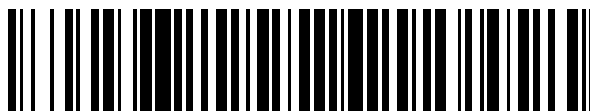


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 727 486**

51 Int. Cl.:

**C07K 16/28**

(2006.01)

12

## TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **09.07.2013 PCT/EP2013/064466**

87 Fecha y número de publicación internacional: **16.01.2014 WO14009358**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **09.07.2013 E 13734785 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **27.02.2019 EP 2877491**

54 Título: **Anticuerpos de la familia anti-DR5, anticuerpos de la familia anti-DR5 biespecíficos o multivalentes y métodos de uso de los mismos**

30 Prioridad:

**09.07.2012 EP 12305821**

**10.07.2012 US 201261669866 P**

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

**16.10.2019**

73 Titular/es:

**GENMAB B.V. (100.0%)**

**Uppsalalaan 15**

**3584 CT Utrecht, NL**

72 Inventor/es:

**VERMOT-DESROCHES, CLAUDINE BRIGITTE FERNANDE;**

**SUBIGER, OLIVIER FRÉDÉRIC y**

**BOURDIN, LAURENCE FRANÇOISE JEANNE-MARIE**

74 Agente/Representante:

**UNGRÍA LÓPEZ, Javier**

ES 2 727 486 T3

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

## DESCRIPCIÓN

Anticuerpos de la familia anti-DR5, anticuerpos de la familia anti-DR5 biespecíficos o multivalentes y métodos de uso de los mismos

**Campo de la invención**

La presente invención se refiere a los campos de inmunología, oncología y, más específicamente, a moléculas de anticuerpos monoespecíficos, biespecíficos o multivalentes que se pueden utilizar de manera ventajosa en el tratamiento de diversos cánceres, enfermedades autoinmunitarias, enfermedades infecciosas que expresan el antígeno DR5. La presente invención se refiere a nuevos polipéptidos que se unen específicamente al receptor DR5 también llamado receptor de TRAIL 2. La invención se refiere en particular a un polipéptido que tiene dos dominios de unión diferentes o una combinación de polipéptidos que tienen estos dominios de unión diferentes, que se unen a diferentes epítomos del receptor DR5, con lo que se induce la apoptosis. La invención también se refiere a composiciones farmacéuticas que contienen estos polipéptidos para el tratamiento del cáncer, enfermedades autoinmunitarias e infecciones virales utilizando estos polipéptidos y composiciones.

**Antecedentes de la invención**

La apoptosis, o muerte celular programada, es un proceso fisiológico esencial para el desarrollo normal y la homeostasis de los organismos multicelulares. Los trastornos de la apoptosis contribuyen a la patogénesis de varias enfermedades humanas, tales como el cáncer, los trastornos neurodegenerativos y el síndrome de inmunodeficiencia adquirida.

El ligando inductor de la apoptosis relacionada con el factor de necrosis tumoral (TNF) (TRAIL), un miembro de la superfamilia de citocinas TNF, es una proteína de membrana de tipo 2 que se expresa en la mayoría de los tejidos normales y puede sufrir escisión de proteasa, lo que da como resultado una forma soluble capaz de unirse a los receptores de TRAIL, (Wiley SR. et al., *Immunity*. 1995; 3:673-682; Daniel PT et al., *J Immunol*. 1994; 152:5624).

Los ligandos de esta familia generalmente reconocen y se unen a un subconjunto limitado de receptores emparentados en la superficie celular, lo que lleva a la transducción de señales en cascada aguas abajo del receptor, permitiendo la activación de un gran panel de vías de señalización que incluye la activación de NF- $\kappa$ B o caspasa. TRAIL induce la apoptosis de ciertas células transformadas, incluidos varios tipos diferentes de células cancerosas, así como células infectadas por virus, mientras que no induce la apoptosis de varios tipos de células normales y, por lo tanto, tiene un interés concreto en el desarrollo de terapias contra el cáncer. (Walczak et al., *Nature Medicine*. 1999; 5/157-163, Ashkenazi A. et al., *J Clin Invest*. 1999; 104:155).

Hay cuatro receptores de superficie celular conocidos para TRAIL. El receptor 1 de TRAIL (TRAIL-R1, DR4) y el Receptor 2 de Trail (TRAIL-R2, DR5, Apo-2, TRICK2, Killer, TR6, Tango-63) tienen un dominio de muerte citoplásmica y pueden desencadenar la apoptosis en células tumorales a través de la activación de caspasa aguas abajo. Los otros dos receptores, Receptor 3 de TRAIL (TRAIL-R3, DcR1, TR5, TRIDD, LIT) y Receptor 4 de TRAIL (TRAIL-R4, DcR2, TRUNDD), carecen de un dominio de muerte citoplásmica y no median la apoptosis. Además, la osteoprotegerina (OPG), un miembro soluble (secretado) de la familia de proteínas del receptor de TNF, también se une a TRAIL.

Los dominios intracitoplasmáticos de DR4 y DR5 incluyen cada uno un denominado dominio de muerte. Después de la activación de sus receptores DR4 y DR5, la molécula adaptadora del dominio de muerte asociada a fas se recluta hacia el receptor, lo que conduce a una escisión autoproteolítica y la activación de la caspasa-8 iniciadora. Se ha informado de que DR4 y DR5 transducen una señal apoptótica a células cancerosas sensibles a TRAIL, al unirse a TRAIL. La caspasa-8 activa desencadena a su vez la activación proteolítica de las caspasas aguas abajo, incluida la caspasa-3. Las caspasas aguas abajo finalmente degradan una amplia gama de proteínas celulares, y se finaliza la apoptosis.

La expresión de DR4 o DR5 se detecta con frecuencia en los cánceres humanos, incluidos los cánceres de colon, gástricos, pancreáticos, ováricos, mamarios y de pulmón de células no pequeñas con expresión baja o nula en tejidos normales.

En el desarrollo o progresión de muchas enfermedades es frecuente que las células no se eliminen. En muchas enfermedades autoinmunitarias y afecciones inflamatorias, las células activadas sobrevivientes atacan los tejidos o células normales. Adicionalmente, la progresión de la tumorigénesis y la proliferación de la formación de panus de la artritis reumatoide se caracterizan por la proliferación no controlada de las células. Por lo tanto, una apoptosis insuficiente conduce al desarrollo de la enfermedad, y los usos del ligando inductor de apoptosis o MAb agonístico para mejorar la apoptosis se consideran una estrategia terapéutica potencial para eliminar esas células no deseadas.

TRAIL induce la apoptosis en una amplia gama de células de tumores hematopoyéticos y sólidos, mientras que evita la mayoría de las células normales. TRAIL tiene una fuerte actividad inductora de la apoptosis contra las células cancerosas *in vitro* y potente actividad antitumoral contra xenoinjertos tumorales de diversos cánceres *in vivo*.

- 5 TRAIL y sus derivados, incluidos los anticuerpos agonísticos dirigidos a los receptores de TRAIL son compuestos atractivos para la terapia contra el cáncer debido a su capacidad para inducir la regresión del tumor sin efectos secundarios significativos.

10 Hay muchos casos en la bibliografía de patentes de esfuerzos para usar polipéptidos derivados del ligando TRAIL como terapia contra células cancerosas (documentos US20090131317; US 6.469.144; US 6.740.739; US20070026000; US 6.444.640; US20050244857; US20050233958; US 7.736.637).

15 Los polipéptidos TRAIL se estudiaron primero como peajes para inducir la vía apoptótica de TRAIL, pero tienen el inconveniente de una semivida corta.

Actualmente, se ha prestado mucha atención al desarrollo de nuevas estrategias de inmunoterapia para el tratamiento del cáncer. Una de estas estrategias es la terapia de anticuerpos contra el cáncer.

20 El determinante más prominente de las propiedades de direccionamiento anteriores es el tamaño de la molécula basada en el anticuerpo en relación con el grado de especificidad, la retención en los tumores y su aclaramiento. Otra característica importante de las moléculas basadas en anticuerpos es la valencia, ya que la retención de tumores significativamente mayor se ha asociado con la unión multivalente a la diana, (Adams et al., Cancer Res. 1993; 51:6363-6371; Wolf et al., Cancer Res. 1993; 53:2560-2565).

25 Como se mencionó anteriormente, se han producido anticuerpos agonísticos contra DR4 o DR5 y representan una nueva generación de terapia contra el cáncer. También se han realizado trabajos sobre el uso de anticuerpos agonísticos dirigidos contra los receptores de TRAIL para inducir la vía apoptótica de TRAIL.

30 Se supone que los anticuerpos monoclonales agonísticos que se unen específicamente a DR4 o DR5 pueden inducir directamente la apoptosis de células tumorales elegidas como diana, (Buchsbaum DJ et al., Future Oncol. 2006; 2:493; Rowinsky EK et al., J Clin Oncol. 2005; 23:9394).

35 Otras patentes se relacionan con el uso de anticuerpos agonísticos dirigidos contra DR4, o DR5 o DR4 y DR5, o con el uso combinado de anticuerpos contra DR5 y otro agente quimioterapéutico: documento US20040147725; documento US 20090022707; documento US20080248037; documento US20020155109; documento US 6.461.823; documento US 6.872.568; documento US 7.064.189; documento US 6.521.228; documento US 7.704.502.

40 También se ha desarrollado un tratamiento combinado con anticuerpos agonísticos dirigidos contra diferentes receptores de TRAIL, por ejemplo, DR4 y DR5. Para preparar anticuerpos biespecíficos agonísticos que se unen a DR4 o DR5 (o hibridomas que producen tales MAb agonísticos) se pueden emplear como materiales de partida en diversos procedimientos (documento WO 2002/0155109).

45 Estos incluyen MAb anti-DR5 lexatumumab, (Plummer R. et al., Clin Cancer Res. 2007; 13:6187), el MAb anti-DR5 apomab, (Adams C. et al., Cell Death Differ. 2008; 15:751), el MAb anti-DR5 LBy135, (Li J. et al., AACR Meeting Abstracts. 2007. Resumen 4874), el MAb anti-DR5 WD-1, (Wang J. et al., Cell Mol Immunol. 2008; 5:55) y el MAb anti-DR5 AMG655, (Wall J. et al., AACR Meeting Abstracts. 2008. Resumen 1326, Kaplan-Lefko P. et al., AACR Meeting Abstracts. 2008. Resumen 399). Un hallazgo constante de todos estos estudios es la considerable variabilidad en la sensibilidad de diversas líneas celulares tumorales a la citotoxicidad mediada por DR5.

50 Los anticuerpos agonísticos anti-DR4 o anti-DR5, incluyendo mapatumumab o lexatumumab respectivamente, también son bien tolerados en pacientes (Herbst R.S. et al., J Clin Oncol. 2006; 24(18S):3013; Hotte S.J. et al., Clin Cancer Res. 2008; 14/3450-3455; Wakelee H.A et al., Ann Oncol. 2010; 21/376-381; Fox N.L. et al., Expert Opin Biol Ther. 2010; 10/1-18).

55 Lexatumumab (también conocido como ETR2-ST01) es un anticuerpo monoclonal humano agonístico contra DR5 utilizado en el tratamiento del cáncer. Los anticuerpos HGS-ETR2 fueron generados por HGS a través de la colaboración con Cambridge Antibody Technology.

60 Tigatuzumab (CS-1008) es un anticuerpo monoclonal IgG1 humanizado compuesto de las regiones CDR de mTRA-8. El anticuerpo monoclonal anti-DR5 murino, TRA-8 (mTRA-8), se seleccionó entre una serie de anticuerpos monoclonales anti-DR5 en función de su especificidad, la capacidad de desencadenar la apoptosis *in vitro* sin el uso de reactivos de entrecruzamiento, y la falta de toxicidad para los hepatocitos humanos, (Buchsbaum DJ et al., Clin Cancer Res. 2003; 9:3731; Ichikawa K. et al., Nat Med. 2001; 7:954).

Tigatuzumab media un patrón muy similar de citotoxicidad *in vitro* y eficacia antitumoral *in vivo* como mTRA-8. Se demostró que tiene potente citotoxicidad *in vitro* frente a una variedad de líneas de células tumorales humanas y eficacia antitumoral *in vivo* en modelos de xenoinjerto murino de cánceres humanos. Su citotoxicidad *in vitro* y eficacia antitumoral *in vivo* se puede mejorar sustancialmente combinada con una variedad de agentes quimioterapéuticos y/o radiación, (Buchsbbaum DJ et al., Clin Cancer Res. 2003; 9:3731; DeRosier LC et al., Clin Cancer Res. 2007; 13:5535s).

Los anticuerpos anti-DR4 y anti-DR5 se han probado en asociación, junto o con otros agentes o terapias quimioterapéuticas. Un tratamiento combinado de tumores colorrectales con dos anticuerpos agonísticos HGS-ETR1 (anti-DR4) y HGS-ETR2 (anti-DR5) y radioterapia permite efectos mejorados *in vitro* y retraso del crecimiento dependiente de la dosis *in vivo* (Marini P et al., Oncogene. 2006; 25 (37):5145-54). Los anticuerpos agonísticos completamente humanos contra DR4 y DR5 demostraron en células de linfoma primarias y cultivadas inducción de apoptosis y aumento de la muerte celular inducida por doxorrubicina y bortezomib (Georgakis GV et al., Oncogene. 2006; 25(37):5145-54). Se ha encontrado que la expresión de DR5 y la susceptibilidad a la apoptosis inducida por TRAIL de las células de cáncer de mama aumentan con la radiación, lo que sugiere que combinada con la radiación, la eficacia de TRAIL aumentaría en la terapia del cáncer. (Chinnaiyan A.M et al., PNAS. 2000; 97/1754-1759).

La combinación de anticuerpos y quimioterapia generalmente mejora el grado de apoptosis y puede revertir parcialmente la resistencia en algunas líneas celulares. (Buchsbbaum DJ et al., J Clin Cancer Res. 2003; 9:3731; DeRosier LC et al., Clin Cancer Res. 2007; 13:5535s; Oliver PG et al., Clin Cancer Res. 2008; 14:2180; Derosier LC et al., Mol Cancer Ther. 2007; 6:3198; Long JW. et al., J Surg Res. 2007; 137:167).

### Compendio de la invención

Los autores de la presente invención han descubierto ahora que, inesperadamente, es posible inducir la ruta apoptótica de DR5 utilizando dos anticuerpos dirigidos contra al menos dos epítomos diferentes del receptor DR5. La unión a ambos epítomos en el mismo receptor tiene una acción agonística sobre el receptor e induce la apoptosis de una manera eficaz. La combinación de los anticuerpos DR5-01 y DR5-05, tal como se describe en la presente memoria, reveló una acción agonística más fuerte que el propio ligando.

Se ha observado una acción inesperada y sinérgica utilizando dos anticuerpos dirigidos cada uno contra un epítomo diferente en el receptor DR5, con respecto a un anticuerpo contra un solo epítomo. Sin desear estar limitados por la teoría, se postula que la unión a los dos epítomos de DR5 permite una función agonística sinérgica, lo que conduce a una inducción de apoptosis inesperadamente elevada. Se ha encontrado que la acción inesperada y sinérgica puede ser beneficiosa para el tratamiento terapéutico o para la integración a un protocolo terapéutico. Por tanto, se ha encontrado que la combinación de los anticuerpos puede conducir a un aumento sinérgico de la inhibición de la proliferación de células cancerosas, en particular en el glioma. También se ha encontrado que la combinación de los anticuerpos y un fármaco quimioterapéutico puede conducir a un aumento sinérgico de la inhibición de la proliferación de células cancerosas en el caso de los cánceres que son difíciles de tratar, tales como el glioma, y los cánceres de pulmón y mama que resisten más o menos a los fármacos quimioterapéuticos. También se ha encontrado que la combinación de anticuerpos y medicamentos puede permitir obtener un efecto terapéutico, tal como la inhibición de la proliferación celular, que se obtiene de manera estable en un amplio rango de dosis de medicamentos y/o anticuerpos.

Por tanto, ahora es posible proporcionar composiciones farmacéuticas que comprenden dos polipéptidos o anticuerpos que actúan como agonistas mediante la unión a los dos epítomos diferentes en DR5, o anticuerpos biespecíficos que actúan como agonistas mediante la unión a los dos epítomos diferentes en DR5 y composiciones farmacéuticas que contienen los mismos.

Un "agonista" o un "polipéptido o anticuerpo agonístico" para un receptor natural es un compuesto que se une al receptor para formar un complejo de receptor-agonista y que activa dicho receptor, iniciando una señalización de la vía y otro proceso biológico. En el contexto de la presente invención, se obtiene una función agonista debido a la interacción simultánea o secuencial entre los polipéptidos o anticuerpos de la invención y dos epítomos diferentes del receptor DR5, iniciando la vía de apoptosis de DR5.

Un objeto de la invención es, por lo tanto, una composición que comprende dos polipéptidos, o anticuerpos o fragmentos de los mismos, ambos con la capacidad de unirse a DR5, un primer polipéptido o anticuerpo que comprende un primer sitio de unión a antígeno que se une a un primer epítomo de dicho DR5, y un segundo polipéptido o anticuerpo que comprende un segundo sitio de unión a antígeno diferente que se une a un segundo epítomo de dicho DR5. Cada uno de dichos primer y segundo sitios de unión a antígeno se une a un epítomo diferente en la misma molécula de DR5. Los dos polipéptidos, o anticuerpos o fragmentos de los mismos son para una administración simultánea, separada o secuencial a un mamífero, incluido un ser humano.

La composición o composición farmacéutica puede contener adicionalmente un portador, diluyente o excipiente

farmacéuticamente aceptable. Los polipéptidos o anticuerpos son sinérgicamente agonísticos combinados, lo que significa que tienen la capacidad de unirse a ambos epítomos de una molécula de DR5 para inducir la vía apoptótica de DR5.

- 5 Un objeto de la invención es también un anticuerpo biespecífico o biparatópico, o fragmento del mismo, que tiene la capacidad de unirse a DR5, comprendiendo dicho anticuerpo un primer sitio de unión a antígeno que se une a un primer epítomo de dicho DR5, y un segundo sitio de unión a antígeno diferente que se une a un segundo epítomo de dicho DR5. Cada uno de dichos primer y segundo sitios de unión a antígeno se une a un epítomo diferente en la misma molécula de DR5. Los polipéptidos o anticuerpos son sinérgicamente agonísticos combinados, lo que  
10 significa que tienen la capacidad de unirse a sus dos epítomos específicos de una molécula de DR5 para inducir la vía apoptótica de DR5.

- La invención abarca la unión de un anticuerpo biespecífico a los dos epítomos diferentes de la misma molécula de DR5, o de dos anticuerpos biespecíficos a los dos epítomos de la misma molécula de DR5, un anticuerpo para un  
15 primer epítomo, el segundo para el segundo epítomo del misma molécula de DR5.

El anticuerpo biespecífico se puede formular en una composición farmacéutica que contiene adicionalmente un portador, diluyente o excipiente farmacéuticamente aceptable.

- 20 Sin desear estar limitados por la teoría, se considera que, en relación con el mecanismo de acción, la combinación de anticuerpos o anticuerpos biespecíficos según la invención puede promover la agrupación de DR5. Estos componentes pueden promover la acumulación de DR5 de mayor concentración en comparación con un anticuerpo monoespecífico.

- 25 La combinación de anticuerpos o anticuerpos biespecíficos puede promover también un cambio de conformación que induce una mayor incidencia para desencadenar la señalización de la apoptosis o para revertir la resistencia de las células cancerosas a la apoptosis. Estos componentes pueden promover la acumulación de DR5 de mayor concentración en comparación con un anticuerpo monoespecífico.

- 30 Otro objeto de la invención abarca la unión de al menos dos, tres, cuatro, cinco o más polipéptidos de unión monovalentes, o anticuerpos o fragmentos de los mismos, ambos con la capacidad de unirse a DR5, un primer polipéptido o anticuerpo que comprende un primer sitio de unión a antígeno que se une a un primer epítomo de dicho DR5, y un segundo polipéptido o anticuerpo que comprende un segundo sitio de unión a antígeno diferente que se  
35 une a un segundo epítomo de dicho DR5.

- Otro objeto de la invención es, por lo tanto, una composición que comprende al menos un fármaco quimioterapéutico y dos polipéptidos, o anticuerpos o fragmentos de los mismos, ambos con la capacidad de unirse a DR5, un primer polipéptido o anticuerpo que comprende un primer sitio de unión a antígeno que se une a un primer epítomo de dicho DR5, y un segundo polipéptido o anticuerpo que comprende un segundo sitio de unión a antígeno diferente que se  
40 une a un segundo epítomo de dicho DR5. Cada uno de dichos primer y segundo sitios de unión a antígeno se une a un epítomo diferente en la misma molécula de DR5. El fármaco y los dos polipéptidos, o anticuerpos o fragmentos de los mismos son para una administración simultánea, separada o secuencial a un mamífero, incluido un ser humano. En este objeto, los dos polipéptidos se pueden reemplazar por un anticuerpo biespecífico o biparatópico, o un fragmento del mismo, como se describe en la presente memoria.

- 45 Los polipéptidos, especialmente los anticuerpos, de acuerdo con la invención se pueden definir adicionalmente por las CDR de las regiones VH y VL de los anticuerpos murinos DR5-01 y DR5-05 o por sus regiones VH y VL completas.

- 50 Un objeto de la invención es una composición que comprende al menos uno o dos polipéptidos que se unen específicamente a un receptor DR5, en donde al menos uno o dos polipéptidos comprenden dos dominios de unión a inmunoglobulina que comprenden:

- un primer dominio de unión que comprende un par de cadenas VH y VL en donde  
55
    - o la cadena VH contiene una CDR1 que comprende o consiste en la secuencia de SEQ ID NO: 13, una CDR2 que comprende o consiste en la secuencia de SEQ ID NO: 14, una CDR3 que comprende o consiste en la secuencia de SEQ ID NO: 15; y la cadena VL contiene una CDR1 que comprende o consiste en la secuencia de SEQ ID NO: 16, una CDR2 que comprende o consiste en la secuencia FAS, una CDR3 que comprende o consiste en la secuencia de SEQ ID NO: 17; o
    - o en donde la cadena VH contiene una CDR1 que comprende o consiste en la secuencia de SEQ ID NO: 22, una CDR2 que comprende o consiste en la secuencia de SEQ ID NO: 23, una CDR3 que comprende o consiste en la secuencia de SEQ ID NO: 24; y la cadena VL contiene una CDR1 que comprende o consiste en la secuencia de SEQ ID NO: 25, una CDR2 que comprende o consiste en la
- 60

secuencia de SEQ ID NO: 26, una CDR3 que comprende o consiste en la secuencia de SEQ ID NO: 17, o

o en donde la cadena VH contiene una CDR1 que comprende o consiste en la secuencia de SEQ ID NO: 32, una CDR2 que comprende o consiste en la secuencia de SEQ ID NO: 14, una CDR3 que comprende o consiste en la secuencia de SEQ ID NO: 24; y la cadena VL contiene una CDR1 que comprende o consiste en la secuencia de SEQ ID NO: 16, una CDR2 que comprende o consiste en la secuencia de SEQ ID NO: 17,

y

- un segundo dominio de unión que comprende un par de cadenas VH y VL en donde

o la cadena VH contiene una CDR1 que comprende o consiste en la secuencia de SEQ ID NO: 18, una CDR2 que comprende o consiste en la secuencia de SEQ ID NO: 14, una CDR3 que comprende o consiste en la secuencia de SEQ ID NO: 19; y la cadena VL contiene una CDR1 que comprende o consiste en la secuencia de SEQ ID NO: 20, una CDR2 que comprende o consiste en la secuencia de SEQ ID NO: 21, o

o en donde la cadena VH contiene una CDR1 que comprende o consiste en la secuencia de SEQ ID NO: 27, una CDR2 que comprende o consiste en la secuencia de SEQ ID NO: 28, una CDR3 que comprende o consiste en la secuencia de SEQ ID NO: 29; y la cadena VL contiene una CDR1 que comprende o consiste en la secuencia de SEQ ID NO: 30, una CDR2 que comprende o consiste en la secuencia de SEQ ID NO: 31, una CDR3 que comprende o consiste en la secuencia de SEQ ID NO: 21, o

o en donde la cadena VH contiene una CDR1 que comprende o consiste en la secuencia de SEQ ID NO: 33, una CDR2 que comprende o consiste en la secuencia de SEQ ID NO: 14, una CDR3 que comprende o consiste en la secuencia de SEQ ID NO: 29; y la cadena VL contiene una CDR1 que comprende o consiste en la secuencia de SEQ ID NO: 20, una CDR2 que comprende o consiste en la secuencia de SEQ ID NO: 21,

en donde

- el al menos un polipéptido comprende ambos dominios de unión a inmunoglobulina, o

- los al menos dos polipéptidos comprenden un primer polipéptido que comprende el primer dominio de unión y un segundo polipéptido que comprende el segundo dominio de unión para una administración simultánea, separada o secuencial a un mamífero, incluido el hombre,

y un portador farmacéutico, diluyente o excipiente. En una realización, la composición comprende adicionalmente un fármaco quimioterapéutico para una administración simultánea, separada o secuencial a un mamífero, incluido el hombre.

Otros objetos de la invención son los polipéptidos o anticuerpos individuales y sus diversas combinaciones de acuerdo con la invención, los kits que comprenden al menos dos polipéptidos o anticuerpos y los kits que comprenden al menos un polipéptido o anticuerpo y al menos un fármaco, en donde los anticuerpos o polipéptidos y los fármacos están separados o no.

Los polipéptidos o anticuerpos de la invención pueden comprender uno o varios, preferiblemente dos, sitios de unión o dominios o paratopos. Un objeto de la presente invención es un polipéptido que se une específicamente a un receptor DR5, que comprende uno o más, preferiblemente uno o dos, dominios de unión a inmunoglobulina que comprende:

- un dominio de unión que comprende un par de cadenas VH y VL en donde:

o la cadena VH contiene una CDR1 que comprende o consiste en la secuencia de SEQ ID NO: 13, una CDR2 que comprende o consiste en la secuencia de SEQ ID NO: 14, una CDR3 que comprende o consiste en la secuencia de SEQ ID NO: 15; y la cadena VL contiene una CDR1 que comprende o consiste en la secuencia de SEQ ID NO: 16, una CDR2 que comprende o consiste en la secuencia de SEQ ID NO: 17 (CDR de tipo DR5-01), o

o la cadena VH contiene una CDR1 que comprende o consiste en la secuencia de SEQ ID NO: 22, una CDR2 que comprende o consiste en la secuencia de SEQ ID NO: 23, una CDR3 que comprende o consiste en la secuencia de SEQ ID NO: 24; y la cadena VL contiene una CDR1 que comprende o consiste en la secuencia de SEQ ID NO: 25, una CDR2 que comprende o consiste en la secuencia de SEQ ID NO: 26, una CDR3 que comprende o consiste en la secuencia de SEQ ID NO: 17, (CDR de tipo DR5-01), o

o la cadena VH contiene una CDR1 que comprende o consiste en la secuencia de SEQ ID NO: 32, una CDR2 que comprende o consiste en la secuencia de SEQ ID NO: 14, una CDR3 que comprende o consiste en la secuencia de SEQ ID NO: 24; y la cadena VL contiene una CDR1 que comprende o

consiste en la secuencia de SEQ ID NO: 16, una CDR2 que comprende o consiste en la secuencia FAS, una CDR3 que comprende o consiste en la secuencia de SEQ ID NO: 17 (CDR de tipo DR5-01); y/o

5 - un dominio de unión que comprende un par de cadenas VH y VL en donde:

- 10      o la cadena VH contiene una CDR1 que comprende o consiste en la secuencia de SEQ ID NO: 18, una CDR2 que comprende o consiste en la secuencia de SEQ ID NO: 14, una CDR3 que comprende o consiste en la secuencia de SEQ ID NO: 19; y la cadena VL contiene una CDR1 que comprende o consiste en la secuencia de SEQ ID NO: 20, una CDR2 que comprende o consiste en la secuencia RTS, una CDR3 que comprende o consiste en la secuencia de SEQ ID NO: 21 (CDR de tipo DR5-05), o
- 15      o la cadena VH contiene una CDR1 que comprende o consiste en la secuencia de SEQ ID NO: 27, una CDR2 que comprende o consiste en la secuencia de SEQ ID NO: 28, una CDR3 que comprende o consiste en la secuencia de SEQ ID NO: 29; y la cadena VL contiene una CDR1 que comprende o consiste en la secuencia de SEQ ID NO: 30, una CDR2 que comprende o consiste en la secuencia de SEQ ID NO: 31, una CDR3 que comprende o consiste en la secuencia de SEQ ID NO: 21 (CDR de tipo DR5-05) o
- 20      o la cadena VH contiene una CDR1 que comprende o consiste en la secuencia de SEQ ID NO: 33, una CDR2 que comprende o consiste en la secuencia de SEQ ID NO: 14, una CDR3 que comprende o consiste en la secuencia de SEQ ID NO: 29; y la cadena VL contiene una CDR1 que comprende o consiste en la secuencia de SEQ ID NO: 20, una CDR2 que comprende o consiste en la secuencia RTS, una CDR3 que comprende o consiste en la secuencia de SEQ ID NO: 21 (CDR de tipo DR5-05).
- 25      El dominio de unión se define mejor por las cadenas VH y VL que comprenden las CDR definidas en función del mismo método, ya sea IMGT®, Kabat® o un sistema de numeración común, véase la tabla de CDR a continuación.

30 Las cadenas VH y VL juntas definen un único sitio de unión. Cada uno de estos dominios de unión se une específicamente a un epítipo diferente en el receptor DR5. Los polipéptidos son agonísticos sinérgicamente, lo que significa que tienen la capacidad de unirse a ambos epítipos de una molécula de DR5 para inducir la vía apoptótica de DR5.

35 Por "dominio de unión a inmunoglobulina" o "dominio de unión" se entiende el parátipo de una inmunoglobulina compuesta por las dos cadenas ligera variable (VL) y pesada variable (VH). El parátipo es capaz de unirse específicamente al epítipo elegido como diana.

40 De acuerdo con la invención, las cadenas VL y VH tienen una estructura convencional de una cadena ligera o una cadena pesada de una inmunoglobulina, con las regiones marco FR. La estructura puede definirse como la estructura FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4. En una realización preferida, el polipéptido de la invención comprende uno o más, preferiblemente uno o dos, dominios de unión a inmunoglobulina que comprenden la región VH + VL de mDR5-01 y/o la región VH + VL de mDR5-05. En una realización, el polipéptido comprende uno o dos dominios de unión que comprenden la región VH + VL de mDR5-01. En una realización, el polipéptido comprende uno o dos dominios de unión que comprenden la región VH + VL de mDR5-05. En una realización, el polipéptido comprende dos dominios de unión que comprenden la región VH + VL de mDR5-05, por una parte, y la región VH + VL de mDR5-01, por otra parte. En una realización preferida, el polipéptido de la invención comprende uno o más, preferiblemente uno o dos, dominios de unión a inmunoglobulina que comprenden la región VH + VL de HzDR5-01 y/o la región VH + VL de HzDR5-05. En una realización, el polipéptido comprende uno o dos dominios de unión que comprenden la región VH + VL de HzDR5-01. En una realización, el polipéptido comprende uno o dos dominios de unión que comprenden la región VH + VL de HzDR5-05. En una realización, el polipéptido comprende dos dominios de unión que comprenden la región VH + VL de HzDR5-05, por una parte, y la región VH + VL de HzDR5-01, por otra parte.

55 El polipéptido anti-DR5 comprende así uno o dos dominios de unión. En una realización, los dominios de unión son específicos del mismo epítipo en el receptor DR5. Estos dominios de unión comprenden el mismo conjunto de 3 CDR en VH y VL como se describe y proporciona allí y pueden ser idénticos o ligeramente diferentes en las regiones marco, en tanto que esto no afecte a la especificidad para unirse al epítipo elegido como diana.

60 El polipéptido anti-DR5 puede ser en particular un anticuerpo, preferiblemente un anticuerpo monoclonal, o un fragmento de anticuerpo adecuado, tal como un Fv, un Fab, un F(ab')<sub>2</sub>, un fragmento variable de cadena sencilla (scFv).

La invención también abarca el uso combinado de polipéptidos o anticuerpos o de polipéptidos o anticuerpos o fragmentos biespecíficos y similares, que hacen uso de la actividad sinérgica ligada a la unión a los dos epítipos revelada por la presente invención. Este uso se puede combinar adicionalmente con el uso de un fármaco

quimioterapéutico, como se describe en la presente memoria.

Otro objeto de la invención abarca la unión de al menos dos, tres, cuatro, cinco o más polipéptidos de unión monovalentes, o anticuerpos o fragmentos de los mismos, ambos con la capacidad de unirse a DR5, un primer polipéptido o anticuerpo que comprende un primer sitio de unión a antígeno que se une a un primer epítipo de dicho DR5, y un segundo polipéptido o anticuerpo que comprende un segundo sitio de unión a antígeno diferente que se une a un segundo epítipo de dicho DR5.

Por lo tanto, otro objeto de la invención es una composición que comprende dos polipéptidos, o anticuerpos o fragmentos de los mismos, ambos con la capacidad de unirse a DR5, un primer polipéptido o anticuerpo que comprende un primer sitio de unión a antígeno que se une a un primer epítipo de dicho DR5, siendo este primer epítipo aquel al que se une específicamente a un dominio de unión que comprende un par de cadenas VH y VL en donde la cadena VH contiene una CDR1 de la secuencia de SEQ ID NO: 13, una CDR2 de la secuencia de SEQ ID NO: 14, una CDR3 de la secuencia de ID SEC NO: 15; y la cadena VL contiene una CDR1 de la secuencia de SEQ ID NO: 16, una CDR2 de la secuencia FAS, una CDR3 de la secuencia de SEQ ID NO: 17, y un segundo polipéptido o anticuerpo que comprende un segundo sitio de unión a antígeno diferente que se une a un segundo epítipo de dicho DR5, siendo este epítipo aquel al que se une específicamente a un dominio de unión que comprende un par de cadenas VH y VL en donde la cadena VH contiene una CDR1 de la secuencia de SEQ ID NO: 18, una CDR2 de la secuencia de SEQ ID NO: 14, una CDR3 de la secuencia de SEQ ID NO: 19; y la cadena VL contiene una CDR1 de la secuencia de SEQ ID NO: 20, una CDR2 de la secuencia RTS, una CDR3 de la secuencia de SEQ ID NO: 21, para una administración simultánea, separada o secuencial a un mamífero, incluido el hombre. Como alternativa, se puede reemplazar aquí la definición de las CDR por aquellas de acuerdo con Kabat® o el Sistema de numeración Común según las Tablas 1 y 2.

Otro objeto de la invención es un anticuerpo biespecífico, o un fragmento del mismo, que tiene la capacidad de unirse a DR5, comprendiendo dicho anticuerpo un primer sitio de unión a antígeno que se une a un primer epítipo de dicho DR5, siendo este primer epítipo aquel al que se une específicamente a un dominio de unión que comprende un par de cadenas VH y VL en donde la cadena VH contiene una CDR1 de la secuencia de SEQ ID NO: 13, una CDR2 de la secuencia de SEQ ID NO: 14, una CDR3 de la secuencia de SEQ ID NO: 15; y la cadena VL contiene una CDR1 de la secuencia de SEQ ID NO: 16, una CDR2 de la secuencia FAS, una CDR3 de la secuencia de SEQ ID NO: 17 y un segundo sitio de unión a antígeno diferente que se une a un segundo epítipo de dicho DR5, siendo este epítipo aquel al que se une específicamente a un dominio de unión que comprende un par de cadenas VH y VL en donde la cadena VH contiene una CDR1 de la secuencia de SEQ ID NO: 18, una CDR2 de la secuencia de SEQ ID NO: 14, una CDR3 de la secuencia de SEQ ID NO: 19; y la cadena VL contiene una CDR1 de la secuencia de SEQ ID NO: 20, una CDR2 de la secuencia RTS, una CDR3 de la secuencia de SEQ ID NO: 21. Como alternativa, se puede reemplazar aquí la definición de las CDR por las de Kabat® o Sistema de numeración Común según las Tablas 1 y 2.

En la presente memoria se describe adicionalmente el método de tratamiento, que comprende la administración de una cantidad eficaz o suficiente de al menos dos polipéptidos o anticuerpos como se describe en la presente memoria, o de al menos un polipéptido o anticuerpo biespecífico o biparatópico como se describe en la presente memoria, o de al menos dos polipéptidos o anticuerpos y al menos un fármaco, como se describe en la presente memoria, o de al menos un polipéptido o anticuerpo biespecífico o biparatópico y al menos un fármaco, como se describe en la presente memoria. Por tratamiento se entiende el tratamiento particular de diversos cánceres, enfermedades autoinmunitarias, enfermedades infecciosas que expresan el antígeno DR5.

## Definiciones

Los términos "apoptosis" y "actividad apoptótica" se usan en un sentido amplio y se refieren a la forma ordenada o controlada de muerte celular en mamíferos que suele ir acompañada de uno o más cambios celulares característicos, incluida la condensación del citoplasma, la pérdida de microvilli de la membrana plasmática, la segmentación del núcleo, degradación del ADN cromosómico o la pérdida de la función mitocondrial. Esta actividad se puede determinar y medir, por ejemplo, mediante ensayos de viabilidad celular, análisis FACS o electroforesis de ADN, y más específicamente mediante unión de anexina V, fragmentación del ADN, contracción celular, dilatación del retículo endoplásmico, fragmentación celular y/o formación de vesículas de membrana (denominadas cuerpos apoptóticos).

Como se emplea en la presente memoria, el término "sinergia" o "sinergismo" o "sinérgicamente" se refiere a la interacción de dos o más agentes para que su efecto combinado sea mayor que la suma de sus efectos individuales.

Los términos "agonista" y "agonístico" cuando se emplean en la presente memoria se refieren o describen una molécula que es capaz de inducir, promover o potenciar sustancialmente, directa o indirectamente, la actividad o activación biológica de DR5. Opcionalmente, un "anticuerpo agonista de DR5" es un anticuerpo que tiene una actividad al menos comparable al ligando para DR5, conocido como ligando Apo-2 (TRAIL), o que es capaz de



activar el receptor DR5, lo que da como resultado una activación de una vía de señalización intracelular más que puede incluir la activación de caspasa 3, caspasa 8, caspasa 10 o FADD.

Los términos "antagonista" y "antagonista" cuando se emplean en la presente memoria se refieren o describen una molécula que puede contrarrestar, reducir o inhibir sustancialmente la actividad biológica de DR5 de activación de DR5 directa o indirectamente. Opcionalmente, un antagonista es una molécula que neutraliza la actividad biológica resultante de la activación de DR5 o la formación de un complejo entre DR5 y su ligando, tal como el ligando Apo-2.

El término "anticuerpo" se emplea en el sentido más amplio y cubre específicamente anticuerpos monoclonales intactos, anticuerpos policlonales, anticuerpos multivalentes (p. ej., anticuerpos biespecíficos) formados a partir de al menos dos anticuerpos intactos, y fragmentos de anticuerpos, siempre y cuando exhiban la actividad biológica deseada.

Los "anticuerpos nativos" y las "inmunoglobulinas nativas" son usualmente glicoproteínas heterotetraméricas de aproximadamente 150.000 daltons, compuestas de dos cadenas ligeras (L) idénticas y cadenas pesadas (H) idénticas. Cada cadena ligera está unida a una cadena pesada por un enlace disulfuro covalente, mientras que el número de enlaces disulfuro varía entre las cadenas pesadas de diferentes isotipos de inmunoglobulina. Cada cadena pesada y ligera también tiene puentes disulfuro intracatenarios espaciados regularmente. Cada cadena pesada tiene en un extremo un dominio variable ( $V_H$ ).

Como se emplea en la presente memoria, un "anticuerpo" se refiere a una proteína que consiste en uno o más polipéptidos sustancialmente codificados por genes de inmunoglobulina o fragmentos de genes de inmunoglobulina. Los genes de inmunoglobulina reconocidos incluyen los genes de región constante kappa, lambda, alfa, gamma, delta, épsilon y mu, así como innumerables genes de región variable de inmunoglobulina. Las cadenas ligeras se clasifican como kappa o lambda. Las cadenas pesadas se clasifican como gamma, mu, alfa, delta o épsilon, que a su vez definen las clases de inmunoglobulina, IgG, IgM, IgA, IgD e IgE, respectivamente.

Con respecto a los anticuerpos de la invención, el término "inmunológicamente específico" o "se une específicamente" se refiere a los anticuerpos que se unen a uno o más epítopos de una proteína de interés (p. ej., DR5/TRAIL R2), pero que no reconocen sustancialmente y se unen a otras moléculas en una muestra que contiene una población mixta de moléculas biológicas antigénicas.

El "epítipo de DR5-01" y el "epítipo de DR5-05" son las regiones en el dominio extracelular de DR5 a las que se unen los anticuerpos DR5-01 y DR5-05 respectivamente.

El término "anticuerpo biespecífico" como se emplea en la presente memoria se refiere a un anticuerpo que comprende dos sitios de unión a antígeno, teniendo un primer sitio de unión afinidad por un primer antígeno o epítipo y teniendo un segundo sitio de unión afinidad de unión por un segundo antígeno o epítipo distinto del primero.

"Anticuerpos biespecíficos" o "anticuerpos biparatópicos" son anticuerpos divalentes únicos que tienen dos sitios de unión a antígeno específicos diferentes. De acuerdo con esta invención, estos anticuerpos tienen dos sitios de unión diferentes, cada uno dirigido contra un epítipo específico y diferente en la molécula de DR5. Esta definición también abarca los fragmentos de un anticuerpo biespecífico o biparatópico que comprende ambos sitios de unión y en donde cada uno de estos sitios de unión tiene la capacidad de unirse al epítipo correspondiente en DR5. Tal fragmento puede ser, por ejemplo, un fragmento de anticuerpo  $F(ab')_2$ .

El término "anticuerpo bivalente, biespecífico", como se emplea en la presente memoria, se refiere a un anticuerpo como se describió anteriormente, en el que cada uno de los dos pares de cadena pesada y cadena ligera (HC/LC) se unen específicamente a un epítipo diferente, es decir, las primeras cadenas pesada y ligera se unen específicamente a un primer epítipo, y, la segunda cadena pesada y ligera se unen específicamente a un segundo epítipo; tales anticuerpos bivalentes y biespecíficos son capaces de unirse específicamente a dos epítopos diferentes, al mismo tiempo o no.

De acuerdo con la invención, la proporción de un anticuerpo bivalente biespecífico deseado en comparación con los productos secundarios no deseados se puede mejorar reemplazando ciertos dominios en solo un par de cadena pesada y cadena ligera (HC/LC). Mientras que el primero de los dos pares de HC/LC se origina a partir de un anticuerpo que se une específicamente a un primer epítipo y se deja esencialmente sin cambios, el segundo de los dos pares de HC/LC se origina a partir de un anticuerpo que se une específicamente a un segundo epítipo, y se altera por el siguiente reemplazo:

- Cadena ligera: sustitución del dominio variable de cadena ligera VL por el dominio variable de cadena pesada VH de dicho anticuerpo que se une específicamente a un segundo epítipo, y el dominio constante de cadena ligera CL por el dominio constante de cadena pesada CH de dicho anticuerpo que se une

- específicamente a un segundo epítipo y Cadena pesada: reemplazo del dominio variable de cadena pesada VH por el dominio variable de cadena ligera VL de dicho anticuerpo que se une específicamente a un segundo epítipo, y el dominio constante de cadena pesada CH por el dominio constante de cadena ligera CL de dicho anticuerpo que se une específicamente a un segundo epítipo

Las proteínas modificadas genéticamente, tales como anticuerpos bi- o multivalentes capaces de unirse a dos o más antígenos o epítopos son conocidas en la técnica. Dichas proteínas de unión multivalente se pueden generar utilizando técnicas de fusión celular, conjugación química o ADN recombinante.

En un enfoque, se han producido anticuerpos biespecíficos que son muy similares a los anticuerpos naturales utilizando la tecnología de cuádrumas, (Milstein C. et al., Nature. 1983; 305:537-40) basado en la fusión somática de dos líneas celulares de hibridoma diferentes que expresan anticuerpos monoclonales murinos con las especificidades deseadas del anticuerpo biespecífico. Debido al emparejamiento aleatorio de dos cadenas pesadas y ligeras de anticuerpos diferentes dentro de la línea celular de hibridoma híbrido (o cuádruma) resultante, se generan hasta diez especies de anticuerpos diferentes de las cuales solo una es el anticuerpo biespecífico funcional deseado. Debido a la presencia de subproductos mal emparejados y a la reducción del rendimiento de producción, se requieren procedimientos de purificación sofisticados, (Morrison S.L., Nature Biotech. 2007; 25:1233-1234). En general, subsiste el mismo problema de los subproductos mal emparejados si se usan técnicas de expresión recombinante.

Un enfoque para evitar el problema de los subproductos mal emparejados, que se conoce como "botones en ojales", tiene como objetivo forzar el emparejamiento de dos cadenas pesadas de anticuerpos diferentes mediante la introducción de mutaciones en los dominios CH3 para modificar la interfaz de contacto. En una cadena, los aminoácidos voluminosos son reemplazados por aminoácidos con cadenas laterales cortas para crear un "ojal". A la inversa, los aminoácidos con grandes cadenas laterales se introducen en el otro dominio CH3, para crear un "botón". Al co-expresar estas dos cadenas pesadas (y dos cadenas ligeras idénticas, que deben ser apropiadas para ambas cadenas pesadas), se pueden observar altos rendimientos de formación de heterodímeros ("botón en ojal") versus formación de homodímero ("ojal en ojal" o "botón en botón"), (Ridgway, JB et al., Protein Eng. 1996; 9:617-621; y documento WO 96/027011).

Los "fragmentos de anticuerpo" comprenden una porción de un anticuerpo intacto, preferiblemente la región de unión a antígeno o variable del anticuerpo intacto. Un "fragmento de anticuerpo" adecuado es un fragmento de anticuerpo que tiene la capacidad de unirse al epítipo DR5 e iniciar la vía de apoptosis.

Los ejemplos de fragmentos de anticuerpos incluyen Fab, Fab', F(ab')<sub>2</sub>, y fragmentos Fv; diacuerpos; anticuerpos lineales, (Zapata et al., Protein Eng. 1995; 8(10):1057-1062); moléculas de anticuerpo de cadena sencilla; y anticuerpos multivalentes formados a partir de fragmentos de anticuerpos.

Un anticuerpo "intacto" es uno que comprende una región variable de unión a antígeno así como un dominio constante de cadena ligera (CL) y dominios constantes de cadena pesada, CH1, CH2 y CH3. La digestión de anticuerpos con papaína produce dos fragmentos de unión a antígeno idénticos, llamados fragmentos "Fab", cada uno de los cuales comprende un único sitio de unión a antígeno y una región CL y CH1, y un fragmento Fc residual. El tratamiento con pepsina produce un fragmento "F(ab')<sub>2</sub>" que tiene dos sitios de unión a antígeno y aún es capaz de entrecruzar el antígeno.

"Fv" es el fragmento de anticuerpo mínimo que contiene un sitio completo de reconocimiento de antígeno y de unión a antígeno. Esta región consiste en un dímero de una cadena pesada y un dominio variable de cadena ligera en asociación estrecha y no covalente. Es en esta configuración que las tres regiones hipervariables (CDR) de cada dominio variable interactúan para definir un sitio de unión a antígeno en la superficie del dímero VH-VL. En conjunto, las seis regiones hipervariables o CDR confieren especificidad de unión a antígeno al anticuerpo.

El fragmento "Fab" también contiene el dominio constante de la cadena ligera y el primer dominio constante (CH1) de la cadena pesada y tiene un solo sitio de unión a antígeno.

Los fragmentos "Fab" difieren de los fragmentos Fab en la adición de unos pocos residuos en el extremo carboxi del dominio CH1 de la cadena pesada, que incluyen una o más cisteínas de la región bisagra del anticuerpo.

Los fragmentos de anticuerpo F(ab')<sub>2</sub> originalmente se produjeron como pares de fragmentos Fab' que tienen cisteínas bisagra entre ellos. También se conocen otros acoplamiento químicos de fragmentos de anticuerpos. (Hermanson et al., Bioconjugate Techniques, Academic Press, 1996, US 4 342 566).

Los fragmentos de anticuerpo "Fv de cadena sencilla" o "scFv" comprenden los dominios VH y VL de un anticuerpo en donde estos dominios están presentes en una única cadena polipeptídica. Preferiblemente, el scFv comprende

un conector polipeptídico entre los dominios VH y VL que permite que el scFv forme la estructura deseada para la unión al antígeno.

Los términos "polipéptido", "péptido" y "proteína" se utilizan indistintamente en la presente memoria para referirse a un polímero de residuos de aminoácidos. Los términos se aplican a polímeros de aminoácidos naturales, así como a polímeros de aminoácidos en los que uno o más residuos de aminoácidos son un análogo químico artificial de un aminoácido natural correspondiente. El término también incluye variantes en el enlace peptídico tradicional que une los aminoácidos que forman el polipéptido. Los "péptidos", "polipéptidos" y "proteínas" preferidos son cadenas de aminoácidos cuyos carbonos están unidos a través de enlaces peptídicos.

El aminoácido terminal en un extremo de la cadena (amino terminal) tiene, por lo tanto, un grupo amino libre, mientras que el aminoácido terminal en el otro extremo de la cadena (carboxi terminal) tiene un grupo carboxilo libre. Como se emplea en la presente memoria, el término "extremo amino terminal" (abreviado N-terminal) se refiere al grupo  $\alpha$ -amino libre en un aminoácido en el amino terminal de un péptido o al grupo  $\alpha$ -amino (grupo amino cuando participa en un enlace peptídico) de un aminoácido en cualquier otra ubicación dentro del péptido. De manera similar, el término "extremo carboxi terminal" se refiere al grupo carboxilo libre en el extremo carboxi terminal de un péptido o el grupo carboxilo de un aminoácido en cualquier otra ubicación dentro del péptido. Los péptidos también incluyen esencialmente cualquier poliaminoácido que incluye, pero no se limita a miméticos de péptidos, tales como aminoácidos unidos por enlace éter, a diferencia de un enlace amina.

El término "variable" se refiere al hecho de que ciertas porciones de los dominios variables difieren ampliamente en la secuencia entre los anticuerpos y se usan en la unión y especificidad de cada anticuerpo concreto para su antígeno concreto. Sin embargo, la variabilidad no está distribuida uniformemente en los dominios variables de los anticuerpos. Se concentra, en tres segmentos denominados regiones determinantes de la complementariedad (CDR) o regiones hipervariables tanto en los dominios variables de cadena ligera como de cadena pesada. Las partes más altamente conservadas de los dominios variables se denominan marco (FR). Los dominios variables de las cadenas ligeras y pesadas nativas comprenden cada una cuatro regiones FR, que adoptan en gran parte una configuración de hoja  $\beta$ , conectadas por tres CDR, que forman bucles que se conectan y, en algunos casos, forman parte de la estructura de la hoja  $\beta$ . Las CDR en cada cadena se mantienen juntas cerca de las regiones FR y, con las CDR de la otra cadena, contribuyen a la formación del sitio de unión a antígeno de los anticuerpos, (*Kabat et al., NIH Publ. 1991; No. 91-3242, Vol. 1, 647-669*). Los dominios constantes no participan directamente en la unión de un anticuerpo a un antígeno, pero exhiben varias funciones efectoras, tales como la participación del anticuerpo en la toxicidad celular dependiente de anticuerpos.

Los anticuerpos monoclonales en la presente memoria incluyen específicamente anticuerpos "quiméricos" (inmunoglobulinas) en los cuales una porción de la cadena pesada y/o ligera es idéntica o homóloga a las secuencias correspondientes en anticuerpos derivados de una especie particular o pertenecientes a una clase o subclase de anticuerpos particular, mientras que el resto de la cadena o de las cadenas es idéntico o homólogo a las secuencias correspondientes en los anticuerpos derivados de otra especie o pertenecientes a otra clase o subclase de anticuerpos, así como a fragmentos de dichos anticuerpos, siempre que exhiban la actividad biológica deseada (Patente de Estados Unidos Núm. 4.816.567; Morrison et al., Proc. Natl Acad Sci. USA, 81: 6851-6855 (1984)).

Otras formas preferidas de "anticuerpos quiméricos" abarcadas por la presente invención son aquellas en las que la región constante se ha modificado o cambiado de la del anticuerpo original para generar las propiedades de acuerdo con la invención, especialmente con respecto a la unión a C1q y/o la unión al receptor Fc (FcR).

Dichos anticuerpos quiméricos también se denominan "anticuerpos de cambio de clase". Los anticuerpos quiméricos son el producto de genes de inmunoglobulina expresados que comprenden segmentos de ADN que codifican regiones variables de inmunoglobulina y segmentos de ADN que codifican regiones constantes de inmunoglobulina. Los métodos para producir anticuerpos quiméricos implican ADN recombinante convencional y técnicas de transfección de genes son bien conocidos en la técnica. Véanse, p. ej., Morrison, S. L et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1984; 81:6851-6855; la Patente de Estados Unidos Núm. 5.202.238 y la Patente de Estados Unidos Núm. 5.204.244. El documento WO 2006/093794 se refiere a composiciones de unión a proteínas heterodiméricas. El documento WO 99/37791 describe derivados de anticuerpos multipropósito. Morrison et al., J. Immunol. 1998; 160:2802-2808 se refiere a la influencia del intercambio de dominio de la región variable en las propiedades funcionales de la IgG.

Las formas "humanizadas" de anticuerpos no humanos (p. ej., murinos) son inmunoglobulinas quiméricas, cadenas de inmunoglobulina o sus fragmentos (tales como Fv, Fab, Fab', F(ab')<sub>2</sub> u otras subsecuencias de unión a antígeno de los anticuerpos) que contienen una secuencia mínima derivada de inmunoglobulina no humana. En su mayor parte, los anticuerpos humanizados son inmunoglobulinas humanas (anticuerpo receptor) en las cuales los residuos de una región determinante de complementariedad (CDR) del receptor se reemplazan por residuos de una CDR de una especie no humana (anticuerpo donante), por ejemplo, de ratón, rata o conejo con la especificidad, afinidad y capacidad deseadas. En algunos casos, los residuos de la región de la estructura Fv (FR) de la inmunoglobulina

humana se reemplazan por los residuos no humanos correspondientes.

En una realización preferida, una CDR murina se injerta en la región marco de un anticuerpo humano para preparar el "anticuerpo humanizado". Véanse, p. ej., Riechmann, L. et al., *Nature*. 1988; 332:323-327; y Neuberger, MS et al., *Nature*. 1985; 314:268-270. Las CDR particularmente preferidas corresponden a aquellas que representan secuencias que reconocen los antígenos destacados anteriormente para anticuerpos quiméricos. Otras formas de "anticuerpos humanizados" abarcados por la presente invención son aquellas en las que la región constante se ha modificado o cambiado adicionalmente a partir de la del anticuerpo original para generar las propiedades de acuerdo con la invención, especialmente con respecto a la unión a C1q y/o unión al receptor Fc (FcR).

Además, los anticuerpos humanizados pueden comprender residuos que no se encuentran en el anticuerpo receptor ni en las CDR o secuencias marco importadas. Estas modificaciones se realizan para refinar y maximizar adicionalmente el rendimiento del anticuerpo. En general, el anticuerpo humanizado comprenderá sustancialmente al menos uno, y típicamente dos, dominios variables, en los cuales todas o sustancialmente todas las regiones CDR corresponden a las de una inmunoglobulina no humana y todas o sustancialmente todas las regiones de FR son las de una secuencia de inmunoglobulina humana. El anticuerpo humanizado de manera óptima también comprenderá al menos una porción de una región constante de inmunoglobulina (Fc), típicamente la de una inmunoglobulina humana. Para más detalles, véanse Jones et al., *Nature*. 1986; 321:522-525; Reichmann et al., *Nature*. 1988; 332:323-329; y Presta et al., *Curr. Op. Struct Biol.* 1992; 2:593-596.

Las funciones efectoras inmunitarias que se ha demostrado que contribuyen a la citotoxicidad mediada por anticuerpos incluyen la citotoxicidad mediada por células y dependiente de anticuerpos (ADCC), la fagocitosis mediada por células dependientes de anticuerpos (ADCP) y la citotoxicidad dependiente del complemento (CDC).

La citotoxicidad también puede estar mediada a través de efectos antiproliferativos. El mecanismo de modulación de anticuerpos de la proliferación de células tumorales es poco conocido. Sin embargo, los avances en la comprensión de las interacciones de los anticuerpos con los receptores Fcγ (FcγR) en las células efectoras inmunitarias han permitido la modificación genética de anticuerpos con una función efectora significativamente mejorada.

El mecanismo de acción de los MAb es complejo y parece variar para diferentes MAb. Existen múltiples mecanismos por los cuales los MAb causan la muerte de las células diana. Estos incluyen apoptosis, CDC, ADCC e inhibición de la transducción de señales.

Las funciones efectoras, tales como CDC y ADCC, son funciones efectoras que pueden ser importantes para la eficacia clínica de los MAb. Todas estas funciones efectoras están mediadas por la región Fc del anticuerpo y permiten a los autores de la presente invención intentar modificaciones de aminoácidos con más o menos éxito. La glicosilación, especialmente la fucosilación de la región Fc, tiene una influencia drástica en la eficacia de un anticuerpo. Esto permitió a los autores de la presente invención modificar las condiciones de producción de los anticuerpos en las células CHO para cambiar el perfil de glicosilación en un intento aquí de nuevo de mejorar algunas funciones efectoras, con más o menos éxito una vez más.

Investigaciones anteriores han demostrado que un polimorfismo del gen FcγRIIIa codifica una fenilalanina (F) o una valina (V) en el aminoácido 158. La expresión de la isoforma de la valina se correlaciona con una mayor afinidad y unión a los MAb (Rowland AJ, et al. 1993. *Cancer Immunol Immunother.* 37(3):195-202; Sapra P, Allen TM. 2002. *Cancer Res* 62:7190-4; Mølhøj M, et al. 2007. *Mol Immunol.* 44(8):1935-43). Algunos estudios clínicos han apoyado este hallazgo, con una mayor respuesta clínica al rituximab en pacientes con linfoma no Hodgkin que muestran el polimorfismo V/V (Bargou R, et al. 2008. *Science.* 321:974-7; Bruenke J, 2005. *Br J Haematol.* 130(2):218-28; Cartron G, *Blood.* 1 de febrero de 2002; 99(3):754-8; Hekman A, et al. 1991. *Cancer Immunol Immunother* 32:364-72).

El documento WO1999051642 describe una variante de la región Fc de la IgG humana que comprende una sustitución de aminoácidos en las posiciones 270 o 329, o en dos o más de las posiciones 270, 322, 329 y 331. Estas modificaciones tienen como objetivo aumentar las funciones efectoras de CDC y ADCC.

"Tratamiento" o "terapia" se refieren tanto al tratamiento terapéutico como a las medidas profilácticas o preventivas.

"Mamífero" para fines de tratamiento o terapia se refiere a cualquier animal clasificado como mamífero, incluidos los seres humanos, los animales domésticos y de granja, y de zoológico, deporte o mascotas, tales como perros, caballos, gatos, vacas, etc. Preferiblemente, el mamífero es humano.

Los términos "cáncer" y "canceroso" se refieren o describen el estado fisiológico en los mamíferos que se caracteriza típicamente por un crecimiento celular no regulado. Los ejemplos de cáncer incluyen, pero no están limitados a, carcinoma, linfoma, blastoma, sarcoma y leucemia. Los ejemplos más concretos de tales cánceres incluyen cáncer de células escamosas, cáncer de pulmón de células pequeñas, cáncer de pulmón de células no pequeñas, cáncer

gastrointestinal, cáncer renal, cáncer de páncreas, glioblastoma, cáncer cervical, cáncer de ovario, cáncer de hígado, cáncer de vejiga, hepatoma, cáncer de mama, cáncer de colon, cáncer colorrectal, carcinoma de endometrio, carcinoma de glándulas salivales, cáncer de riñón, cáncer de próstata, cáncer de vulva, cáncer de tiroides, carcinoma hepático y varios tipos de cáncer de cabeza y cuello.

El término "ácido nucleico" u "oligonucleótido" o equivalentes gramaticales en la presente memoria se refieren a al menos dos nucleótidos covalentes unidos entre sí. Un ácido nucleico de la presente invención es preferiblemente monocatenario o bicatenario y generalmente contendrá enlaces fosfodiéster.

Las "variantes" (o mutantes) de la secuencia de aminoácidos del anticuerpo se preparan introduciendo cambios de nucleótidos apropiados en el ADN del anticuerpo, o mediante síntesis de nucleótidos. Tales modificaciones se pueden realizar, sin embargo, solo en un rango muy limitado, p. ej. como se ha descrito anteriormente. Por ejemplo, las modificaciones no alteran las características de los anticuerpos mencionados anteriormente, tales como el isotipo IgG y la unión al antígeno, pero pueden mejorar el rendimiento de la producción recombinante, la estabilidad de la proteína o facilitar la purificación.

#### Descripción detallada de la invención

Las secuencias de CDR pueden definirse de acuerdo con IMGT®, Kabat® o el Sistema de numeración común que conserva la secuencia común entre IMGT® y Kabat®.

Las CDR para los anticuerpos anti-DR5 mDR5-01 (un anticuerpo quimérico con VH y VL murinas y Fc humana) y HzDR5-01 (un anticuerpo humanizado con CDR murinas y FR humana con o sin mutación inversa y Fc optimizado o no) de la invención comprenden las siguientes CDR:

Tabla 1

	SEC ID NO:	Secuencia de IMGT®	SEC ID NO:	Secuencia de Kabat®	SEC ID NO:	Secuencia (sistema de numeración común)
<b>VH mDR5-01 - VH HzDR5-01</b>						
CDR1	13	GFNIKDTF	22	DTFIH	32	KDTF
CDR2	14	IDPANGNT	23	RIDPANGNTKYDPKFQG	14	IDPANGNT
CDR3	15	VRGLYTTYFDY	24	GLYTTYFDY	24	GLYTTYFDY
<b>VL mDR5-01 - VH HzDR5-01</b>						
CDR1	16	QSSNN	25	RASQSSNNLH	16	QSSNN
CDR2		FAS	26	FASQSS		FAS
CDR3	17	QQGNSWPYT	17	QQGNSWPYT	17	QQGNSWPYT

Las CDR para los anticuerpos anti-DR5 mDR5-05 y HzDR5-05 de la invención comprenden las siguientes CDR:

Tabla 2

	SEC ID NO:	Secuencia de IMGT®	SEC ID NO:	Secuencia de Kabat®	SEC ID NO:	Secuencia (sistema numérico común)
<b>VH mDR5-05 - VH HzDR5-05</b>						
CDR1	18	GFNIKDTH	27	DTHIH	33	KDTH
CDR2	14	IDPANGNT	28	RIDPANGNTEYDPKFQG	14	IDPANGNT
CDR3	19	ARWGTNVYFAY	29	WGTNVYFAY	29	WGTNVYFAY
<b>VL mDR5-05 - VH HzDR5-05</b>						
CDR1	20	SSVSY	30	SASSSVSYMY	20	SSVSY
CDR2		RTS	31	RTSNLAS		RTS
CDR3	21	QQYHSYPPT	21	QQYHSYPPT	21	QQYHSYPPT

Por definición, estas CDR incluyen CDR variantes, por delección, sustitución o adición de uno o más aminoácidos, cuya variante mantiene la especificidad de la CDR original. El sistema de numeración común proporciona una

definición de CDR que tiene las secuencias de aminoácidos más cortas o la definición mínima de CDR.

mDR5-01, mDR5-05, HzDR5-01 y HzDR5-05 tienen las secuencias de aminoácidos de VH y VL y las secuencias de ácido nucleico se representan en las siguientes tablas:

5

Tabla 3

	Secuencia de aminoácidos de VH	Secuencia de aminoácidos de VL
mDR5-01	SEC ID NO: 4	SEC ID NO: 2
mDR5-05	SEC ID NO: 8	SEC ID NO: 6
HzDR5-01	SEC ID NO: 35	SEC ID NO: 37
HzDR5-05	SEC ID NO: 39	SEC ID NO: 41

Tabla 4

	Secuencia de ácido nucleico de VH	Secuencia de ácido nucleico de VL
mDR5-01	SEC ID NO: 3	SEC ID NO: 1
mDR5-05	SEC ID NO: 7	SEC ID NO: 5
HzDR5-01	SEC ID NO: 34	SEC ID NO: 36
HzDR5-05	SEC ID NO: 38	SEC ID NO: 40

10 DR5-01 y DR5-05 tienen las secuencias de aminoácidos de CH y CL y las secuencias de ácido nucleico se representan en las siguientes tablas:

Tabla 5

	CH	CL
Secuencia de aminoácidos	SEC ID NO: 10	SEC ID NO: 12
Secuencia de ácido nucleico	SEC ID NO: 9	SEC ID NO: 11

15 En una realización, el polipéptido comprende uno o dos dominios de unión que comprenden un par de cadenas VH y VL en donde la cadena VH contiene una CDR1 de la secuencia de SEQ ID NO: 13, una CDR2 de la secuencia de SEQ ID NO: 14, una CDR3 de la secuencia de SEQ ID NO: 15; y la cadena VL contiene una CDR1 de la secuencia de SEQ ID NO: 16, una CDR2 de la secuencia FAS, una CDR3 de la secuencia de SEQ ID NO: 17. Este polipéptido se une específicamente a un primer epítipo en el receptor DR5. En una realización, el polipéptido comprende dos de tales dominios de unión.

20

En una realización, el polipéptido comprende uno o dos dominios de unión que comprenden un par de cadenas VH y VL en donde la cadena VH contiene una CDR1 de la secuencia de SEQ ID NO: 22, una CDR2 de la secuencia de SEQ ID NO: 23, una CDR3 de la secuencia de SEQ ID NO: 24; y la cadena VL contiene una CDR1 de la secuencia de SEQ ID NO: 25, una CDR2 de la secuencia de SEQ ID NO: 26, una CDR3 de la secuencia de SEQ ID NO: 17. Este polipéptido se une específicamente a un primer epítipo en el receptor DR5. En una realización, el polipéptido comprende dos de tales dominios de unión.

25

En una realización, el polipéptido comprende uno o dos dominios de unión que comprenden un par de cadenas VH y VL en donde la cadena VH contiene una CDR1 de la secuencia de SEQ ID NO: 32, una CDR2 de la secuencia de SEQ ID NO: 14, una CDR3 de la secuencia de SEQ ID NO: 24; y la cadena VL contiene una CDR1 de la secuencia de SEQ ID NO: 16, una CDR2 de la secuencia FAS, una CDR3 de la secuencia de SEQ ID NO: 17. Este polipéptido se une específicamente a un primer epítipo en el receptor DR5. En una realización, el polipéptido comprende dos de tales dominios de unión.

30

35

En otra realización, el polipéptido comprende un par de cadenas VH y VL en donde la cadena VH contiene una CDR1 de la secuencia de SEQ ID NO: 18, una CDR2 de la secuencia de SEQ ID NO: 14, una CDR3 de la secuencia de SEQ ID NO: 19; y la cadena VL contiene una CDR1 de la secuencia de SEQ ID NO: 20, una CDR2 de la secuencia RTS, una CDR3 de la secuencia de SEQ ID NO: 21. Este polipéptido se une específicamente a un segundo y diferente epítipo en el receptor DR5. En una realización, el polipéptido comprende dos de tales dominios de unión.

40

En otra realización, el polipéptido comprende un par de cadenas VH y VL en donde la cadena VH contiene una

CDR1 de la secuencia de SEQ ID NO: 27, una CDR2 de la secuencia de SEQ ID NO: 28, una CDR3 de la secuencia de SEQ ID NO: 29; y la cadena VL contiene una CDR1 de la secuencia de SEQ ID NO: 30, una CDR2 de la secuencia de SEQ ID NO: 31, una CDR3 de la secuencia de SEQ ID NO: 21. Este polipéptido se une específicamente a un segundo y diferente epítipo en el receptor DR5. En una realización, el polipéptido comprende dos de tales dominios de unión.

En otra realización, el polipéptido comprende un par de cadenas VH y VL en donde la cadena VH contiene una CDR1 de la secuencia de SEQ ID NO: 33, una CDR2 de la secuencia de SEQ ID NO: 14, una CDR3 de la secuencia de SEQ ID NO: 29; y la cadena VL contiene una CDR1 de la secuencia de SEQ ID NO: 20, una CDR2 de la secuencia RTS, una CDR3 de la secuencia de SEQ ID NO: 21. Este polipéptido se une específicamente a un segundo y diferente epítipo en el receptor DR5. En una realización, el polipéptido comprende dos de tales dominios de unión.

En otra realización, el polipéptido anti-DR5 comprende dos dominios de unión y estos dos dominios de unión son cada uno específicos de un epítipo diferente en el receptor DR5. Estos dominios de unión comprenden un conjunto específico de 3 CDR en la VH y la VL como se describe y proporciona allí y pueden ser idénticos o ligeramente diferentes en las regiones marco.

El polipéptido anti-DR5 puede ser en particular un F(ab')<sub>2</sub>, Fab, Fv, un fragmento variable de cadena sencilla divalente (scFv), un anticuerpo, preferiblemente un anticuerpo monoclonal, fragmento, nanocuerpo, scFv multimérico.

En esta realización, el polipéptido anti-DR5, preferiblemente anticuerpo, es biespecífico o biparatópico y comprende:

- un primer dominio de unión que comprende un par de cadenas VH y VL en donde la cadena VH contiene una CDR1 que comprende o consiste en la secuencia de SEQ ID NO: 13, una CDR2 que comprende o consiste en la secuencia de SEQ ID NO: 14, una CDR3 que comprende o consiste en la secuencia de SEQ ID NO: 15; y la cadena VL contiene una CDR1 que comprende o consiste en la secuencia de SEQ ID NO: 16, una CDR2 que comprende o consiste en la secuencia FAS, una CDR3 que comprende o consiste en la secuencia de SEQ ID NO: 17, y
- un segundo dominio de unión que comprende un par de cadenas VH y VL en donde la cadena VH contiene una CDR1 que comprende o consiste en la secuencia de SEQ ID NO: 18, una CDR2 que comprende o consiste en la secuencia de SEQ ID NO: 14, una CDR3 que comprende o consiste en la secuencia de SEQ ID NO: 19; y la cadena VL contiene una CDR1 que comprende o consiste en la secuencia de SEQ ID NO: 20, una CDR2 que comprende o consiste en la secuencia RTS, una CDR3 que comprende o consiste en la secuencia de SEQ ID NO: 21.

En una realización, el polipéptido anti-DR5, preferiblemente anticuerpo, es biespecífico o biparatópico y comprende:

- un primer dominio de unión que comprende un par de cadenas VH y VL en donde la cadena VH contiene una CDR1 que comprende o consiste en la secuencia de SEQ ID NO: 22, una CDR2 que comprende o consiste en la secuencia de SEQ ID NO: 23, una CDR3 que comprende o consiste en la secuencia de SEQ ID NO: 24; y la cadena VL contiene una CDR1 que comprende o consiste en la secuencia de SEQ ID NO: 25, una CDR2 que comprende o consiste en la secuencia de SEQ ID NO: 26, una CDR3 que comprende o consiste en la secuencia de SEQ ID NO: 17, y
- un segundo dominio de unión que comprende un par de cadenas VH y VL en donde la cadena VH contiene una CDR1 que comprende o consiste en la secuencia de SEQ ID NO: 27, una CDR2 que comprende o consiste en la secuencia de SEQ ID NO: 28, una CDR3 que comprende o consiste en la secuencia de SEQ ID NO: 29; y la cadena VL contiene una CDR1 que comprende o consiste en la secuencia de SEQ ID NO: 30, una CDR2 que comprende o consiste en la secuencia de SEQ ID NO: 31, una CDR3 que comprende o consiste en la secuencia de SEQ ID NO: 21.

En una realización, el polipéptido anti-DR5, preferiblemente anticuerpo, es biespecífico o biparatópico y comprende:

- un primer dominio de unión que comprende un par de cadenas VH y VL en donde la cadena VH contiene una CDR1 que comprende o consiste en la secuencia de SEQ ID NO: 32, una CDR2 que comprende o consiste en la secuencia de SEQ ID NO: 14, una CDR3 que comprende o consiste en la secuencia de SEQ ID NO: 24; y la cadena VL contiene una CDR1 que comprende o consiste en la secuencia de SEQ ID NO: 16, una CDR2 que comprende o consiste en la secuencia FAS, una CDR3 que comprende o consiste en la secuencia de SEQ ID NO: 17, y
- un segundo dominio de unión que comprende un par de cadenas VH y VL en donde la cadena VH contiene una CDR1 que comprende o consiste en la secuencia de SEQ ID NO: 33, una CDR2 que comprende o consiste en la secuencia de SEQ ID NO: 14, una CDR3 que comprende o consiste en la secuencia de SEQ ID NO: 29; y la cadena VL contiene una CDR1 que comprende o consiste en la secuencia de SEQ ID NO: 20,

una CDR2 que comprende o consiste en la secuencia RTS, una CDR3 que comprende o consiste en la secuencia de SEQ ID NO: 21.

5 Este polipéptido o anticuerpo biespecífico o biparatópico anti-DR5 comprende los dos dominios diferentes de la invención y se puede unir específicamente a cualquiera de los dos epítomos diferentes o a los dos epítomos diferentes al mismo tiempo.

En algunas realizaciones, los polipéptidos anti-DR5 preferiblemente anticuerpo de la invención comprenden:

- 10 - uno o más de los pares de secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 2 y 4 (VL y VH de DR5-01) y SEQ ID NO: 6 y 8 (VH y VL de DR5-05),  
 - el par de secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 2 y 4, (VL y VH de DR5-01)  
 - el par de secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 6 y 8, (VL y VH de DR5-05) o  
 15 - ambos pares de secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 2 y 4 (VL y VH de DR5-01) y SEQ ID NO: 6 y 8 (VL y VH de DR5-05);  
 - uno o más de los pares de secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 35 y 37 (VH y VL de HzDR5-01) y SEQ ID NO: 39 y 41 (VH y VL de HzDR5-05),  
 - el par de secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 35 y 37, (VH y VL de HzDR5-01)  
 - el par de secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 39 y 41, (VH y VL de HzDR5-05) o  
 20 - ambos pares de secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 35 y 37 (VH y VL de HzDR5-01) y SEQ ID NO: 39 y 41 (VL y VH de HzDR5-05).

En algunas realizaciones, el polipéptido anti-DR5, preferiblemente el anticuerpo de la invención, comprende:

- 25 - dos de cada una de las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 4, 10, 2 y 12 (p. ej., el anticuerpo DR5-01 completo o intacto)  
 - secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 4, 10, 2 y 12 (Fv de cadena sencilla basado en DR5-01);  
 - dos de cada una de las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 8, 10, 6 y 12 (p. ej., el anticuerpo DR5-05 completo o intacto)  
 30 - secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 8, 10, 6 y 12 (Fv de cadena sencilla basado en DR5-05);  
 - secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 4, 8, 2, 6, 10 y 12 (anticuerpo biespecífico), especialmente el anticuerpo biespecífico comprende SEQ ID NO: 4, 8, 2, 6 (uno de cada) y 10, 12 (dos de cada);  
 - secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 2 y 12 (cadena ligera);  
 - secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 6 y 12 (cadena ligera);  
 35 - secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 4 y 10 (cadena pesada);  
 - secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 8 y 10 (cadena pesada).  
 - dos de cada una de las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 35, 10, 37 y 12 (p. ej., el anticuerpo HzDR5-01 completo o intacto)  
 - secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 35, 10, 37 y 12 (Fv de cadena sencilla basado en HzDR5-01);  
 40 - dos de cada una de las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 39, 10, 41 y 12 (p. ej., el anticuerpo HzDR5-05 completo o intacto)  
 - secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 39, 10, 41 y 12 (Fv de cadena sencilla basado en HzDR5-05);  
 - secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 35, 39, 37, 41, 10 y 12 (anticuerpo biespecífico), especialmente el anticuerpo biespecífico comprende SEQ ID NO: 35, 39, 37, 41 (uno de cada) y 10, 12 (dos de cada);  
 45 - secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 37 y 12 (cadena ligera);  
 - secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 41 y 12 (cadena ligera);  
 - secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 35 y 10 (cadena pesada);  
 - secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 39 y 10 (cadena pesada).

50 Los polipéptidos anti-DR5, preferiblemente anticuerpos, de la invención pueden ser totalmente murinos, es decir comprenden secuencias de aminoácidos que coinciden con la secuencia de aminoácidos del anticuerpo murino original o materno. Los polipéptidos de la invención también pueden ser quiméricos o humanizados, es decir pueden comprender secuencias de aminoácidos derivadas de seres humanos. Específicamente, el polipéptido puede comprender regiones marco y/o regiones constantes de un anticuerpo derivado de ser humano.

55 Otro objeto de la invención es una composición o composición farmacéutica que comprende uno, dos o más polipéptidos de acuerdo con la invención, como se ha descrito anteriormente y se proporciona en la presente memoria, y un vehículo, diluyente o excipiente farmacéuticamente aceptable. Las realizaciones de estas composiciones se definen utilizando las definiciones de CDR de acuerdo con IMGT®. Sin embargo, la invención  
 60 abarca y se relaciona también con las composiciones equivalentes o alternativas en las que la numeración IMGT® se reemplaza por la numeración de Kabat® o el sistema de numeración común, utilizando las secuencias indicadas anteriormente. Por lo tanto, en las siguientes realizaciones de una composición, otras realizaciones son parte de la invención en la que se reemplazan las CDR definidas con la numeración de IMGT®, mediante la numeración de Kabat®, de acuerdo con la tabla de más arriba. Además, en las siguientes realizaciones de una composición, otras



realizaciones son parte de la invención en las que se reemplaza las CDR definidas con numeración IMGT®, por el sistema de numeración común, de acuerdo con la tabla de más arriba.

En una primera realización, la composición comprende un polipéptido, preferiblemente anticuerpo, que tiene uno o dos dominios de unión que comprenden un par de cadenas VH y VL en donde la cadena VH contiene una CDR1 de la secuencia de SEQ ID NO: 13, una CDR2 de la secuencia de SEQ ID NO: 14, una CDR3 de la secuencia de SEQ ID NO: 15; y la cadena VL contiene una CDR1 de la secuencia de SEQ ID NO: 16, una CDR2 de la secuencia de SEQ ID NO: 17. En una segunda realización, la composición comprende un polipéptido, preferiblemente un anticuerpo, que tiene uno o dos dominios de unión que comprenden un par de cadenas VH y VL en donde la cadena VH contiene una CDR1 de la secuencia de SEQ ID NO: 18, una CDR2 de la secuencia de SEQ ID NO: 14, una CDR3 de la secuencia de SEQ ID NO: 19; y la cadena VL contiene una CDR1 de la secuencia de SEQ ID NO: 20, una CDR2 de la secuencia de SEQ ID NO: 21. En una tercera realización, la composición comprende estos dos polipéptidos o anticuerpos en mezcla. Como alternativa, se puede reemplazar aquí la definición de las CDR por aquellas de acuerdo con Kabat® o el Sistema de numeración Común según las Tablas 1 y 2.

En otra realización, la composición comprende un polipéptido biespecífico anti-DR5, preferiblemente anticuerpo, que comprende un primer dominio de unión que comprende un par de cadenas VH y VL en donde la cadena VH contiene una CDR1 de la secuencia de SEQ ID NO: 13, una CDR2 de la secuencia de SEQ ID NO: 14, una CDR3 de la secuencia de SEQ ID NO: 15; y la cadena VL contiene una CDR1 de la secuencia de SEQ ID NO: 16, una CDR2 de la secuencia de SEQ ID NO: 17 y un segundo dominio de unión que comprende un par de cadenas VH y VL en donde la cadena VH contiene una CDR1 de la secuencia de SEQ ID NO: 18, una CDR2 de la secuencia de SEQ ID NO: 14, una CDR3 de la secuencia de SEQ ID NO: 19; y la cadena VL contiene una CDR1 de la secuencia de SEQ ID NO: 20, una CDR2 de la secuencia de SEQ ID NO: 21. Como alternativa, se puede reemplazar aquí la definición de las CDR por aquellas de acuerdo con Kabat® o el Sistema de numeración Común según las Tablas 1 y 2.

En una realización, la composición comprende un polipéptido anti-DR5, preferiblemente anticuerpo, que comprende el par de secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 2 y 4, un polipéptido anti-DR5, preferiblemente anticuerpo, que comprende el par de secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 6 y 8, y un portador, diluyente o excipientes farmacéuticos. En una realización, la composición comprende un polipéptido anti-DR5, preferiblemente anticuerpo, que comprende el par de secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 35 y 37, un polipéptido anti-DR5, preferiblemente anticuerpo, que comprende el par de secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 39 y 41, y un portador, diluyentes o excipiente farmacéuticos.

La presente invención también se refiere a estas composiciones que comprenden al menos dos polipéptidos, preferiblemente anticuerpos, para una administración simultánea, separada o secuencial a un mamífero, incluido el hombre.

Un objeto particular es una composición que comprende un anticuerpo anti-DR5 biespecífico que comprende un par de secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 2 y 4 y un par de secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 6 y 8, o que comprende un par de secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 35 y 37 y un par de secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 39 y 41, y un portador farmacéuticamente aceptable.

Un objeto de la invención es especialmente una composición que comprende al menos uno o dos polipéptidos que se unen específicamente a un receptor DR5, en donde al menos uno o dos polipéptidos comprenden dos dominios de unión a inmunoglobulina que comprenden:

- un primer dominio de unión que comprende un par de cadenas VH y VL en donde la cadena VH contiene una CDR1 de la secuencia de SEQ ID NO: 13, una CDR2 de la secuencia de SEQ ID NO: 14 CDR1, una CDR3 de la secuencia de SEQ ID NO: 15; y la cadena VL contiene una CDR1 de la secuencia de SEQ ID NO: 16, una CDR2 de la secuencia de SEQ ID NO: 17, y
- un segundo dominio de unión que comprende un par de cadenas VH y VL en donde la cadena VH contiene una CDR1 de la secuencia de SEQ ID NO: 18, una CDR2 de la secuencia de SEQ ID NO: 14, una CDR3 de la secuencia de SEQ ID NO: 19; y la cadena VL contiene una CDR1 de la secuencia de SEQ ID NO: 20, una CDR2 de la secuencia de SEQ ID NO: 21, en donde
- el al menos un polipéptido comprende ambos dominios de unión a inmunoglobulina, o los al menos dos polipéptidos comprenden un primer polipéptido que comprende el primer dominio de unión y un segundo polipéptido que comprende el segundo dominio de unión para una administración simultánea, separada o secuencial a un mamífero, incluido el hombre,

y un portador, diluyente o excipiente farmacéuticos. Como alternativa, se puede reemplazar aquí la definición de las CDR por aquellas de acuerdo con Kabat® o el Sistema de numeración Común según las Tablas 1 y 2.

En algunas realizaciones, la composición de la invención comprende un polipéptido anti-DR5, preferiblemente anticuerpo que comprende:

- 5 - dos de cada una de las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 4, 10, 2 y 12 (p. ej., el anticuerpo DR5-01 completo o intacto)
- secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 4, 10, 2 y 12 (Fv de cadena sencilla basado en DR5-01);
- dos de cada una de las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 8, 10, 6 y 12 (p. ej., el anticuerpo DR5-05 completo o intacto)
- secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 8, 10, 6 y 12 (Fv de cadena sencilla basado en DR5-05);
- 10 - secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 4, 8, 2, 6, 10 y 12 (anticuerpo biespecífico), especialmente el anticuerpo biespecífico comprende SEQ ID NO: 4, 8, 2, 6 (uno de cada uno) y 10, 12 (dos de cada);
- secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 2 y 12 (cadena ligera);
- secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 6 y 12 (cadena ligera);
- secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 4 y 10 (cadena pesada);
- 15 - secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 8 y 10 (cadena pesada);
- dos de cada una de las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 35, 10, 37 y 12 (p. ej., el anticuerpo HzDR5-01 completo o intacto)
- secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 35, 10, 37 y 12 (Fv de cadena sencilla basado en HzDR5-01);
- dos de cada una de las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 39, 10, 41 y 12 (p. ej., el anticuerpo HzDR5-05 completo o intacto)
- 20 - secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 39, 10, 41 y 12 (Fv de cadena sencilla basado en HzDR5-05);
- secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 35, 39, 37, 41, 10 y 12 (anticuerpo biespecífico), especialmente el anticuerpo biespecífico comprende SEQ ID NO: 35, 39, 37, 41 (uno de cada) y 10, 12 (dos de cada);
- secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 37 y 12 (cadena ligera);
- 25 - secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 41 y 12 (cadena ligera);
- secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 35 y 10 (cadena pesada);
- secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 39 y 10 (cadena pesada).

30 Estas composiciones pueden comprender al menos un polipéptido o anticuerpo adicional dirigido contra otra diana y/o al menos un fármaco quimioterapéutico (tal como una molécula pequeña), para una administración simultánea, separada o secuencial con el polipéptido o polipéptidos o anticuerpo o anticuerpos de la invención, a un mamífero, incluido el hombre. Como principio activo adicional, se puede citar doxorubicina, gemcitabina, camptotecina, paclitaxel. La composición puede comprender dos polipéptidos, o anticuerpos o fragmentos de los mismos, ambos con la capacidad de unirse a DR5, modificados para comprender una región Fc de IgG humana optimizada variante,

35 preferiblemente la región Fc de IgG1, en donde esta región variante comprende una sustitución de aminoácido para modular PDCC, ADCC y/o CDC. En particular, dos polipéptidos, o anticuerpos o fragmentos de los mismos, tienen la capacidad de unirse a DR5 y conjugarse con componentes citotóxicos celulares (ADC).

40 Las composiciones o composiciones farmacéuticas de acuerdo con la invención están destinadas a emplearse como un medicamento, especialmente para inducir la apoptosis de una célula tumoral. Las composiciones o composiciones farmacéuticas de acuerdo con la invención están destinadas a emplearse como un medicamento, especialmente para tratar el cáncer, preferiblemente un cáncer sólido.

45 Las secuencias de ácido nucleico aisladas descritas y proporcionadas en la presente memoria también son objeto de la invención.

Por lo tanto, la invención también se refiere a una secuencia de nucleótidos aislada que comprende las siguientes secuencias de nucleótidos SEC ID NO: 1, 3, 5 o 7 o combinaciones de secuencias de nucleótidos unidas entre sí; SEC ID NO: 9 y 7, o 9 y 3, SEC ID NO: 11 y 1, o 11 y 5. La invención también se refiere a una secuencia de

50 nucleótidos aislada que comprende las siguientes secuencias de nucleótidos. SEC ID NO: 34, 36, 38 o 40 o combinaciones de secuencias de nucleótidos unidas entre sí; SEC ID NO: 9 y 34, o 9 y 38, SEC ID NO: 11 y 36, o 11 y 40.

La presente descripción también se refiere a un método de prevención y/o tratamiento de una enfermedad en la que

55 inducir la apoptosis de algunas células es beneficioso para el mamífero, en particular para el ser humano en términos de prevención o tratamiento (terapéutico o profiláctico). Esas enfermedades son en particular el cáncer, especialmente una de las enumeradas en las Definiciones más arriba, enfermedades autoinmunitarias, afecciones inflamatorias, infecciones virales y enfermedades virales. Este método comprende la administración a un mamífero, incluido el ser humano, de una cantidad eficaz de una composición como se describe y proporciona en la presente

60 memoria. El método comprende la administración de los dos polipéptidos, preferiblemente anticuerpos dirigidos contra los dos epítopos diferentes de acuerdo con la invención, o del polipéptido biespecífico, preferiblemente anticuerpos dirigidos contra los dos epítopos diferentes de acuerdo con la invención. Las realizaciones de estas composiciones se definen utilizando las definiciones de CDR de acuerdo con IMGT®. Sin embargo, la invención abarca y se refiere también a los métodos equivalentes o alternativos en los que la numeración IMGT® se reemplaza

por la numeración Kabat® o el sistema de numeración común, utilizando las secuencias indicadas anteriormente. Por lo tanto, en las siguientes realizaciones de un método, otras realizaciones son parte de la invención en la que se reemplazan las CDR definidas con la numeración de IMGT®, por la numeración de Kabat®, de acuerdo con la tabla de más arriba. Además, en las siguientes realizaciones de un método, otras realizaciones son parte de la invención en la que se reemplazan las CDR definidas con la numeración de IMGT®, por el Sistema de numeración común, de acuerdo con la tabla de más arriba.

En un primer ejemplo, el método comprende la administración de una composición que comprende un polipéptido, preferiblemente anticuerpo, que tiene uno o dos dominios de unión que comprenden un par de cadenas VH y VL en donde la cadena VH contiene una CDR1 de secuencia de SEQ ID NO: 13, una CDR2 de la secuencia de SEQ ID NO: 14, una CDR3 de la secuencia de SEQ ID NO: 15; y la cadena VL contiene una CDR1 de la secuencia de SEQ ID NO: 16, una CDR2 de la secuencia de SEQ ID NO: 17. En un segundo ejemplo, el método comprende la administración de una composición que comprende un polipéptido, preferiblemente anticuerpo, que tiene uno o dos dominios de unión que comprende un par de cadenas VH y VL en donde la cadena VH contiene una CDR1 de la secuencia de SEQ ID NO: 18, una CDR2 de la secuencia de SEQ ID NO: 14, una CDR3 de la secuencia de SEQ ID NO: 19; y la cadena VL contiene una CDR1 de la secuencia de SEQ ID NO: 20, una CDR2 de la secuencia de SEQ ID NO: 21. En un tercer ejemplo, el método comprende la administración de una composición que comprende estos dos polipéptidos o anticuerpos en mezcla, o de dos composiciones, una que contiene el primer polipéptido o anticuerpo mencionado, y la segunda que comprende el segundo polipéptido o anticuerpo mencionado. Como alternativa, se puede reemplazar aquí la definición de las CDR por aquellas de acuerdo con Kabat® o el Sistema de Numeración común según las Tablas 1 y 2.

En otro ejemplo, el método comprende la administración de una composición que comprende un polipéptido biespecífico, preferiblemente un anticuerpo, que comprende un primer dominio de unión que comprende un par de cadenas VH y VL en donde la cadena VH contiene una CDR1 de secuencia de SEQ ID NO: 13, una CDR2 de la secuencia de SEQ ID NO: 14, una CDR3 de la secuencia de SEQ ID NO: 15; y la cadena VL contiene una CDR1 de la secuencia de SEQ ID NO: 16, una CDR2 de la secuencia de SEQ ID NO: 17 y un segundo dominio de unión que comprende un par de cadenas VH y VL en donde la cadena VH contiene una CDR1 de la secuencia de SEQ ID NO: 18, una CDR2 de la secuencia de SEQ ID NO: 14, una CDR3 de la secuencia de SEQ ID NO: 19; y la cadena VL contiene una CDR1 de la secuencia de SEQ ID NO: 20, una CDR2 de la secuencia de SEQ ID NO: 21. Como alternativa, se puede reemplazar aquí la definición de las CDR por las de Kabat® o el Sistema de numeración Común según las Tablas 1 y 2.

En un ejemplo, el método proporciona la administración de una composición que comprende un polipéptido anti-DR5, preferiblemente anticuerpo, que comprende el par de secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 2 y 4 y un polipéptido anti-DR5, preferiblemente anticuerpo, que comprende el par de secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 6 y 8, y un portador, diluyente o excipiente farmacéuticos. En otro ejemplo, el método proporciona la administración de dos composiciones, una que comprende un polipéptido anti-DR5, preferiblemente un anticuerpo, que comprende el par de secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 2 y 4 y otra que comprende un polipéptido anti-DR5, preferiblemente anticuerpo, que comprende el par de secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 6 y 8. En un ejemplo, el método proporciona la administración de una composición que comprende un polipéptido anti-DR5, preferiblemente anticuerpo, que comprende el par de secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 35 y 37 y un polipéptido anti-DR5, preferiblemente anticuerpo, que comprende el par de secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 39 y 41, y un portador, diluyente o excipiente farmacéuticos. En otro ejemplo, el método proporciona la administración de dos composiciones, una que comprende un polipéptido anti-DR5, preferiblemente un anticuerpo, que comprende el par de secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 35 y 37 y otra que comprende un polipéptido anti-DR5, preferiblemente anticuerpo, que comprende el par de secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 39 y 41.

En otro ejemplo, el método proporciona la administración de una composición que comprende un anticuerpo anti-DR5 biespecífico que comprende un par de secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 2 y 4 y un par de secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 6 y 8, y un portador farmacéuticamente aceptable. En otro ejemplo, el método proporciona la administración de una composición que comprende un anticuerpo anti-DR5 biespecífico que comprende un par de secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 35 y 37 y un par de secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 39 y 41, y un portador farmacéuticamente aceptable.

En otro ejemplo, el método proporciona la administración de una composición que comprende los anticuerpos DR5-01 y DR5-05 como se describe y proporciona en la presente memoria, o anticuerpos similares producidos a través de ingeniería genética como se describe en la presente memoria, basándose en las secuencias de nucleótidos de SEQ ID NO: 9, 3, 11 y 1, o SEQ ID NO: 9, 34, 11 y 36 para DR5-01, y SEQ ID NO: 9, 7, 11 y 5, o SEQ ID NO: 9, 38, 11 y 40 para DR5-05; se puede hacer uso de una composición que comprende estos anticuerpos definidos por sus secuencias de aminoácidos y que comprende SEC ID NO: 4, 10, 2 y 12 para DR5-01 y SEC ID NO: 8, 10, 6 y 12 para DR5-05, o SEC ID NO: 35, 10, 37 y 12 para HzDR5-01 y SEC ID NO: 39, 10, 41 y 12 para HzDR5-05.

Las composiciones farmacéuticas, los usos y los métodos de tratamiento están destinados a la prevención y/o tratamiento del cáncer. Una lista de los cánceres que pueden beneficiarse de la invención se proporciona más arriba en las Definiciones.

- 5 Las composiciones farmacéuticas, los usos y los métodos de tratamiento también están destinados a la prevención y/o tratamiento de enfermedades autoinmunitarias y afecciones inflamatorias. Las siguientes enfermedades están especialmente afectadas.

- 10 Las composiciones farmacéuticas, los usos y los métodos de tratamiento también están destinados a la prevención y/o tratamiento de infecciones virales o enfermedades virales. Las infecciones y enfermedades virales incluyen, entre otras, infecciones con citomegalovirus, influenza, virus de la enfermedad de Newcastle, virus de la estomatitis vesicular, virus del herpes simple, hepatitis, adenovirus-2, virus de la diarrea viral bovina, virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) y Virus de Epstein Barr.

- 15 En una realización concreta, los polipéptidos, anticuerpos o anticuerpos biespecíficos de esta invención también se pueden emplear para marcar específicamente células cancerosas, tumores sólidos y similares, y más generalmente, para dirigir/administrar específicamente cualquier efector conjugado o acoplado de otra manera (p. ej., radioisótopo, marca, citotoxina, fármaco, liposoma, anticuerpo, ácido nucleico, dendrímero, etc.) a células cancerosas que incluyen, pero no están limitadas a, células cancerosas aisladas, células metastásicas, células de tumores sólidos y similares.

- 20 Por lo tanto, otro objeto de la invención es un complejo de un polipéptido de acuerdo con la invención y una molécula, que es una molécula efectora, cuya función puede beneficiarse de la orientación del receptor DR5 por el polipéptido. Tal molécula efectora puede ser un radioisótopo, una etiqueta, una citotoxina, un fármaco, un liposoma, un anticuerpo, un ácido nucleico, un dendrímero. La invención también se refiere a una composición farmacéutica que contiene este complejo y un portador, diluyente o excipiente farmacéuticamente aceptables.

- 25 La descripción también se refiere al uso de tal composición, y también a un método para prevenir o tratar un cáncer, tal como uno de los citados anteriormente en las Definiciones.

- 30 Un polipéptido o los polipéptidos de esta invención se pueden emplear para identificar otros polipéptidos o anticuerpos que se unen a uno de los epítopos contra los que se dirigen el DR5-01 y el DR5-05. Por lo tanto, en ciertas realizaciones, un polipéptido o anticuerpo de esta invención, dirigido contra un epítipo, se puede emplear o emparejar con otro anticuerpo con especificidad de unión para el otro epítipo de DR5.

- 35 Un polipéptido o los polipéptidos de esta invención se pueden emplear para identificar otros polipéptidos o anticuerpos que se unen a otro epítipo en DR5, que al unirse a polipéptidos o anticuerpos en estos diversos epítopos en DR5, inducen apoptosis. DR5-01 y/o DR5-05 están dirigidos. Así, en ciertas realizaciones, se pueden utilizar un polipéptido o anticuerpo de esta invención, dirigido contra un epítipo (DR5-01 o DR5-05), o polipéptidos o anticuerpos de esta invención, dirigidos contra ambos epítopos (DR5-01 y DR5-05) con otro anticuerpo con especificidad de unión para otro epítipo en DR5.

- 40 Uno o más polipéptidos, anticuerpos, anticuerpos biespecíficos y/o anticuerpos biespecíficos funcionalizados, y/o radicales quiméricos de esta invención, o composiciones farmacéuticas que contienen los mismos, se pueden administrar mediante inyección, es decir, por vía intravenosa, intramuscular, intracutánea, subcutánea, Intraduodenal o intraperitoneal. También en ciertos ejemplos, los compuestos se pueden administrar mediante inhalación, p. ej., por vía intranasal. También se pueden emplear otros sistemas de administración farmacéutica, p. ej., liposomas.

- 45 La elección como diana de DR5 con los polipéptidos o anticuerpos de la presente invención combinada con los tratamientos quimioterapéuticos existentes será más eficaz para destruir las células tumorales que la quimioterapia sola. Se ha empleado una amplia variedad de fármacos en la quimioterapia del cáncer. Los ejemplos incluyen, pero no se limitan a, cisplatino, taxol, etopósido, mitoxantrona, actinomicina D, campototecina, metotrexato, gemcitabina, mitomicina, dacarbazina, 5-fluorouracilo, doxorubicina y daunomicina.

- 50 En un enfoque, la combinación de anticuerpos o anticuerpos biespecíficos anti-MAb DR5 se agrega a un régimen de quimioterapia convencional, en el tratamiento de un paciente con cáncer. Para aquellas combinaciones en las que el anticuerpo y el agente o los agentes contra el cáncer ejercen un efecto sinérgico contra las células cancerosas, la dosis del agente o de los agentes adicionales puede reducirse, en comparación con la dosis convencional del segundo agente cuando se administra solo. El anticuerpo puede administrarse junto con una cantidad de un fármaco anticanceroso que sea eficaz para mejorar la sensibilidad de las células cancerosas a la combinación de anticuerpos o al anticuerpo biespecífico.

- 55 En un ejemplo, el DR5 dirigido con una combinación de anticuerpos o un anticuerpo biespecífico se administra al paciente antes de la administración de un segundo agente contra el cáncer. Un método alternativo comprende

administrar el segundo agente contra el cáncer antes de administrar la combinación de anticuerpos o el anticuerpo biespecífico y el segundo agente en un programa alternativo. En otra realización, la combinación de anticuerpos o el anticuerpo biespecífico y el segundo agente se administran simultáneamente.

El método del ejemplo puede proporcionar la inclusión en un régimen terapéutico que implique el uso de al menos otro método de tratamiento, tal como la irradiación, la quimioterapia con una molécula pequeña o un anticuerpo. El método del ejemplo puede incluir directamente la administración de una cantidad suficiente de al menos un polipéptido o anticuerpo adicional dirigido contra otra diana y/o al menos un fármaco quimioterapéutico (tal como una molécula pequeña), para una administración simultánea, separada o secuencial con uno o varios polipéptidos o anticuerpos de la invención, a un mamífero, incluido el hombre. Como principio activo adicional, se pueden citar doxorubicina, gemcitabina, camptotecina, paclitaxel o los otros medicamentos mencionados anteriormente. En un ejemplo, el cáncer de pulmón y el cáncer de mama se tratan con esta combinación. Esta combinación es más generalmente útil para los cánceres (en particular los cánceres agresivos) que no responden bien al tratamiento con el fármaco solo o los anticuerpos/anticuerpo de la invención solos, y para los cuales la combinación conduce a un efecto sinérgico.

En un ejemplo, se puede emplear la elección como diana de DR5 con una combinación de anticuerpos o un anticuerpo biespecífico o un fragmento de anticuerpo multivalente, en el tratamiento de infecciones virales y afecciones asociadas derivadas de infecciones virales. Las infecciones virales incluyen, entre otras, infecciones por citomegalovirus, influenza, virus de la enfermedad de Newcastle, virus de la estomatitis vesicular, virus del herpes simple, hepatitis, adenovirus-2, virus de la diarrea viral bovina, virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) y virus de Epstein-Barr.

Las células de mamífero son los anfitriones preferidos para la producción de glucoproteínas terapéuticas, debido a su capacidad para glicosilar proteínas en la forma más compatible para aplicaciones humanas. Las bacterias muy raramente glicosilan proteínas, y al igual que otro tipo de anfitriones comunes, tales como levaduras, hongos filamentosos, insectos y células vegetales, producen patrones de glicosilación asociados con el rápido aclaramiento del torrente sanguíneo.

Entre las células de mamíferos, las células de Ovario de Hámster Chino (CHO) son las más utilizadas. Además de proporcionar patrones de glicosilación adecuados, estas células permiten la generación constante de líneas celulares clonales genéticamente estables y altamente productivas. Se pueden cultivar a altas densidades en biorreactores simples que utilizan medios sin suero, y permiten el desarrollo de bioprocesos seguros y reproducibles. Otras células animales comúnmente utilizadas incluyen células de riñón de cría hámster (BHK), células de mieloma de ratón NSO y SP2/0.

En una realización, los polipéptidos y anticuerpos de acuerdo con la invención se producen o expresan en células de mamífero, preferiblemente células de mamífero de tipo salvaje, preferiblemente de origen roedor, especialmente células CHO.

Se pueden realizar modificaciones y cambios en la estructura de un polipéptido de la presente invención y todavía obtener una molécula que tiene características similares. Por ejemplo, ciertos aminoácidos pueden ser sustituidos por otros aminoácidos en una secuencia sin una pérdida apreciable de actividad. Debido a que es la capacidad interactiva y la naturaleza de un polipéptido lo que define la actividad funcional biológica del polipéptido, se pueden realizar ciertas sustituciones en las secuencias de aminoácidos en una secuencia de polipéptidos (o, por supuesto, su secuencia codificante de ADN subyacente) y, sin embargo, obtener un polipéptido con propiedades similares.

Al realizar tales cambios, se puede considerar el índice hidropático de los aminoácidos. La importancia del índice hidropático de los aminoácidos para conferir una función biológica interactiva a un polipéptido se entiende en general en la técnica. Se sabe que ciertos aminoácidos pueden ser sustituidos por otros aminoácidos que tienen una puntuación o índice hidropático similar y aún dan como resultado un polipéptido con actividad biológica similar. A cada aminoácido se le ha asignado un índice hidropático sobre la base de sus características de carácter hidrófobo y carga.

Se cree que el carácter hidropático relativo del aminoácido determina la estructura secundaria del polipéptido resultante, que a su vez define la interacción del polipéptido con otras moléculas, p. ej., enzimas, sustratos, receptores, anticuerpos, antígenos y similares. Se sabe en la técnica que un aminoácido se puede sustituir por otro aminoácido que tenga un índice hidropático similar y todavía se puede obtener un polipéptido funcionalmente equivalente biológicamente. En tales cambios, se prefiere la sustitución de aminoácidos cuyos índices hidropáticos están dentro de  $\pm 2$ , los que están dentro de  $\pm 1$  son particularmente preferidos, y aquellos dentro de  $\pm 0,5$  son incluso más concretamente preferidos.

La sustitución de aminoácidos similares también se puede realizar sobre la base del carácter hidrófilo, particularmente cuando el péptido o polipéptido funcionalmente equivalente biológicamente creado de este modo se

destina al uso en realizaciones inmunológicas. La Patente de Estados Unidos Núm. 4.554.101, a la que se puede remitir el experto en la técnica, afirma que el mayor carácter hidrófilo promedio local de un polipéptido, según se rige por el carácter hidrófilo de sus aminoácidos adyacentes, se correlaciona con su inmunogenicidad y antigenicidad, es decir con una propiedad biológica del polipéptido.

Como se detalla en la Patente de Estados Unidos Núm. 4.554.101, se han asignado los siguientes valores de carácter hidrófilo a los residuos de aminoácidos: arginina (+3,0); lisina (+3,0); aspartato (+3,0  $\pm$  1); glutamato (+3,0  $\pm$  1); serina (+0,3); asparragina (+0,2); glutamina (+0,2); glicina (0); prolina (-0,5  $\pm$  1); treonina (-0,4); alanina (-0,5); histidina (-0,5); cisteína (-1,0); metionina (-1,3); valina (-1,5); leucina (-1,8); isoleucina (-1,8); tirosina (-2,3); fenilalanina (-2,5); triptófano (-3,4). Se entiende que un aminoácido se puede sustituir por otro que tenga un valor de carácter hidrófilo similar y aún así obtener un polipéptido biológicamente equivalente y, en particular, uno inmunológicamente equivalente. En tales cambios, se prefiere la sustitución de aminoácidos cuyos valores de carácter hidrófilo están dentro de  $\pm$  2, se prefieren particularmente aquellos que están dentro de  $\pm$  1, y se prefieren aún más concretamente aquellos dentro de  $\pm$  0,5.

Como se describió anteriormente, las sustituciones de aminoácidos se basan generalmente en la similitud relativa de los sustituyentes de la cadena lateral del aminoácido, p. ej., su carácter hidrófobo, carácter hidrófilo, carga, tamaño y similares.

Tabla 5

Aminoácido	Índice	Aminoácido	Índice
isoleucina L	(+4,5)	triptófano W	(-0,9)
valina V	(+4,2)	tirosina Y	(-1,3)
leucina L	(+3,8)	prolina P	(-1,6)
fenilalanina	(+2,8)	histidina H	(-3,2)
cisteína C	(+2,5)	glutamato E	(-3,5)
metionina M	(+1,9)	glutamina Q	(-3,5)
alanina A	(+1,8)	aspartato D	(-3,5)
glicina G	(-0,4)	asparragina N	(-3,5)
treonina T	(-0,7)	lisina K	(-3,9)
serina S	(-0,8)	arginina R	(-4,5)

La sustitución de aminoácidos se puede elegir o seleccionar de manera diferente. Se han documentado posibles sustituciones en los documentos WO99/51642, WO2007024249 y WO2007106707.

Por definición, las CDR de la invención incluyen CDR variantes, por eliminación, sustitución o adición de uno o más aminoácidos, cuya variante mantiene la especificidad de la CDR original. El sistema de numeración común proporciona una definición de CDR que tiene las secuencias de aminoácidos más cortas o la definición mínima de CDR.

El anticuerpo puede ser un anticuerpo monoclonal, un anticuerpo quimérico, un anticuerpo humanizado, un anticuerpo humano completo, un anticuerpo biespecífico, un producto conjugado de fármaco de anticuerpo o un fragmento de anticuerpo. Un "anticuerpo humanizado" o "anticuerpo humanizado quimérico" significarán un anticuerpo derivado de un anticuerpo no humano, típicamente un anticuerpo murino, que conserva o conserva sustancialmente las propiedades de unión al antígeno del anticuerpo parental, pero que es menos inmunogénico en seres humanos.

Los métodos para producir los polipéptidos y anticuerpos son conocidos por los expertos en la técnica. Las células de mamífero, preferiblemente células de roedor tales como células CHO, preferiblemente células de tipo salvaje se transfectan con uno o varios vectores de expresión. Preferiblemente, las células se co-transfectan con un vector de expresión para la cadena ligera y con un vector de expresión para la cadena pesada.

La transfección celular también es conocida por los expertos en la técnica. Como transfección que se puede realizar, se pueden mencionar, sin limitación, los procedimientos de transfección convencionales, bien conocidos por los expertos en la técnica, tales como la precipitación con fosfato de calcio, la transfección mediada por DEAE-Dextrano, la electroporación, la magnetofección, la nucleofección (AMAXA GmbH, GE), la transfección mediada por liposomas (utilizando tecnología dreamfect®, lipofectin® o lipofectamine®, por ejemplo) o microinyección.

Los vectores de expresión son conocidos. Como vectores que se pueden emplear, se pueden mencionar sin limitación: pcDNA3.3, pOptiVEC, pFUSE, pMCMVHE, pMONO, pSPORT1, pcDV1, pcDNA3, pcDNA1, pRc/CMV, pSEC. Se puede emplear un solo vector de expresión o varios vectores de expresión que expresan diferentes partes del polipéptido o anticuerpo.

5 Un vector de expresión para CH1, la región bisagra, CH2 y CH3 comprende SEC ID NO: 9 o comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 10.

10 Un vector de expresión contiene una secuencia de ácido nucleico que codifica una región variable VH de la invención. En una realización, el vector comprende SEC ID NO: 3 o comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica las secuencias de aminoácidos de SEC ID NO: 4. En otra realización, comprende SEC ID NO: 7 o comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 8. En una realización, el vector comprende SEC ID NO: 34 o comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica las secuencias de aminoácidos de SEC ID NO: 35. En otra realización, comprende SEC ID NO: 38 o comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 39.

20 Un conjunto de vectores de expresión que codifican una cadena pesada, comprende un vector de expresión que comprende SEC ID NO: 9 (o comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 10) y SEC ID NO: 3 (o una secuencia de ácido nucleico que codifica las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 4) o SEC ID NO: 7 (o una secuencia de ácido nucleico que codifica las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 8). Un conjunto de vectores de expresión que codifican una cadena pesada, comprende un vector de expresión que comprende SEC ID NO: 9 (o comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 10) y SEC ID NO: 34 (o una secuencia de ácido nucleico que codifica las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 35) o SEC ID NO: 38 (o una secuencia de ácido nucleico que codifica las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 39).

30 Un solo vector de expresión para la cadena pesada contiene una secuencia de ácido nucleico que codifica VH, CH1, la región bisagra, CH2, CH3. En una realización, el vector comprende SEC ID NO: 3 y 9 o comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica las secuencias de aminoácidos de SEC ID NO: 4 y 10. En otra realización, comprende SEC ID NO: 7 y 9 o comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 8 y 10. En una realización, el vector comprende SEC ID NO: 34 y 9 o comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 35 y 10. En otra realización, comprende SEC ID NO: 38 y 9 o comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica las secuencias de aminoácidos de SEC ID NO: 39 y 10.

35 Un vector de expresión para la cadena constante ligera comprende SEC ID NO: 11 o comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 12.

40 Un vector de expresión contiene una secuencia de ácido nucleico que codifica una región variable VL de la invención. En una realización, el vector comprende la SEQ ID NO: 1 o una secuencia de ácido nucleico que codifica las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 2. En otra realización, comprende la SEQ ID NO: 5 o una secuencia de ácido nucleico que codifica las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 6. En una realización, el vector comprende SEC ID NO: 36 o una secuencia de ácido nucleico que codifica la secuencia de aminoácidos SEC ID NO: 37. En otra realización, comprende SEC ID NO: 40 o una secuencia de ácido nucleico que codifica la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 41.

50 Un vector de expresión contiene una secuencia de ácido nucleico que codifica una cadena ligera de la invención. En una realización, el vector comprende SEQ ID NO: 1 y 11 o una secuencia de ácido nucleico que codifica las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 2 y 12. En otra realización, comprende SEQ ID NO: 5 y 11 o una secuencia de ácido nucleico que codifica las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 6 y 12. En una realización, el vector comprende SEQ ID NO: 36 y 11 o una secuencia de ácido nucleico que codifica las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 37 y 12. En otra realización, comprende SEQ ID NO: 40 y 11 o una secuencia de ácido nucleico que codifica las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 41 y 12.

55 Un conjunto de vectores de expresión para producir un anticuerpo completo comprende varios vectores, por ejemplo dos o tres.

60 También se puede emplear un solo vector de expresión, que comprende SEC ID NO: 3, 9, 1 y 11 (o una secuencia de ácido nucleico que codifica las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 4, 10, 2 y 12), o SEC ID NO: 7, 9, 5 y 11 (o una secuencia de ácido nucleico que codifica las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 8, 10, 6 y 12). También se puede emplear un solo vector de expresión, que comprende SEC ID NO: 34, 9, 36 y 11 (o una secuencia de ácido nucleico que codifica las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 35, 10, 37 y 12), o SEC ID NO: 38, 9, 40 y 11 (o una secuencia de ácido nucleico que codifica las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 39, 10, 41 y 12).

El vector de expresión comprende una secuencia de ácido nucleico o secuencias de ácido nucleico que codifican la región variable que se desea. A continuación se presentan varias realizaciones de regiones variables que pueden ser expresadas por el vector. Las realizaciones de estos vectores se definen utilizando las definiciones de CDR de acuerdo con IMGT®. Sin embargo, la invención abarca y se relaciona también con los vectores equivalentes o alternativos en los que la numeración de IMGT® se reemplaza por la numeración de Kabat® o el Sistema de numeración común, utilizando las secuencias indicadas anteriormente. Por lo tanto, en las siguientes realizaciones de un vector, otras realizaciones son parte de la invención en la que se reemplazan las CDR definidas con numeración de IMGT®, por la numeración de Kabat®, de acuerdo con la tabla de más arriba. Además, en las siguientes realizaciones de un vector, otras realizaciones son parte de la invención en la que se reemplazan las CDR definidas con numeración de IMGT®, por el Sistema de numeración común, de acuerdo con la tabla de más arriba.

Un vector de expresión codifica una VH que comprende una CDR1 de la secuencia de SEQ ID NO: 13, una CDR2 de la secuencia de SEQ ID NO: 14, una CDR3 de la secuencia de SEQ ID NO: 15.

Un vector de expresión codifica una VL que comprende una CDR1 de la secuencia de SEQ ID NO: 16, una CDR2 de la secuencia FAS, una CDR3 de la secuencia de SEQ ID NO: 17.

Un conjunto de vectores de expresión comprende un vector de expresión que codifica una VH que comprende una CDR1 de la secuencia de SEQ ID NO: 13, una CDR2 de la secuencia de SEQ ID NO: 14 CDR1, una CDR3 de la secuencia de SEQ ID NO: 15 y un vector de expresión que codifica una VL que comprende una CDR1 de la secuencia de SEQ ID NO: 16, una CDR2 de la secuencia FAS, una CDR3 de la secuencia de SEQ ID NO: 17.

Un vector de expresión comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica una VH que comprende una CDR1 de la secuencia de SEQ ID NO: 13, una CDR2 de la secuencia de SEQ ID NO: 14, una CDR3 de la secuencia de SEQ ID NO: 15 y una secuencia de ácido nucleico que codifica una VL que comprende una CDR1 de la secuencia de SEQ ID NO: 16, una CDR2 de la secuencia FAS, una CDR3 de la secuencia de SEQ ID NO: 17.

Un vector de expresión codifica una VH que comprende una CDR1 de la secuencia de SEQ ID NO: 18, una CDR2 de la secuencia de SEQ ID NO: 14, una CDR3 de la secuencia de SEQ ID NO: 19.

Un vector de expresión codifica una VL que comprende una CDR1 de la secuencia de SEQ ID NO: 20, una CDR2 de la secuencia RTS, una CDR3 de la secuencia de SEQ ID NO: 21.

Un conjunto de vectores de expresión comprende un vector de expresión que codifica una VH que comprende una CDR1 de la secuencia de SEQ ID NO: 18, una CDR2 de la secuencia de SEQ ID NO: 14, una CDR3 de la secuencia de SEQ ID NO: 19 y un vector de expresión que codifica una VL que comprende una CDR1 de la secuencia de SEQ ID NO: 20, una CDR2 de la secuencia RTS, una CDR3 de la secuencia de SEQ ID NO: 21.

Un vector de expresión comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica una VH que comprende una CDR1 de la secuencia de SEQ ID NO: 18, una CDR2 de la secuencia de SEQ ID NO: 14, una CDR3 de la secuencia de SEQ ID NO: 19 y una secuencia de ácido nucleico que codifica una VL que comprende una CDR1 de la secuencia de SEQ ID NO: 20, una CDR2 de la secuencia RTS, una CDR3 de la secuencia de SEQ ID NO: 21.

La invención comprende así el uso de un solo vector o un conjunto de vectores para producir los polipéptidos o anticuerpos de la invención. Estos vectores también son objetos de la invención, solos o como un conjunto de vectores.

Otro objeto de la invención es una célula anfitriona que contiene un vector o un conjunto de vectores de la invención. La célula anfitriona puede ser una célula de mamífero, preferiblemente una célula de roedor, más preferiblemente una célula CHO. Aún más preferiblemente, la célula anfitriona puede ser una célula de mamífero de tipo salvaje, preferiblemente una célula de roedor de tipo salvaje, lo más preferiblemente una célula CHO de tipo salvaje.

El experto en la técnica posee completamente los métodos para generar los anticuerpos de acuerdo con la invención utilizando un vector o varios vectores y células tales como células CHO.

#### Breve descripción de los dibujos

La presente invención se describirá ahora con más detalle mediante Ejemplos que se refieren a la figura. Obsérvese que en los diagramas de bloques, los bloques aparecen de izquierda a derecha en el mismo orden que se indica en la leyenda en los diagramas donde la leyenda se coloca en un cuadro.

La FIG. 1 muestra el análisis FACS del panel de anticuerpos anti-DR5 en líneas celulares de glioma humano (H4, HS683, A172, T98G, U87MG).

La FIG. 2 muestra el análisis FACS de la expresión de anti-DR5 en algunas líneas celulares de cáncer como el adenocarcinoma de riñón humano (A704, ACHN, Caki1), el carcinoma de colon humano (SW948, HCT 116), el



carcinoma de vejiga urinaria humana (5637) y el adenocarcinoma de mama humano (MCF7).

La FIG. 3 es un gráfico que muestra los resultados de un ensayo ELISA que evalúa la unión de los MAb (1 µg/mL) contra Fas (50 ng/mL), FasL (100 ng/mL), TRAIL (100 ng/mL) y contra DR4, DR5, DcR1 o DcR2 (50 ng/mL), (media +/- DT, n = 2).

La FIG. 4 es un diagrama de barras que muestra el porcentaje (%) de la inhibición de unión de MAb anti-DR5 biotinilado (1 µg/mL, análisis FACS) en presencia de otro anticuerpo anti-DR5 no conjugado (5 µg/mL) utilizando las células T98G ( $1 \cdot 10^6$  células/mL), (media +/- DT, n = 2).

La FIG. 5 es un diagrama de barras que muestra el porcentaje (%) de la inhibición de la unión de TRAIL (100 ng/mL, análisis FACS) en presencia de anticuerpo (MAb anti-TRAIL, MAb anti-MAb DR5) sometida a ensayo a diferentes concentraciones utilizando células H4 ( $5 \cdot 10^5$  células/mL), (media +/- DT, n = 2).

La FIG. 6 es un diagrama de barras que muestra el porcentaje (%) de la inhibición de la proliferación celular (bioensayo bioluminiscente ATP, 72 horas) del anticuerpo anti-DR5 solo o combinado probado a 1 µg/mL en comparación con TRAIL (10 ng/mL) utilizando células H4 ( $5 \cdot 10^4$  células/mL), (media +/- DT, n = 2).

La FIG. 7 es un diagrama de barras que muestra el porcentaje (%) de la inhibición de la proliferación celular (bioensayo BrDU, 72 horas) de la combinación selectiva de anticuerpos agonísticos anti-DR5 (mDR5-01 + mDR5-05) versus combinación de anticuerpos neutros (mDR5-05 + mDR5-04) sometida a ensayo en diferentes concentraciones utilizando células H4 ( $5 \cdot 10^4$  células/mL), (media +/- DT, n = 2).

La FIG. 8 es un diagrama de barras que muestra el porcentaje (%) de apoptosis (tinción con yoduro de propidio, 72 horas) de la combinación selectiva de anticuerpos agonísticos anti-DR5 (mDR5-01 + mDR5-05) frente a la combinación de anticuerpos neutros (mDR5-05 + mDR5-04) sometida a ensayo a 1 µg/mL y también comparada con TRAIL (10 ng/mL) utilizando células H4 ( $1 \cdot 10^5$  células/mL), (media +/- DT, n = 2).

La FIG. 9 es un diagrama de barras que muestra el porcentaje (%) de caspasa 3 escindida (análisis FACS, 48 horas) de la combinación selectiva de anticuerpos agonísticos anti-DR5 (mDR5-01 + mDR5-05) frente a la combinación de anticuerpos neutros (mDR5-05 + mDR5-04) y también en comparación con TRAIL utilizando células H4 ( $1 \cdot 10^5$  células/mL), (experimento representativo, n = 2).

La FIG. 10 es una transferencia Western que muestra la PARP escindida inducida o no con la presencia de una combinación selectiva de anticuerpos agonísticos anti-DR5 (mDR5-01 + mDR5-05) frente a una combinación de anticuerpos neutros (mDR5-05 + mDR5-04) utilizando células H4 ( $2 \cdot 10^5$  células/mL, 5 horas).

La FIG. 11 es un diagrama de barras que muestra el porcentaje (%) de la inhibición de la proliferación celular (bioensayo bioluminiscente ATP, 72 horas) con la combinación selectiva de anticuerpos agonísticos anti-DR5 (10 µg/mL mDR5-05 + 0,1 µg/mL mDR5-01), en presencia o no de MAb anti-DR5 (mDR5-01, mDR5-02, mDR5-04 o mDR5-05, 1 µg/mL) utilizando células H4 ( $5 \cdot 10^4$  células/mL), (media +/- DT, n = 2).

La FIG. 12 es un diagrama de barras que muestra el porcentaje (%) de la inhibición de la proliferación celular (bioensayo bioluminiscente ATP, 72 horas) de la combinación selectiva de anticuerpos agonísticos anti-DR5 (10 µg/mL mDR5-05 + 0,1 µg/mL mDR5-01) y a continuación diluidos a 1/2 en comparación con TRAIL (20 ng/mL) y a continuación diluidos a 1/2 utilizando células de glioma H4, HS683, A172, T98G o U87MG ( $5 \cdot 10^4$  células/mL), (media +/- DT, n = 2).

La FIG. 13 es un diagrama de barras que muestra el porcentaje (%) de la inhibición de la proliferación (bioensayo bioluminiscente con ATP, 72 horas) del anticuerpo quimérico (chDR5-01 o chDR5-05 MAb) sometido a ensayo solo a 5 µg/mL y a continuación diluido a 1/2 frente a la combinación de anticuerpo (5 µg/mL chDR5-05 + 0,05 µg/mL chDR5-01) a continuación diluidos a 1/2 utilizando células de glioma H4 ( $5 \cdot 10^4$  células/mL), (media +/- DT, n = 2).

La FIG. 14 es un diagrama de barras que muestra el porcentaje (%) de la inhibición de la proliferación celular (bioensayo bioluminiscente ATP, 72 horas) del anticuerpo anti-DR5 solo o combinado sometido a ensayo a 10 µg/mL (razón 1/10) en comparación con TRAIL (50 ng/mL) utilizando células de glioma humano *ex vivo* ( $5 \cdot 10^4$  células/mL), (media +/- DT, n = 3 de tres células GBM *ex vivo* independientes).

Las FIG. 15-18 es un diagrama de barras que muestra el porcentaje (%) de la inhibición de la proliferación celular (bioensayo bioluminiscente ATP, 72 horas) en presencia de anticuerpo anti-DR5 de ratón combinado sometido a ensayo a 10 µg/mL diluido a 1/10, en presencia de un fármaco solo (1 µg/mL diluido a 1/10) o combinado con anticuerpo anti-DR5 de ratón asociado y fármaco utilizando células de glioma HS683, A172, 42MGBA o T98G, ( $5 \cdot 10^4$  células/mL), (media +/- DT, n = 2).

Las FIG. 19-22 es un diagrama de barras que muestra el porcentaje (%) de la inhibición de la proliferación celular (bioensayo bioluminiscente ATP, 72 horas) en presencia de anticuerpo anti-DR5 de ratón combinado sometido a ensayo a 10 µg/mL diluido a 1/10, en presencia de un fármaco solo (1 µg/mL diluido a 1/10) o combinado con el anticuerpo anti-DR5 de ratón asociado y el fármaco utilizando líneas celulares de mama humanas (MCF7, MDAMB231) o líneas celulares de adenocarcinoma de pulmón humano (NCIH1703, A549), ( $5 \cdot 10^4$  células/mL), (media +/- DT, n = 2).

La FIG. 23 es un diagrama de barras que muestra el porcentaje (%) de la inhibición de la proliferación celular (bioensayo bioluminiscente ATP, 72 horas) del anticuerpo anti-DR5 de ratón solo o combinado en comparación con el anticuerpo anti-DR5 humanizado solo o combinado sometido a ensayo a 1 µg/mL (razón 1/1 combinado) a continuación diluido a 1/2 utilizando células de glioma H4 ( $5 \cdot 10^4$  células/mL), (media +/- DT, n = 2).

La FIG. 24 es una curva de supervivencia de ratones atímicos ortotópicos a los que se ha injertado glioma humano SC2 tratado con o sin anticuerpo anti-DR5 de ratón combinado. El tratamiento con MAb se administró mediante inyección intraperitoneal (IP) a 5 mg/kg por ratón hasta la eutanasia de los ratones debido a la pérdida de peso y se aplicó durante un máximo de 36 días. Los tiempos de supervivencia obtenidos con el grupo de control se

compararon con los tiempos de supervivencia obtenidos con los grupos tratados (mDR5-01 + mDR5-05 frente a mDR5-04 + mDR5-05) utilizando el método de Kaplan Meier y la prueba estadística de Wilcoxon (soporte lógico JMP).

FIG. 25 Secuencia de aminoácidos y ácidos nucleicos para VH HzDR5-01 con descripción de FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3 que se definen según IMGT®.

FIG. 26 Secuencia de aminoácidos y ácidos nucleicos para VL HzDR5-01 con descripción de FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3 que se definen según IMGT®.

FIG. 27 Secuencia de aminoácidos y ácidos nucleicos para VH HzDR5-05 con descripción de FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3 que se define según IMGT®.

La FIG. 28 Secuencia de aminoácidos y ácidos nucleicos para VL HzDR5-05 con descripción de FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3 que se definen según IMGT®.

## Ejemplos

Los siguientes Ejemplos se ofrecen para ilustrar, pero no para limitar la invención reivindicada.

### Ejemplo 1: Preparación de MAb murino anti-DR5

Este Ejemplo ilustra la preparación de líneas celulares de hibridoma que secretan anticuerpos anti-DR5.

**Anticuerpos** Los anticuerpos anti-DR5, anticuerpos monoclonales murinos específicos para DR5 se produjeron utilizando técnicas de hibridoma convencionales (Zola et al., Aust J. Exp. Biol Med Sci. 1981; 59:303-6). En pocas palabras, los ratones recibieron inyecciones i.p. de DR5 recombinante (10 µg), (R&D Systems, Lille, Francia) en las semanas 0, 2 y 4. A esto le siguió una inyección i.v. de DR5 recombinante (10 µg) y los esplenocitos se fusionaron con la línea de mieloma de ratón X63-Ag8.653. Los sobrenadantes de hibridoma se escrutaron para determinar la unión a DR5 mediante ELISA y mediante citometría de flujo en líneas celulares positivas para DR5. Un panel de MAb murino anti-DR5 anotó mDR5-01, mDR5-02, mDR5-04 y mDR5-05.

### Ejemplo 2: cultivo celular

Varias líneas celulares derivadas de tumores se encuentran entre las células diana que pueden ponerse en contacto con TRAIL, MAb anti-DR5 solo, combinación de MAb, en dichos procedimientos de ensayo.

Líneas celulares. Las células de neuroglioma humano establecidas H4, HS683 o A172 (disponibles de ATCC) y las células de adenocarcinoma de pulmón humano establecidas A549 se cultivaron en medio de Eagle modificado por Dulbecco (Sigma, St Quentin Fallavier, Francia) con un suplemento de suero bovino fetal inactivado con calor al 10% (FBS) (Sigma, St Quentin Fallavier, Francia), 4 nM de L-glutamina (Sigma, St Quentin Fallavier, Francia) y 100 U/mL, 100 µg/mL de penicilina - estreptomina (Sigma, St Quentin Fallavier, Francia). Las células de glioblastoma astrocitoma humano establecidas U87MG o T98G, las células de adenocarcinoma de riñón humano A704, las células de adenocarcinoma de riñón humano ACHN y las células de adenocarcinoma de seno humano MCF7 (disponibles en ATCC) se cultivaron en Medio Esencial Mínimo de Eagle (Sigma, St Quentin Fallavier, Francia) con un suplemento de suero bovino fetal inactivado por calor al 10% (FBS) (Sigma, St Quentin Fallavier, Francia), L-glutamina 4 nM (Sigma, St Quentin Fallavier, Francia) y 100 U/mL, 100 µg/mL de penicilina - estreptomina (Sigma, St Quentin Fallavier, Francia). Las células SW948 de adenocarcinoma de colon humano establecidas y las células de adenocarcinoma de mama humano establecidas MDAMB231 (disponibles de ATCC) se cultivaron en L-15 de Leibovitz (Sigma, St Quentin Fallavier, Francia) con un suplemento de suero bovino fetal inactivado por calor al 10% (FBS) (Sigma, St Quentin Fallavier, Francia), 4 nM de L-glutamina (Sigma, St Quentin Fallavier, Francia) y 100 U/mL, 100 µg/mL de penicilina - estreptomina (Sigma, St Quentin Fallavier, Francia). Las células de carcinoma de riñón humano establecidas Caki-1 y las células de carcinoma colorrectal humano HCT-116 (disponibles de ATCC) se cultivaron en el medio 5A de McCoy modificado (Sigma, St Quentin Fallavier, Francia) con un suplemento de suero bovino fetal inactivado por calor al 10% (FBS) (Sigma, St Quentin Fallavier, Francia), 4 nM de L-glutamina (Sigma, St Quentin Fallavier, Francia) y 100 U/mL, 100 µg/mL de penicilina - estreptomina (Sigma, St Quentin Fallavier, Francia). Las células de carcinoma de vejiga urinaria humano establecidas 5637 y las células de adenocarcinoma de pulmón humano establecidas NCIH1703 (disponibles de ATCC) se cultivaron en medio RPMI-1640 (Sigma, St Quentin Fallavier, Francia) con un suplemento de suero bovino fetal inactivado con calor al 10% (FBS) (Sigma, St Quentin Fallavier, Francia), 4 nM de L-glutamina (Sigma, St Quentin Fallavier, Francia) y 100 U/mL, 100 µg/mL de penicilina - estreptomina (Sigma, St Quentin Fallavier, Francia). Las células de glioma humano establecidas 42MGBA (disponibles en DSMZ) se cultivaron en una mezcla de Medio RPMI-1640 al 80% y Medio Esencial Mínimo de Eagle a 1:1 (Sigma, St Quentin Fallavier, Francia) con un suplemento de suero bovino fetal inactivado por calor (FBS) al 20% (Sigma, St Quentin Fallavier, Francia), L-glutamina 4 nM (Sigma, St Quentin Fallavier, Francia) y 100 U/mL, 100 µg/mL de penicilina - estreptomina (Sigma, St Quentin Fallavier, Francia).

### Ejemplo 3: Ensayos de unión de anticuerpos (FCM, ELISA)

Este Ejemplo describe métodos para determinar la especificidad de MAb anti-DR5 mediante ELISA con antígenos aplicados como recubrimiento, para investigar la expresión celular de DR5 en la superficie celular y para determinar los epítomos después de la competición de MAb analizada mediante citometría de flujo.

Experimentos de citometría de flujo para determinar la expresión celular de DR5. En pocas palabras, se incuban  $2 \cdot 10^5$  las células por 96 pocillos con una dilución de MAb anti-DR5 no conjugado a 10  $\mu\text{g/mL}$  y a continuación se diluyen a 1/10. Los anticuerpos no unidos se separan mediante lavado con PBS (Invitrogen, Villebon sur Yvette, Francia) con un suplemento de albúmina de suero bovino al 1% (Sigma, St Quentin Fallavier, Francia). Posteriormente, las células se centrifugan (5 minutos a 400 g) y el anticuerpo unido se detecta con anti-(Fab')<sub>2</sub> de ratón policlonal de cabra conjugado con isotiocianato de fluoresceína (FITC) (MP Biomedical, Illkirch, Francia) a 4°C durante 30 min. El reactivo de detección se separa mediante lavado y las células se centrifugan (5 min a 400 g) y se resuspenden en 300  $\mu\text{L}$  de PBS. El anticuerpo de detección de enlace se cuantifica en un FACSCAN (BD Biosciences, Rungis, Francia), (canal FL1, 2000 eventos por adquisición). Durante el experimento, se incluyen los controles de isotipo respectivos para excluir cualquier evento de enlace inespecífico.

Los resultados de los experimentos se muestran en la FIG. 1 (a 10  $\mu\text{g/mL}$ ) y la FIG. 2 y la Tabla 6 (a 5  $\mu\text{g/mL}$ ) muestra, p. ej., la tinción celular con la concentración de MAb o a 5  $\mu\text{g/mL}$ . Varias líneas celulares de cáncer expresan diferentes subconjuntos de receptores de TRAIL. Los patrones de expresión variaban de una línea celular a otra. En el presente estudio se expresó DR5 en todas las líneas celulares analizadas. Cualquiera que sea el MAb anti-DR5 (mDR5-01, mDR5-02, mDR5-04 o mDR5-05) sometido a ensayo, se observó un patrón celular similar.

La Tabla 6 muestra el análisis FACS de la expresión de DR5 utilizando 5  $\mu\text{g/mL}$  de anticuerpo anti-DR5 en otras líneas celulares de tumores sólidos ( $1 \cdot 10^6$  células/mL), es decir, líneas celulares de adenocarcinoma de mama humano (MCF7, MDAMB231) y en líneas celulares de adenocarcinoma de pulmón humano (NCIH1703, A549).

Tabla 6

	Línea celular de cáncer de mama.				Línea celular de cáncer de pulmón			
Mab	MCF7		MDAMB231		NCIH1703		A549	
	%	IMF	%	IMF	%	IMF	%	IMF
mIgG1 CTRL	1	176	0	119	0	100	0	190
mDR5-01	51	225	89	238	64	152	82	323
mDR5-05	33	192	82	224	74	166	71	274

Análisis de la especificidad de MAb utilizando ELISA con antígenos aplicados como recubrimiento. Las propiedades de unión específicas de los anticuerpos se evaluaron en un ELISA con antígenos Fas (50 ng/mL) (R&D Systems, Lille, Francia), FasL (100 ng/mL) (Tebu-bio, Le Perray en Yvelines, Francia), TRAIL (100 ng/mL) (R&D Systems, Lille, Francia), DR4 (50 ng/mL) (R&D Systems, Lille, Francia), DR5 (50 ng/mL) (R&D Systems, Lille, Francia), DcR1 (50 ng/mL) (R&D Systems, Lille, Francia) o DcR2 (50 ng/mL) (R&D Systems, Lille, Francia) como recubrimiento. El panel de MAb anti-DR5 se sometió a ensayo a 1  $\mu\text{g/mL}$  y se reveló utilizando un producto conjugado de anti-IgG1 de ratón policlonal de cabra-peroxidasa de rábano picante (HRP) (AbD Serotec, Colmar, Francia).

Los resultados de los experimentos se muestran en la FIG. 3. Los anticuerpos mDR5-01, mDR5-02, mDR5-04 y mDR5-05 (1  $\mu\text{g/mL}$ ) solo reaccionaron con antígenos DR5 aplicados como recubrimiento (50 ng/mL). No se observó reactividad con otros antígenos relacionados con la apoptosis (FAS, FASL, TRAIL, DR4, DcR1, DcR2), (media +/- DT en 2 experimentos independientes).

Experimentos de citometría de flujo para determinar la unión competitiva de MAb. En pocas palabras, se incuban  $2 \cdot 10^5$  las células T98G por 96 pocillos con una dilución de anticuerpo murino biotinilado anti-DR5 (10  $\mu\text{g/mL}$ , a continuación se diluyen a 1/10) como referencia y con o sin anticuerpo no conjugado a 5  $\mu\text{g/mL}$  y se incuban a 4°C durante 30 minutos. Solo se muestran los datos obtenidos con 1  $\mu\text{g/mL}$  de anticuerpo biotinilado. El anticuerpo no unido se separa mediante lavado con PBS (Invitrogen, Villebon sur Yvette, Francia) con un suplemento de albúmina de suero bovino al 1% (Sigma, St Quentin Fallavier, Francia). Posteriormente, las células se centrifugan (5 minutos a 400 g) y el anticuerpo unido se detecta con Estreptavidina conjugada con Ficoeritrina (Interchim, Montluçon, Francia) a 4°C durante 30 minutos. El reactivo de detección se separa mediante lavado y las células se centrifugan (5 min a 400 g) y se resuspenden en 300  $\mu\text{L}$  de PBS. El anticuerpo de detección de enlace se cuantifica en un FACSCAN (BD Biosciences, Rungis, Francia), (canal FL2, 2000 eventos por adquisición). Durante el experimento, se incluyen los controles de isotipo respectivos para excluir cualquier evento de enlace inespecífico.

Los resultados de los experimentos se muestran en la FIG. 4. Por ejemplo, los anticuerpos mDR5-02 y mDR5-05 no conjugados (5  $\mu\text{g/mL}$ ) no compiten con el anticuerpo mDR5-01 biotinilado (1  $\mu\text{g/mL}$ ). Por el contrario, mDR5-01 y mDR5-04 no conjugados compiten con el anticuerpo mDR5-01 biotinilado. Por lo tanto, los epítomos DR5-01 y DR5-

04 son comunes o adyacentes, mientras que los epítomos DR5-02 y DR5-05 son dos epítomos separados. Además, el epítomo DR5-01 también es distinto del epítomo DR5-05, (media +/- DT en dos experimentos independientes).

### Ejemplo 3: Actividad *in vitro* del MAb biológico

Este Ejemplo ilustra los métodos para evaluar el impacto del MAb anti-DR5 sobre la unión celular de TRAIL en su capacidad para desencadenar un efecto citotóxico celular en las células cancerosas. Estos componentes se pueden analizar para determinar la actividad antitumoral, utilizando cualquiera de una serie de ensayos adecuados, incluidos, pero no limitados a, los ensayos para determinar la capacidad de ralentizar el crecimiento tumoral o destruir células cancerosas *in vitro*. Varias líneas celulares derivadas de tumores se encuentran entre las células diana que se pueden poner en contacto con la combinación de MAb, en tales procedimientos de ensayo.

Para identificar o seleccionar la combinación de anticuerpos anti-DR5 que induce apoptosis, pérdida de integridad de la membrana como se indica, p. ej., mediante PI se evalúa con respecto al control (células no tratadas) y se compara con TRAIL recombinante (Fig. 8). La capacidad para ralentizar el crecimiento tumoral se evalúa mediante la cuantificación de ATP o BrDU (Fig. 6, Fig. 7). La respuesta apoptótica se evalúa mediante la cuantificación de la caspasa 3 escindida (FIG. 9) o la Poli-(ADP-Ribosa)-Polimerasa (PARP) escindida, (FIG. 10).

Reactivos bioquímicos. Los reactivos bioquímicos utilizados para los estudios de apoptosis fueron: yoduro de propidio (PI), (Sigma, St Quentin Fallavier, Francia), anticuerpo Caspasa 3 (Ozyme, Saint Quentin Yvelines, Francia), ELISA-BrDU de proliferación celular (Roche Diagnostics, Meylan, Francia), Cell Titer Glo-ATP (Promega, Charbonnières-les-bains, Francia) y el anti-Poli-(ADP-Ribosa)-Polimerasa (PARP) policlonal (Roche Diagnostics, Meylan, Francia).

Experimentos de citometría de flujo del impacto de MAb en la unión de TRAIL. Las líneas de células H4 se sembraron a una densidad de  $1 \cdot 10^5$  por 96 pocillos. Las células se incubaron durante 30 minutos a 4°C con o sin MAb anti-TRAIL o anti-DR5 (mDR5-01, mDR5-02, mDR5-3 mDR5-4) sometido a ensayo a 1 µg/mL y a continuación se diluyeron a 1/10. Los anticuerpos no unidos se separaron mediante lavado con PBS (Invitrogen, Villebon sur Yvette, Francia) con un suplemento de albúmina de suero bovino al 1% (Sigma, St Quentin Fallavier, Francia). Posteriormente, las células se incubaron con TRAIL recombinante (100 ng/mL), (R&D Systems, Lille, Francia) durante 30 minutos a 4°C. Los anticuerpos no unidos se separaron mediante lavado con PBS (Invitrogen, Villebon sur Yvette, Francia) con un suplemento de albúmina de suero bovino al 1% (Sigma, St Quentin Fallavier, Francia). El TRAIL recombinante unido se detectó con MAb B-S23 anti-TRAIL conjugado biotinilado (iDD biotech, Dardilly, Francia). Después de los lavados, se añadió estreptavidina conjugada con ficoeritrina (Interchim, Montluçon, Francia) a 4°C durante 30 min. El reactivo de detección se separó mediante lavado y las células se centrifugaron (5 min a 400 g) y se resuspendieron en 300 µL de PBS. El anticuerpo de detección de enlace se cuantificó en un FACSCAN (BD Biosciences, Rungis, Francia), (canal FL2, 2000 eventos por adquisición). Durante el experimento, se incluyeron los controles de isotipo respectivos para excluir cualquier evento de enlace inespecífico.

La H4 humana que expresa DR5 en la superficie celular se utilizó para determinar la actividad agonística o antagónica de los cuatro anticuerpos anti-DR5 designados mDR5-01, mDR5-02, mDR5-04 y mDR5-05. Los resultados de los experimentos se muestran en la FIG. 5. La unión de TRAIL recombinante en la superficie celular se inhibió con el antagonista anti-TRAIL MAb B-T24 (iDD biotech, Dardilly, Francia). Entre el panel de MAb anti-DR5 sometido a ensayo, los MAb mDR5-01, mDR5-04 y mDR5-05 inhibieron la unión de TRAIL recombinante, sin ningún impacto de MAb mDR5-02.

Análisis de viabilidad celular tras la determinación del nivel de ATP. Se utilizó el Ensayo de Viabilidad Celular Luminiscente CellTiter-Glo® (Promega, Charbonnières les Bains, Francia) para determinar el número de células viables en cultivo basándose en la cuantificación del ATP presente, un indicador de células metabólicamente activas. La detección se basa en el uso de la reacción de luciferasa para medir la cantidad de ATP de las células viables. A los pocos minutos de la pérdida de integridad de la membrana, las células pierden la capacidad de sintetizar ATP y las ATPasas endógenas destruyen cualquier ATP restante; de este modo los niveles de ATP caen precipitadamente. Los cultivos celulares ( $5 \cdot 10^4$  células/mL) se incuban durante 72 horas solos o con MAb anti-DR5 solo (1 µg/mL) o con dos MAb combinados a 1 µg/mL para cada MAb (FIG. 6). La concentración del ligando TRAIL se utilizó a 10 ng/mL. El reactivo CellTiter-Glo® se añadió directamente a las células en cultivo en una proporción de 50 µl de reactivo por 200 µl de medio de cultivo. Las placas de ensayo se incuban a temperatura ambiente durante 10 minutos y la señal bioluminiscente se registra utilizando un fluorómetro convencional de múltiples pocillos Mithras LB940, (Berthold, Thoiry, Francia).

Los resultados de los experimentos para determinar la actividad agonística de los cuatro anticuerpos anti-DR5 se muestran en la FIG. 6. Ninguno de los MAb anti-DR5 sometido a ensayo solo fue capaz de inducir citotoxicidad celular en células H4. Por el contrario, solo la combinación de MAb anti-DR5 mDR5-01 y mDR5-05 desencadenó la apoptosis en células H4. La capacidad de esta combinación de MAb anti-DR5 restringida (1/10) no se relacionó con el nivel de tinción de MAb (Figura 1). Es interesante que los MAb mDR5-01 y mDR5-05 reconozcan dos epítomos

diferentes (Figura 4). Sin embargo, la combinación de MAb mDR5-05 con otros MAb mDR5 tales como mDR5-02 que reconoce también un epítipo distinto no pudo desencadenar la apoptosis de H4 (FIG. 6).

Análisis de viabilidad celular tras la determinación de la incorporación de BrdU. Las células diana H4 ( $5 \cdot 10^4$  células/mL) se cultivaron con la combinación de MAb mDR5-05 y mDR5-01 o con la combinación de MAb mDR5-05 y mDR5-04 a diferentes rangos de concentración de MAb. El crecimiento celular se determina utilizando el ELISA-BrdU de proliferación celular (Roche Diagnostics, Meylan, Francia), de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Este método se basa en la incorporación del análogo de pirimidina BrdU en lugar de timidina en el ADN de células en proliferación. Después de su incorporación al ADN, BrdU se detecta con un MAb anti-BrdU. Al final de la revelación, la señal bioluminiscente se registra con un fluorómetro multipocillos convencional Mithras LB940, (Berthold, Thoiry, Francia).

Los resultados de los experimentos se muestran en la FIG. 7. La combinación específica de MAb mDR5-01 y mDR5-05 indujo sinérgicamente la apoptosis en la línea celular H4 como se pone de manifiesto mediante la cuantificación de BrdU (media  $\pm$  DT en 2 experimentos independientes). No se observó un impacto significativo con la combinación de MAb mDR5-05 y mDR5-04.

Captación de yoduro de propidio por citometría de flujo para medir la apoptosis inducida por MAb. Las líneas de células H4 se sembraron a una densidad de  $2 \cdot 10^4$  por 96 pocillos. Las células se incubaron durante un período de 3 días con o sin MAb anti-DR5. Cada MAb anti-DR5 se sometió a ensayo solo o después de la combinación de MAb a  $1 \mu\text{g/mL}$  (FIG. 8). La concentración del ligando TRAIL se utilizó a  $10 \text{ ng/mL}$ . Las células se centrifugaron a 2000 rpm durante 5 min a  $4^\circ\text{C}$ , el sedimento se resuspendió en etanol del 70% (Sigma, St Quentin Fallavier, Francia) para la permeabilización. Después de una nueva centrifugación, las células se incubaron con  $100 \mu\text{l}$  de PI ( $100 \mu\text{g/mL}$ ) y  $100 \mu\text{l}$  de ARNasa ( $100 \mu\text{g/mL}$ ), (Sigma, St Quentin Fallavier, Francia) por pocillo durante 15 minutos. Las células se centrifugaron (5 min a 2000 rpm) y se resuspendieron en  $300 \mu\text{l}$  de PBS. El anticuerpo de detección de enlace se cuantificó en un FACSCAN (BD Biosciences, Rungis, Francia), (canal FL2, 3000 eventos por adquisición).

Los resultados de los experimentos se muestran en la FIG. 8. Mientras que no se obtuvo PCD con MAb sometido a ensayo solo, la combinación específica de MAb mDR5-01 y mDR5-05 indujo sinérgicamente la apoptosis en la línea celular H4 como se pone de manifiesto por la captación de PI (media  $\pm$  DT en 2 experimentos independientes). No se requirió ningún entrecruzamiento de MAb. No se obtuvo PCD con la combinación de MAb mDR5-05 y mDR5-04.

Cuantificación de la caspasa-3 escindida por citometría de flujo para medir la apoptosis inducida por MAb. Las líneas de células H4 se sembraron a una densidad de  $2 \cdot 10^4$  por 96 pocillos. Las células se incubaron durante 48 horas con o sin MAb anti-DR5. Cada MAb anti-DR5 se sometió a ensayo solo o en presencia de una combinación de MAb a  $1 \mu\text{g/mL}$  para mDR5-05 con  $0,01 \mu\text{g/mL}$  para mDR5-01 o mDR5-04 (FIG. 9). La concentración del ligando TRAIL se utilizó a  $10 \text{ ng/mL}$ . Las células se centrifugaron a 2000 rpm durante 5 min a  $4^\circ\text{C}$ , el sedimento se resuspendió en metanol del 90% (Sigma, St Quentin Fallavier, Francia) para la permeabilización. Las células se centrifugaron a 2000 rpm durante 5 minutos a  $4^\circ\text{C}$  y se incubaron a  $4^\circ\text{C}$  durante 30 minutos con los anticuerpos MAb anti-caspasa-3 activa conjugados con alexa fluor 488 (Ozyme, Saint Quentin Yvelines, Francia). Las células se centrifugaron (5 min a 2000 rpm) y se resuspendieron en  $300 \mu\text{l}$  de PBS. El anticuerpo de detección de enlace se cuantificó en un FACSCAN (BD Biosciences, Rungis, Francia), (canal FL2, 3000 eventos por adquisición).

Cuando se activa la apoptosis, las caspasas escinden múltiples sustratos de proteínas, lo que conduce a la pérdida de la estructura y función celular, y en última instancia, produce la muerte celular. En particular, las caspasas 8, 9 y 3 se han implicado en la apoptosis: la caspasa-9 en la vía mitocondrial, la caspasa-8 en la vía Fas/CD95, y la caspasa-3 más aguas abajo, activada por múltiples vías. La combinación específica de MAb mDR5-01 y mDR5-05 indujo sinérgicamente la apoptosis en la línea celular H4 como se pone de manifiesto por la cuantificación de la caspasa 3 escindida (FIG. 9) (media  $\pm$  DT en 2 experimentos independientes). En comparación con TRAIL (también llamado Apo2L), solo la combinación de MAb mDR5-01 y mDR5-05 activó la apoptosis celular en comparación con la combinación de MAb mDR5-04 y mDR5-05.

Transferencia Western de PARP. Las líneas de células H4 se sembraron a una densidad de  $1 \cdot 10^6$  por matraz T25  $\text{cm}^2$ . Las células se incubaron durante 5 horas con o sin MAb anti-DR5. Los extractos celulares se resuspendieron en Tris-HCl  $50 \text{ mM}$ , KCl  $150 \text{ mM}$  a pH 7 y se sometieron a sonicación y se incubaron durante 15 min a  $65^\circ\text{C}$ . Las muestras ( $10 \mu\text{g}$ ) se sometieron a DTS-PAGE reductora y se transfirieron a una membrana de PVDF utilizando métodos convencionales. Después de bloquear en 5% de leche, las transferencias se incubaron en la anti-Poli-(ADP-Ribosa)-Polimerasa (PARP) (Roche Diagnostics, Meylan, Francia) a  $1/2000$ . Después del lavado, las membranas se incubaron en anticuerpo anti-IgG de conejo de oveja Pab conjugado con peroxidasa de rábano picante a  $1/10000$  (AbD Serotec, Colmar, Francia). Las transferencias se desarrollaron con transferencia ECL Advance Western utilizando un sustrato quimioluminiscente basado en luminol mejorado para la detección de peroxidasa de rábano picante (GE Healthcare, St Cyr au Mont d'Or, Francia).

Se han identificado muchos sustratos específicos de la diana para la caspasa, incluida la enzima reparadora DAN, la

poli(ADP-ribosa)polimerasa (PARP). La detección mediante transferencia Western de la escisión de PARP se ha utilizado ampliamente como un indicador de apoptosis. PARP se escinde entre Asp213 y Gly 214 en la secuencia humana, produciendo dos fragmentos de pesos moleculares aparentes de 24 y 89 kDa. A partir de células H4 tratadas con la combinación de MAb mDR5-01 y mDR5-05, se detectaron los fragmentos de PARP escindida, mientras que no se observó un efecto similar en las células no tratadas o tratadas con la combinación de MAb mb5-05 y mDR5-04, (FIG. 10).

Como se muestra en la FIG. 11, el MAb mDR5-02 (1 µg/mL) bloqueó la apoptosis activada con la combinación de MAb mDR5-01 y mDR5-05 sometida a ensayo en la proporción 1/100 (10 µg/mL + 0,1 µg/mL). No se observó un impacto significativo con los otros MAb anti-DR5 (mDR5-01, mDR5-04 o mDR5-05). La viabilidad celular se evaluó en función de la cuantificación del ATP presente, un indicador de células metabólicamente activas.

Se evaluó la susceptibilidad de cinco de las líneas celulares de glioma, H4, HS683, A172, T98G y U87MG a TRAIL o una combinación de MAb anti-DR5 (mDR5-01 + mDR5-05 frente a mDR5-05 + mDR5-04) sometida a ensayo a una razón 1/100 (10 µg/mL + 0,1 µg/mL) basándose en la cuantificación del ATP presente, un indicador de células metabólicamente activas (FIG. 12). Mientras que cuatro líneas celulares (HS683, A172, T98G y U87MG) son resistentes o muy poco sensibles a la apoptosis inducida por TRAIL, el uso de la combinación de anti-DR5 MAb mDR5-01 y mDR5-05 elude este mecanismo regulador.

Se evaluó la susceptibilidad de las células de glioma *ex vivo* de pacientes a la combinación de MAb anti-DR5 de ratón (mDR5-01 + mDR5-05) sometida a ensayo a 10 µg/mL (razón 1/10) según la cuantificación del ATP presente, un indicador de células metabólicamente activas (FIG.14).

Se evaluó la susceptibilidad de cuatro líneas celulares de glioma (HS683, A172, 42MGBA, T98G) a la combinación de MAb anti-DR5 de ratón (mDR5-01 + mDR5-05) sometida a ensayo a 10 µg/mL y a continuación diluida a 1/10 (razón 1/1) sola o asociada con Camptotecina (FIG. 15-18). Estas líneas celulares mostraron diferentes niveles de apoptosis inducida con la combinación de MAb anti-DR5 de ratón o en presencia de Camptotecina. El uso de la combinación de MAb anti-DR5 asociada con Camptotecina eludió este mecanismo regulador y mejoró el nivel de apoptosis.

Se evaluó la susceptibilidad de otras líneas celulares de tumores sólidos que expresan DR5, tal como en líneas celulares de adenocarcinoma de mama humano (MCF7, MDAMB231) y en líneas celulares de adenocarcinoma de pulmón humano (NCIH1703, A549) a la combinación de MAb anti-DR5 de ratón (mDR5-01 + mDR5-05) sometida a ensayo a 10 µg/mL y a continuación diluida a 1/10 (razón 1/1) sola o asociada con paclitaxel, gemcitabina o doxorubicina (FIG. 19-22). Estas líneas celulares mostraron diferentes niveles de apoptosis inducida con la combinación de MAb anti-DR5 de ratón o en presencia de los diferentes fármacos sometidos a ensayo. El uso de la combinación de MAb anti-DR5 asociada con estos fármacos superó este mecanismo regulador y mejoró el nivel de apoptosis.

#### **Ejemplo 4: Preparación de anticuerpos monoclonales quiméricos dirigidos contra DR5**

El ADN que codifica los anticuerpos monoclonales se aísla y secuencia fácilmente mediante procedimientos convencionales (p. ej., mediante el uso de sondas oligonucleotídicas que son capaces de unirse específicamente a los genes que codifican las cadenas pesada y ligera de los anticuerpos murinos). Las células de hibridoma sirven como una fuente preferida de tal ADN.

Conversión de MAb murino en MAb quimérico nativo: el ADNc correspondiente a la región variable del hibridoma se obtuvo mediante dos enfoques, el primer enfoque consiste en la utilización en la PCR del conjunto de cebadores degenerados relacionado con aminoácidos N-terminales generados desde la secuenciación N-terminal y el segundo enfoque consisten en la utilización en la PCR del conjunto de cebadores degenerados generado por la base de datos de cebadores IMGT® y los cebadores específicos descritos anteriormente (Esson et al., J. Immunol Methods. 2003; 203: 279: 25-66, Wang et al., Mol Immunol. 1991; 28: 1387-97). La secuencia de la región variable N-terminal se determinó mediante degradación de Edman. La extracción de ARN total se llevó a cabo utilizando el kit Tri Reagent de acuerdo con el protocolo descrito por el proveedor Sigma. Los fragmentos VL y VH amplificados se clonaron en el vector de clonación TOPO-TA (Invitrogen) para análisis de secuencia mediante el método de dideoxiacetaminación. (Sanger et al., Nature. 1977; 265:687-95). A continuación, las construcciones de variantes de anticuerpos se amplificaron mediante PCR y se clonaron en el vector de expresión.

Las posiciones se numeran de acuerdo con IMGT® y el índice de Kabat® (Secuencias de aminoácidos de la región V idénticas y segmentos de secuencias en anticuerpos de diferentes especificidades). Se analizaron las contribuciones relativas de los genes VH y VL, los minigenes y las regiones determinantes de la complementariedad a la unión de los sitios de combinación de anticuerpos (Kabat et al., NIH Publ. 1991; Núm. 91-3242, vol. 1, 647-669).

Como se muestra en la FIG. 13, la combinación de MAb quimérico chDR5-01 y chDR5-05 activó la apoptosis de las

células H4 sometida a ensayo en la proporción 1/100 (5 µg/mL + 0,05 µg/mL). No se observó un impacto significativo de MAb con el MAb quimérico probado solo. La viabilidad celular se evaluó en función de la cuantificación del ATP presente, un indicador de células metabólicamente activas.

5 La secuencia de ácido nucleico o la secuencia de aminoácidos con respecto a los MAb quiméricos DR5-01 y DR5-05 se muestran en la Lista de Secuencias:

- secuencia de nucleótidos de la cadena ligera murina variable del anticuerpo DR5-01 anti-DR5 (SEC ID NO: 1) y su secuencia de aminoácidos derivada (SEQ ID NO: 2).
- 10 - secuencia de nucleótidos de la cadena pesada murina variable del anticuerpo DR5-01 anti-DR5 (SEC ID NO: 3) y su secuencia de aminoácidos derivada (SEQ ID NO: 4).
- secuencia de nucleótidos de la cadena ligera murina variable del anticuerpo DR5-05 anti-DR5 (SEC ID NO: 5) y su secuencia de aminoácidos derivada (SEQ ID NO: 6).
- secuencia de nucleótidos de la cadena pesada murina variable del anticuerpo DR5-05 anti-DR5 (SEQ ID NO: 7) y su secuencia de aminoácidos derivada (SEQ ID NO: 8).
- 15 - secuencia de nucleótidos de la cadena pesada humana constante de anticuerpo DR5-01 o DR5-05 anti-DR5 (SEC ID NO: 9) y su secuencia de aminoácidos derivada (SEQ ID NO: 10).
- secuencia de nucleótidos de la cadena ligera humana constante de anticuerpo DR5-01 o DR5-05 anti-DR5 (SEC ID NO: 11) y su secuencia de aminoácidos derivada (SEC ID NO: 12).

20

#### **Ejemplo 5: Producción de MAb y purificación de proteína A**

Las células de mamífero son los anfitriones preferidos para la producción de glicoproteínas terapéuticas, debido a su capacidad para glicosilar proteínas en la forma más compatible para aplicaciones humanas (Jenkins et al., Nat Biotech. 1996; 14:975-81). Las células anfitrionas de mamífero que se podrían utilizar incluyen células Hela, 283, H9 y Jurkat humanas, células NIH3T3 y C127 de ratón, células Cos 1, Cos 7 y CV1 de mono verde africano, células QC1-3 de codorniz, células L de ratón y células de ovario de hámster chino. Las bacterias muy raramente glicosilan proteínas, y al igual que otros tipos de anfitriones comunes, tales como las levaduras, hongos filamentosos, insectos y células vegetales, producen patrones de glicosilación asociados con la rápida eliminación del torrente sanguíneo.

30

Las células de ovario de hámster chino (CHO) permiten la generación constante de líneas celulares clonales genéticamente estables y altamente productivas. Se pueden cultivar a altas densidades en biorreactores simples que utilizan medios sin suero, y permiten el desarrollo de bioprocesos seguros y reproducibles. Otras células animales comúnmente utilizadas incluyen células de riñón de cría hámster (BHK), células de mieloma de ratón NSO y SP2/0. También se ha sometido a ensayo la producción de animales transgénicos. (Jenkins et al., Nat Biotech. 1996; 14:975-81).

35

Un vector de expresión de mamífero típico contiene el elemento promotor (promotores temprano y tardío de SV40, las repeticiones terminales largas (LTR) de Retrovirus, p. ej., RSV, HTLV1, VIH1 y el promotor temprano del citomegalovirus (mCMV, hCMV), que media el inicio de transcripción del ARNm, la secuencia codificante de la proteína y las señales requeridas para la terminación de la transcripción y la poliadenilación de la transcripción (BGH poliA, gen de timidina quinasa de Herpes del poli A de virus del Herpes simple (TKpa), poliA de SV40 tardía y 3' UTR\_Beta\_Globina\_poliA). Los elementos adicionales incluyen potenciadores (Eµ, hIE1), secuencias de Kozak, péptidos señal y secuencias intermedias flanqueadas por sitios donantes y aceptores para el empalme de ARN. Los vectores de expresión adecuados para su uso en la práctica de la presente invención incluyen, p. ej., vectores tales como pcDNA3.1, pcDNA3.3, pOptiVEC, pRSV, pEµMCMV, pMCMVHE-UTR-BG, pHCMVHE-UTR-BG, pMCMV-UTR-BG, pHCMV-UTR-BG, pMCMVHE-SV40, pHCMVHE-SV40, pMCMV-SV40, pHCMV-SV40, pMCMVHE-TK, pHCMVHE-TK, pMCMV-TK, pHCMV-TK, pMCMVHE-BGH, pHCMVHE-BGH, pMCMV-BGH, pHCMV-UTR-BGH).

45

Las células CHO Easy C vacías (adquiridas por la colección de CCT) se co-transfectaron con el vector de expresión de MAb para cadenas ligeras y pesadas después de un procedimiento de transfección transitoria o estable establecido en el laboratorio de los autores de la presente invención. La secreción de las cadenas H y L fue habilitada por la respectiva secuencia líder de IgH humana. Las regiones codificantes de las cadenas ligeras y pesadas de MAb anti-DR5 se introducen en el vector de expresión de MAb en el sitio de clonación múltiple. Los transformantes se analizan para determinar la orientación correcta y el marco de lectura, el vector de expresión se puede transfectar a la línea celular CHO.

55

Cromatografía de Proteína A de fluido ascítico murino. El fluido ascítico murino se ajusta a pH 8,3 con el tampón de equilibrado Tris 0,1 M y sulfato de amonio 1,5 M y a continuación se carga en la columna de flujo rápido de proteína A sefarosa (GE Healthcare, Saint Cyr au Mont d'or, Francia). Las proteínas que no se unen pasan al flujo continuo y se eliminan mediante varios lavados con tampón de equilibrado. El MAb anti-DR5 se eluye de la columna de Proteína A utilizando el tampón de elución de citrato sódico 0,1 M a pH 3,5. El eluyente de la columna se verifica mediante A280. El pico de MAb anti-DR5 se reúne.

60

Cromatografía de proteína A del fluido de cultivo de células CHO recolectadas. El líquido de cultivo celular recolectado producido a partir de células CHO se carga en la columna Hi Trap rProtein A (GE Healthcare, Saint Cyr au Mont d'Or, Francia) que se equilibra con solución salina tamponada con fosfato, pH 7,2. Las proteínas que no se unen pasan al flujo continuo y se eliminan mediante varios lavados con tampón PBS seguido. El MAb anti-DR5 se eluye de la columna de Proteína A utilizando una etapa de elución con ácido cítrico 0,1 M a pH 3,0. El eluyente de la columna se verifica mediante A280. El pico de MAb anti-DR5 se reúne.

#### **Ejemplo 6: Preparación de anticuerpos monoclonales humanizados dirigidos contra DR5**

Las regiones de CDR y FR de anticuerpos se han determinado de acuerdo con varios enfoques de numeración tales como IMGT (ImMunoGeneTics Information System® <http://imgt.cines.fr>), Kabat o Common Numbering System. Sin embargo, las CDR determinadas mediante IMGT para un anticuerpo dado no son necesariamente idénticas a las CDR definidas por los otros sistemas de numeración. Las CDR de dominio variable y las regiones marco han sido identificadas por el autor de la presente invención gracias a los sistemas de numeración IMGT.

Conversión de MAb quimérico en MAb humanizado: Se generaron las cadenas H y L del anticuerpo DR5 humanizado utilizando un injerto de CDR mediante el método de PCR. Con el fin de generar un anticuerpo humanizado en el que las CDR de un anticuerpo monoclonal de ratón se injertan en un anticuerpo humano, preferiblemente hay una alta homología entre la región variable de un anticuerpo monoclonal de ratón y la región variable de un anticuerpo humano. Por lo tanto, las regiones V de la cadena H y la cadena L de un anticuerpo monoclonal de ratón anti-DR5 humano se comparan con la región V de todos los anticuerpos humanos conocidos utilizando el soporte lógico IMGT/DomainGapAlign. Cuando un anticuerpo de ratón se humaniza mediante una tecnología convencional, la secuencia de aminoácidos de algunas de las FR de la región V de un anticuerpo de ratón que soporta la CDR se puede injertar en la FR de una región V humana, según se desee.

Para las regiones V tanto de la cadena H como de la cadena L humanizadas, es posible seleccionar las regiones V de la cadena L y H y la región J, IGKV3-D-15\*01, IGHV1-3\*01, IGKJ2\*01 e IGHJ4\*01 respectivamente, que tienen una alta homología con la región V de la cadena H y L y la región J del anticuerpo mDR5 e IGKV1-16\*01, IGHV1-3\*01, IGKJ4\*01 e IGHJ4\*01, que tienen una alta homología con la región V de la cadena H y L y la región J del anticuerpo mDR5-05.

Después se determina la secuencia de la región variable humanizada de HzDR5-01 y HzDR5-05. Las regiones variables de H y L de HzDR5-01 y Hz-DR5-05 se amplifican mediante PCR y se clonan en el vector de expresión p3U que contiene la región constante de IgG1 humana.

En el caso de anticuerpos injertados con CDR humanas, la actividad de unión disminuye al injertar la secuencia de aminoácidos de CDR en el anticuerpo de ratón solo. Para evitar esta reducción, entre los residuos de aminoácidos en FR diferentes entre un anticuerpo humano y un anticuerpo de ratón, se injertan residuos de aminoácidos que se consideran influyentes en la actividad de unión junto con la secuencia de aminoácidos de CDR. Por consiguiente, en este Ejemplo también se intentó identificar los residuos de aminoácidos en FR que se considera que tienen influencias en la actividad de unión.

La susceptibilidad de la línea celular de glioma H4 a la combinación de MAb anti-DR5 de ratón o humanizado (mDR5-01 + mDR5-05) sometida a ensayo a 1 µg/mL y a continuación diluida a 1/2 (razón 1/1) se evaluó con basándose en la cuantificación del ATP presente, un indicador de células metabólicamente activas (FIG 23). La combinación de MAb humanizado (hzDR5-01 y hzDR5-05) desencadenó la apoptosis celular a un nivel más alto en comparación con la combinación de MAb de ratón (mDR5-01 y mDR5-05).

#### **Ejemplo 7: Actividad *In vivo* del MAb biológico**

El modelo ortotópico de ratón con xenoinjerto de glioma humano se obtuvo mediante inyección intracerebral en un ratón atímico de 100 000 células aisladas provenientes de un modelo de ratón de xenoinjerto de glioma humano heterotípico Sc2. El tratamiento con MAb se administró mediante inyección intraperitoneal (IP) a 5 mg/kg por ratón hasta la eutanasia de los ratones debido a la pérdida de peso y se aplicó durante un máximo de 36 días. Los tiempos de supervivencia obtenidos con el grupo control se compararon con los tiempos de supervivencia obtenidos con los grupos tratados (mDR5-01 + mDR5-05 frente a mDR5-04 + mDR5-05) utilizando el método de Kaplan Meier y la prueba estadística de Wilcoxon (soporte lógico JMP), (FIG. 24). Este estudio demostró la actividad antitumoral de la combinación de MAb anti-DR5 de ratón (mDR5-01 + mDR5-05) en el glioma intracerebral.

#### **LISTA DE SECUENCIAS**

<110> IDD BIOTECH (INTERNACIONAL - DROGAS - DESARROLLO - BIOTECH)

<120> ANTICUERPOS DE LA FAMILIA ANTI-DR5, ANTICUERPOS DE LA FAMILIA ANTI-DR5 BISPECÍFICOS Y



MÉTODOS DE USO DE LOS MISMOS

<130> BET 13L1916

5 <150> EP 12305821.6  
<151> 2012-07-09

<150> US 61/669866  
<151> 2012-07-10

10 <160> 41

<170> PatentIn versión 3.5

15 <210> 1  
<211> 321  
<212> ADN  
<213> Secuencia Artificial

20 <220>  
<223> Secuencia de ácido nucleico de la cadena ligera variable anti-DR5-01 murina

<400> 1

gacattgtgc tgacccagtc tccagccacc ctgtctgtga ctccaggaga tagcgtcagt	60
ctttcctgca gggccagcca aagtattagc aacaacctac actggtatca acaaaaatca	120
catgagtctc caaggcttct catcaagttt gcttcccagt ccatctctgg gatcccctcc	180
cggttcagtg gcagtggatc aggggcagat ttactctctca ttatcaacag tgtggagact	240
gaagattttg gaatgtattt ctgtcaacag ggtaacagct ggccgtacac attcggtgga	300
ggcaccaagc tcgagatcaa a	321

25 <210> 2  
<211> 107  
<212> PRT  
30 <213> Secuencia Artificial

<220>  
<223> Secuencia de aminoácidos de la cadena ligera variable anti-DR5-01 murina

35 <400> 2

Asp	Ile	Val	Leu	Thr	Gln	Ser	Pro	Ala	Thr	Leu	Ser	Val	Thr	Pro	Gly
1				5					10					15	
Asp	Ser	Val	Ser	Leu	Ser	Cys	Arg	Ala	Ser	Gln	Ser	Ile	Ser	Asn	Asn
			20					25					30		
Leu	His	Trp	Tyr	Gln	Gln	Lys	Ser	His	Glu	Ser	Pro	Arg	Leu	Leu	Ile
		35					40					45			

# ES 2 727 486 T3

Lys Phe Ala Ser Gln Ser Ile Ser Gly Ile Pro Ser Arg Phe Ser Gly  
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Ala Asp Phe Thr Leu Ile Ile Asn Ser Val Glu Thr  
65 70 75 80

Glu Asp Phe Gly Met Tyr Phe Cys Gln Gln Gly Asn Ser Trp Pro Tyr  
85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys  
100 105

<210> 3  
<211> 354  
<212> ADN  
<213> Secuencia Artificial

<220>  
<223> Secuencia de ácido nucleico de cadena pesada variable anti-DR5-01 murina  
<400> 3

gaggtccagc tgcagcagtc tggggcagag tttgtgaagc caggggcctc agtcaagttg 60  
tcctgcacag cttctggctt caacattaaa gacaccttta tacactgggt gaagcagagg 120  
cctgaacagg gcctggactg gattggaagg attgatcctg cgaatggtaa tactaaatat 180  
gatccgaagt tccagggcaa ggccactgaa acaacagaca catcctccaa cacagcctac 240  
ctgcagctca gcagcctgac atctgaggac actgccgtct attattgtgt tagaggacta 300  
tatacgctact actttgacta ctggggccaa ggaacctcgg tcaccgtctc ctca 354

<210> 4  
<211> 118  
<212> PRT  
<213> Secuencia Artificial

<220>  
<223> Secuencia de aminoácidos de la cadena pesada variable anti-DR5-01 murina  
<400> 4

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

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

Phe Ile His Trp Val Lys Gln Arg Pro Glu Gln Gly Leu Asp Trp Ile  
35 40 45

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

# ES 2 727 486 T3

Gln Gly Lys Ala Thr Glu Thr Thr Asp Thr Ser Ser Asn Thr Ala Tyr  
65 70 75 80

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

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

Ser Val Thr Val Ser Ser  
115

<210> 5  
<211> 318  
<212> ADN  
<213> Secuencia Artificial

<220>  
<223> Secuencia de ácido nucleico de la cadena ligera variable anti-DR5-05 murina  
<400> 5

gacattcagc tgacccagtc tccagcaatc atgtctgcat ctccagggga gaaggtcacc 60  
atatcctgca gtgccagttc aagtgttaagt tacatgtact ggtaccagca gaagccagga 120  
tcctccccca aaccctggat ttatcgacaca tccaacctgg cttctggagt ccctgggtcgc 180  
ttcagtggca gtgggtctgg gacctcttac tctctcacia tcagcagcat ggaggtgaa 240  
gatgctgcca cttattactg ccagcagtat catagttacc cacctacatt cggtggagggc 300  
accaagctcg agatcaaa 318

<210> 6  
<211> 106  
<212> PRT  
<213> Secuencia Artificial

<220>  
<223> Secuencia de aminoácidos de la cadena ligera variable anti-DR5-05 murina  
<400> 6

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

# ES 2 727 486 T3

Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Ser Met Glu Ala Glu  
65 70 75 80

Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr His Ser Tyr Pro Pro Thr  
85 90 95

Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys  
100 105

<210> 7

<211> 354

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Secuencia de ácido nucleico de cadena pesada variable anti-DR5-05 murina

<400> 7

gaggtccagc tgcagcagtc tggggcagag cttgtgaagc caggggcctc agtcaagttg 60  
ttctgcacag cttctggctt caacattaaa gacacccata tacactgggt gaaacagagg 120  
cctgagcagg gcctggagtg gattggaagg attgatcctg cgaatggtaa tactgaatat 180  
gacccgaagt tccagggcaa ggccactata agagtagaca catcctccga cacagcctac 240  
ctgcagctca gcagcctgac atctgaggac actgccgtcc attattgtgc tagatggggg 300  
actaacgtct attttgctta ctgggggtcaa ggaacctcgg tcaccgtctc ctca 354

<210> 8

<211> 118

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Secuencia de aminoácidos de la cadena pesada variable anti-DR5-05 murina

<400> 8

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

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

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

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

Gln Gly Lys Ala Thr Ile Arg Val Asp Thr Ser Ser Asp Thr Ala Tyr

ES 2 727 486 T3

```

65              70              75              80

Leu Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Thr Ala Val His Tyr Cys
      85                90                95

Ala Arg Trp Gly Thr Asn Val Tyr Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
      100               105               110

Ser Val Thr Val Ser Ser
      115

```

<210> 9

<211> 993

<212> ADN

### <213> Secuencia Artificial

$\langle 220 \rangle$

<223> Secuencia de ácido nucleico de humano anti-DR5-01 o humano anti-DR5-05 constante de cadena pesada

<400> 9

gcctccacca	agggcccatc	ggtcttcccc	ctggcaccct	cctccaagag	cacctctggg	60
ggcacagcgg	ccctgggctg	cctgggtcaag	gactacttcc	ccgaaccggg	gacggtgtcg	120
tggaaactcag	gcgccctgac	cagcggcgtg	cacaccttcc	cggctgtcct	acagtcctca	180
ggactctact	ccctcagcag	cgctcgtgacc	gtgccctcca	gcagcttggg	caccagagacc	240
tacatctgca	acgtgaatca	caagcccagc	aacaccaagg	tggacaagaa	agttgagccc	300
aaatcttgtg	acaaaactca	cacatgcca	ccgtgccag	cacctgaact	cctgggggga	360
ccgtcagttc	tcctcttccc	cccaaaacc	aaggacacc	tcatgatctc	ccggaccct	420
gaggtcacat	gcgtgggtgt	ggacgtgagc	cacgaagacc	ctgaggtcaa	gttcaactgg	480
tacgtggacg	gcgtggaggt	gcataatgcc	aagacaaagc	cgcgggagga	gcagtacaac	540
agcacgtacc	gtgtgggtcag	cgctctcacc	gtcctgcacc	aggactggct	gaatggcaag	600
gagtacaagt	gcaaggtctc	caacaaagcc	ctcccagccc	ccatcgagaa	aaccatctcc	660
aaagccaaag	ggcagccccc	agaaccacag	gtgtacacc	tgccccatc	ccgggatgag	720
ctgaccaaga	accaggtcag	cctgacctgc	ctgggtcaaag	gcttctatcc	cagcgacatc	780
gccgtggagt	gggagagcaa	tgggcagccg	gagaacaact	acaagaccac	gcctcccgtg	840
ctggactccg	acggctcctt	cttctcttac	agcaagctca	ccgtggacaa	gagcaggtgg	900
cagcagggga	acgtcttctc	atgctccgtg	atgcatgagg	ctctgcacaa	ccactacacg	960
cagaagagcc	tctccctgtc	tccgggtaaa	tag			993

<210> 10

$\langle 211 \rangle$  330

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

$\langle 220 \rangle$

<223> Secuencia de aminoácidos de la cadena pesada constante anti-DR5-01 humana o anti-DR5-05 humana

<400> 10

# ES 2 727 486 T3

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

# ES 2 727 486 T3

Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu  
 225 230 235 240

Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr  
 245 250 255

Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn  
 260 265 270

Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe  
 275 280 285

Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn  
 290 295 300

Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr  
 305 310 315 320

Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys  
 325 330

<210> 11

<211> 324

5 <212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

10 <223> Secuencia de ácido nucleico de la cadena ligera constante anti-DR5-01 humana o anti-DR5-05 humana

<400> 11

cgaactgtgg ctgcaccatc tgtcttcac	60
ttcccgccat ctgatgagca gttgaaatct	
ggaactgcct ctgttgtgtg cctgctgaat	120
aacttctatc ccagagaggc caaagtacag	
tggaagggtgg ataacgccct ccaatcgggt	180
aactcccagg agagtgtcac agagcaggac	
agcaaggaca gcacctacag cctcagcagc	240
accctgacgc tgagcaaagc agactacgag	
aaacacaaag tctacgcctg cgaagtcacc	300
catcagggcc tgagctcgcc cgtcacaaag	
agcttcaaca ggggagagtg ttag	324

15 <210> 12

<211> 107

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

20 <220>

<223> Secuencia de aminoácidos de la cadena ligera constante anti-DR5-01 humana o anti-DR5-05 humana

<400> 12

# ES 2 727 486 T3

Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu  
1 5 10 15

Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe  
20 25 30

Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln  
35 40 45

Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser  
50 55 60

Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu  
65 70 75 80

Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser  
85 90 95

Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys  
100 105

<210> 13

<211> 8

5 <212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

10 <223> CDR1 de cadena pesada anti-DR5-01 murina (Sistema de numeración IGMT)

<400> 13

Gly Phe Asn Ile Lys Asp Thr Phe  
1 5

15 <210> 14

<211> 8

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

20 <220>

<223> CDR2 de cadena pesada anti-DR5-01 o anti-DR5-05 murina (Sistema de numeración IGMT o Común)

<400> 14

Ile Asp Pro Ala Asn Gly Asn Thr  
1 5

25

<210> 15

<211> 11

<212> PRT

30 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> CDR3 de cadena pesada anti-DR5-01 murina (Sistema de numeración IGMT)

35 <400> 15

Val Arg Gly Leu Tyr Thr Tyr Tyr Phe Asp Tyr  
1 5 10

<210> 16



# ES 2 727 486 T3

<211> 6  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia Artificial

5 <220>  
 <223> CDR1 de cadena ligera anti-DR5-01 murina (Sistema de numeración IGMT o Común)  
 <400> 16

10 Gln Ser Ile Ser Asn Asn  
 1 5

<210> 17  
 <211> 9  
 <212> PRT  
 15 <213> Secuencia Artificial

<220>  
 <223> CDR3 de cadena ligera anti-DR5-01 murina (Sistema de numeración IGM, Kabat o Común)

20 <400> 17

Gln Gln Gly Asn Ser Trp Pro Tyr Thr  
 1 5

<210> 18  
 <211> 8  
 <212> PRT  
 25 <213> Secuencia Artificial

<220>  
 30 <223> CDR1 de cadena pesada anti-DR5-05 murina (Sistema de numeración IGMT)  
 <400> 18

Gly Phe Asn Ile Lys Asp Thr His  
 1 5

35 <210> 19  
 <211> 11  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia Artificial

40 <220>  
 <223> CDR3 de cadena pesada anti-DR5-05 murina (Sistema de numeración IGMT)  
 <400> 19

45 Ala Arg Trp Gly Thr Asn Val Tyr Phe Ala Tyr  
 1 5 10

50 <210> 20  
 <211> 5  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia Artificial

55 <220>  
 <223> CDR1 de cadena ligera anti-DR5-05 murina (Sistema de numeración IGMT o Común)  
 <400> 20

60 Ser Ser Val Ser Tyr  
 1 5

<210> 21  
 <211> 9  
 <212> PRT  
 5 <213> Secuencia Artificial  
  
 <220>  
 <223> CDR3 de cadena ligera anti-DR5-05 murina (Sistema de numeración IGM, Kabat o Común)  
 10 <400> 21  
  
                           Gln Gln Tyr His Ser Tyr Pro Pro Thr  
                           1                          5  
  
 <210> 22  
 15 <211> 5  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia Artificial  
  
 <220>  
 20 <223> CDR1 de cadena pesada anti-DR5-01 murina (Sistema de numeración de Kabat)  
  
 <400> 22  
  
                           Asp Thr Phe Ile His  
                           1                          5  
 25  
 <210> 23  
 <211> 17  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia Artificial  
 30  
 <220>  
 <223> CDR2 de cadena pesada anti-DR5-01 murino (sistema de numeración de Kabat)  
  
 <400> 23  
 35  
           Arg Ile Asp Pro Ala Asn Gly Asn Thr Lys Tyr Asp Pro Lys Phe Gln  
           1                          5                          10                          15  
  
           Gly  
  
 <210> 24  
 <211> 9  
 40 <212> PRT  
 <213> Secuencia Artificial  
  
 <220>  
 <223> CDR3 de cadena pesada anti-DR5-01 murina (Sistema de numeración de Kabat o Común)  
 45  
 <400> 24  
  
                           Gly Leu Tyr Thr Tyr Tyr Phe Asp Tyr  
                           1                          5  
 50  
 <210> 25  
 <211> 11  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia Artificial  
 55  
 <220>  
 <223> CDR1 de cadena ligera anti-DR5-01 murina (sistema de numeración Kabat)  
  
 <400> 25

# ES 2 727 486 T3

```

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

<210> 26
<211> 7
5 <212> PRT
   <213> Secuencia Artificial

<220>
<223> CDR2 de cadena ligera anti-DR5-01 murina (Sistema de numeración de Kabat)
10
<400> 26

Phe Ala Ser Gln Ser Ile Ser
1          5

15 <210> 27
   <211> 5
   <212> PRT
   <213> Secuencia Artificial

20 <220>
   <223> CDR1 de cadena pesada anti-DR5-05 murina (Sistema de numeración de Kabat)

   <400> 27

Asp Thr His Ile His
1          5

25 <210> 28
   <211> 17
   <212> PRT
30 <213> Secuencia Artificial

   <220>
   <223> CDR2 de cadena pesada anti-DR5-05 murina (Sistema de numeración de Kabat)

35 <400> 28

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

Gly

40 <210> 29
   <211> 9
   <212> PRT
   <213> Secuencia Artificial

   <220>
45 <223> CDR3 de cadena pesada anti-DR5-05 murina (Sistema de numeración de Kabat o Común)

   <400> 29

Trp Gly Thr Asn Val Tyr Phe Ala Tyr
1          5

50 <210> 30
   <211> 10
   <212> PRT
   <213> Secuencia Artificial

55 <220>
   <223> CDR1 de cadena ligera anti-DR5-05 murina (Sistema de numeración de Kabat)

```

<400> 30

Ser Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met Tyr  
1 5 10

5 <210> 31  
<211> 7  
<212> PRT  
<213> Secuencia Artificial

10 <220>  
<223> CDR2 de cadena ligera anti-DR5-05 murina (Sistema de numeración de Kabat)

15 <400> 31

Arg Thr Ser Asn Leu Ala Ser  
1 5

20 <210> 32  
<211> 4  
<212> PRT  
<213> Secuencia Artificial

25 <220>  
<223> CDR1 de cadena pesada anti-DR5-01 murina (Sistema de numeración común)

<400> 32

Lys Asp Thr Phe  
1

30 <210> 33  
<211> 4  
<212> PRT  
<213> Secuencia Artificial

35 <220>  
<223> CDR1 de cadena pesada anti-DR5-05 murina (Sistema de numeración común)

<400> 33

Lys Asp Thr His  
1

40 <210> 34  
<211> 354  
<212> ADN

45 <213> Secuencia Artificial

<220>  
<223> Secuencia de ácido nucleico de cadena pesada variable anti-DR5-01 humanizada

50 <400> 34

# ES 2 727 486 T3

```

gaggtgcaac tgcagcaatc aggagcagaa gtcgtaaagc ccggtgcctc cgttaaactt      60
agctgcaaag caagtgggtt taatatcaaa gatacattca tccattgggt caaacaggca      120
ccaggccagg gccttgaatg gatcggtcgc atcgaccag ctaacggaaa cactaagtat      180
gaccctaagt tccagggaaa ggctacaatt acaacagata catcctccaa taccgcttac      240
atggagctgt cttccttgcg gtctgaggat actgctgtgt attactgtgt acgtgggctg      300
tacacatatt acttcgatta ttggggccag gggactcttg taaccgtttc ctcc          354

```

<210> 35

<211> 118

5 <212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Secuencia de aminoácidos de la cadena pesada variable anti-DR5-01 humanizada

10

<400> 35

```

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

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

Phe Ile His Trp Val Lys Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
35              40              45

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

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

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

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

Leu Val Thr Val Ser Ser
115

```

15

<210> 36

<211> 321

<212> ADN

20 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Secuencia de ácido nucleico de la cadena ligera variable anti-DR5-01 humanizada

25

<400> 36

# ES 2 727 486 T3

```

gagattgtta tgacacagtc ccctgctaca ttgagtgtta gtccaggcga aagagctaca      60
ctgtcatgta gggcctctca gtctattagc aataacctgc actggatatca gcaaaagcca      120
ggtcaagccc ccaggctgct gattaagttt gcatctcaaa gtattacagg aatccctgct      180
cggttcagcg gctccgggag tggaaccgag tttaactca caatctcaag cctccagtcc      240
gaagacttcg ccgtatatta ctgtcagcag ggcaactctt ggcctacac cttcggtcag      300
ggaaccaagc tggagatcaa g                                              321

```

<210> 37

<211> 107

5 <212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Secuencia de aminoácidos de la cadena ligera variable anti-DR5-01 humanizada

10

<400> 37

```

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

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser Asn Asn
                20              25              30

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

Lys Phe Ala Ser Gln Ser Ile Thr Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly
                50              55              60

Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Ser
65              70              75              80

Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Gly Asn Ser Trp Pro Tyr
                85              90              95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
                100              105

```

15

<210> 38

<211> 354

<212> ADN

20 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Secuencia de ácido nucleico de cadena pesada variable anti-DR5-05 humanizada

25

<400> 38

# ES 2 727 486 T3

```

caagttcagt tggtagaatc aggtgcagaa gttaaaaagc caggggcatc tgttaaagtg      60
tcttgcaagg cctccggctt taatatcaag gacacacaca tgcattgggt gcgccaggcc      120
ccaggccagc gactggagtg gattgggcgt attgaccccg ccaacggcaa caccgagtat      180
gaccagaagt ttcagggccg tgtaaccatc accgtcgata cctcagcatc aaccgcttac      240
atggagcttt catctcttcg gtccgaagac acagccgtct attactgcgc tcgatgggga      300
acaaacgttt actttgcata ttggggtcag ggtactctcg tcaccgtgag cagt          354

```

<210> 39

<211> 118

5 <212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Secuencia de aminoácidos de la cadena pesada variable anti-DR5-05 humanizada

10

<400> 39

```

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

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

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

Gly Arg Ile Asp Pro Ala Asn Gly Asn Thr Glu Tyr Asp Gln Lys Phe
                50              55              60

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

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

Ala Arg Trp Gly Thr Asn Val Tyr Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
                100              105              110

Leu Val Thr Val Ser Ser
                115

```

15

<210> 40

<211> 318

<212> ADN

20 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Secuencia de ácido nucleico de la cadena ligera variable anti-DR5-05 humanizada

25

<400> 40

# ES 2 727 486 T3

```

gatattcaac ttacacaatc tccctcttct ctctccgctt cagtagggga tagagtgacc      60
atcacttgct ctgcttcttc cagcgtgtca tatatgtatt ggtatcagca aaagcccggc      120
aaggcaccta aaccatggat ttacagaacc agcaatcttg ccagcgggtg tccaagtagg      180
tttagcggct cgggctctgg tacagacttt accctgacta tctcctctct ccagcccgag      240
gattttgcca catattactg ccagcaatac cattcttacc ctccaacttt tggaggtggc      300
actaaggtgg agatcaag                                          318

```

<210> 41

<211> 106

5 <212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Secuencia de aminoácidos de la cadena ligera variable anti-DR5-05 humanizada

10

<400> 41

```

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

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

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

Arg Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser
          50           55           60

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

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

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

```

15



## REIVINDICACIONES

1. Una composición que comprende al menos uno o dos polipéptidos que se unen específicamente a un receptor DR5, en la que al menos uno o dos polipéptidos comprenden dos dominios de unión a inmunoglobulina que comprenden:

- un primer dominio de unión que comprende un par de cadenas VH y VL en donde la cadena VH contiene una CDR1 de la secuencia de SEQ ID NO: 13, una CDR2 de la secuencia de SEQ ID NO: 14 una CDR3 de la secuencia de SEQ ID NO: 15; y la cadena VL contiene una CDR1 de la secuencia de SEQ ID NO: 16, una CDR2 de la secuencia FAS, una CDR3 de la secuencia de SEQ ID NO: 17, y
- un segundo dominio de unión que comprende un par de cadenas VH y VL en donde la cadena VH contiene una CDR1 de la secuencia de SEQ ID NO: 18, una CDR2 de la secuencia de SEQ ID NO: 14, una CDR3 de la secuencia de SEQ ID NO: 19; y la cadena VL contiene una CDR1 de la secuencia de SEQ ID NO: 20, una CDR2 de la secuencia RTS, una CDR3 de la secuencia de SEQ ID NO: 21,

en donde

- el al menos un polipéptido comprende ambos dominios de unión a inmunoglobulina; o
- los al menos dos polipéptidos comprenden un primer polipéptido que comprende el primer dominio de unión y un segundo polipéptido que comprende el segundo dominio de unión; y un portador, diluyente o excipiente farmacéuticos.

2. La composición de la reivindicación 1, que comprende un polipéptido que se une específicamente a un receptor DR5, en donde dicho polipéptido comprende:

- uno o más de los pares de secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 2 y 4 y SEQ ID NO: 6 y 8,
- el par de secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 2 y 4,
- el par de secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 6 y 8, o
- ambos pares de secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 2 y 4 y SEQ ID NO: 6 y 8; o
- uno o más de los pares de secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 35 y 37 y SEQ ID NO: 39 y 41,
- el par de secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 35 y 37,
- el par de secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 39 y 41, o
- ambos pares de secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 35 y 37 y SEQ ID NO: 39 y 41.

3. La composición de la reivindicación 1, que comprende un polipéptido que se une específicamente a un receptor DR5, comprendiendo dicho polipéptido el par de secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 2 y 4, y otro polipéptido que se une específicamente a un receptor DR5, comprendiendo dicho polipéptido el par de secuencias de aminoácidos de SEC ID NO: 6 y 8.

4. La composición de la reivindicación 1, que comprende un polipéptido que se une específicamente a un receptor DR5, comprendiendo dicho polipéptido el par de secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 35 y 37, y otro polipéptido que se une específicamente a un receptor DR5, comprendiendo dicho polipéptido el par de secuencias de aminoácidos de SEC ID NO: 39 y 41.

5. La composición de la reivindicación 1, que comprende un polipéptido que se une específicamente a un receptor DR5, comprendiendo dicho polipéptido:

- ambos pares de secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 2 y 4 y SEQ ID NO: 6 y 8, o
- ambos pares de secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 35 y 37 y SEQ ID NO: 39 y 41.

6. La composición de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en donde el polipéptido o los polipéptidos es/son Fv, Fab, F(ab')<sub>2</sub>, scFv, anticuerpo, preferiblemente un anticuerpo monoclonal.

7. La composición de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, para su uso como un medicamento para inducir la apoptosis de una célula tumoral y/o para tratar el cáncer, preferiblemente un cáncer sólido.

8. Un polipéptido que se une específicamente a un receptor DR5, que comprende uno o dos dominios de unión que comprenden un par de cadenas VH y VL, en donde la cadena VH contiene una CDR1 de la secuencia de SEQ ID NO: 13, una CDR2 de la secuencia de SEQ ID NO: 14, una CDR3 de secuencia de ID SEC NO: 15; y la cadena VL contiene una CDR1 de la secuencia de SEQ ID NO: 16, una CDR2 de la secuencia FAS, una CDR3 de la secuencia de SEQ ID NO: 17.

9. Un polipéptido que se une específicamente a un receptor DR5, que comprende uno o dos dominios de unión que comprenden un par de cadenas VH y VL, en donde la cadena VH contiene una CDR1 de la secuencia de SEQ ID

NO: 18, una CDR2 de la secuencia de SEQ ID NO: 14, una CDR3 de secuencia de ID SEC NO: 19; y la cadena VL contiene una CDR1 de la secuencia de SEQ ID NO: 20, una CDR2 de la secuencia RTS, una CDR3 de la secuencia de SEQ ID NO: 21.

- 5 10. Un polipéptido biparatópico, biespecífico o multivalente que se une específicamente a un receptor DR5, que comprende:

- 10 - un primer dominio de unión que comprende un par de cadenas VH y VL en donde la cadena VH contiene una CDR1 de la secuencia de SEQ ID NO: 13, una CDR2 de la secuencia de SEQ ID NO: 14 una CDR3 de la secuencia de SEQ ID NO: 15; y la cadena VL contiene una CDR1 de la secuencia de SEQ ID NO: 16, una CDR2 de la secuencia FAS, una CDR3 de la secuencia de SEQ ID NO: 17, y
- 15 - un segundo dominio de unión que comprende un par de cadenas VH y VL en donde la cadena VH contiene una CDR1 de la secuencia de SEQ ID NO: 18, una CDR2 de la secuencia de SEQ ID NO: 14, una CDR3 de la secuencia de SEQ ID NO: 19; y la cadena VL contiene una CDR1 de la secuencia de SEQ ID NO: 20, una CDR2 de la secuencia RTS, una CDR3 de la secuencia de SEQ ID NO: 21.

11. Un nucleótido aislado que comprende la secuencia de nucleótidos SEQ ID NO: 1, 3, 5, 7, 34, 36, 38 o 40.

- 20 12. Un vector de expresión o una célula anfitriona que comprenden la secuencia de nucleótidos de acuerdo con la reivindicación 11.

- 25 13. Una composición que comprende dos polipéptidos, o anticuerpos o fragmentos de los mismos, ambos con la capacidad de unirse a DR5, un primer polipéptido o anticuerpo que comprende un primer sitio de unión a antígeno que se une a un primer epítipo de dicho DR5, siendo este primer epítipo aquel al que se une específicamente a un dominio de unión que comprende un par de cadenas VH y VL en donde la cadena VH contiene una CDR1 de la secuencia de SEQ ID NO: 13, una CDR2 de la secuencia de SEQ ID NO: 14 una CDR3 de la secuencia de SEQ ID NO: 15; y la cadena VL contiene una CDR1 de la secuencia de SEQ ID NO: 16, una CDR2 de la secuencia FAS, una CDR3 de la secuencia de SEQ ID NO: 17, y un segundo polipéptido o anticuerpo que comprende un segundo sitio de unión a antígeno diferente que se une a un segundo epítipo de dicho DR5, siendo este epítipo aquel al que se une específicamente un dominio de unión que comprende un par de cadenas VH y VL en donde la cadena VH contiene una CDR1 de la secuencia de SEQ ID NO: 18, una CDR2 de la secuencia de SEQ ID NO: 14, una CDR3 de la secuencia de SEQ ID NO: 19; y la cadena VL contiene una CDR1 de la secuencia de SEQ ID NO: 20, una CDR2 de la secuencia RTS, una CDR3 de la secuencia de SEQ ID NO: 21 para su uso como un medicamento para una administración simultánea, separada o secuencial a un mamífero, incluido el hombre .

- 35 14. Un anticuerpo biespecífico, o un fragmento del mismo, que tiene la capacidad de unirse a DR5, comprendiendo dicho anticuerpo un primer sitio de unión a antígeno que se une a un primer epítipo de dicho DR5, siendo este primer epítipo aquel al que se une específicamente un dominio de unión que comprende un par de cadenas VH y VL en donde la cadena VH contiene una CDR1 de la secuencia de SEQ ID NO: 13, una CDR2 de la secuencia de SEQ ID NO: 14 CDR1, una CDR3 de la secuencia de SEQ ID NO: 15; y la cadena VL contiene una CDR1 de la secuencia de SEQ ID NO: 16, una CDR2 de la secuencia FAS, una CDR3 de la secuencia de SEQ ID NO: 17 y un segundo sitio de unión a antígeno diferente que se une a un segundo epítipo de dicho DR5, siendo este epítipo aquel al que se une específicamente un dominio de unión que comprende un par de cadenas VH y VL en donde la cadena VH contiene una CDR1 de la secuencia de SEQ ID NO: 18, una CDR2 de la secuencia de SEQ ID NO: 14, una CDR3 de la secuencia de SEQ ID NO: 19; y la cadena VL contiene una CDR1 de la secuencia de SEQ ID NO: 20, una CDR2 de la secuencia RTS, una CDR3 de la secuencia de SEQ ID NO: 21.

- 50 15. Una composición o polipéptido de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, 8 a 10, o 14, o la composición para su uso de acuerdo con la reivindicación 13, para su uso para el tratamiento o la prevención de un cáncer, una enfermedad autoinmunitaria, una afección inflamatoria, una infección viral o una enfermedad viral.

MAb	H4		HS683		A172		T98G		U87-MG	
	%	IFM	%	IFM	%	IFM	%	IFM	%	IFM
mIgG1 CTRL	1+/-1	127+/-1	2+/-2	143+/-11	0+/-0	119+/-11	1+/-1	126+/-1	0+/-0	120+/-2
mDR5-01	90+/-1	284+/-2	87+/-6	264+/-30	94+/-0	296+/-3	94+/-0	299+/-4	75+/-1	226+/-4
mDR5-02	89+/-0	256+/-3	85+/-4	236+/-20	92+/-0	279+/-4	93+/-1	266+/-4	82+/-1	219+/-17
mDR5-04	90+/-0	283+/-4	88+/-2	243+/-13	97+/-1	308+/-10	96+/-1	314+/-6	80+/-3	219+/-13
mDR5-05	77+/-8	239+/-6	79+/-10	214+/-23	89+/-4	268+/-13	89+/-0	255+/-1	70+/-11	169+/-12

Fig.1

MAB	A704		ACHN		SW948		Caki1		5637		HCT116		MCF7	
	%	IFM	%	IFM	%	IFM	%	IFM	%	IFM	%	IFM	%	IFM
mIgG1 CTRL	0	136	1	139	1	208	1	165	1	160	1	172	1	176
mDR5-01	92	252	93	244	69	316	79	233	78	263	59	254	51	225
mDR5-05	75	225	82	211	32	245	68	214	51	188	43	224	33	192

Fig.2

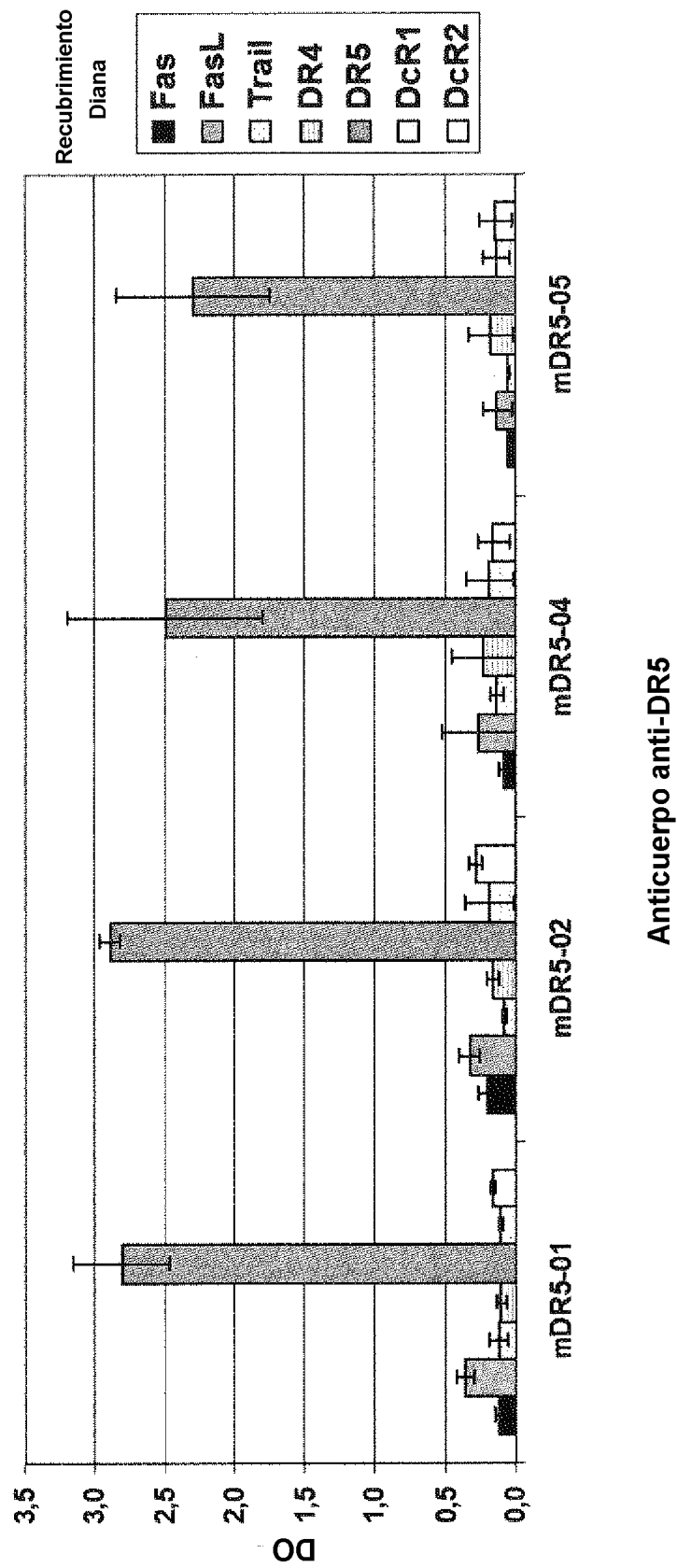


Fig.3

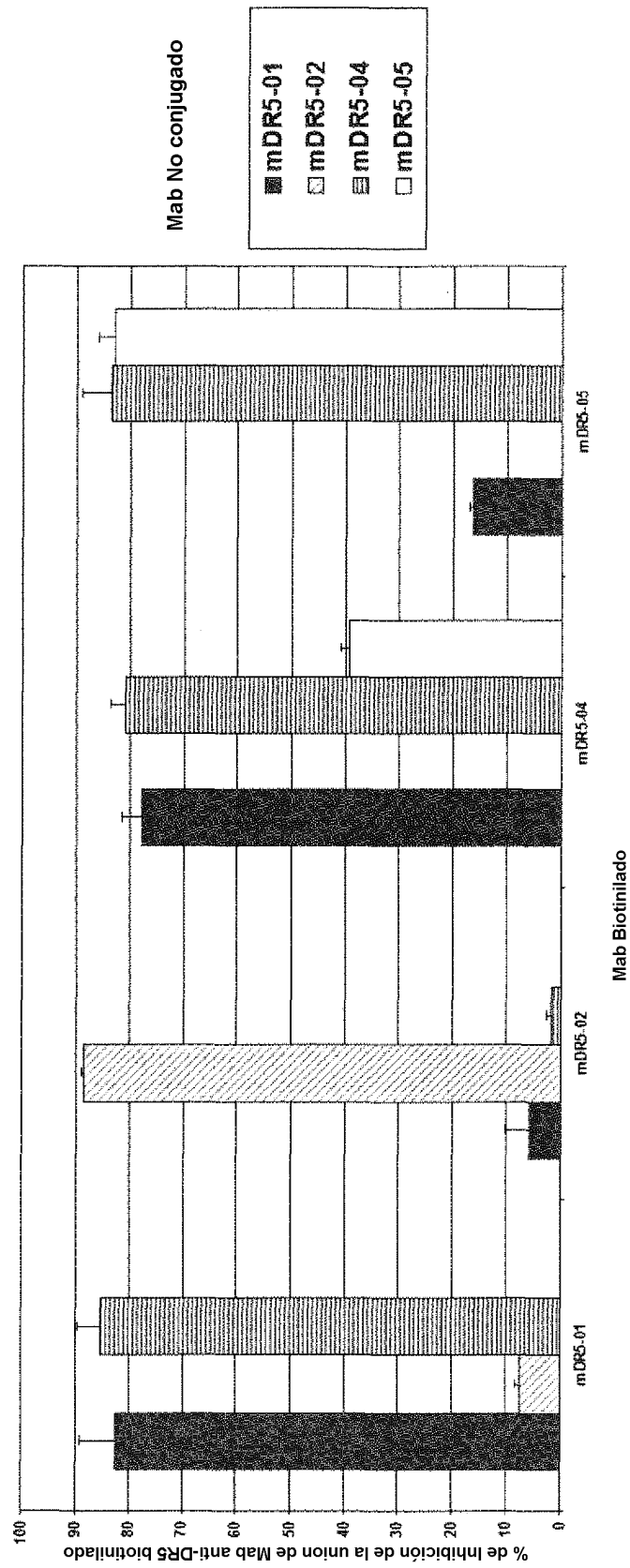


Fig.4

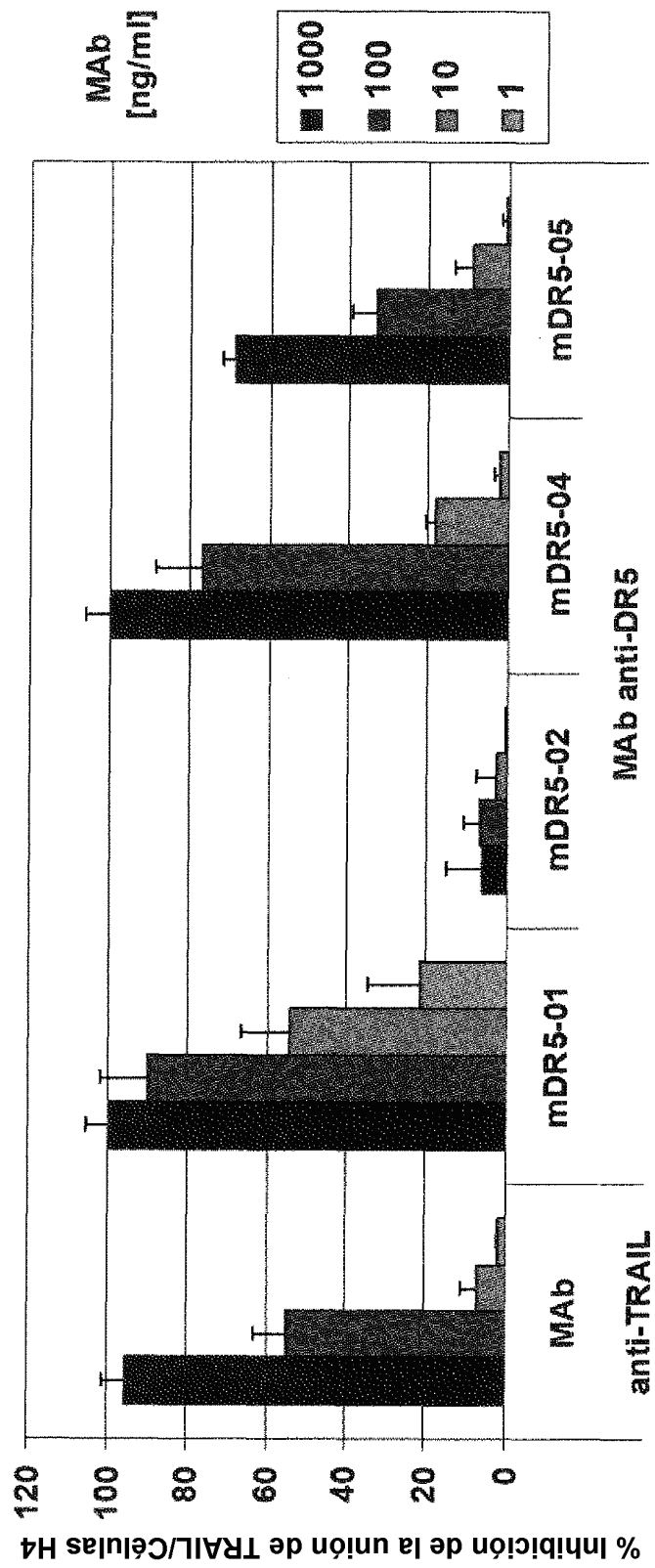


Fig.5

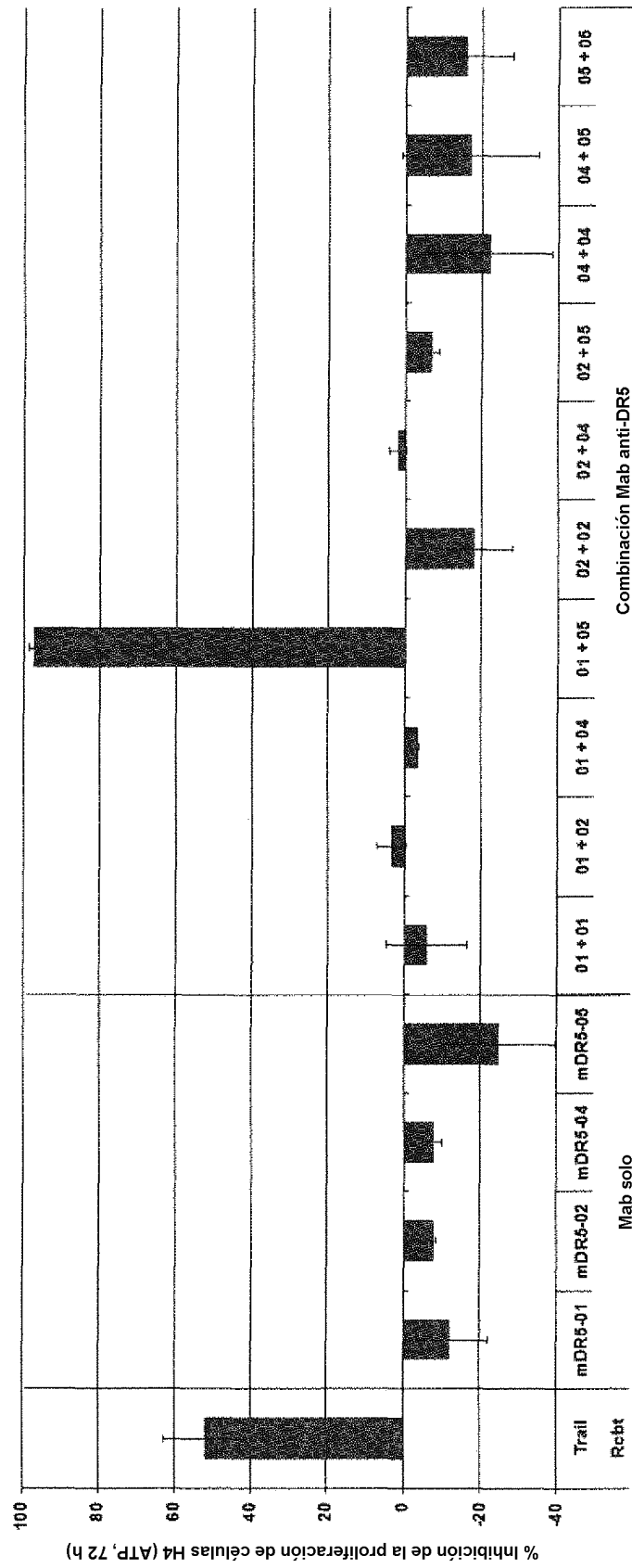


Fig.6

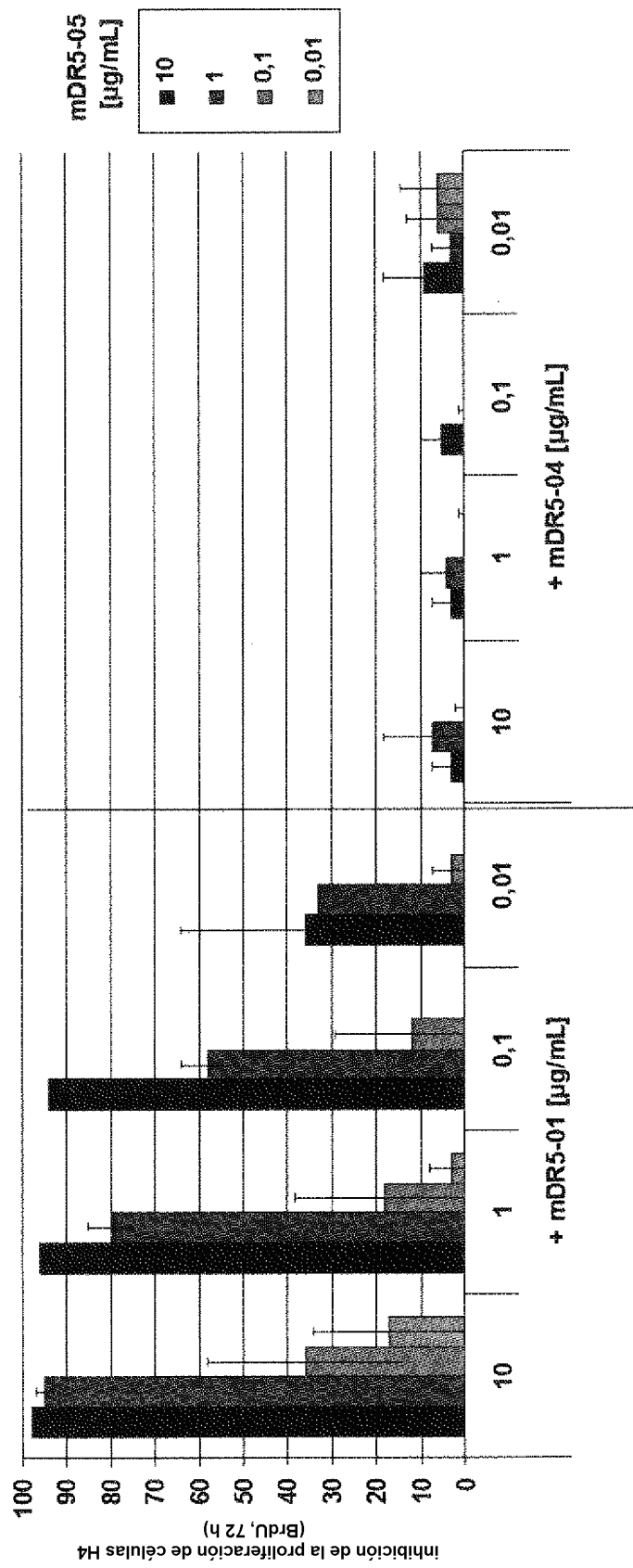


Fig.7



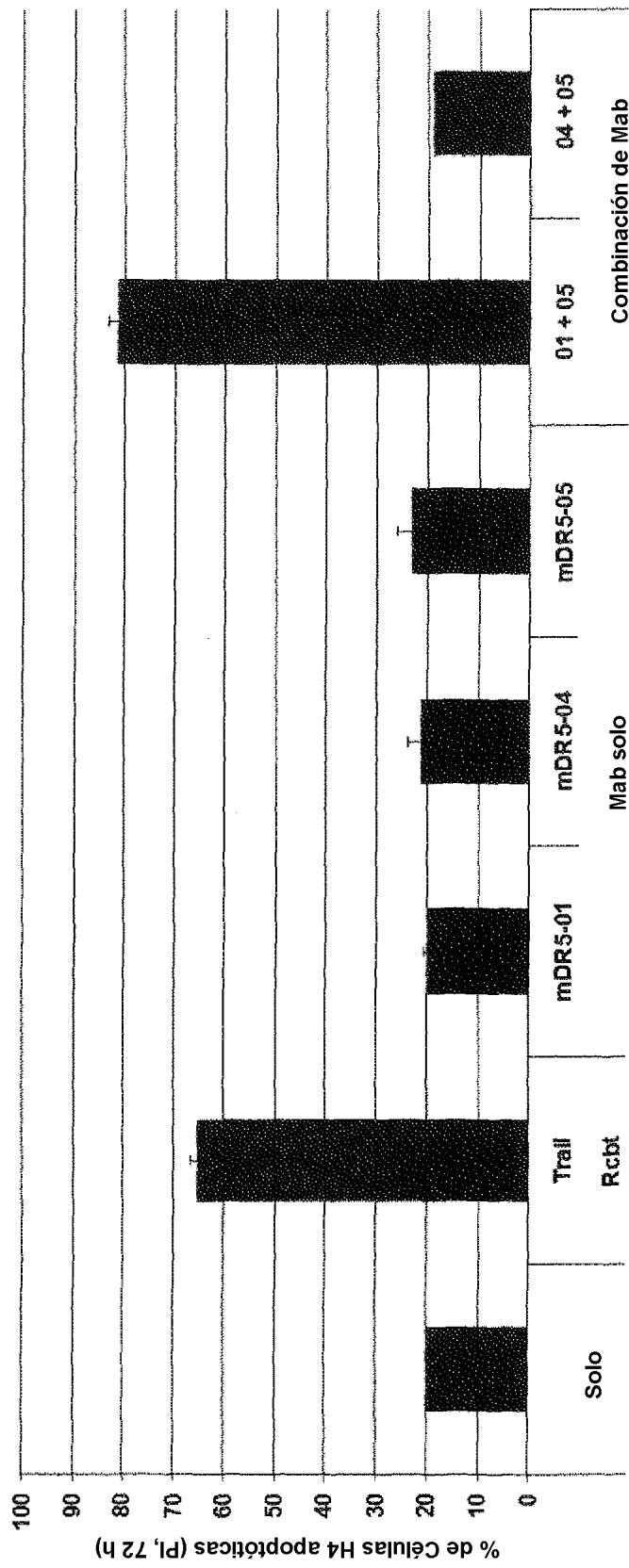


Fig.8

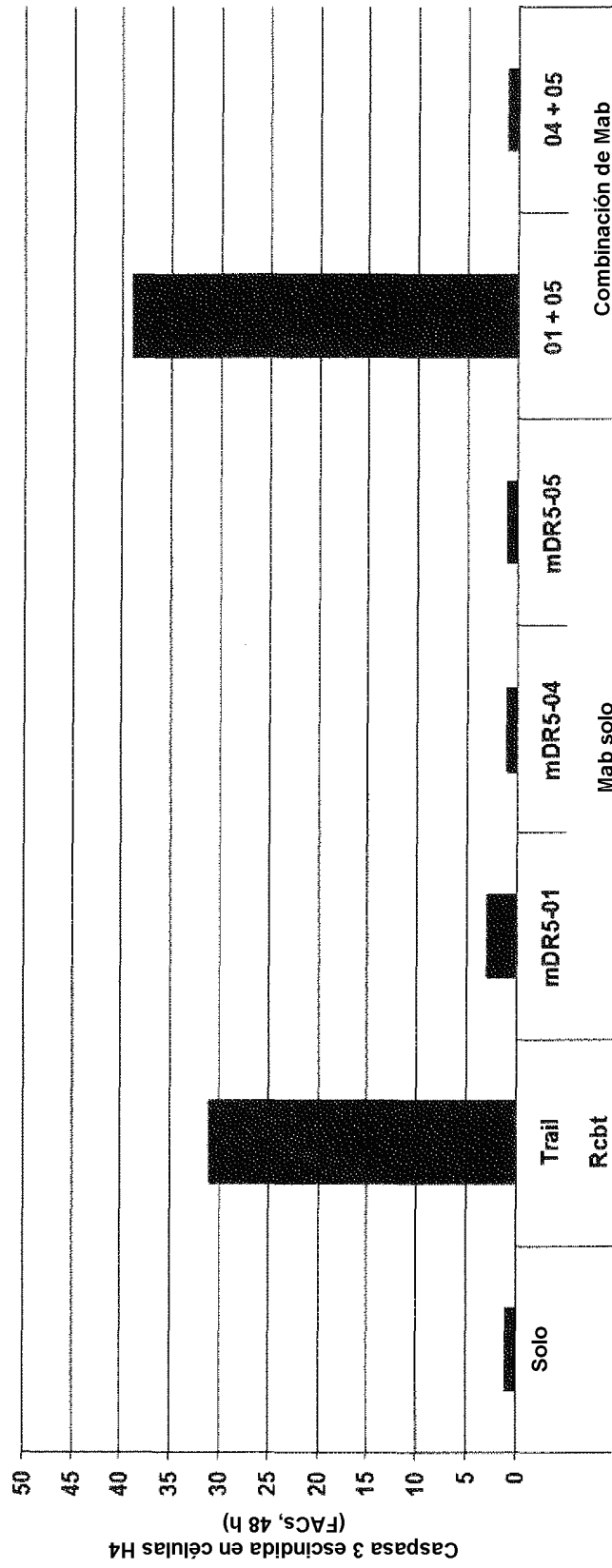


Fig.9

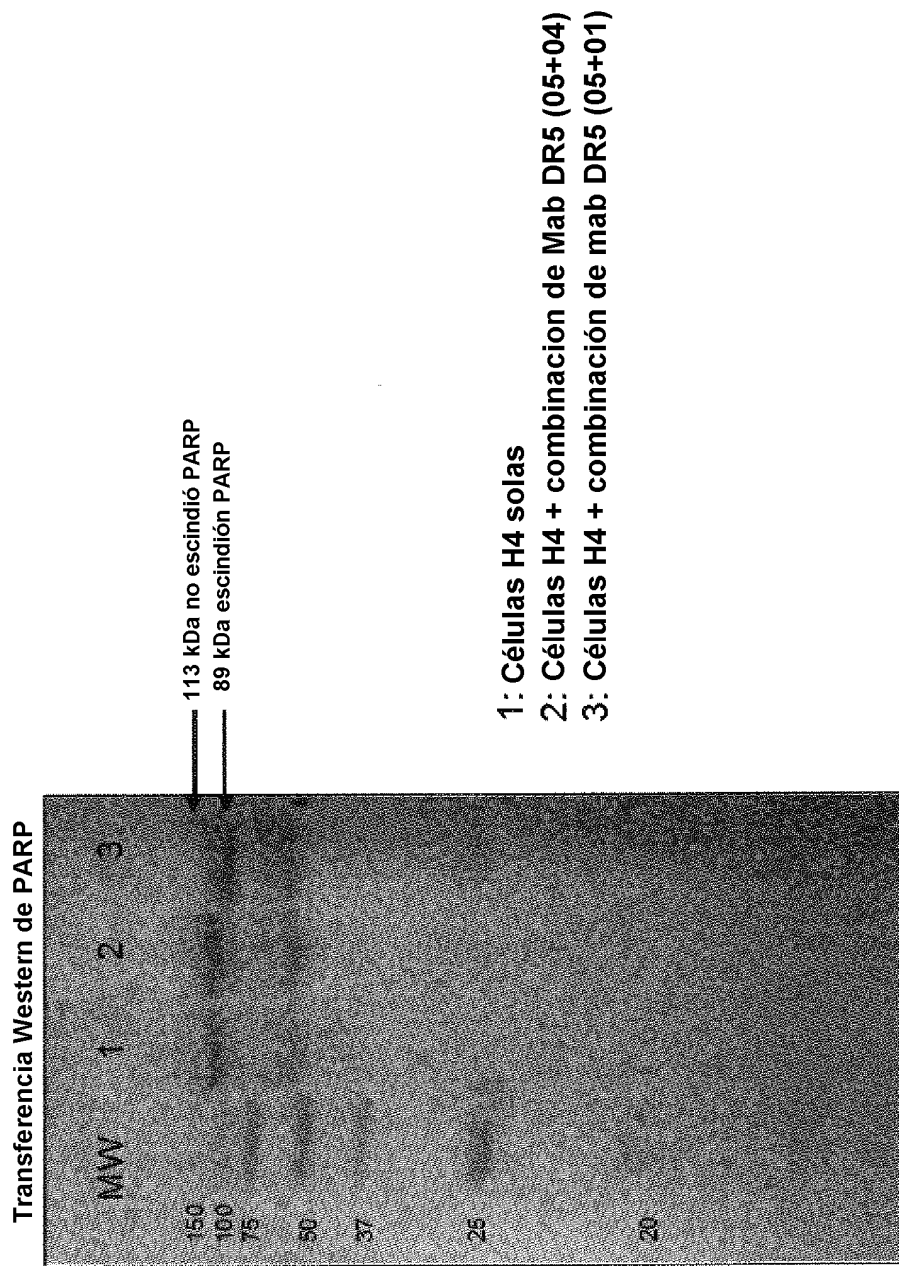


Fig.10

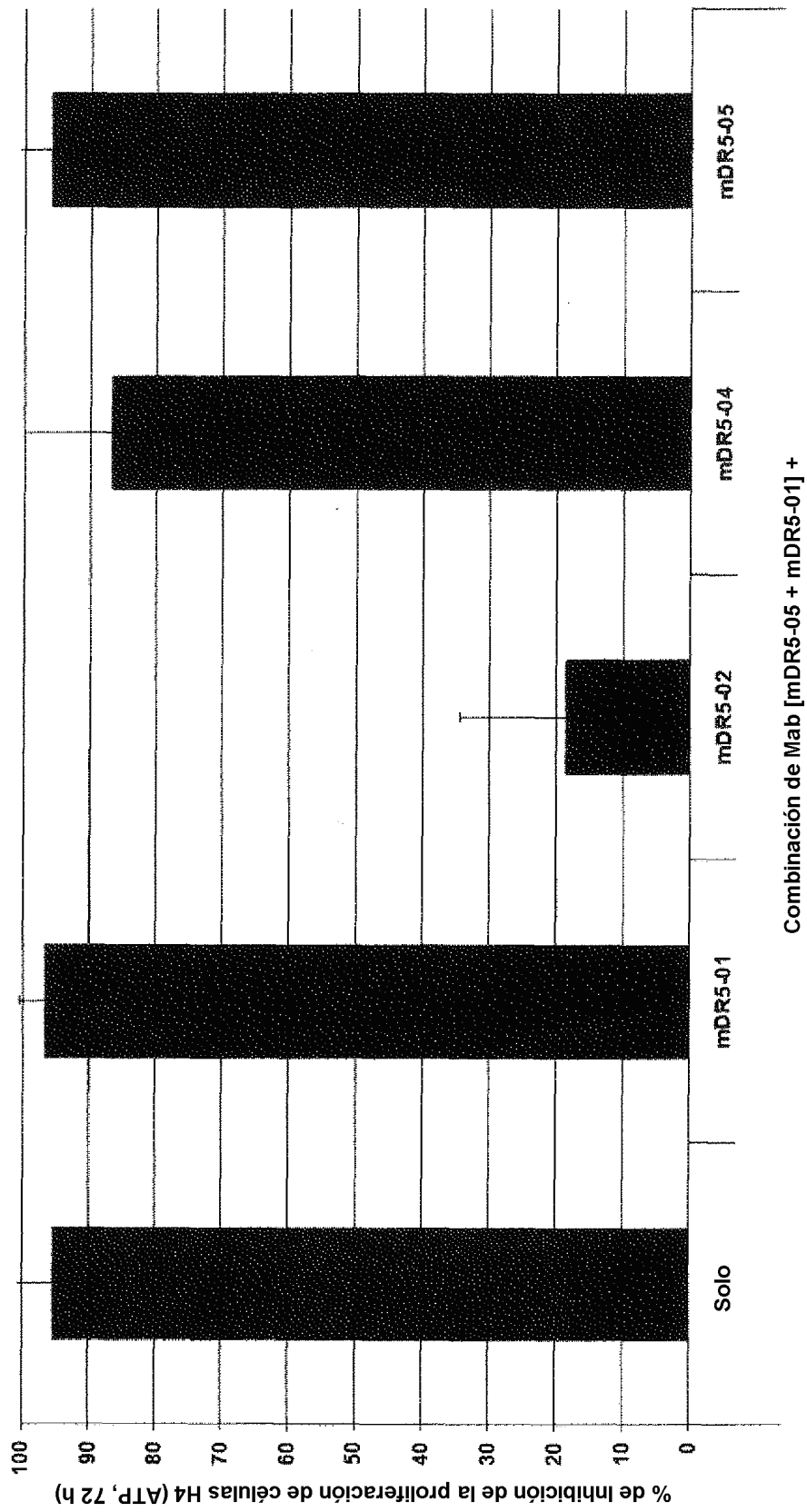


Fig. 11

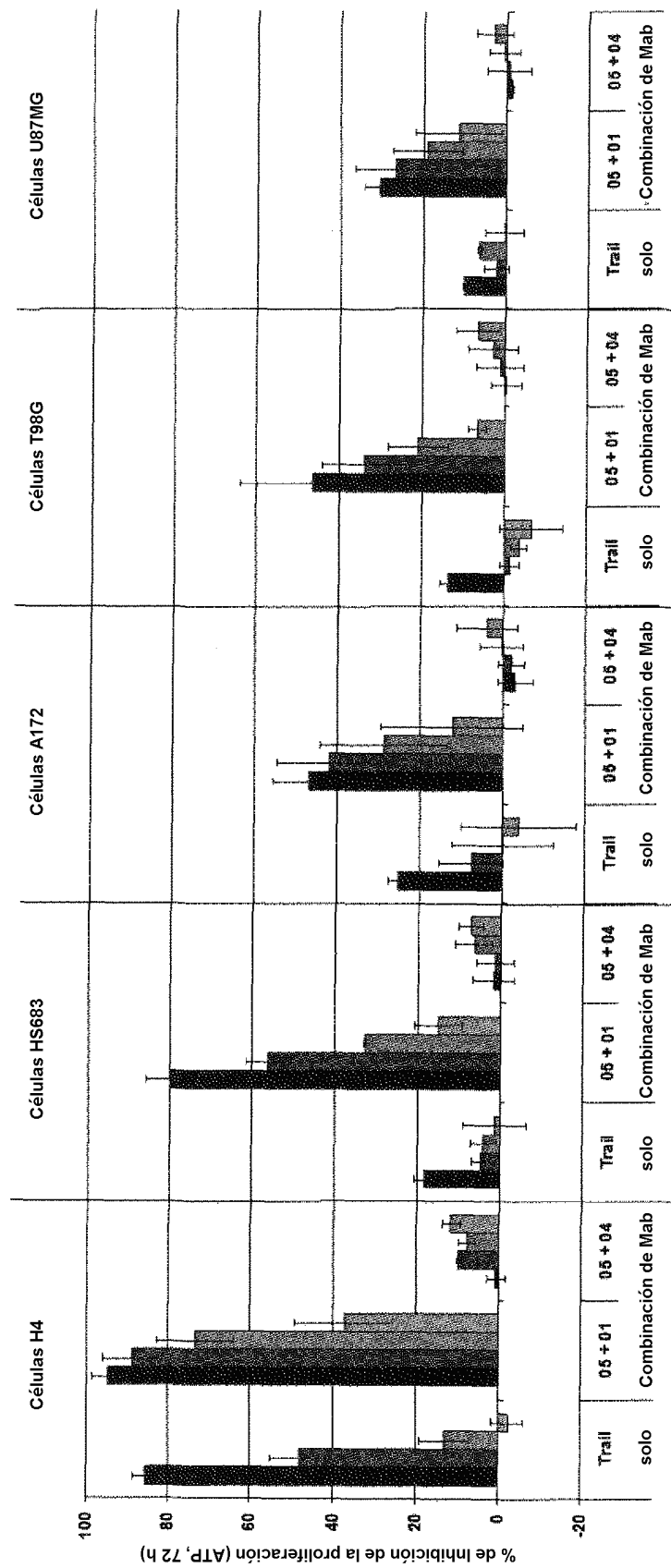


Fig.12

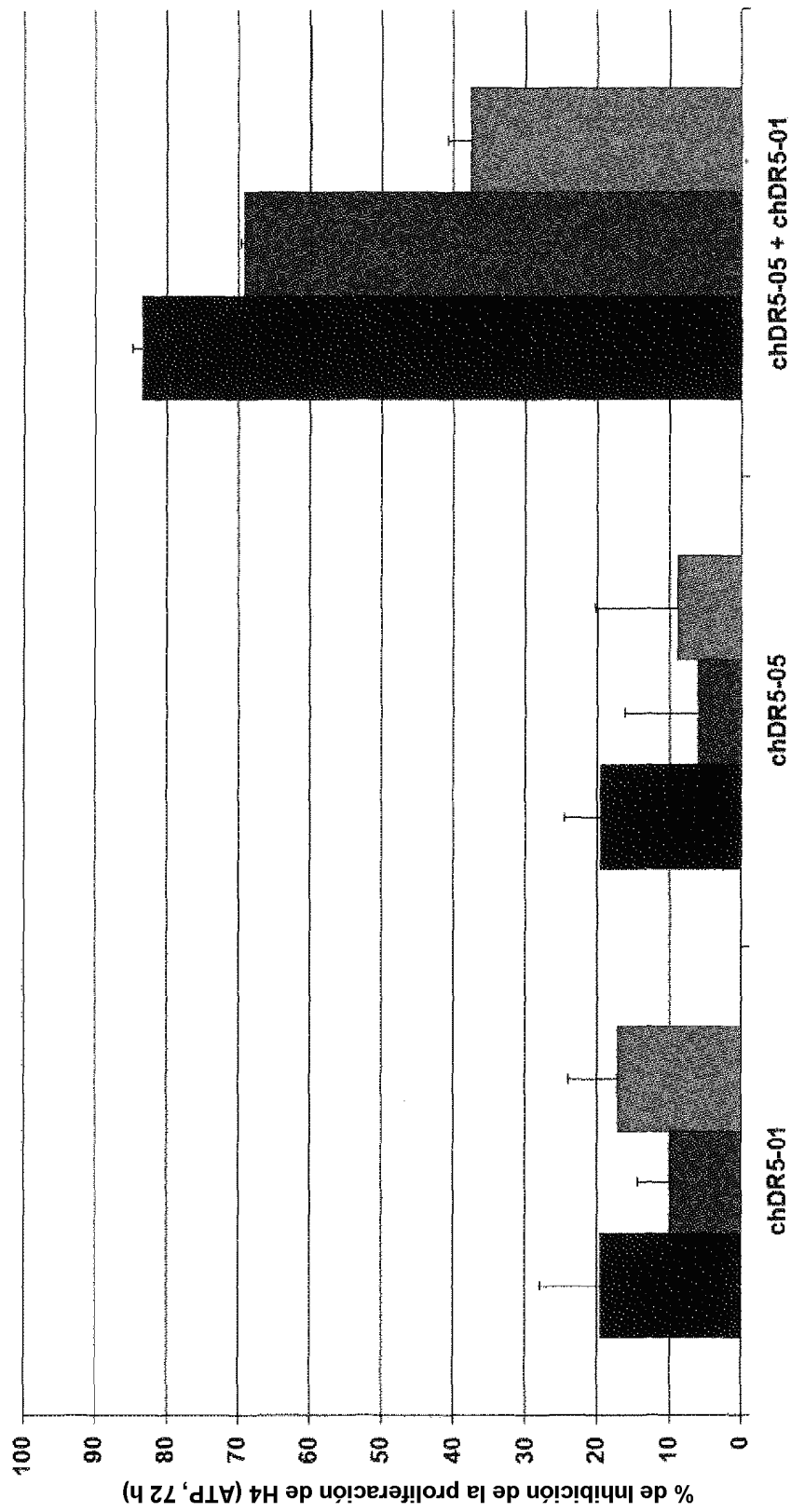


Fig. 13

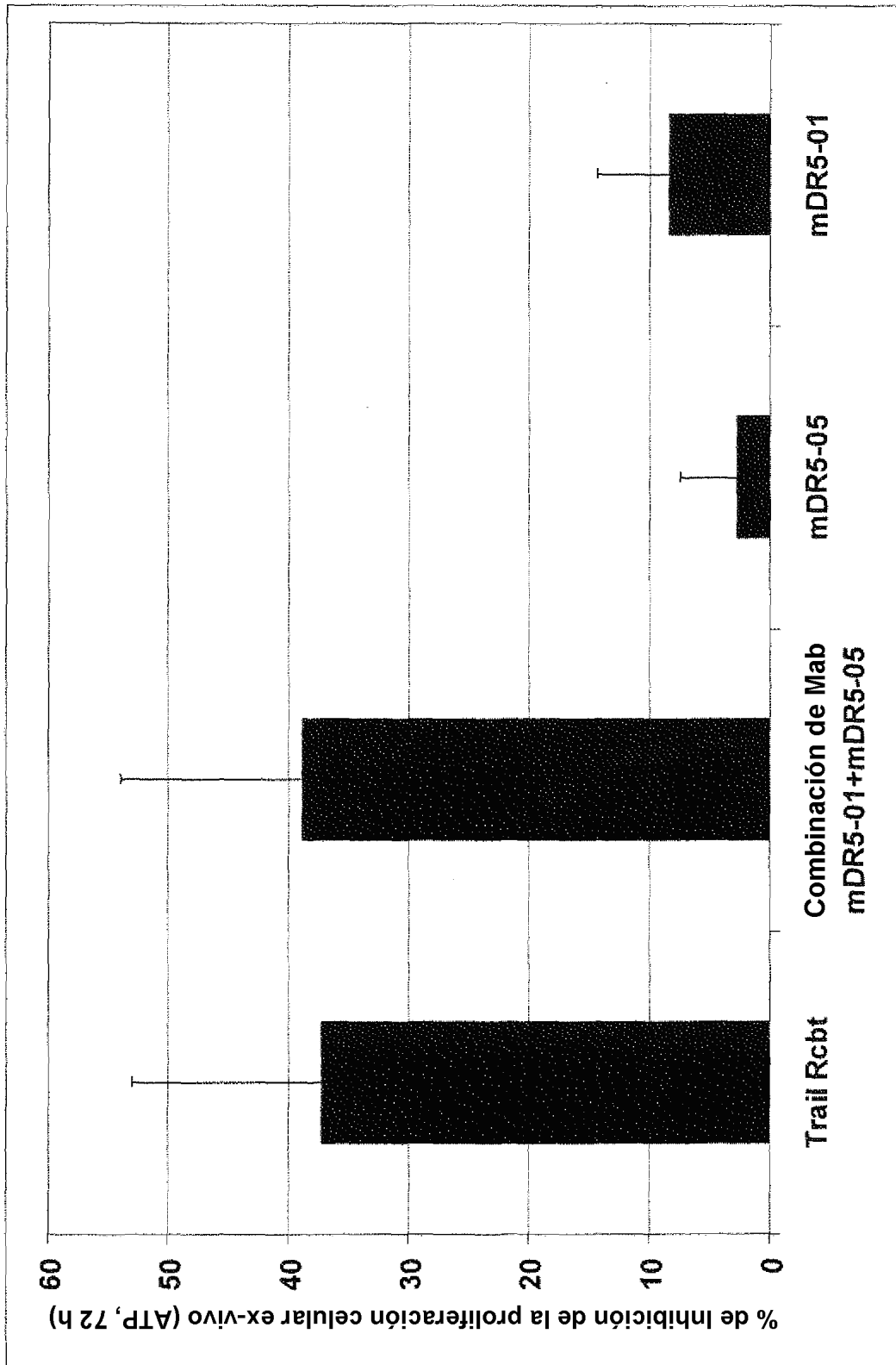


Figura 14

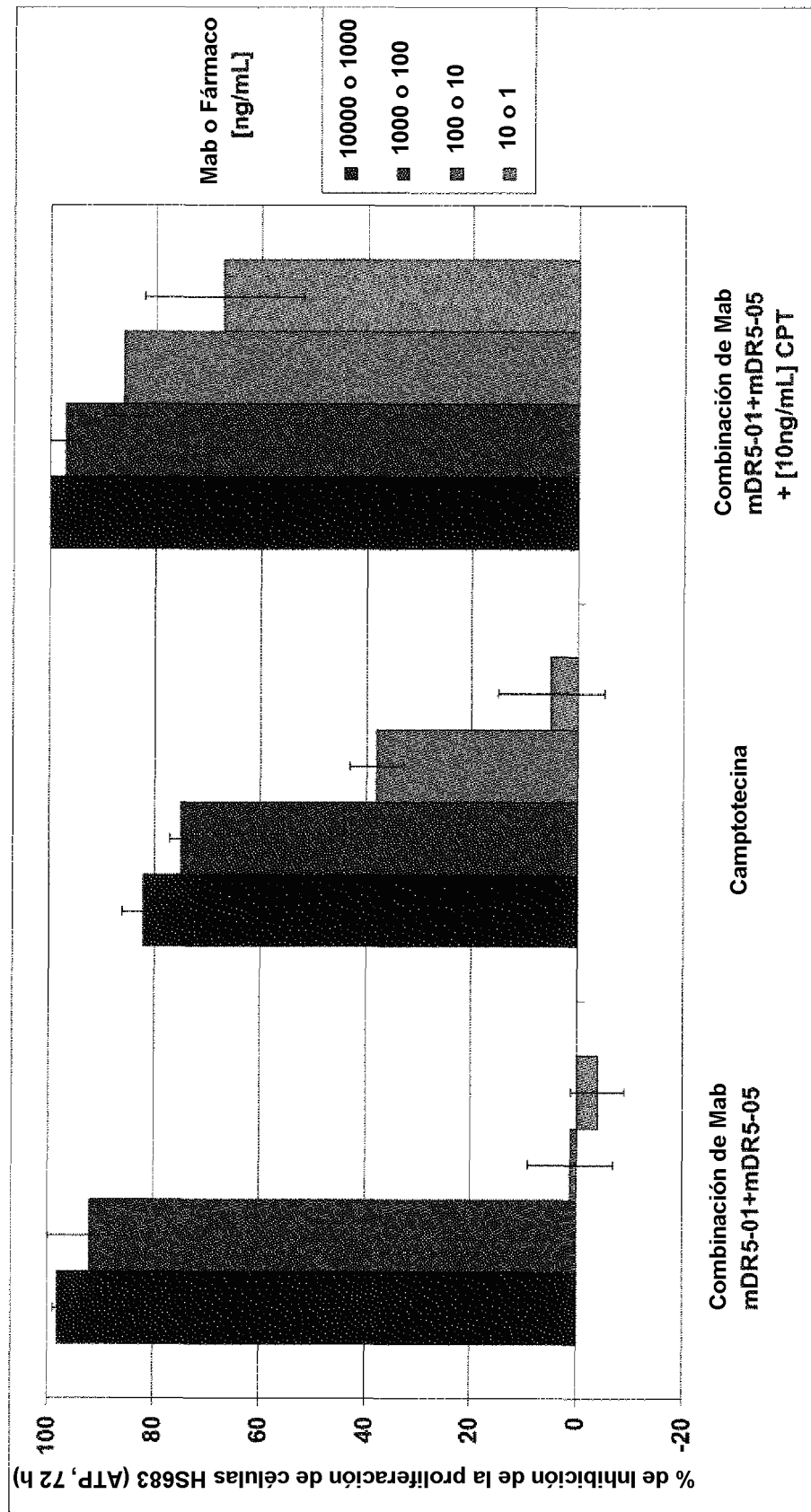


Figura 15



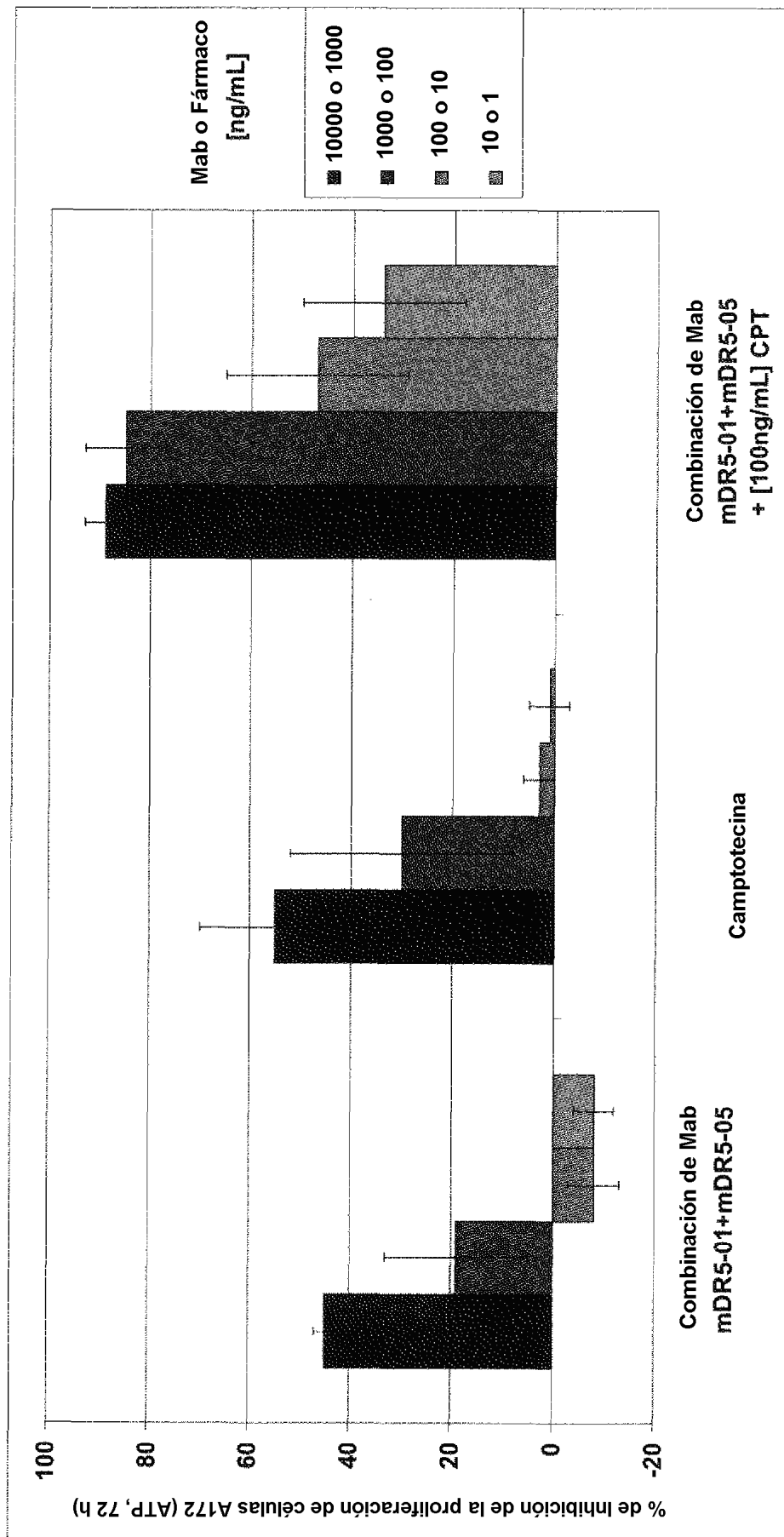


Figura 16

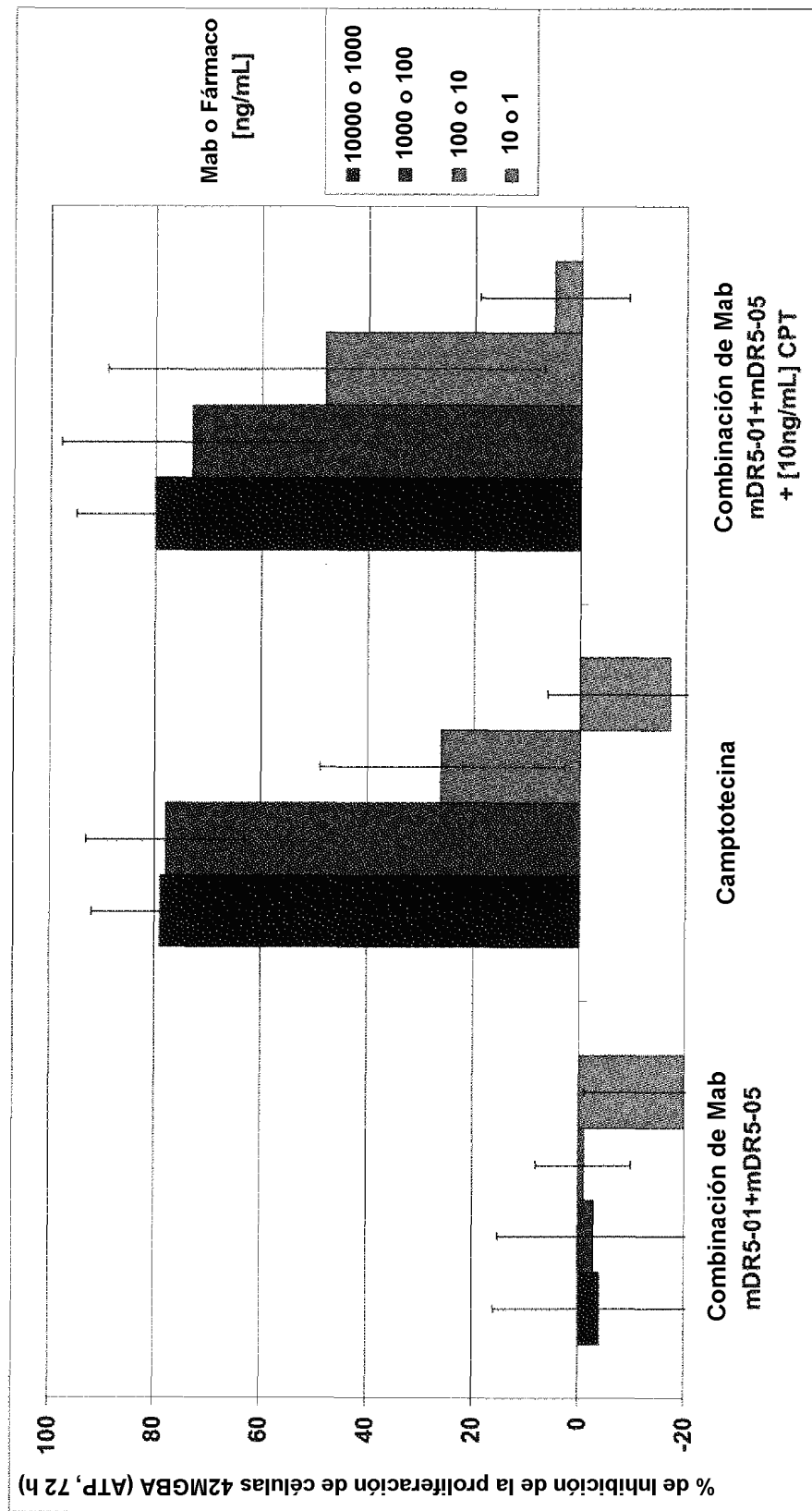


Figura 17

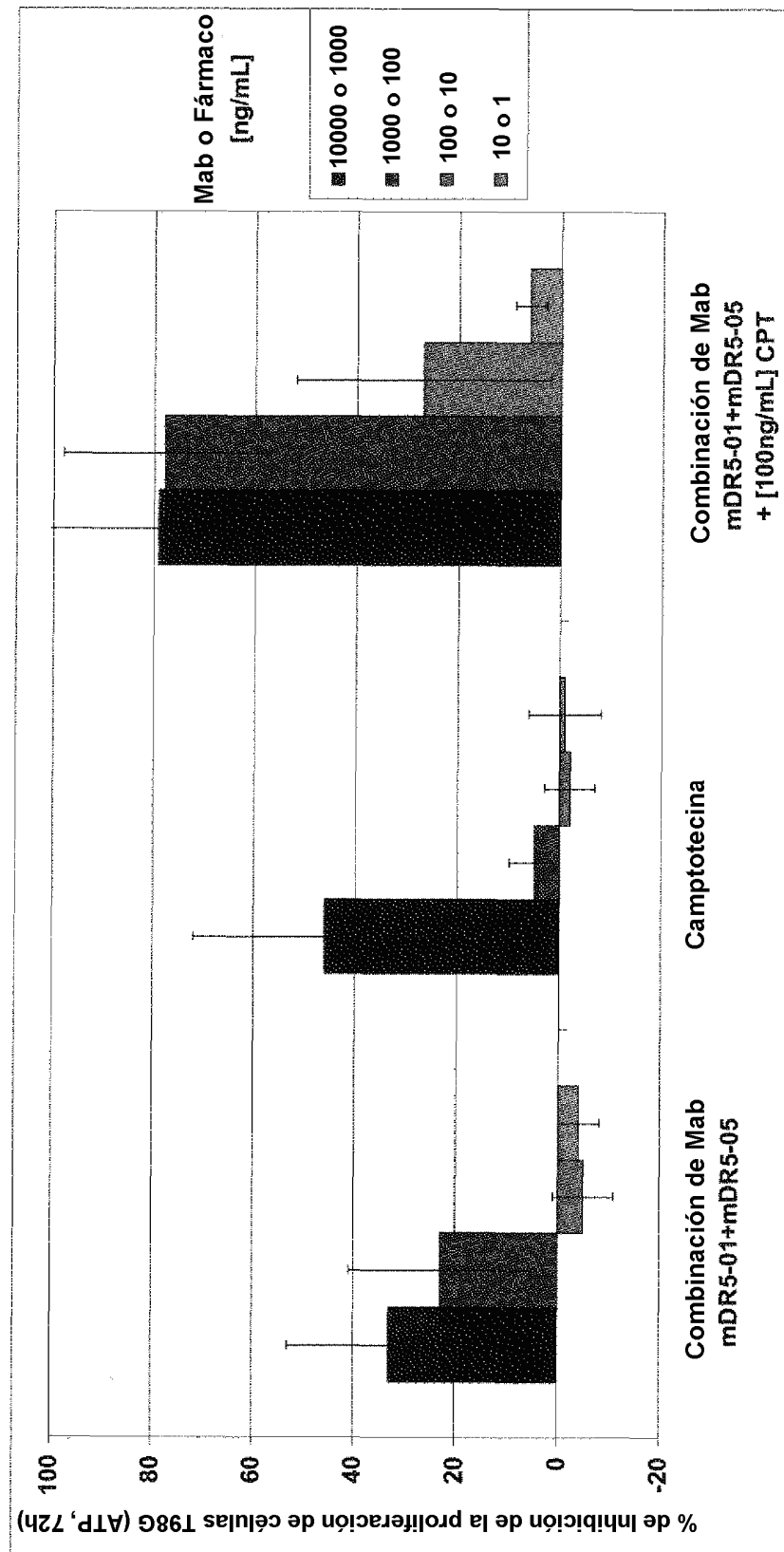


Figura 18

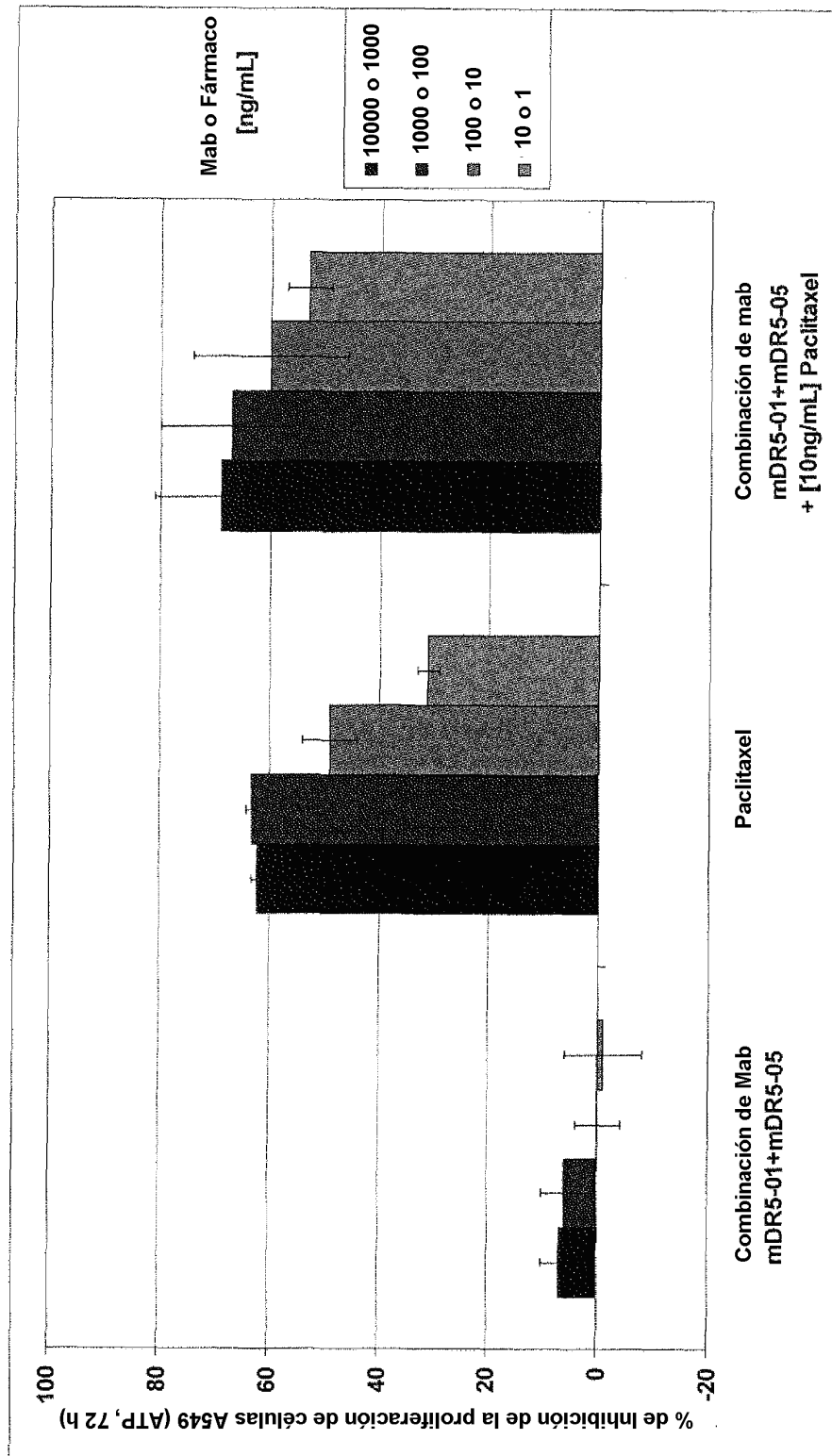


Figura 19

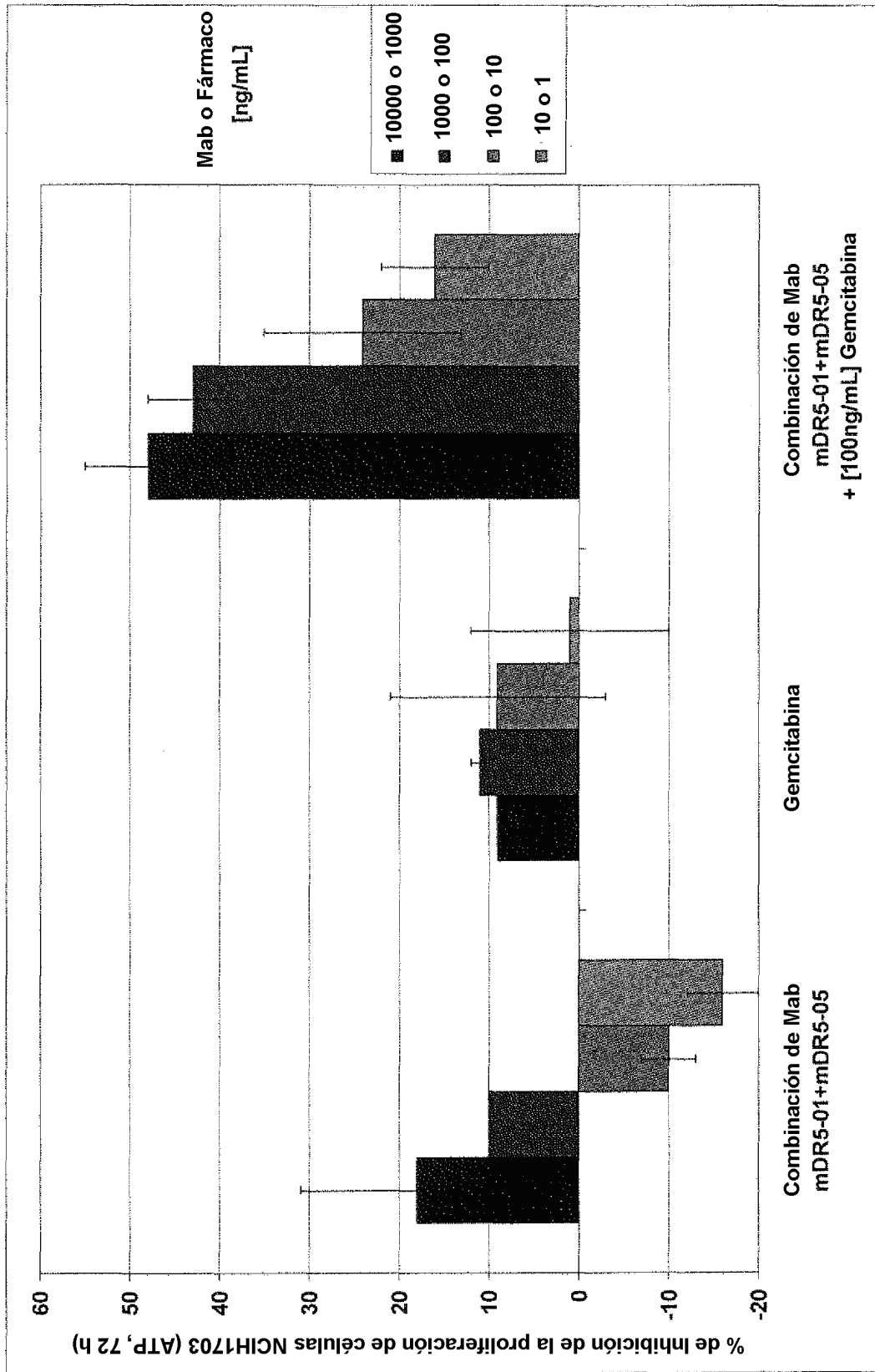


Figura 20

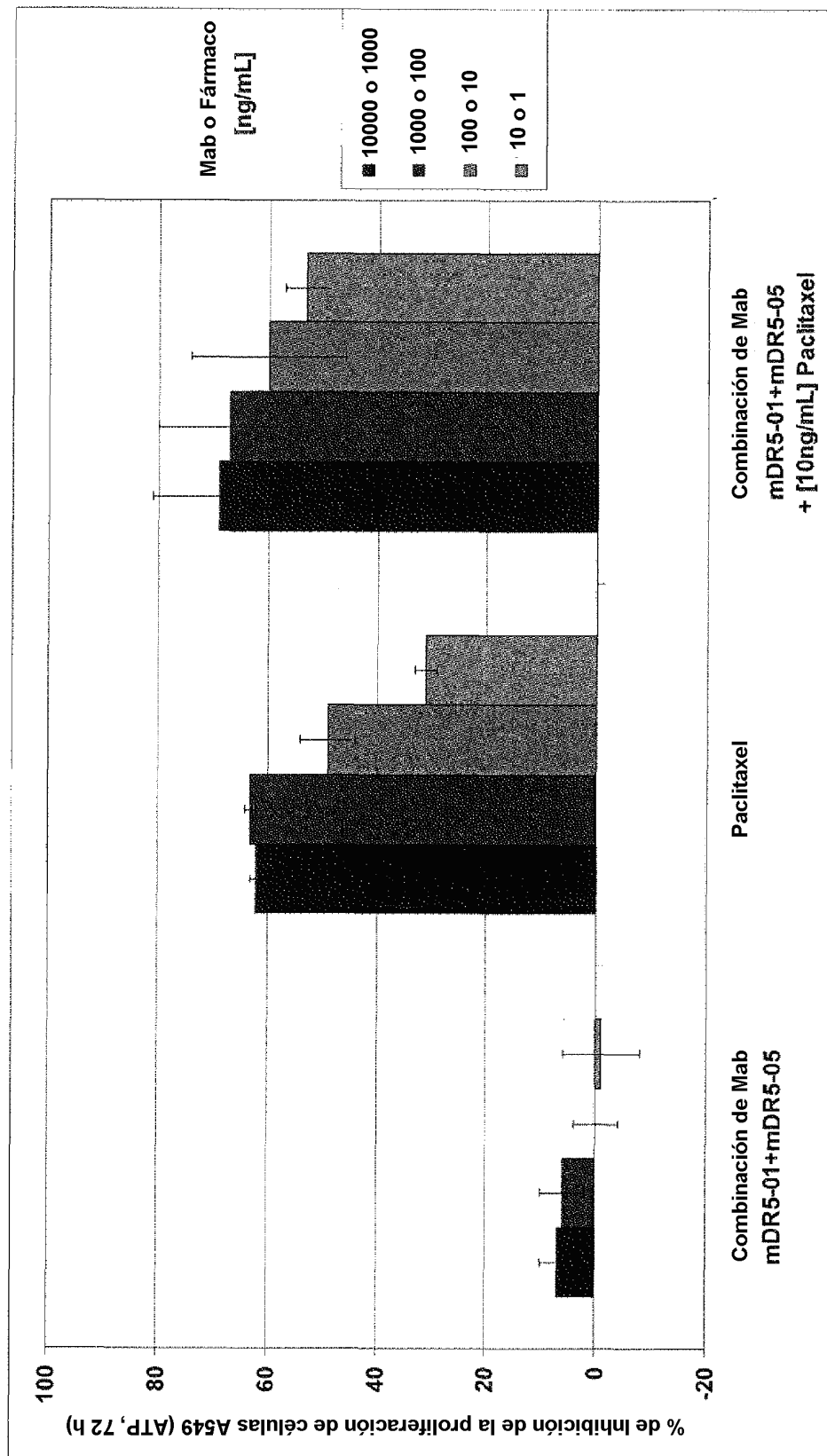


Figura 21

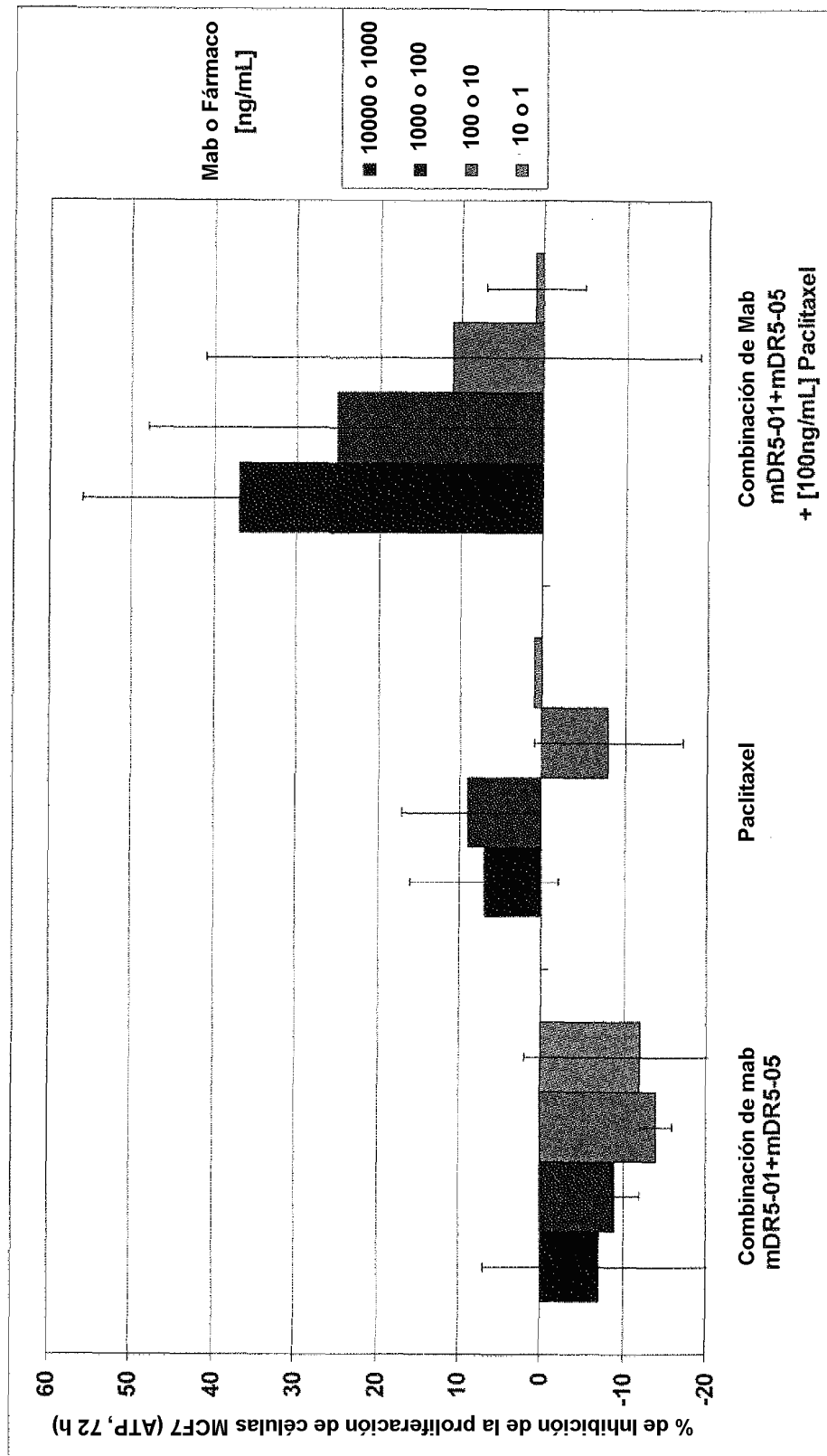


Figura 22

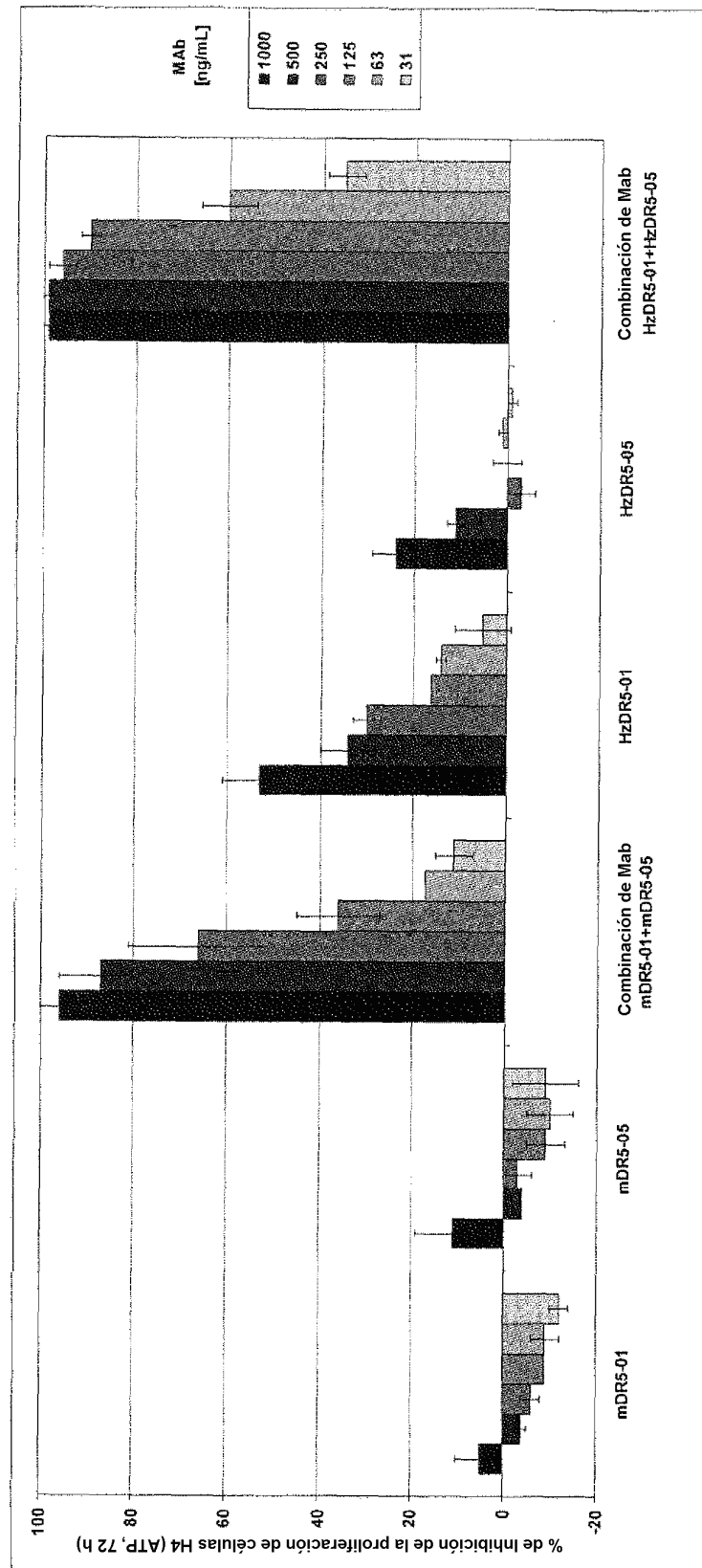


Figura 23



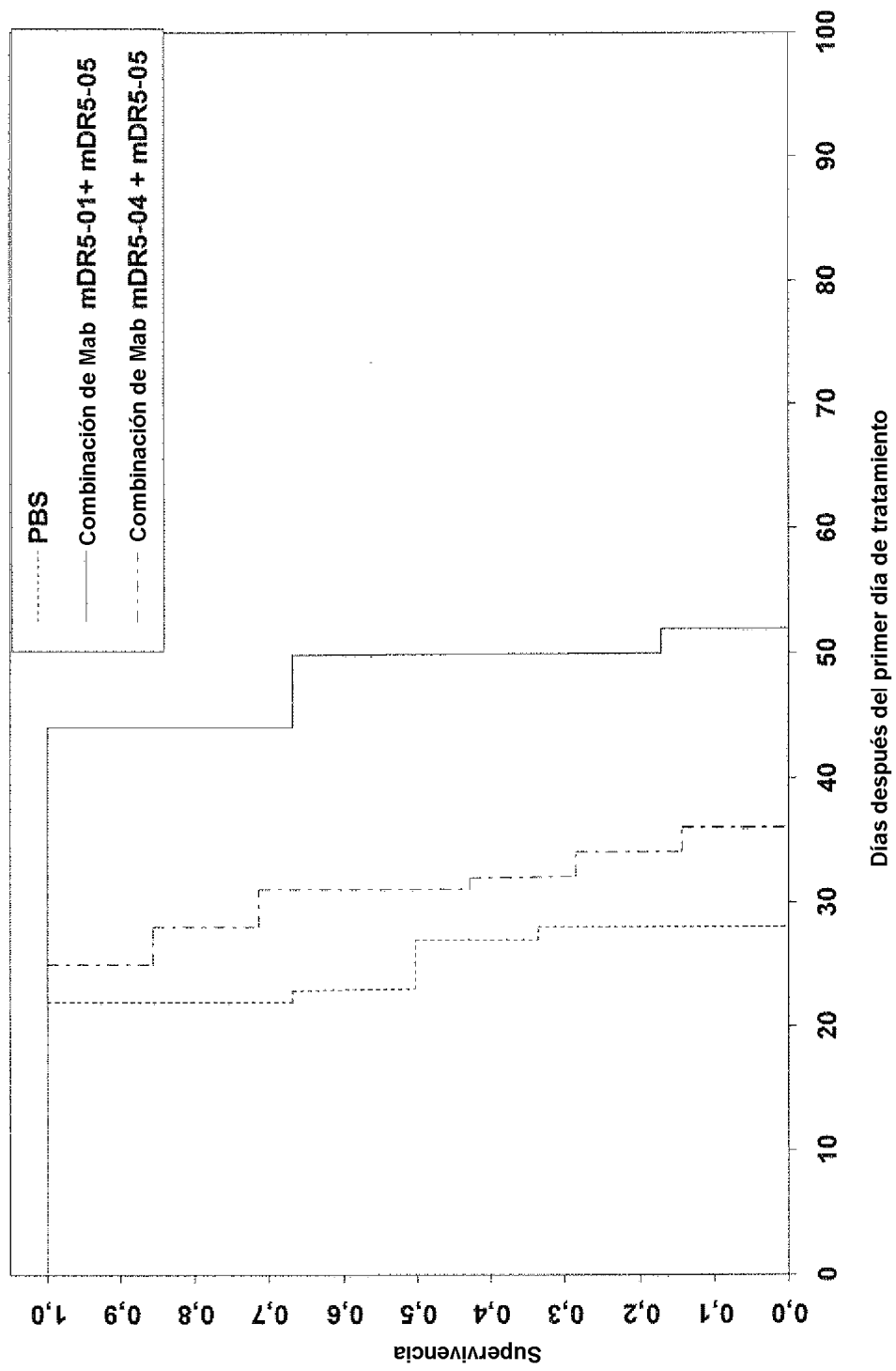


Figura 24

```

<----- H-PR1-IMGT -----
GAG GTG CAA CTG CAG CAA TCA GGA GCA GAA GTC GTA AAG CCC GGT GCC TCC GTT AAA CTT AGC
E V Q L Q Q S G A E V V K P G A S V K L S

----- H-CDR1-IMGT -----
TGC AAA GCA AGT GGG TTT AAT ATC AAA GAT ACA TTC ATC CAT TGG GTC AAA CAG GCA CCA GGC
C K A S G F N I K D T F I H W V K Q A P G

----- H-CDR2-IMGT -----
CAG GGC CTT GAA TGG ATC GGT CGC ATC GAC CCA GGT AAC GGA AAC ACT AAG TAT GAC CCT AAG
Q G L E W I G R I D P A N G N T K Y D P K

----- H-PR3-IMGT -----
TTC CAG GGA AAG GCT ACA ATT ACA ACA GAT ACA TCC TCC AAT ACC GCT TAC ATG GAG CTG TCT
F Q G K A T I T T D T S S N T A Y M E L S

----- H-CDR3-IMGT -----
TCC TTG CGG TCT GAG GAT ACT GCT GTG TAT TAC TGT GTA CGT GGG CTG TAC ACA TAT TAC TTC
S L R S E D T A V Y C V R G L Y T Y Y F

GAT TAT TGG GGC CAG GGG ACT CTT GTA ACC GTT TCC TCC
D Y W G Q G T L V T V S S

```

Figura 25

```

<----- L-FR1-IMGT -----
GAG ATT GTT ATG ACA CAG TCC CCT GCT ACA TTG AGT GTT AGT CCA GGC GAA AGA GCT ACA CTG
E I V M T Q S P A T L S V S P G E R A T L

----- L-CDR1-IMGT ----- L-FR2-IMGT -----
TCA TGT AGG GCC TCT CAG TCT ATT AGC AAT AAC CTG CAC TGG TAT CAG CAA AAG CCA GGT CAA
S C R A S Q S I S N N L H W Y Q Q K P G Q

----- L-CDR2-IMGT ----- L-FR3-IMGT -----
GCC CCC AGG CTG CTG ATT AAG TTT GCA TCT CAA AGT ATT ACA GGA ATC CCT GCT CGG TTC AGC
A P R L L I K F A S Q S I T G I P A R F S

----- L-CDR3-IMGT -----
GGC TCC GGG AGT GCA ACC GAG TTT ACA CTC ACA ATC TCA AGC CTC CAG TCC GAA GAC TTC GCC
G S G S G T E F T L T I S S L Q S E D F A

----- L-CDR3-IMGT -----
GTA TAT TAC TGT CAG CAG GGC AAC TCT TGG CCC TAC ACC TTC GGT CAG GGA ACC AAG CTG GAG
V Y Y C Q Q G N S W P Y T F G Q G T K L E

ATC AAG
I K

```

Figura 26

```

----- H-FR1-IMGT -----
CAA GTT CAG TTG GTA TCA TCA GGT GCA GAA GTT AAA AAG CCA GGG GCA TCT GTT AAA GTG TCT
Q V Q Q L V Q S G A E V K K K P G A S V K V S

----- H-CDR1-IMGT -----
TGC AAG GCC TCC GGC TTT AAT ATC AAG GAC ACA CAC ATG CAT TGG GTG CGC CAG GCC CCA GGC
C K A S G F N I K D T H M H W V R Q A P G

----- H-CDR2-IMGT -----
CAG CGA CTG GAG TGG AIT GGG CGT ATT GAC CCC GCC AAC GGC AAC ACC GAG TAT GAC CAG AAG
Q R L E W I G R I D P A N G N T E Y D Q K

----- H-FR3 - IMGT -----
TTT CAG GGC CGT GTA ACC ATC ACC GTC GAT ACC TCA GCA TCA ACC GCT TAC ATG GAG CTT TCA
F Q G R V T I T V D T S A S T A Y M E L S

----- H-CDR3-IMGT -----
TCT CTT CGG TCC GAA GAC ACA GGC GTC TAT TAC TGC GCT CGA TGG GGA ACA AAC GTT TAC TTT
S L R S E D T A V Y Y C A R W G T N V Y F

GCA TAT TGG GGT CAG GGT ACT CTC GTC ACC GTG AGC AGT
A Y W G Q G T L V T V S S

```

Figura 27

```

<----- L-FR1-IMGT -----
GAT ATT CAA CTT ACA CAA TCT CCC TCT TCT CTC TCC GGT TCA GTA GGG GAT AGA GTG ACC ATC
D I Q L T Q S P S L S A S V G D R V T I

-----> L-CDR1-IMGT <----- L-PR2-IMGT -----
ACT TGC TCT GCT TCT TCC AGC GTG TCA TAT ATG TAT TGG TAT CAG CAA AAG CCC GGC AAG GCA
T C S A S S V S Y M Y W Y Q Q K P G K A

-----> L-CDR2-IMGT <----- L-FR3-IMGT -----
CCT AAA CCA TGG ATT TAC AGA ACC AGC AAT CTT GCC AGC GGT GTT CCA AGT AGG TTT AGC GGC
P K P W I Y R T S N L A S G V P S R S G

TCC GGC TCT GGT ACA GAC TTT ACC CTG ACT ATC TCC TCT CTC CAG CCC GAG GAT TTT GCC ACA
S G S G T D F T L T I S S L Q P E D F A T

-----> L-CDR3-IMGT -----
TAT TAC TGC CAG CAA TAC CAT TCT TAC CCT CCA ACT TTT GGA GGT GGC ACT AAG GTG GAG ATC
Y Y C Q Q Y H S Y P P T F G G G T K V E I

AAG
K

```

Figure 28