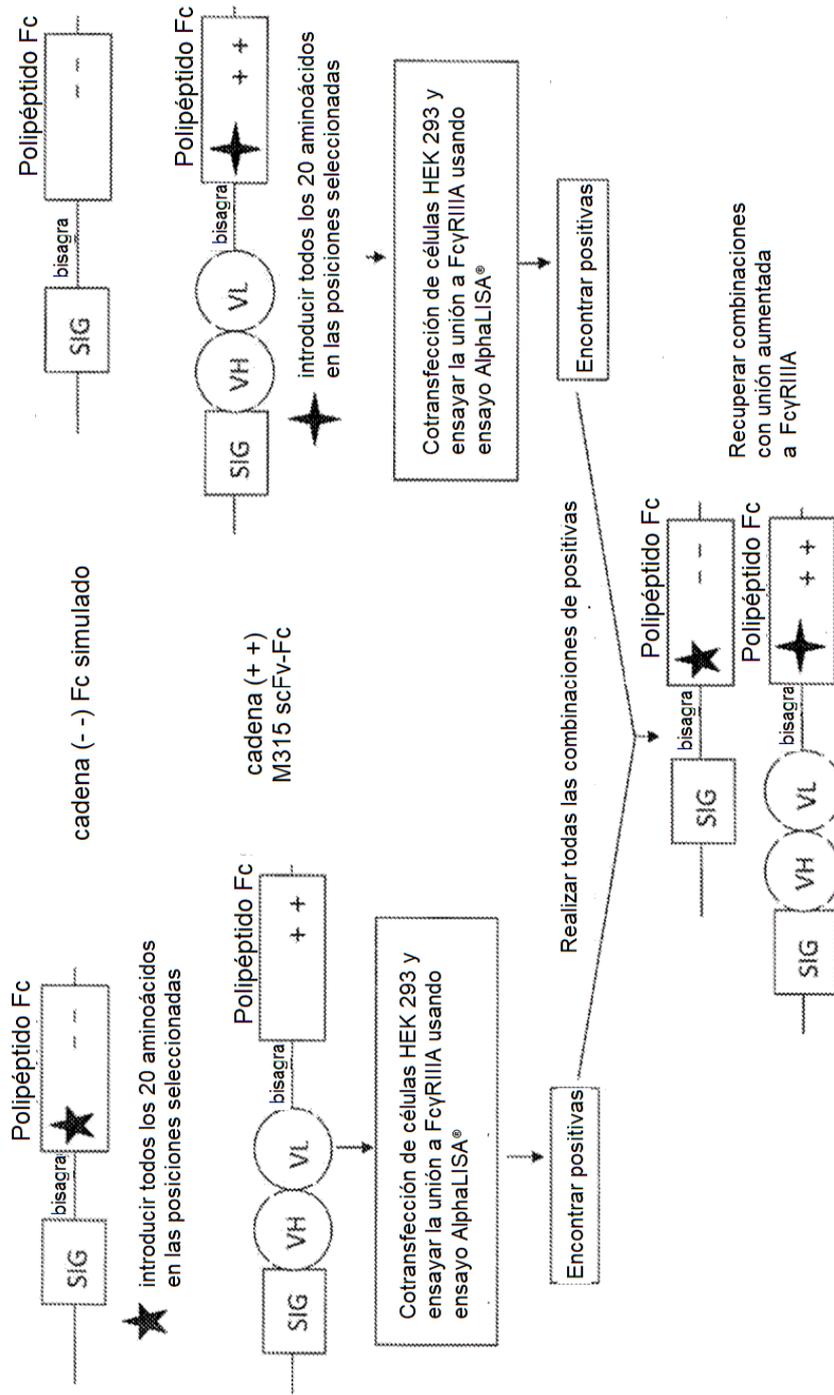


Figura 3

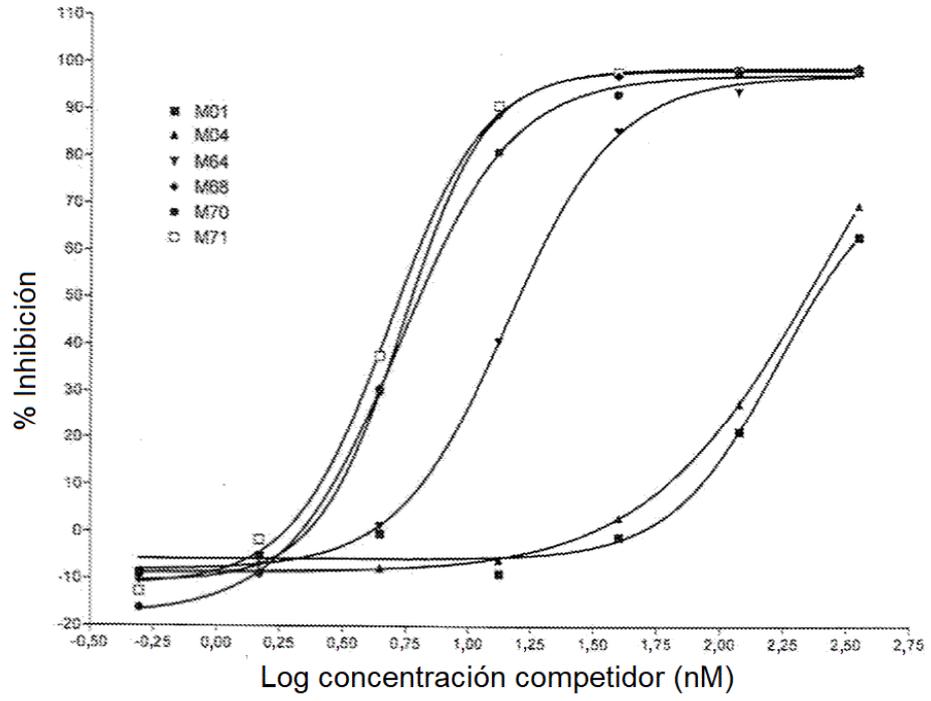


Figura 4

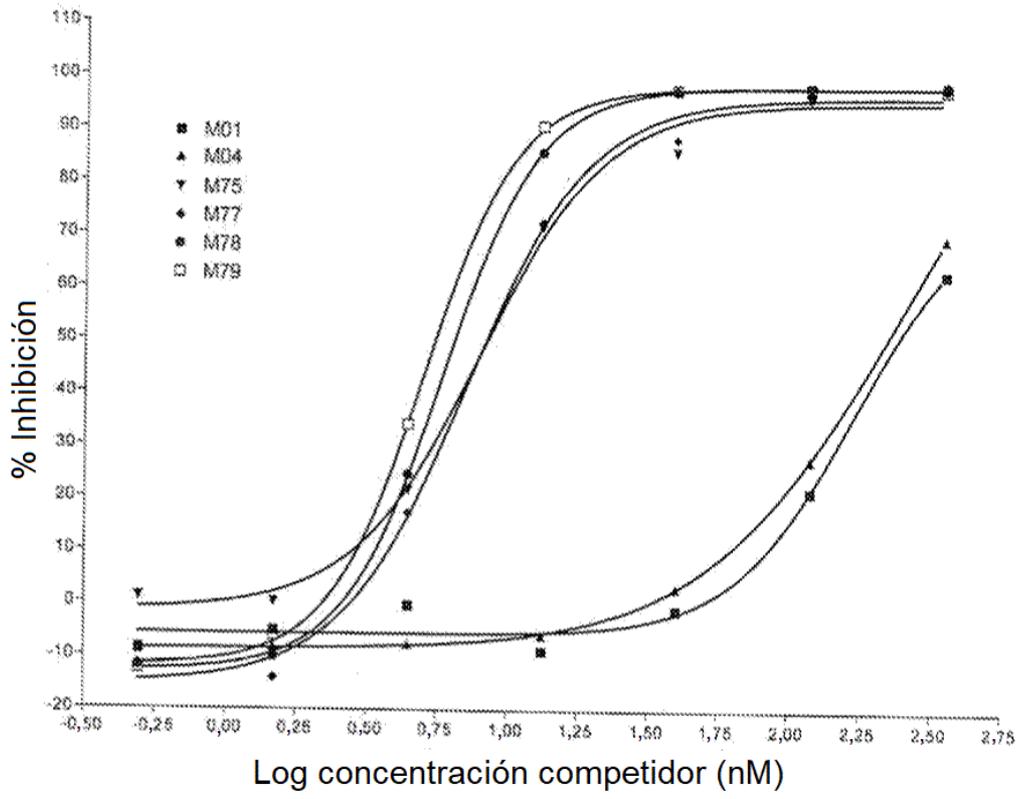


Figura 5

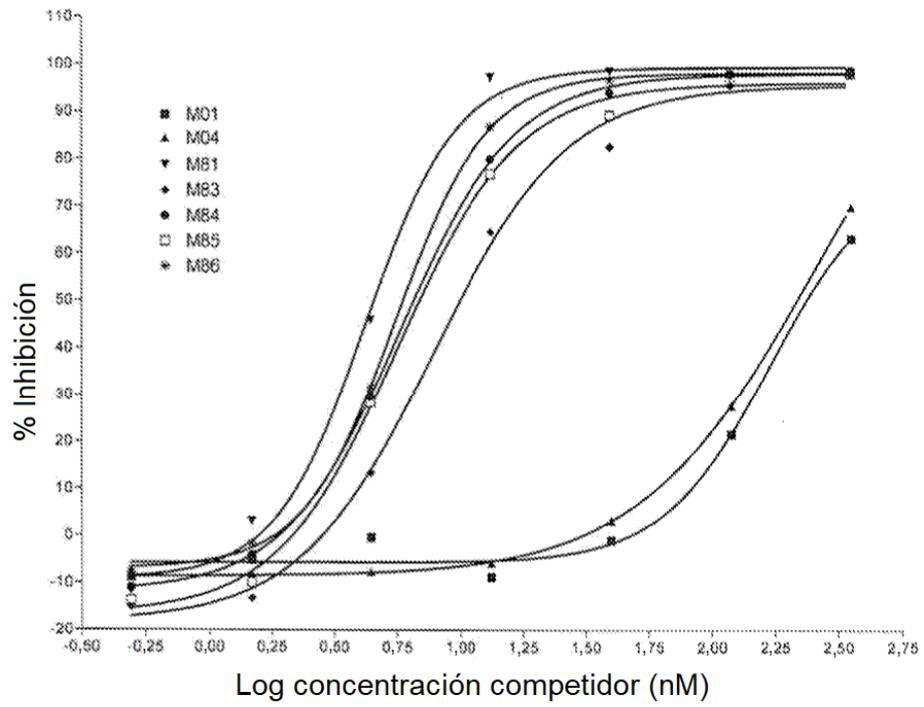


Figura 6

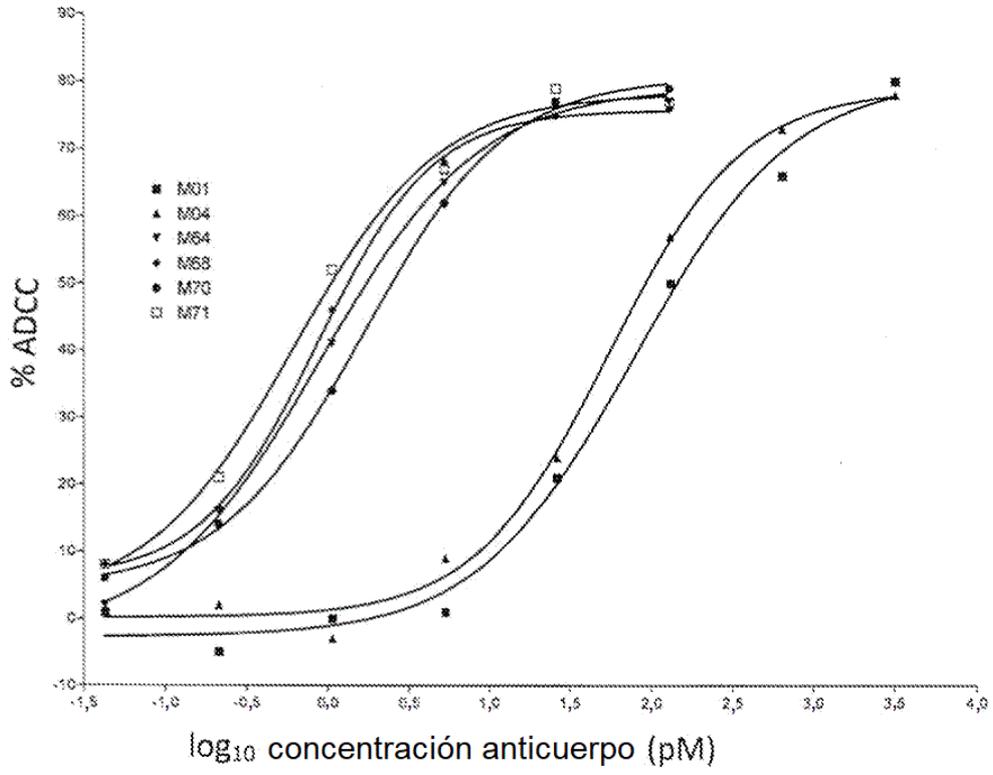


Figura 7

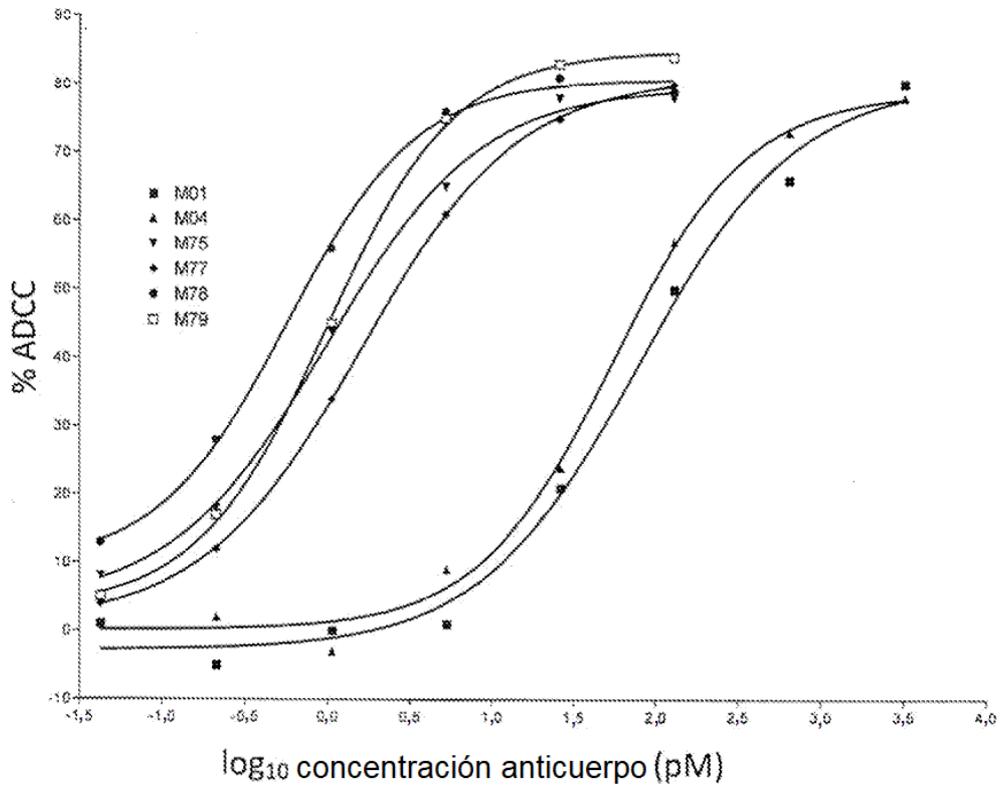


Figura 8

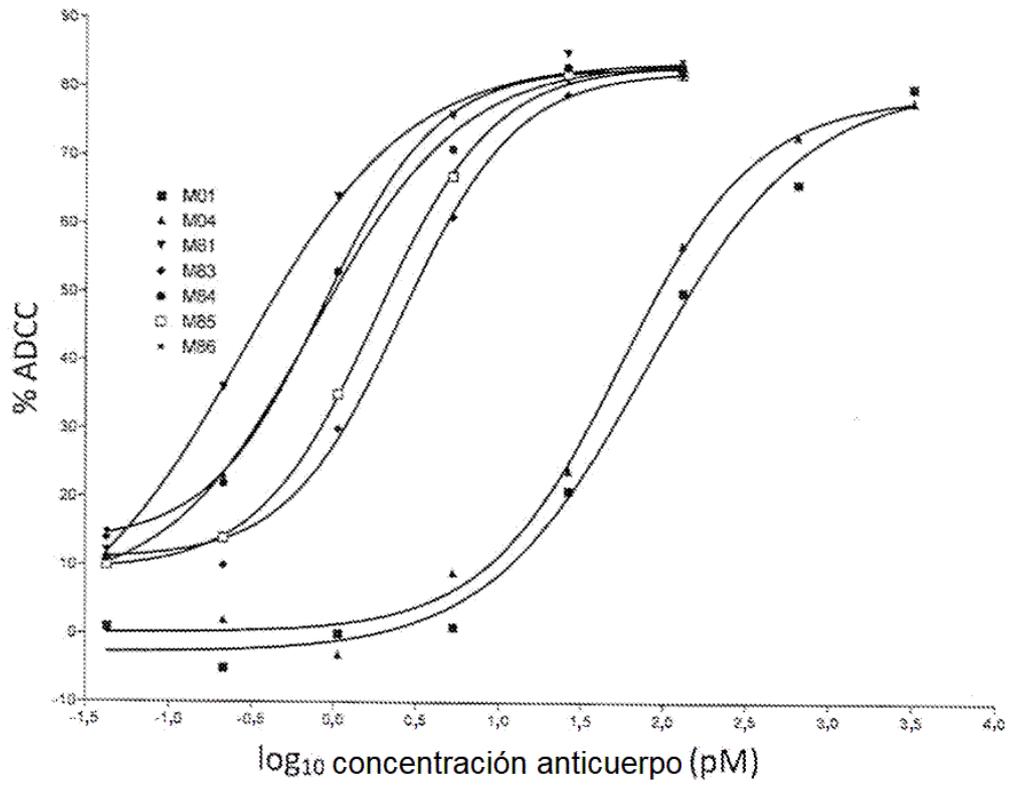


Figura 9

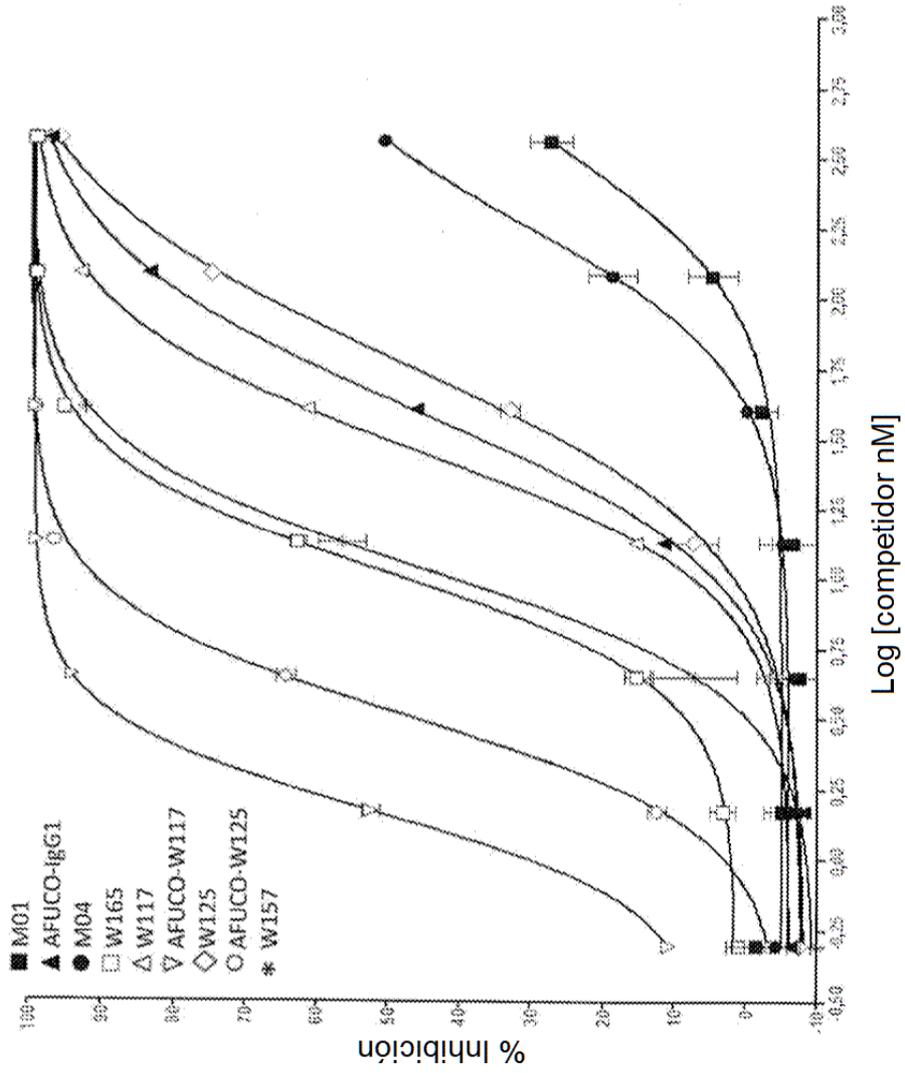


Figura 10

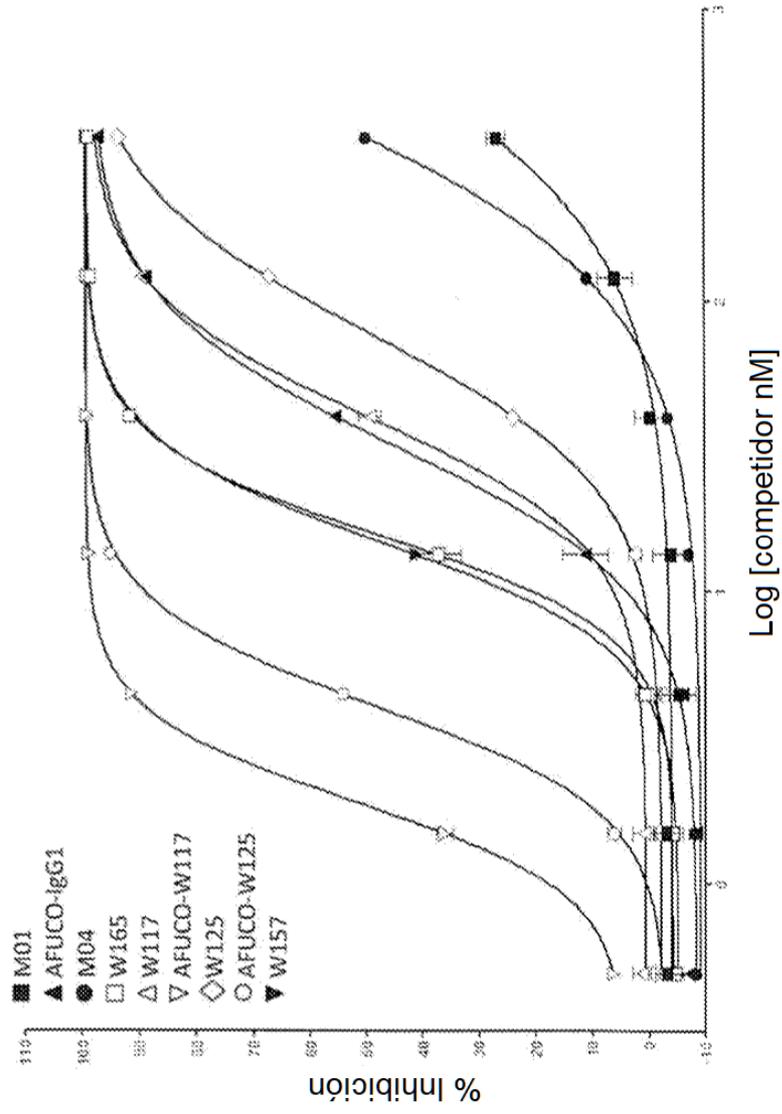


Figura 11

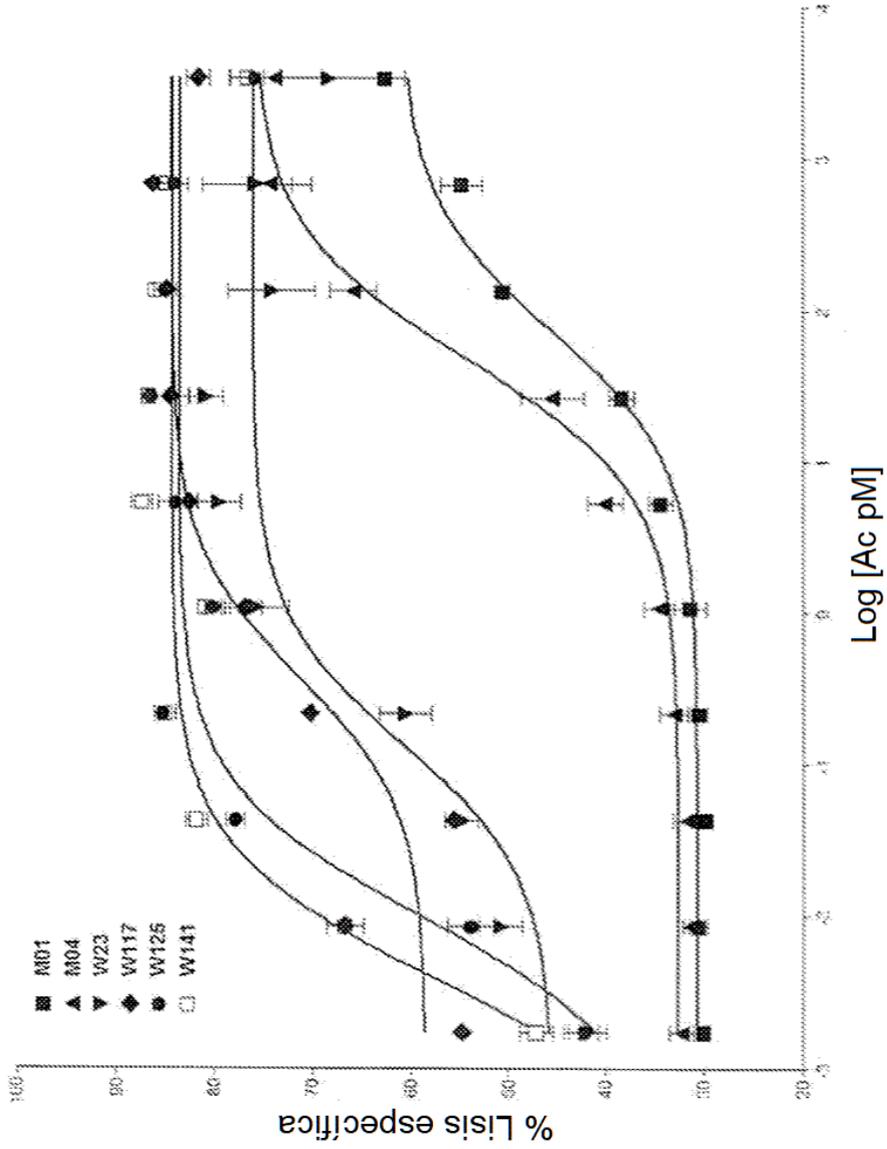


Figura 12

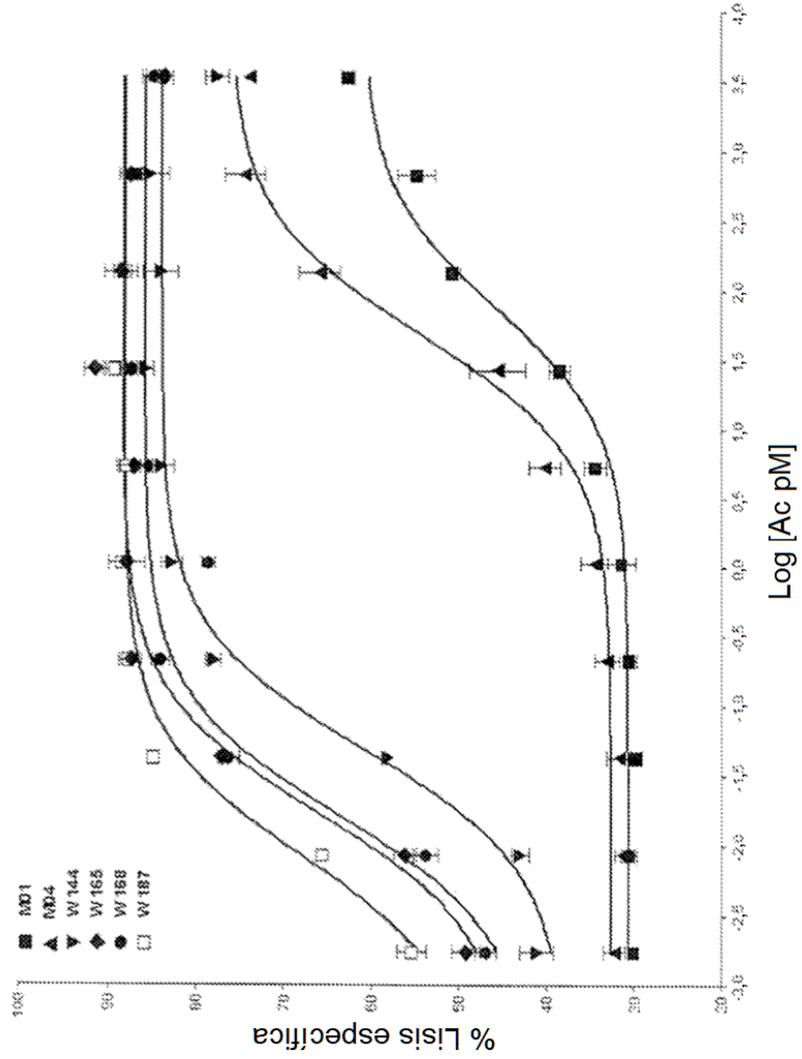


Figura 13

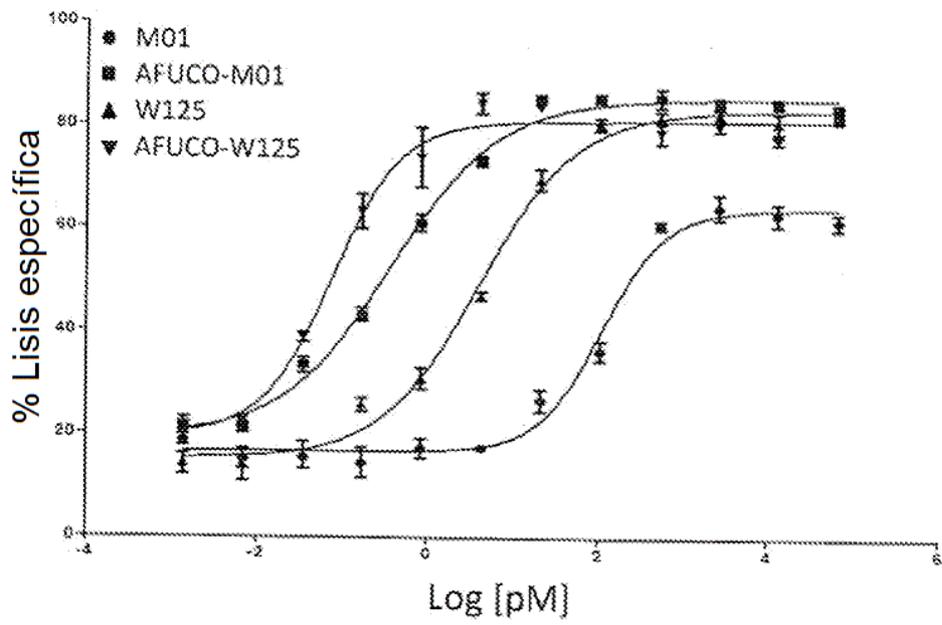
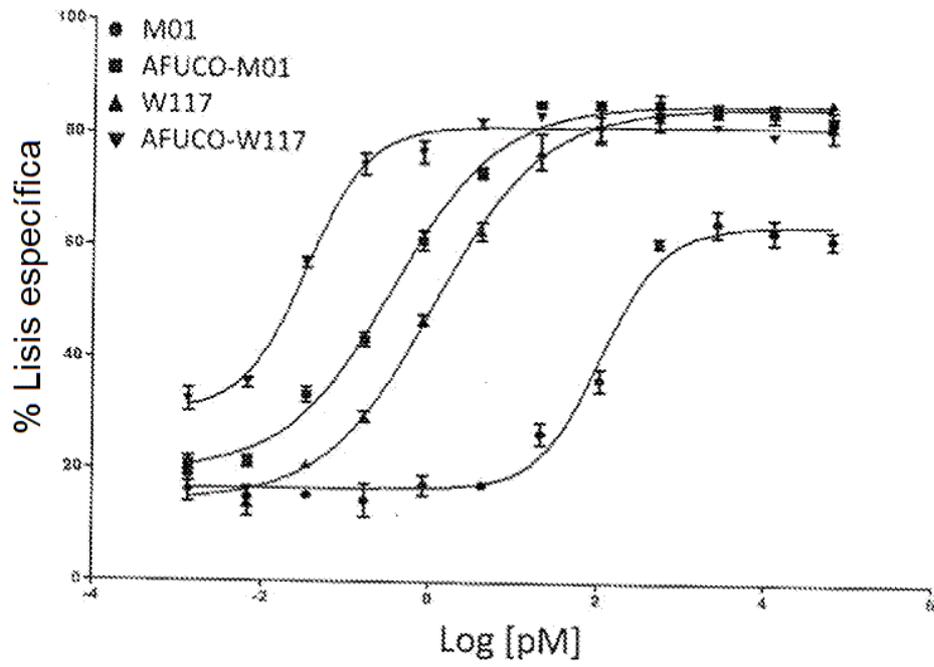


Figura 14