Industria y Comercio

SUPERINTE

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

No. 12-135218- -00000-0000

Fecha: 2012-08-10 16:30:12 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 5

DELEGATURA DE PROPIEDAD INDUSTRIAL

DIRECCIÓN DE NUEVAS CREACIONES

SOLICITUD DE PATENTE DE INVENCIÓN

TITULO: POLIPÉPTIDOS AGONISTAS QUE SE ENLAZAN A DR5

SOLICITANTE: NOVARTIS AG y ABLYNX NV.

DIRECCIÓN: Lichtstrasse 35, CH- 4056 Basel, Suiza y Technologiepark 4, B-9052 Zwijnaarde, Belgium

APODERADO: CARLOS R. OLARTE

BOGOTÁ: 10 de agosto de 2012

P2012/000100

OLARTEMOURE

OLARTE MOURE & ASOC

Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

No. 12-135218- -00000-0000

Fecha: 2012-08-10 16:30:12 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 5

PETITORIO - FORMULARIO ÚNICO DE SOLICITUD
PATENTE PCT
ENTRADA EN FASE NACIONAL **P2012/000100**

SOLICITUD DE:

(1)

[X] Patente de Invención. [ ] Patente de Modelo de Utilidad.

[X] Capítulo I. [ ] Capítulo II.

(2)

SOLICITANTE (71)

Nombre: NOVARTIS AG y ABLYNX NV
Dirección: Lichtstrasse 35, CH-4056 Basel y Technologiepark 4, B-9052 Zwijnaarde, Belgium
Nacionalidad o Domicilio: Suiza y Belga
Lugar de Constitución: Suiza y Belga
Teléfono: _____ **Fax:** _____
E-mail: _____

IDENTIFICACIÓN
C.C. [ ] **NIT** [ ]
C.E. [ ] **Otro** [ ]
Cual _____
Número _____

REPRESENTANTE O APODERADO

Nombre: CARLOS R. OLARTE
Dirección: Carrera 5 No 34-03 Bogotá D.C.
Teléfono: 601-7700 **Fax:** 601-7799
E-mail: office@olartemoure.com

IDENTIFICACIÓN
C.C. [X] **NIT** [ ]
C.E. [ ] **Otro** [ ]
Cual _____
Número 79782747Bta
TP 74.295

INVENTOR (ES) (72)

Nombre: VER PAGINA ADJUNTA.
Dirección: VER PAGINA ADJUNTA.
Nacionalidad o Domicilio: VER PAGINA ADJUNTA.

(5) **PCT (86)**

Solicitud Internacional No. PCT/EP2011/051958 Fecha Febrero 10, 2011

Publicación Internacional No. WO2011/098520 Fecha Agosto 18, 2011

(6) **Título (54)** **POLIPÉPTIDOS AGONISTAS QUE SE ENLAZAN A DR5**

Clasificación Internacional (51) C07D 16/28; A61K 39/395.

Prioridad

SI [X] **NO** [ ]

(33) País de Origen	(32) Fecha	(31) Número de Solicitud
US	Febrero 10, 2010	61/303.173
US	Febrero 26, 2010	61/308.599

(9) **Comprobante de pago No.** 12- **Fecha** _____

(10) **ANEXOS**

[x]	Comprobante de pago de la tasa de presentación de la solicitud.
[x]	Documento que acredita la existencia y representación legal cuando el solicitante sea persona jurídica.
[x]	Poderes, si fuere el caso.
[ ]	Documento de cesión del inventor al solicitante o a su causante.
[ ]	Declaraciones. Declaración bajo la Regla 4.17 (ii) del PCT.
[x]	Copia de la solicitud internacional. (Resumen, descripción, reivindicaciones, dibujos).
[x]	Traducción de la solicitud internacional al castellano. (Resumen, descripción, reivindicaciones, dibujos).
[ ]	Copia del examen preliminar internacional efectuado por la Autoridad Internacional de Examen Preliminar (IPEA).
[ ]	Traducción del examen preliminar internacional efectuado por la IPEA.
[ ]	De ser el caso, copia del contrato de acceso.
[ ]	De ser el caso, documento que acredite la licencia o autorización de uso de conocimientos tradicionales de las comunidades indígenas.
[ ]	De ser el caso, certificado de depósito del material biológico.
[ ]	Arte final 12 x 12.
[ ]	De ser el caso, información sobre otras solicitudes de patente o títulos obtenidos en el extranjero por el mismo titular o su causante, relacionadas parcial o totalmente con la invención de esta solicitud.
[ ]	De ser el caso, modificaciones efectuadas a la solicitud internacional.
[x]	Otros. Búsqueda Internacional

(11) **FIGURA CARACTERÍSTICA:**

(12) Solicito la concesión de la patente,

NOMBRE: CARLOS R. OLARTE FIRMA:

C.C. 79.782.747 Btá T.P. 74.295

3

LISTA DE INVENTORES

PCT/EP2011/051958

Karen CROMIE
Technologiepark 4,
B-9052 Zwijnaarde
Belgium
Citizen: United Kingdom

Bruno DOMBRECHT
Technologiepark 4,
B-9052 Zwijnaarde
Belgium
Citizen: Belgium

Seth ETTENBERG
250 Massachusetts Avenue,
Cambridge, Massachusetts 02139
United States of America
Citizen: United States of America

Joost KOLKMAN
Technologiepark 4,
B-9052 Zwijnaarde
Belgium
Citizen: Netherland

Jing LI
200 Technology Square,
Cambridge, Massachusetts 02139
United States of America
Citizen: United States of America

Kris MEERSCHAERT
Technologiepark 4,
B-9052 Zwijnaarde
Belgium
Citizen: Belgium

David Raymond STOVER
15093 Hesby ST, Sherman Oaks,
California 91403
United States of America
Citizen: United States of America

Jingxin ZHANG
8 Shoreview Lane, Walpole,
Massachusetts, 02081
United States of America
Citizen: Chinese

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
NIT : 800.176.089-2
- / -

Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

RECIBO DE CAJA

No. 12 - 0070951

Bogotá D.C., Julio 12 de 2012 - 14:34:37

RECIBIDO DE : OLARTE MOURE & ASOCIADOS NI 830.122.870

*** Soporte del Pago ***

TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PAGO	VR.PAGO
CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	455532582	11/07/2012	8.025.000.00

*** Conceptos Pagados ***

CANT	RENTISTICO	CONCEPTO	Vr.UNDITARIO	Vr.CONCEPTO
1	50005-01-01 SOLICITUDES	1 TRAMITES DE SOL. DE PATENTE DE INVENCION	590.000.00	590.000.00
				$590.000.00

SON: **QUINIENTOS NOVENTA MIL PESOS MONEDA CORRIENTE

Responsable: _____

Recibo de Caja Aplicado al Expediente No. _____

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

No. 12-135218- -00000-0000

Fecha: 2012-08-10 16:30:12 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 5

Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

PLANILLA DE RADICACIÓN - DIGITALIZACIÓN DIARIA
RELACIÓN DE ANEXOS

Dependencia:	Fecha: _____/ _____/ _____/ AAAA MM DD	Recorrido:
Tipo de Radicación: Entrada: ☐ Salida: ☐ Traslado: ☐ Convenio: ☐		
Radicador:		Planilla:

ID	*No. Radicación*	*Consecutivo*	*Item*
1	1		
2	12-135218--0		
3			
4			
5			
6			
7			
8			
9			
10			
11			
12			
13			
14			
15			
16			
17			

Item	*Unidad de Conservación*
1	Bolsa
2	Caja
3	Libro
4	Sobre
5	Tomo
6	**Otro**
Item	***Soporte Documental***
7	CD
8	Disquete
9	DVD
10	Folleto
11	Foto
12	Periódico
13	Plano
14	Publicación Periódica
15	USB
10	**Otro**

Observaciones:

Anexan : CD

Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

No. 12-135218- -00000-0000

Fecha: 2012-08-10 16:30:12 Dep: 2020 DIR.NUEVASCR
Tra: 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act: 411 PRESENTACION Folios: 5

PATENTE DE INVENCIÓN ☐ MODELO DE

- ☐ Indicación que se solicita una patente.
- ☐ Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud
- ☐ Descripción de la invención
- ☐ Dibujos de ser estos pertinentes
- ☐ Comprobante de pago de las tasas establecidas (De ser el caso formato de descuento)

Completa ☐ Incompleta ☐

PATENTE DE INVENCIÓN PCT ☑ MODELO DE UTILIDAD PCT ☐ Art.33 Decisión 486/00, Circular Única

- ☑ Indicación que se solicita una PCT
- ☑ Copia de la solicitud en español, tal como fue presentada inicialmente (capítulo descriptivo, reivindicatorio, resumen)
- ☑ Dibujos de ser estos pertinentes
- ☑ Comprobante de pago de las tasas establecidas (de ser el caso formato de descuento)

Completa ☑ Incompleta ☐

DISEÑO INDUSTRIAL ☐ (Art. 119 Decisión 486/00)

- ☐ Indicación que se solicita Diseño industrial
- ☐ Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud
- ☐ Representación gráfica y fotográfica del Diseño industrial o muestra del material que incorpora el diseño
- ☐ Comprobante de pago de las tasas establecidas

Completa ☐ Incompleta ☐

ESQUEMA DE TRAZADO ☐ (Art. 92 Decisión 486/00)

- ☐ Indicación que se solicita un esquema de trazado
- ☐ Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud
- ☐ Representación gráfica de un esquema de trazado
- ☐ Comprobante de pago de las tasas establecidas

Completa ☐ Incompleta ☐

TRADUCCIÓN OFICIAL DE UN DOCUMENTO QUE ESTÁ ORIGINALMENTE EN INGLÉS

Nota del traductor:

El documento adjunto de poder de Novartis AG a Carlos R. Olarte y/o J. Ian Raisbeck y/o Ana Maria Frieri y/o Juan Guillermo Moure y/o Natalia Castro lleva los siguientes datos en inglés.

CERTIFICACIÓN NOTARIAL

1. En esta fecha, día 30 de Agosto de 2006, yo, el suscrito Notario Público certifico por medio del presente la autenticidad de las firmas del señor Arthur Canonica, ciudadano de Corticiasca, Suiza, residente en Wisen/SO, Suiza, y del Sr. Pascal Traub, ciudadano de Riehen, Suiza, residente en Basilea, Suiza, ambos personas mayores de edad y con dirección comercial en Lichstrasse 35, 4056, Basilea, Suiza. La autenticidad de la firmas fue establecida por medio de la comparación.
2. Además, yo, el Notario Público, certifico por el presente que las anteriores personas han ejecutado el anterior documento como apoderados de Novartis AG.
3. Además, yo, el Notario Público certifico por el presente que Novartis AG, con su principal lugar de negocios en Basilea, Suiza, está debidamente constituida, está actualmente vigente y que los propósitos para los cuales se otorgó el Documento de Poder están dentro del alcance de sus propósitos corporativos.

Traductor Oficial
JORGE E. SIERRA REYES
Licencia 376 - 1993 Miniusticia

4. Además, yo, el Notario Público, certifico por el presente que las anteriores personas tienen la autoridad para ejecutar el documento de Poder y que por este instrumento, su representación es legal.

La base para mis certificaciones de los puntos 2, 3 y 4 fue la exhibición de los siguientes documentos auténticos:

- Documento de Poder de Novartis AG fechado el 19 de junio de 2006 y
- Extracto del Registro de Comercio del Cantón de la ciudad de Basilea para Novartis AG, en Basilea, fechado el 25 de enero de 2006.

Basilea, Suiza, este día 30 de Agosto de 2006.

(Firmado) Dr. Matthias Staehelin, Notario Público del Cantón de la ciudad de Basilea, Suiza.

Mi licencia vence el 11 de Marzo de 2009.

Hay una Apostilla de Suiza, firmada por Heidi Fischer, bajo el No. 8049/13584.

Traductor Oficial
JORGE E. SIERRA REYES
Licencia 376 - 1993 Minjusticia

Certificación:

Certifico que la presente es una traducción verdadera y completa del documento adjunto: "Novartis"

Fecha: 12 de Septiembre de 2006.

Traductor: Jorge Enrique Sierra Reyes.

Licencia No. 376 de 1993, del Ministerio de Justicia.

Dirección: Carrera 15 No. 99-13 Oficina 411. Bogotá, Colombia.

Teléfono: (57-1) 2182308, (57-1) 6232925.

E-mail: treseser1@yahoo.com. No. 8346

Traductor Oficial
JORGE E. SIERRA REYES
Licencia 376 - 1993 Minjusticia

OLARTERAISBECK
OLARTE RAISBECK & FRIERI LTDA.

Carlos R. Olarte
J. Ian Raisbeck
Ana María Frieri
Juan Guillermo Moure
Natalia Castro

Zayde Chahin
Jacqueline Chaparro
José Luis Londoño
Felipe Mendoza
Simón Salinas

Of Counsel
Guillermo Chahin
Graciela Melo

Power of Attorney

Poder

The undersigned,

El suscrito,

NOVARTIS AG

domiciled in

domiciliado en

Lichtstrasse 35, CH-4056 Basel / Switzerland

by means of these presents hereby grants to **Carlos R. Olarte and/or J. Ian Raisbeck and/or Ana María Frieri and/or Juan Guillermo Moure and/or Natalia Castro** full and sufficient Power of Attorney to file, prosecute, obtain, defend and enforce any and all of the company's **Patents for Inventions, Utility Models, Layout-Designs (topographies) of Integrated Circuits, Industrial Designs, Trademarks, Advertising Slogans, Trade Names, Commercial Emblems, Geographical Indications, Protection of Trade Secrets, Obtainer's Certificates, Copyrights, Registration of Domain Names, Health Registrations, or any other intellectual property right** in the Republic of Colombia, to which end it empowers them to take all steps necessary before any administrative or judicial authority of any class for the objects stated, to file petitions, recourses, replies and oppositions, pay taxes and annuities, request testimonies, receive documents and securities, abandon applications and collect refunds. Sufficient power is hereby granted to receive notifications on behalf of the Company, to confer powers on those who are to represent the company judicially and extrajudicially, to answer in court in the matter of all claims and demands that may be presented in connection with the objects stated, giving them likewise power to substitute these presents and revoke such substitutions.

por medio del presente otorga a **Carlos R. Olarte y/o J. Ian Raisbeck y/o Ana María Frieri y/o Juan Guillermo Moure y/o Natalia Castro** poder especial, amplio y suficiente para presentar, tramitar, obtener, defender y hacer respetar todas y cualquiera de las **Patentes de Invención, Modelos de Utilidad, Esquemas de Trazados de Circuitos Integrados, Diseños Industriales, Marcas, Lemas Comerciales, Nombres Comerciales, Enseñas Comerciales, Denominaciones de Origen, Protección de Secretos Empresariales, Certificados de Obtentor, Derechos de Autor, Registro de Nombres de Dominio, Registros Sanitarios, o cualquier otro bien de propiedad intelectual** de la compañía en la República de Colombia, a cuyo efecto los faculta para dar todos los pasos necesarios ante cualquier autoridad administrativa o judicial de cualquier jerarquía para cumplir con lo encomendado, elevar solicitudes, recursos, respuestas y oposiciones, pagar impuestos y anualidades, solicitar testimonios, recibir documentos y valores, desistir y percibir. Se concede poder bastante para recibir notificaciones a nombre de la compañía, otorgar poderes a quienes vayan a representar a la compañía judicial y extrajudicialmente, responder en juicio a todas las reclamaciones o demandas que por motivo de lo encomendado se presentaren, dándoles asimismo facultad para sustituir el presente y revocar dichas sustituciones.

Signature/Firma:

Arthur Canonica

Pascal Traub

Date/Fecha: June 27, 2006

City,Country/Ciudad,País: Basel, Switzerland

Attestation

1 On this date, the 30th (thirtieth) day of August 2006 (two thousand and six), I, the undersigned Notary Public certify herewith the authenticity of the signatures of **Mr. Arthur Canonica**, citizen of Corticiasca, Switzerland, residing in Wisen/SO, Switzerland and of **Mr. Pascal Traub**, citizen of Riehen, Switzerland, residing in Basel, Switzerland, both of legal age and with business address at, Lichtstrasse 35, 4056 Basel, Switzerland. The authenticity of the signatures was established by means of comparison.

2 Further, I, the Notary Public certify herewith that the foregoing persons have executed the foregoing document as proxy holders for Novartis AG.

3 Further, I, the Notary Public certify herewith that Novartis AG, having its principal place of business located in Basel / Switzerland, is duly incorporated, is currently in existence, and that the purposes for which the Power of Attorney is granted are within the scope of its corporate purposes.

4 Further, I, the Notary Public certify herewith that the foregoing persons have the authority to execute the Power of Attorney and that for this instrument their representation is legal.

The foundation for my certifications contained in points 2 (two), 3 (three) and 4 (four) was the exhibition of the following authentic documents:

- Power of Attorney by Novartis AG dated June 19 (nineteen), 2006 (two thousand and six); and
- Extract from the Register of Commerce of the Canton of Basel-City for Novartis AG, in Basel, dated January 25 (twenty-five), 2006 (two thousand and six).

BASEL, Switzerland, this 30th (thirtieth) day of August 2006 (two thousand and six)

M. Staehelin Notar

Dr. Matthias Staehelin, Notary Public
in the Canton of Basel-City, Switzerland

My license expires on March 11 (eleven), 2009 (two thousand and nine).

Leg.Prot.Nr. 975 /2006

APOSTILLE

(Hague Convention of October 5th, 1961)

1. Country: Switzerland (Schweiz / Suisse)
   This official document
2. is signed by .....
   .....
3. in his/her function as .....
4. and certified by the seal of the .....
   .....

Certified 24. May. 2006

5. in Basel (Bâle) 6. on .....
7. by the State Chancery of the Canton of Basel-Stadt .....
8. no. 2'049'13'389
9. Seal / stamp: 10. Signature:

Heidi Fischer

STATE CHANCERY * BASLE-CITY *

Sheet No. .....

Box No. VIII (ii) DECLARATION: ENTITLEMENT TO APPLY FOR AND BE GRANTED A PATENT

The declaration must conform to the standardized wording provided for in Section 212; see Notes to Boxes Nos. VIII, VIII (i) to (v) (in general) and the specific Notes to Box No. VIII (ii). If this Box is not used, this sheet should not be included in the request.

Declaration as to the applicant's entitlement, as at the international filing date, to apply for and be granted a patent (Rules 4.17(ii) and 51*bis*.1(a)(ii)), in a case where the declaration under Rule 4.17(iv) is not appropriate:

in relation to the international application PCT/EP2011/051958,

Novartis AG, is entitled to apply for and be granted a patent by virtue of the following:

an assignment from:

Seth ETTENBERG, Novartis Institutes for BioMedical Research, Inc., 250 Massachusetts Avenue, Cambridge, MA 02139, USA, dated 03.02.2011
Jing LI, Novartis Institutes for BioMedical Research, Inc., 200 Technology Square, Cambridge, MA 02139, USA, dated 03.02.2011
David Raymond STOVER, 15093 Hesby ST, Sherman Oaks, CA 91403, USA, dated 03.02.2011
Jingxin ZHANG, 8 Shoreview Lane, Walpole, MA 02081, USA, dated 02.02.2011

to Novartis AG.

Ablynx NV, is entitled to apply for and be granted a patent by virtue of the following:

an assignment from:

Karen CROMIE, Ablynx NV, Technologiepark 4, 9052 Zwijnaarde, Belgium, dated 04.02.2011
Bruno DOMBRECHT, Ablynx NV, Technologiepark 4, 9052 Zwijnaarde, Belgium, dated 02.02.2011
Joost KOLKMAN, Ablynx NV, Technologiepark 4, 9052 Zwijnaarde, Belgium, dated 04.02.2011
Kris MEERSCHAERT, Ablynx NV, Technologiepark 4, 9052 Zwijnaarde, Belgium, dated 02.02.2011

to Ablynx NV.

☐ This declaration is continued on the following sheet, "Continuation of Box No. VIII (ii)".

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau

(43) International Publication Date
18 August 2011 (18.08.2011)

PCT

(10) International Publication Number
WO 2011/098520 A1

(51) International Patent Classification:
C07K 16/28 (2006.01) *A61K 39/395* (2006.01)

(21) International Application Number:
PCT/EP2011/051958

(22) International Filing Date:
10 February 2011 (10.02.2011)

(25) Filing Language: English

(26) Publication Language: English

(30) Priority Data:
61/303,173 10 February 2010 (10.02.2010) US
61/308,599 26 February 2010 (26.02.2010) US

(71) Applicants *(for all designated States except US)*: **NOVARTIS AG** [CH/CH]; Lichtstrasse 35, CH-4056 Basel (CH). **ABLYNX NV** [BE/BE]; Technologiepark 4, B-9052 Zwijnaarde (BE).

(72) Inventors; and

(75) Inventors/Applicants *(for US only)*: **CROMIE, Karen** [GB/BE]; Ablynx NV, Technologiepark 4, B-9052 Zwijnaarde (BE). **DOMBRECHT, Bruno** [BE/BE]; Ablynx NV, Technologiepark 4, B-9052 Zwijnaarde (BE). **ETTENBERG, Seth** [US/US]; Novartis Institutes for BioMedical Research, Inc., 250 Massachusetts Avenue, Cambridge, Massachusetts 02139 (US). **KOLKMAN, Joost** [NL/BE]; Ablynx NV, Technologiepark 4, B-9052 Zwijnaarde (BE). **LI, Jing** [US/US]; Novartis Institutes for BioMedical Research, Inc., 200 Technology Square, Cambridge, Massachusetts 02139 (US). **MEERSCHAERT, Kris** [BE/BE]; Ablynx NV, Technologiepark 4, B-9052 Zwijnaarde (BE). **STOVER, David Raymond** [US/US]; 15093 Hesby ST, Sherman Oaks, California 91403 (US). **ZHANG, Jingxin** [CN/US]; 8 Shoreview Lane, Walpole, Massachusetts 02081 (US).

(74) Agent: **KASSOW, Anders**; NOVARTIS PHARMA AG, Patent Department, CH-4002 Basel (CH).

(81) Designated States *(unless otherwise indicated, for every kind of national protection available)*: AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PE, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(84) Designated States *(unless otherwise indicated, for every kind of regional protection available)*: ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Eurasian (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Declarations under Rule 4.17:

[Continued on next page]

(54) Title: AGONIST DR5 BINDING POLYPEPTIDES

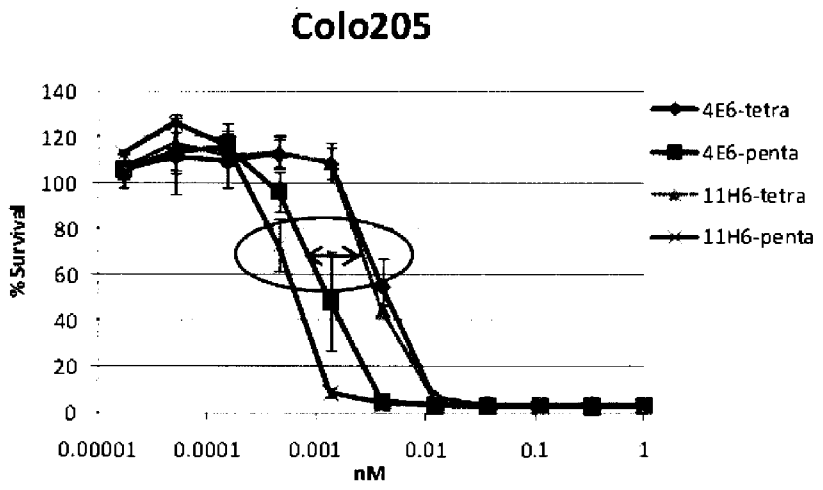


FIGURE 6B

(57) Abstract: The present invention relates to amino acid sequences that are directed against TRAIL cell surface receptor 2 (herein also "DR5"), as well as to compounds or constructs thereof, and in particular proteins and polypeptides and nucleotides that encode them (referred to herein in their entirety as "NB agents") and fragments thereof, and pharmaceutically effective variants thereof, and their use in the diagnosis and treatment of DR5 associated diseases and disorders.

WO 2011/098520 A1

— *as to applicant's entitlement to apply for and be granted a patent (Rule 4.17(ii))*

— *with sequence listing part of description (Rule 5.2(a))*

Published:

— *with international search report (Art. 21(3))*

AGONIST DR5 BINDING POLYPEPTIDES

BACKGROUND

[001] The tumor necrosis factor (TNF)-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) induces apoptosis in a variety of tumorigenic and transformed cell lines with little or no effect on normal cells. At least five receptors for TRAIL have been identified, of which two, namely DR4 (Death Receptor 4, TRAIL-R1) and DR5 (Death Receptor 5, TRAIL-R2; KILLER or TRICK 2), are capable of transducing an apoptosis signal, whereas the other three (TRAIL-R3, TRAIL-R4 and soluble OPG) serve as decoy receptors to block TRAIL-mediated apoptosis. See e.g., Ozoren and El-Deiry, Sem. Cancer Biol 13: 135 (2003); Yagita et al., Cancer Sci., 95(10): 777 (2004).

[002] TRAIL or Apo2L is a 281 amino-acid cytotoxic ligand found integrated into the cytoplasmic membrane with the C-terminus exposed at the extracellular surface (Type II ligand) of cells. Small quantities of soluble TRAIL ligand can also be detected. TRAIL forms a homo-trimeric molecule that binds its respective receptors, initiating a cascade of signaling events.

[003] The binding of TRAIL ligand to the receptors DR4 or DR5 initiates the extrinsic cell death pathway, resulting in the formation of death-inducing signaling complexes (DISC), which contain the adaptor FADD (Fas-activating DD) and pro-caspase 8 or pro-caspase 10. The interactions at the DISC and the activation of the downstream cascade are similar to FAS, resulting in activation of the NFκB and Jun N-terminal kinase pathways (JNK). See, e.g., Mongkolsapaya et al., Nat. Struct. Biol., 6(11): 1048 (1999); Cha et al., J. Biol. Chem., 275(40): 31171 (2000). TRAIL binding to DR4 or DR5 also results in a BID cleavage (by caspase 8 or 10), activation of mitochondria and hence activation of the intrinsic apoptosis pathway.

[004] The ability of TRAIL ligand to preferentially induce apoptosis of tumor cells, with little or no effect on normal cells, makes it a potentially good candidate for cancer therapy. However, soluble TRAIL has been shown to induce apoptosis of normal human hepatocytes in vitro, highlighting potentially toxicity concerns. See, e.g., Jo et al., Nat Med. 6(5): 564 (2000). A more advantageous target for cancer therapy is DR5. Because DR5 requires multiple receptors to induce apoptosis of normal hepatocytes, the development of agonists against the specific DR5 responsible for induction of apoptosis is predicted to avoid this toxicity against normal cells, while retaining the ability to kill tumor cells.

[005] Peptide and antibody agonists of DR5 have been used to induce apoptosis in cells expressing DR5. See, e.g., Li et al., J. Mol. Biol., 361, 522-536 (2006); Kajiwara et al., Biochim. Biophys. Acta 1699: 131-137 (2004); Yang et al., Cancer Cell, 5, 501-512 (2004). Agonists of DR5 have the potential to be used in cancer therapy against a wide

range of cancers. For example, Lexatumumab, a monoclonal antibody against DR5, induces expression of DR5 and promotes apoptosis in a mouse model of renal cell carcinoma. Zhang et al., Cancer Lett. 251(1): 146-57 (2007). Other agonistic monoclonal antibodies against DR5, or single-chain Fv fragment against DR5, and the tumoricidal activity thereof are similarly described, e.g., in Takeda et al., Journal Exp. Medicine, 199, 437-448 (2004); Guo et al., J. Biol. Chem., 280, 41940-41952 (2005); Motoki et al., Clin. Cancer Res 11(8): 3126-35 (2005); and Ichikawa et al., Nature Medicine, 7, 954-960 (2001), Chuntharapai et al., J. Immunol. 166(8): 4891-8 (2001), Shi et al., Cancer Res., 66(24): 11946-11953 (2006).

[006] Various DR5 specific antibodies are being developed for use in the clinic but none are yet approved. It is believed that for DR5 to be activated, multiple cross-linking antibodies are required, and issues remain for sufficient delivery of these antibodies at the site of action to achieve reproducible therapeutic effects. Therefore, a need exists for improved DR5 specific agonists for treatment of associated diseases.

SUMMARY OF THE INVENTION

[007] The present invention relates to one or more "NB agents" comprising amino acid sequences that are directed against Death Receptor 5 (herein referred to as "DR5") as provided herein, as well as to specific compounds or constructs, and in particular proteins and polypeptides, that comprise or essentially consist of one or more such amino acid sequences (also referred to as "compounds", and "polypeptides", respectively) and fragments thereof, plus the nucleic acids that encode such constructs. Monomeric and multimeric variants of the inventive DR5 specific constructs are provided herein. Humanized and humaneered variants of the NB agents are provided. In one embodiment, pharmaceutically relevant NB agents of the invention act as agonists of the TRAIL receptors DR5.

[008] The invention also relates to nucleic acids encoding such amino acid sequences and polypeptides; methods for preparing such amino acid sequences and polypeptides; host cells expressing or capable of expressing such amino acid sequences or polypeptides; compositions, and in particular to pharmaceutical compositions, that comprise such amino acid sequences, polypeptides, nucleic acids and/or host cells; and uses of such amino acid sequences or polypeptides, nucleic acids, host cells and/or compositions, in particular for prophylactic, therapeutic or diagnostic purposes, such as the purposes mentioned herein.

[009] Agonists of the TRAIL receptors DR5 described herein as NB agents have the potential to be used in therapy against a wide range of diseases associated with DR5. These inventive NB agents therefore have utility in the treatment of proliferative diseases

including, e.g., cancers such as solid tumors, primary and metastatic cancers such as renal cell carcinoma, and cancers of the lung (e.g., small cell lung cancer "SCLC" and non-small cell lung cancer "NSCLC"), pancreas, hematopoietic malignancy, glioma, astrocytoma, mesothelioma, colorectal cancers, prostate cancer, osteosarcoma, melanoma, lymphoma (including but not limited to Burkitt's Lymphoma), breast cancer, endometrial cancer, liver cancer, gastric cancer, skin cancer, ovarian cancer and squamous cell cancers of any origin (e.g., lung, head and neck, breast, thyroid, cervix, skin, esophageal, etc.), as well as liquid cancers, e.g., such as leukemias (see, e.g., Uno et al., Nature Medicine, 12(6): 693-698(2006)) including especially a T-cell leukemia such as acute T-cell leukemia (T-ALL), acute B-cell leukemia (B-ALL), chronic myelogenous leukemia (CML), acute myelogenous leukemia (AML), plasma cell myeloma and multiple myeloma (MM). These inventive NB agents also have utility in the treatment of non-cancer indications include inflammatory and autoimmune disease, such as systemic lupus erythematosus, Hashimoto's disease, rheumatoid arthritis, graft-versus-host disease, Sjogren's syndrome, pernicious anemia, Addison disease, scleroderma, Goodpasture's syndrome, Crohn's disease, autoimmune hemolytic anemia; sterility, myasthenia gravis, multiple sclerosis, Basedow's disease; thrombotic throbocytopenia, thrombopenia purpurea, insulin-dependent diabetes mellitus, allergy; asthma; atopic disease; arteriosclerosis; myocarditis; cardiomyopathy; globerula nephritis; and hypoplastic anemia.

[0010] The amino acid sequences and polypeptides described herein may be directed against, or be specific to, any DR5. According to one non-limiting aspect, amino acid sequences and polypeptides described herein are directed against DR5. In one embodiment, the NB agents specifically bind to a DR5 extracellular domain.

[0011] The polypeptides and compositions of the present invention can generally be used to modulate DR5. In one embodiment, an NB agent will trigger, activate and/or increase or enhance the signaling that is mediated by DR5. In one embodiment, agonism of DR5 by an NB agent will modulate, and in particular trigger or increase the biological mechanisms, responses and effects associated with DR5, their signaling and/or the pathways in which DR5 is involved.

[0012] In one embodiment, the compounds, polypeptides and compositions described herein induce, trigger, increase or enhance apoptosis in certain cells or tissues. In one embodiment, the compounds, polypeptides and compositions described herein are capable of binding to DR5 on a cell surface, and in particular of binding to a DR5 in such a way that the signaling mediated by the DR5 is induced, triggered, increased or enhanced. In one embodiment, the polypeptides and compositions described herein may be such that they are capable of binding to a DR5 in such a way that apoptosis is triggered or induced in the cell on which the DR5 is present.

[0013] In one embodiment, the NB compounds, (monovalent or multivalent) polypeptides and compositions described herein can bind to the binding site of TRAIL on the DR5. In one embodiment, the NB agents compete with TRAIL for binding to the DR5. In one embodiment, the binding of such compounds and polypeptides to DR5 induces, triggers, increases or enhances the signaling mediated by the DR5, and in particular triggers or induces apoptosis in the cell on which the DR5 is present.

[0014] Other aspects, embodiments, advantages and applications of the invention will become clear from the further description herein.

BRIEF DESCRIPTION OF THE FIGURES

[0015] Figure 1 is a graphic representation of an ELISA experiment showing the binding of multivalent anti-DR5 NB agents against TNF Receptor family members.

[0016] Figure 2 is a graphic representation of a tumor tissue PD (Caspase3/7 activation) of tetravalent anti-DR5 NB agents.

[0017] Figure 3 is a graphic representation of the in vivo efficacy of tetravalent and pentavalent anti-DR5 NB agents in a Colo205 tumors model.

[0018] Figures 4A and 4B are graphic representations of 11H6 tetramer exhibiting anti-tumor activity in a MiaPaCa pancreatic tumor model grown in NSG hosts (i.e., macrophage/NK deficient hosts) either without (Fig. 4A) or with (Fig. 4B) CSF-1R inhibitor.

[0019] Figure 5 shows 11H6 tetramer ability to regress patient-derived pancreatic tumor TPAN1-IFA that is insensitive to LCR211, a murine antibody specific to DR5.

[0020] Figures 6A, 6B and 6C are graphic representations showing that an increased number of subunits in a NB construct corresponds with an improved efficacy and potency for (Fig. 6A) 11H6 trimers, tetramers and pentamers in Colo205 cells; (Fig. 6B) 4E6 and 11H6 tetramers and pentamers in Colo205 cells; and (Fig. 6C) 4E6 and 11H6 tetramers and pentamers in H226 cells.

DETAILED DESCRIPTION OF THE INVENTION

[0021] The NB agents described herein, namely the compounds, polypeptides (monovalent or multivalent) and compositions, bind to Death Receptor 5 ("DR5"). In one embodiment, the binding of the disclosed compounds and polypeptides to the DR5 induces, triggers, increases or enhances the signaling mediated by the DR5, and in particular triggers or induces apoptosis in the cell on which the DR5 is present.

[0022] As used herein a "NB agent" of the invention is defined as a polypeptide containing at least one CDR3 sequence that specifically bind to a DR5 polypeptide and whose binding produces an agonistic effect on DR5 activity, or a nucleotide that encodes such a polypeptide. In one embodiment, NB agents of the invention are a polypeptide

having the general structure of a V_H domain. In one embodiment, NB agents of the invention are a polypeptide having the general structure of a V_{HH} domain. In one embodiment, NB agents of the invention are a polypeptide having the general structure of a V_L domain. In one embodiment, NB agents of the invention contain at least one CDR1 and at least one CDR2 sequence in addition to the CDR3 sequence. In one embodiment, NB agents of the invention comprise at least one monovalent polypeptide having the FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4 construction as defined below for Formula 1. In one embodiment, NB agents of the invention are monomeric compositions. In one embodiment, NB agents are multimeric compositions. In one embodiment, NB agents of the invention are monovalent compositions. In one embodiment, NB agents are multivalent compositions. In one embodiment, the framework regions contain residues that are sequence optimized for use in humans. Other aspects of NB agents of the invention are described below.

[0023] Whereas the term "NB agent" is used as a general term that is meant to encompass the full scope of the compositions of the invention, the terms "NB sequence" or alternatively "NB construct" are used herein to refer to the specific polypeptide variants disclosed herein as SEQ ID NOS: 1-72, 87-88 and 103-104 and the nucleotides that encode them, including those specifically disclosed herein as SEQ ID NOS: 96-99 and those sequences that encode the same polypeptide sequences as SEQ ID NOs: 96-99 but differ by the degenerate code.

[0024] **NB Agents of the invention**

[0025] In one embodiment, the NB agent is selected from the group of 11D1, 11H6, 10F1, 7A12, and 4E6, or a variant thereof. In one embodiment, the NB agent is a variant whose sequence is optimized for use in humans, e.g., is humanized. In one embodiment humanized NB agents include without limitation the group of 4E6hu and 11H6hu. In one embodiment, the NB agent is a monomeric variant of the listed group, or a variant thereof. In one embodiment, the NB agent is a multimeric variant of the listed group, or a variant thereof. In one embodiment, the multimeric variant of the listed group is monospecific, or a variant thereof. In one embodiment, the multimeric variant of the listed group is multispecific, or a variant thereof. In one embodiment, the multiple epitopes recognized by a multispecific NB agent are various epitopes of the DR5 target, or a variant thereof. In one embodiment, the multiple epitopes recognized by a multispecific NB agent is at least one epitope of the DR5 target and at least one epitope on a target other than the DR5 polypeptide, or a variant thereof.

[0026] In one embodiment, the NB agent is selected from one or more of SEQ ID NOs: 1-22, 26–40, 87-88, and 103-104, or SEQ ID NOs: 96-99, or a variant thereof.

Specific embodiments of NB agents 11D1, 11H6, 10F1, 7A12, and 4E6, or variants thereof, are as provided below and in Tables 1-4.

[0027] Exemplary NB agents of the invention include the following NB polypeptide constructs and variants thereof.

[0028] **4E6 Family**

[0029] In one embodiment, the NB agent is 4E6, or a variant thereof. In one embodiment, the 4E6 construct is the monomer of SEQ ID NO: 1, or a variant thereof. In one embodiment, the 4E6 construct is the monomer of SEQ ID NO: 26, or a variant thereof. In one embodiment, the 4E6 construct is a multimer comprising two or more monomers of SEQ ID NO: 1 that are operably linked, or a variant thereof. In one embodiment, the 4E6 construct is a multimer comprising two or more monomers of SEQ ID NO: 26 that are operably linked, or a variant thereof. In one embodiment, the 4E6 construct is a multimer comprising two or more monomers of both SEQ ID NO: 1 and of SEQ ID NO: 26 that are operably linked, or a variant thereof, wherein the monomers may be in any order.

[0030] In one embodiment, the 4E6 multimeric construct is a trimer, a tetramer or a pentamer of SEQ ID NO: 1, or a variant thereof. In one embodiment, the 4E6 multimeric construct is a trimer, a tetramer or a pentamer of SEQ ID NO: 26, or a variant thereof. In one embodiment, the 4E6 multimeric construct is a trimer, a tetramer or a pentamer of a combination of both SEQ ID NO: 1 and of SEQ ID NO: 26, or a variant thereof, wherein the monomers may be in any order. In one embodiment, the 4E6 construct is the multimer as provided in any one or more of SEQ ID NOs: 6-8 and 27-29, or a variant thereof. Higher order multimers, such as multimers comprised of 6 – 10 subunits, are also contemplated.

[0031] In one embodiment, the 4E6 construct comprises SEQ ID NO: 64, or a variant thereof. In one embodiment, the 4E6 construct comprises SEQ ID NO: 65, or a variant thereof. In one embodiment, the 4E6 construct comprises a CDR1 sequence of SEQ ID NO: 42, a CDR2 sequence of SEQ ID NO: 52 and a CDR3 sequence of any one or more of SEQ ID NO: 64 and/or SEQ ID NO: 65, or a variant thereof. In one embodiment, the 4E6 construct is a humanized or humaneered sequence, or a variant thereof. In one embodiment, the 4E6 construct is as provided in SEQ ID NO: 28, or a variant thereof. In one embodiment, the 4E6 construct is as provided in SEQ ID NO: 29, or a variant thereof. In one embodiment, the 4E6 construct comprises SEQ ID NOs: 35, 42, 46, 52, 57, 64 and 70, respectively, or a variant thereof. In one embodiment, the 4E6 construct comprises SEQ ID NOs: 36, 42, 47, 52, 58, 65 and 71, respectively, or a variant thereof.

[0032] In one embodiment, the NB construct is a nucleic acid that encodes the 4E6 polypeptide of SEQ ID NO: 1 or variants, multimers or fragments thereof. In one embodiment, the NB construct is a nucleic acid that encodes the 4E6Hu polypeptide of

SEQ ID NO: 26 or variants, multimers or fragments thereof. In one embodiment, the NB construct is a nucleic acid that encodes one or more of the CDR regions of the 4E6Hu polypeptide, namely SEQ ID NO: 42, 52 and 64, or variants thereof. In one embodiment, the NB construct is a nucleic acid that encodes one or more of the CDR regions of the 4E6 polypeptide, namely SEQ ID NO: 42, 52 and 65, or variants thereof. In one embodiment, the NB construct is a nucleic acid that encodes the CDR3 region of SEQ ID NO: 64 or variants thereof. In one embodiment, the NB construct is a nucleic acid that encodes the CDR3 region of SEQ ID NO: 65 or variants thereof.

[0033] 7A12 Family

[0034] In one embodiment, the NB agent is 7A12, or a variant thereof. In one embodiment, the 7A12 construct is the monomer of SEQ ID NO: 2, or a variant thereof. In one embodiment, the 7A12 construct is a multimer comprising two or more monomers of SEQ ID NO: 2 that are operably linked, or a variant thereof. In one embodiment, the 7A12 multimeric construct is a trimer, a tetramer or a pentamer of SEQ ID NO: 2, or a variant thereof. In one embodiment, the 7A12 construct is the multimer as provided in any one or more of SEQ ID NOs: 9-11, or a variant thereof. In one embodiment, the 7A12 construct comprises SEQ ID NO: 63. In one embodiment, the 7A12 construct comprises a CDR1 sequence of SEQ ID NO: 41, a CDR2 sequence of SEQ ID NO: 51 and a CDR3 sequence of SEQ ID NO: 63, or a variant thereof. In one embodiment, the 7A12 construct is a humanized or humaneered sequence, or a variant thereof. In one embodiment, the 7A12 construct is as provided in SEQ ID NO: 10, or a variant thereof. In one embodiment, the 7A12 construct is as provided in SEQ ID NO: 11, or a variant thereof. In one embodiment, the 7A12 construct comprises SEQ ID NOs: 34, 41, 45, 51, 56, 63 and 69, respectively, or a variant thereof. Higher order multimers, such as multimers comprised of 6 – 10 subunits, are also contemplated.

[0035] In one embodiment, the NB construct is a nucleic acid that encodes the 7A12 polypeptide of SEQ ID NO: 2 or variants, multimers or fragments thereof. In one embodiment, the NB construct is a nucleic acid that encodes one or more of the CDR regions of SEQ ID NO: 41, 51 and 63, or variants thereof. In one embodiment, the NB construct is a nucleic acid that encodes the CDR3 region of SEQ ID NO: 63 or variants thereof.

[0036] 10F1 Family

[0037] In one embodiment, the NB agent is 10F1, or a variant thereof. In one embodiment, the 10F1 construct is the monomer of SEQ ID NO: 3, or a variant thereof. In one embodiment, the 10F1 construct is a multimer comprising two or more monomers of SEQ ID NO: 3 that are operably linked, or a variant thereof. In one embodiment, the 10F1 multimeric construct is a trimer, a tetramer or a pentamer of SEQ ID NO: 3, or a variant

thereof. In one embodiment, the 10F1 construct is the multimer as provided in any one or more of SEQ ID NOs: 12-16, or a variant thereof. In one embodiment, the 10F1 construct comprises SEQ ID NO: 68, or a variant thereof. In one embodiment, the 10F1 construct comprises a CDR1 sequence of SEQ ID NO: 44, a CDR2 sequence of SEQ ID NO: 55 and a CDR3 sequence of SEQ ID NO: 68, or a variant thereof. In one embodiment, the 10F1 construct is a humanized or humaneered sequence, or a variant thereof. In one embodiment, the 10F1 construct comprises SEQ ID NO: 15, or a variant thereof. In one embodiment, the 10F1 construct comprises SEQ ID NO: 16, or a variant thereof. In one embodiment, the 10F1 construct comprises SEQ ID NOs: 40, 44, 50, 55, 62, 68 and 72, respectively, or a variant thereof. Higher order multimers, such as multimers comprised of 6 – 10 subunits, are also contemplated.

[0038] In one embodiment, the NB construct is a nucleic acid that encodes the 10F1 polypeptide of SEQ ID NO: 3 or variants, multimers or fragments thereof. In one embodiment, the NB construct is a nucleic acid that encodes one or more of the CDR regions of SEQ ID NO: 44, 55 and 68, or variants thereof. In one embodiment, the NB construct is a nucleic acid that encodes the CDR3 region of SEQ ID NO: 68 or variants thereof.

[0039] **11D1 Family**

[0040] In one embodiment, the NB agent is 11D1, or a variant thereof. In one embodiment, the 11D1 construct is the monomer of SEQ ID NO: 4, or a variant thereof. In one embodiment, the 11D1 construct is a multimer comprising two or more monomers of SEQ ID NO: 4 that are operably linked, or a variant thereof. In one embodiment, the 11D1 multimeric construct is a trimer, a tetramer or a pentamer of SEQ ID NO: 4, or a variant thereof. In one embodiment, the 11D1 construct is the multimer as provided in any one or more of SEQ ID NOs: 17-19, or a variant thereof. In one embodiment, the 11D1 construct comprises SEQ ID NO: 67, or a variant thereof. In one embodiment, the 11D1 construct comprises a CDR1 sequence of SEQ ID NO: 43, a CDR2 sequence of SEQ ID NO: 54 and a CDR3 sequence of SEQ ID NO: 67, or a variant thereof. In one embodiment, the 11D1 construct is a humanized or humaneered sequence, or a variant thereof. In one embodiment, the 11D1 construct comprises SEQ ID NO: 18, or a variant thereof. In one embodiment, the 11D1 construct comprises SEQ ID NO: 19, or a variant thereof. In one embodiment, the 11D1 construct comprises SEQ ID NOs: 39, 43, 49, 54, 61, 67 and 71, respectively, or a variant thereof. Higher order multimers, such as multimers comprised of 6 – 10 subunits, are also contemplated.

[0041] In one embodiment, the NB construct is a nucleic acid that encodes the 11D1 polypeptide of SEQ ID NO: 4 or variants, multimers or fragments thereof. In one embodiment, the NB construct is a nucleic acid that encodes one or more of the CDR

regions of SEQ ID NO: 43, 54 and 67, or variants thereof. In one embodiment, the NB construct is a nucleic acid that encodes the CDR3 region of SEQ ID NO: 67 or variants thereof.

[0042] 11H6 Family

[0043] In one embodiment, the NB agent is 11H6, or a variant thereof. In one embodiment, the 11H6 construct is the monomer of SEQ ID NO: 5, or a variant thereof. In one embodiment, the 11H6 construct is the monomer of SEQ ID NO: 30, or a variant thereof. In one embodiment, the 11H6 construct is a multimer comprising two or more monomers of SEQ ID NO: 5 that are operably linked, or a variant thereof. In one embodiment, the 11H6 construct is a multimer comprising two or more monomers of SEQ ID NO: 30 that are operably linked, or a variant thereof. In one embodiment, the 11H6 construct is a multimer comprising two or more monomers of both SEQ ID NO: 5 and of SEQ ID NO: 30 that are operably linked, or a variant thereof (e.g., SEQ ID NO: 88), wherein the monomers may be in any order. Higher order multimers, such as multimers comprised of 6 – 10 subunits, are also contemplated.

[0044] In one embodiment, the 11H6 multimeric construct is a trimer, a tetramer or a pentamer of SEQ ID NO: 5, or a variant thereof. In one embodiment, the 11H6 multimeric construct is a trimer, a tetramer or a pentamer of SEQ ID NO: 30, or a variant thereof. In one embodiment, the 11H6 multimeric construct is a trimer, a tetramer or a pentamer of a combination of both SEQ ID NO: 5 and of SEQ ID NO: 30, or a variant thereof, wherein the monomers may be in any order. In one embodiment, the 11H6 construct is the multimer as provided in any one or more of SEQ ID NOs: 20-22 and 31-33, or a variant thereof.

[0045] In one embodiment, the 11H6 construct comprises SEQ ID NO: 66 or 83, or a variant thereof. In one embodiment, the 11H6 construct comprises a CDR1 sequence of SEQ ID NO: 43, a CDR2 sequence of SEQ ID NO: 53 and a CDR3 sequence of any one or more of SEQ ID NO: 66, or a variant thereof. In one embodiment, the 11H6 construct is a humanized or humaneered sequence, or a variant thereof. In one embodiment, the 11H6 construct is as provided in SEQ ID NO: 31, or a variant thereof. In one embodiment, the 11H6 construct is as provided in SEQ ID NO: 32, or a variant thereof. In one embodiment, the 11H6 construct is as provided in SEQ ID NO: 33, or a variant thereof. In one embodiment, the 11H6 construct comprises SEQ ID NOs: 37, 43, 48, 53, 59, 66 and 70, respectively, or a variant thereof. In one embodiment, the 11H6 construct comprises SEQ ID NOs: 38, 43, 48, 53, 60, 66 and 71, respectively, or a variant thereof.

[0046] In one embodiment, the NB construct is a nucleic acid that encodes the 11H6 polypeptide of SEQ ID NO: 5 or variants, multimers or fragments thereof. In one embodiment, the NB construct is a nucleic acid that encodes the 11H6Hu polypeptide of SEQ ID NO: 30 or variants, multimers or fragments thereof. In one embodiment, the NB

construct is a nucleic acid that encodes one or more of the CDR regions of SEQ ID NO: 43, 53 and 66, or variants thereof. In one embodiment, the NB construct is a nucleic acid that encodes the CDR3 region of SEQ ID NO: 66 or variants thereof.

[0047] Other contemplated variants of NB agents

[0048] In one embodiment, a NB agent of the invention is a multimeric construct comprising at least two different subunits selected from the group of 11D1, 11H6, 10F1, 7A12, and 4E6, or a variant thereof. In one such embodiment, the particular order of the multimeric constructs comprises alternating subunits. An exemplary construct is provided in SEQ ID NO: 84. Other arrangements of the subunits within a multimeric NB construct are contemplated. A skilled person will generally be able to determine and select suitable substitutions, deletions or insertions, or suitable combinations of thereof, based on the disclosure herein and optionally after a limited degree of routine experimentation, which may e.g., involve introducing a limited number of possible substitutions and determining their influence on the properties of the NB constructs thus obtained.

[0049] In addition to the disclosed exemplary NB polypeptides constructs provided herein, the invention encompasses nucleotides that encode any NB agent encompassed within the present invention disclosure, including without limitation: DNA and RNA sequences or variants thereof, in isolation or in recombinant vectors or the like, and/or as coding regions or fragments including especially fragments encoding the CDR3 region of the disclosed NB constructs. In one embodiment, the NB agent is a nucleic acid that encodes the NB construct of any one of the sequences provided in Tables 1-4. In one embodiment, the NB agent is a nucleic acid that encodes the 4E6 construct of any one of SEQ ID NOS: 1-5, 2, 3, 4, 5, 26, 30 and 87. In one embodiment, the NB agent is a nucleic acid that encodes any one of SEQ ID NOS: 41-44, 51-55 and 63-68. In one embodiment, the NB agent is a nucleic acid that encodes any one of SEQ ID NOS: 41-44, 51-55 and 63-68.

[0050] Exemplary sequences of the invention are provided below in Tables 1-4. The header term "ID" refers to the given SEQ ID NO. Preferred combinations of FR and CDR sequences for each NB construct are used interchangeably throughout the application.

Table 1: Polypeptide sequences of monovalent / monomeric DR5-binding components from initial screen, with SEQ ID NOs.

Name	Sequences	ID
4E6	evqlvesgggsvqagdslrlscaasgrtfgSIRVGwfrqtpgkerefvaAINRNDGTTYYADSV KGrftisrdnakntvymqmaslkpedtavyycaaGLQYNRSADRVPVGAVYwgqgtqvtvss	1
7A12	evqlvesggglvqaggslrlscaasgrtfsNYAMGwfrqapgkerefvaALNWSGGSTYYVDSV KGrftisrdnakntvylqmnslkpedtavyycaaAGSFSLGGRPYGDDYwgkgtlvtvss	2
10F1	evqlvesggglvqpggslrlscaasgftfsRYWMYwvrqapgkglewvsAINSGGGDTYYRDSV RGrftisrdnfkntlylqmnslksedtavyycakAEGPPTFSLIRTMTVDPgaqgtqvtvss	3

11D1	evqlvesggglvqpggslrlscaasgsidsINNMGwyrqapgkqrelvaEITPRGRTNYADSEK SrftisrdnakrtvnlqmnslkpedtavyycnaEVRERGTSWYRPDYwgqgtqvtvss	4
11H6	evqlvesggglvqpggslrlscaasgtfdkINNMGwyrqapgkqrdlvaQITPGGITDYADSVK GrftisrdnakdtmylqmnslkpedtavyfcnaEILKRAYIDVYVNYwgqgtqvtvss	5
11H6a	evqllesggglvqpggslrlscaasgtfdkINNMGwyrqapgkqrdlvaQITPGGITDYADSVK GrftisrdnakdtmylqmnslkpedtavyfcnaEILKRAYIDVYVNYwgqgtqvtvss	87

Table 2: Polypeptide sequences of multivalent anti-DR5 NB constructs with optional linker sequences, with SEQ ID NOs.

Name	Sequence	ID
4E6 tri	evqlvesggggsvqagdslrlscaasgrtfgSIRVGwfrqtpgkerefvaAINRNDGTTYYADS VKGrftisrdnakntvymqmaslkpedtavyycaaGLQYNRSADRVPVGAVYwgqgtqvtvss ggggsggggsggggsggggsggggsggggsggggsevqlvesggggsvqagdslrlscaasgrt fgSIRVGwfrqtpgkerefvaAINRNDGTTYYADSVKGrftisrdnakntvymqmaslkpedt avyycaaGLQYNRSADRVPVGAVYwgqgtqvtvssggggsggggsggggsggggsggggsggg gsggggsevqlvesggggsvqagdslrlscaasgrtfgSIRVGwfrqtpgkerefvaAINRNDG TTYYADSVKGrftisrdnakntvymqmaslkpedtavyycaaGLQYNRSADRVPVGAVYwgqg tqvtvss	6
4E6 tetra	evqlvesggggsvqagdslrlscaasgrtfgSIRVGwfrqtpgkerefvaAINRNDGTTYYADS VKGrftisrdnakntvymqmaslkpedtavyycaaGLQYNRSADRVPVGAVYwgqgtqvtvss ggggsggggsggggsggggsggggsggggsggggsevqlvesggggsvqagdslrlscaasgrt fgSIRVGwfrqtpgkerefvaAINRNDGTTYYADSVKGrftisrdnakntvymqmaslkpedt avyycaaGLQYNRSADRVPVGAVYwgqgtqvtvssggggsggggsggggsggggsggggsggg gsggggsevqlvesggggsvqagdslrlscaasgrtfgSIRVGwfrqtpgkerefvaAINRNDG TTYYADSVKGrftisrdnakntvymqmaslkpedtavyycaaGLQYNRSADRVPVGAVYwgqg tqvtvssggggsggggsggggsggggsggggsggggsevqlvesggggsvqagdslrlscaasgrtfgSIRVGwfrqtpgkerefvaAINRNDGTTYYADSVKGrftisrdnakntvymqmaslkpedtavyycaaGLQYNRSADRVPVGAVYwgqgtqvtvss	7
4E6 penta	evqlvesggggsvqagdslrlscaasgrtfgSIRVGwfrqtpgkerefvaAINRNDGTTYYADS VKGrftisrdnakntvymqmaslkpedtavyycaaGLQYNRSADRVPVGAVYwgqgtqvtvss ggggsggggsggggsggggsggggsggggsggggsevqlvesggggsvqagdslrlscaasgrt fgSIRVGwfrqtpgkerefvaAINRNDGTTYYADSVKGrftisrdnakntvymqmaslkpedt avyycaaGLQYNRSADRVPVGAVYwgqgtqvtvssggggsggggsggggsggggsggggsggg gsggggsevqlvesggggsvqagdslrlscaasgrtfgSIRVGwfrqtpgkerefvaAINRNDG TTYYADSVKGrftisrdnakntvymqmaslkpedtavyycaaGLQYNRSADRVPVGAVYwgqg tqvtvssggggsggggsggggsggggsggggsggggsevqlvesggggsvqagdslrlscaasgrtfgSIRVGwfrqtpgkerefvaAINRNDGTTYYADSVKGrftisrdnakntvymqmaslkpedtavyycaaGLQYNRSADRVPVGAVYwgqgtqvtvssggggsggggsggggsggggsggggsg gggsggggsggggsevqlvesggggsvqagdslrlscaasgrtfgSIRVGwfrqtpgkerefva AINRNDGTTYYADSVKGrftisrdnakntvymqmaslkpedtavyycaaGLQYNRSADRVPVG AVYwgqgtqvtvss	8
7A12 tri	evqlvesggglvqaggslrlscaasgrtfsNYAMGwfrqapgkerefvaALNWSGGSTYYVDS VKGrftisrdnakntvylqmnslkpedtavyycaaAGSFSLGGRPYGDDYwgkgtlvtvssgg ggsggggsggggsggggsggggsggggsggggsevqlvesggglvqaggslrlscaasgrtfs NYAMGwfrqapgkerefvaALNWSGGSTYYVDSVKGrftisrdnakntvylqmnslkpedtav yycaaAGSFSLGGRPYGDDYwgkgtlvtvssggggsggggsggggsggggsggggsggggsgg ggsevqlvesggglvqaggslrlscaasgrtfsNYAMGwfrqapgkerefvaALNWSGGSTYY VDSVKGrftisrdnakntvylqmnslkpedtavyycaaAGSFSLGGRPYGDDYwgkgtlvtvs s	9

7A12 tetra	evqlvesggglvqaggslrlscaasgrtfsNYAMGwfrqapgkerefvaALNWSGGSTYYVDS VKGrftisrdnakntvylqmnslkpedtavyycaaAGSFSLGGRPYGDDYwgkgtlvtvssgg ggsggggsggggsggggsggggsggggsggggsevqlvesggglvqaggslrlscaasgrtfs NYAMGwfrqapgkerefvaALNWSGGSTYYVDSVKGrftisrdnakntvylqmnslkpedtav yycaaAGSFSLGGRPYGDDYwgkgtlvtvssggggsggggsggggsggggsggggsggggsgg ggsevqlvesggglvqaggslrlscaasgrtfsNYAMGwfrqapgkerefvaALNWSGGSTYY VDSVKGrftisrdnakntvylqmnslkpedtavyycaaAGSFSLGGRPYGDDYwgkgtlvtvs sggggsggggsggggsggggsggggsggggsggggsevqlvesggglvqaggslrlscaasgr tfsNYAMGwfrqapgkerefvaALNWSGGSTYYVDSVKGrftisrdnakntvylqmnslkped tavyycaaAGSFSLGGRPYGDDYwgkgtlvtvss	10
7A12 penta	evqlvesggglvqaggslrlscaasgrtfsNYAMGwfrqapgkerefvaALNWSGGSTYYVDS VKGrftisrdnakntvylqmnslkpedtavyycaaAGSFSLGGRPYGDDYwgkgtlvtvssgg ggsggggsggggsggggsggggsggggsggggsevqlvesggglvqaggslrlscaasgrtfs NYAMGwfrqapgkerefvaALNWSGGSTYYVDSVKGrftisrdnakntvylqmnslkpedtav yycaaAGSFSLGGRPYGDDYwgkgtlvtvssggggsggggsggggsggggsggggsggggsgg ggsevqlvesggglvqaggslrlscaasgrtfsNYAMGwfrqapgkerefvaALNWSGGSTYY VDSVKGrftisrdnakntvylqmnslkpedtavyycaaAGSFSLGGRPYGDDYwgkgtlvtvs sggggsggggsggggsggggsggggsggggsggggsevqlvesggglvqaggslrlscaasgr tfsNYAMGwfrqapgkerefvaALNWSGGSTYYVDSVKGrftisrdnakntvylqmnslkped tavyycaaAGSFSLGGRPYGDDYwgkgtlvtvssggggsggggsggggsggggsggggsgggg sggggsevqlvesggglvqaggslrlscaasgrtfsNYAMGwfrqapgkerefvaALNWSGGS TYYVDSVKGrftisrdnakntvylqmnslkpedtavyycaaAGSFSLGGRPYGDDYwgkgtlv tvss	11
10F1 tri 9	evqlvesggglvqpggslrlscaasgftfsRYWMYwvrqapgkglewvsAINSGGGDTYYRDS VRGrftisrdnfkntlylqmnslksedtavyycakAEGPPTFSLIRTMTVDPgaqgtqvtvss ggggsgggsevqlvesggglvqpggslrlscaasgftfsRYWMYwvrqapgkglewvsAINSG GGDTYYRDSVRGrftisrdnfkntlylqmnslksedtavyycakAEGPPTFSLIRTMTVDPga qgtqvtvssggggsgggsevqlvesggglvqpggslrlscaasgftfsRYWMYwvrqapgkgl ewvsAINSGGGDTYYRDSVRGrftisrdnfkntlylqmnslksedtavyycakAEGPPTFSLI RTMTVDPgaqgtqvtvss	12
10F1 tri 20	evqlvesggglvqpggslrlscaasgftfsRYWMYwvrqapgkglewvsAINSGGGDTYYRDS VRGrftisrdnfkntlylqmnslksedtavyycakAEGPPTFSLIRTMTVDPgaqgtqvtvss ggggsggggsggggsggggsevqlvesggglvqpggslrlscaasgftfsRYWMYwvrqapgk glewvsAINSGGGDTYYRDSVRGrftisrdnfkntlylqmnslksedtavyycakAEGPPTFS LIRTMTVDPgaqgtqvtvssggggsggggsggggsggggsevqlvesggglvqpggslrlsca asgftfsRYWMYwvrqapgkglewvsAINSGGGDTYYRDSVRGrftisrdnfkntlylqmnsl ksedtavyycakAEGPPTFSLIRTMTVDPgaqgtqvtvss	13
10F1 tri	evqlvesggglvqpggslrlscaasgftfsRYWMYwvrqapgkglewvsAINSGGGDTYYRDS VRGrftisrdnfkntlylqmnslksedtavyycakAEGPPTFSLIRTMTVDPgaqgtqvtvss ggggsggggsggggsggggsggggsggggsggggsevqlvesggglvqpggslrlscaasgft fsRYWMYwvrqapgkglewvsAINSGGGDTYYRDSVRGrftisrdnfkntlylqmnslksedt avyycakAEGPPTFSLIRTMTVDPgaqgtqvtvssggggsggggsggggsggggsggggsggg gsggggsevqlvesggglvqpggslrlscaasgftfsRYWMYwvrqapgkglewvsAINSGGG DTYYRDSVRGrftisrdnfkntlylqmnslksedtavyycakAEGPPTFSLIRTMTVDPgaqg tqvtvss	14

10F1 tetra	evqlvesggglvqpggslrlscaasgftfsRYWMYwvrqapgkglewvsAINSGGGDTYYRDS VRGrftisrdnfkntlylqmnslksedtavyycakAEGPPTFSLIRTMTVDPgaqgtqvtvss ggggsggggsggggsggggsggggsggggsggggsevqlvesggglvqpggslrlscaasgft fsRYWMYwvrqapgkglewvsAINSGGGDTYYRDSVRGrftisrdnfkntlylqmnslksedt avyycakAEGPPTFSLIRTMTVDPgaqgtqvtvssggggsggggsggggsggggsggggsggg gsggggsevqlvesggglvqpggslrlscaasgftfsRYWMYwvrqapgkglewvsAINSGGG DTYYRDSVRGrftisrdnfkntlylqmnslksedtavyycakAEGPPTFSLIRTMTVDPgaqg tqvtvssggggsggggsggggsggggsggggsggggsevqlvesggglvqpggslrls caasgftfsRYWMYwvrqapgkglewvsAINSGGGDTYYRDSVRGrftisrdnfkntlylqmn slksedtavyycakAEGPPTFSLIRTMTVDPgaqgtqvtvss	15
10F1 penta	evqlvesggglvqpggslrlscaasgftfsRYWMYwvrqapgkglewvsAINSGGGDTYYRDS VRGrftisrdnfkntlylqmnslksedtavyycakAEGPPTFSLIRTMTVDPgaqgtqvtvss ggggsggggsggggsggggsggggsggggsggggsevqlvesggglvqpggslrlscaasgft fsRYWMYwvrqapgkglewvsAINSGGGDTYYRDSVRGrftisrdnfkntlylqmnslksedt avyycakAEGPPTFSLIRTMTVDPgaqgtqvtvssggggsggggsggggsggggsggggsggg gsggggsevqlvesggglvqpggslrlscaasgftfsRYWMYwvrqapgkglewvsAINSGGG DTYYRDSVRGrftisrdnfkntlylqmnslksedtavyycakAEGPPTFSLIRTMTVDPgaqg tqvtvssggggsggggsggggsggggsggggsggggsevqlvesggglvqpggslrls caasgftfsRYWMYwvrqapgkglewvsAINSGGGDTYYRDSVRGrftisrdnfkntlylqmn slksedtavyycakAEGPPTFSLIRTMTVDPgaqgtqvtvssggggsggggsggggsggggsg gggsggggsggggsevqlvesggglvqpggslrlscaasgftfsRYWMYwvrqapgkglewvs AINSGGGDTYYRDSVRGrftisrdnfkntlylqmnslksedtavyycakAEGPPTFSLIRTMT VDPgaqgtqvtvss	16
11D1 tri	evqlvesggglvqpggslrlscaasgsidsINNMGwyrqapgkqrelvaEITPRGRTNYADSE KSrftisrdnakrtvnlqmnslkpedtavyycnaEVRERGTSWYRPDYwgqgtqvtvssgggg sggggsggggsggggsggggsggggsggggsevqlvesggglvqpggslrlscaasgsidsIN NMGwyrqapgkqrelvaEITPRGRTNYADSEKSrftisrdnakrtvnlqmnslkpedtavyyc naEVRERGTSWYRPDYwgqgtqvtvssggggsggggsggggsggggsggggsggggsggggse vqlvesggglvqpggslrlscaasgsidsINNMGwyrqapgkqrelvaEITPRGRTNYADSEK SrftisrdnakrtvnlqmnslkpedtavyycnaEVRERGTSWYRPDYwgqgtqvtvss	17
11D1 tetra	evqlvesggglvqpggslrlscaasgsidsINNMGwyrqapgkqrelvaEITPRGRTNYADSE KSrftisrdnakrtvnlqmnslkpedtavyycnaEVRERGTSWYRPDYwgqgtqvtvssgggg sggggsggggsggggsggggsggggsggggsevqlvesggglvqpggslrlscaasgsidsIN NMGwyrqapgkqrelvaEITPRGRTNYADSEKSrftisrdnakrtvnlqmnslkpedtavyyc naEVRERGTSWYRPDYwgqgtqvtvssggggsggggsggggsggggsggggsggggsggggse vqlvesggglvqpggslrlscaasgsidsINNMGwyrqapgkqrelvaEITPRGRTNYADSEK SrftisrdnakrtvnlqmnslkpedtavyycnaEVRERGTSWYRPDYwgqgtqvtvssggggs ggggsggggsggggsggggsggggsggggsevqlvesggglvqpggslrlscaasgsidsINN MGwyrqapgkqrelvaEITPRGRTNYADSEKSrftisrdnakrtvnlqmnslkpedtavyycn aEVRERGTSWYRPDYwgqgtqvtvss	18
11D1 penta	evqlvesggglvqpggslrlscaasgsidsINNMGwyrqapgkqrelvaEITPRGRTNYADSE KSrftisrdnakrtvnlqmnslkpedtavyycnaEVRERGTSWYRPDYwgqgtqvtvssgggg sggggsggggsggggsggggsggggsggggsevqlvesggglvqpggslrlscaasgsidsIN NMGwyrqapgkqrelvaEITPRGRTNYADSEKSrftisrdnakrtvnlqmnslkpedtavyyc naEVRERGTSWYRPDYwgqgtqvtvssggggsggggsggggsggggsggggsggggsggggse vqlvesggglvqpggslrlscaasgsidsINNMGwyrqapgkqrelvaEITPRGRTNYADSEK SrftisrdnakrtvnlqmnslkpedtavyycnaEVRERGTSWYRPDYwgqgtqvtvssggggs ggggsggggsggggsggggsggggsggggsevqlvesggglvqpggslrlscaasgsidsINN MGwyrqapgkqrelvaEITPRGRTNYADSEKSrftisrdnakrtvnlqmnslkpedtavyycn aEVRERGTSWYRPDYwgqgtqvtvssggggsggggsggggsggggsggggsggggsggggsev qlvesggglvqpggslrlscaasgsidsINNMGwyrqapgkqrelvaEITPRGRTNYADSEKS rftisrdnakrtvnlqmnslkpedtavyycnaEVRERGTSWYRPDYwgqgtqvtvss	19

11H6 tri	evqlvesggglvqpggslrlscaasgtfdkINNMGwyrqapgkqrdlvaQITPGGITDYADSV KGrftisrdnakdtmylqmnslkpedtavyfcnaEILKRAYIDVYVNYwgqgtqvtvssgggg sggggsggggsggggsggggsggggsggggsevqlvesggglvqpggslrlscaasgtfdkIN NMGwyrqapgkqrdlvaQITPGGITDYADSVKGrftisrdnakdtmylqmnslkpedtavyfc naEILKRAYIDVYVNYwgqgtqvtvssgggggsggggsggggsggggsggggsggggsggggse vqlvesggglvqpggslrlscaasgtfdkINNMGwyrqapgkqrdlvaQITPGGITDYADSVK GrftisrdnakdtmylqmnslkpedtavyfcnaEILKRAYIDVYVNYwgqgtqvtvss	20
11H6 tetra	evqlvesggglvqpggslrlscaasgtfdkINNMGwyrqapgkqrdlvaQITPGGITDYADSV KGrftisrdnakdtmylqmnslkpedtavyfcnaEILKRAYIDVYVNYwgqgtqvtvssgggg sggggsggggsggggsggggsggggsggggsevqlvesggglvqpggslrlscaasgtfdkIN NMGwyrqapgkqrdlvaQITPGGITDYADSVKGrftisrdnakdtmylqmnslkpedtavyfc naEILKRAYIDVYVNYwgqgtqvtvssgggggsggggsggggsggggsggggsggggsggggse vqlvesggglvqpggslrlscaasgtfdkINNMGwyrqapgkqrdlvaQITPGGITDYADSVK GrftisrdnakdtmylqmnslkpedtavyfcnaEILKRAYIDVYVNYwgqgtqvtvssggggs ggggsggggsggggsggggsggggsggggsevqlvesggglvqpggslrlscaasgtfdkINN MGwyrqapgkqrdlvaQITPGGITDYADSVKGrftisrdnakdtmylqmnslkpedtavyfcn aEILKRAYIDVYVNYwgqgtqvtvss	21
11H6 penta	evqlvesggglvqpggslrlscaasgtfdkINNMGwyrqapgkqrdlvaQITPGGITDYADSV KGrftisrdnakdtmylqmnslkpedtavyfcnaEILKRAYIDVYVNYwgqgtqvtvssgggg sggggsggggsggggsggggsggggsggggsevqlvesggglvqpggslrlscaasgtfdkIN NMGwyrqapgkqrdlvaQITPGGITDYADSVKGrftisrdnakdtmylqmnslkpedtavyfc naEILKRAYIDVYVNYwgqgtqvtvssgggggsggggsggggsggggsggggsggggsggggse vqlvesggglvqpggslrlscaasgtfdkINNMGwyrqapgkqrdlvaQITPGGITDYADSVK GrftisrdnakdtmylqmnslkpedtavyfcnaEILKRAYIDVYVNYwgqgtqvtvssggggs ggggsggggsggggsggggsggggsggggsevqlvesggglvqpggslrlscaasgtfdkINN MGwyrqapgkqrdlvaQITPGGITDYADSVKGrftisrdnakdtmylqmnslkpedtavyfcn aEILKRAYIDVYVNYwgqgtqvtvssggggsggggsggggsggggsggggsggggsggggsev qlvesggglvqpggslrlscaasgtfdkINNMGwyrqapgkqrdlvaQITPGGITDYADSVKG rftisrdnakdtmylqmnslkpedtavyfcnaEILKRAYIDVYVNYwgqgtqvtvss	22
Link 1	ggggsggggsggggsggggsggggsggggsggggs	23
Link 2	ggggsggggsggggsggggs	24
Link 3	ggggsgggs	25
Link 4	GGGGS	81
Link 5	GGGS	82
11H6a tetra2	evqlvesggglvqpggslrlscaasgtfdkINNMGwyrqapgkqrdlvaQITPGGITDYADSV KGrftisrdnakdtmylqmnslkpedtavyfcnaEILKRAYIDVYVNYwgqgtqvtvssgggg sggggsggggsggggsggggsggggsggggsevqllesggglvqpggslrlscaasgtfdkIN NMGwyrqapgkqrdlvaQITPGGITDYADSVKGrftisrdnakdtmylqmnslkpedtavyfc naEILKRAYIDVYVNYwgqgtqvtvssgggggsggggsggggsggggsggggsggggsggggse vqlvesggglvqpggslrlscaasgtfdkINNMGwyrqapgkqrdlvaQITPGGITDYADSVK GrftisrdnakdtmylqmnslkpedtavyfcnaEILKRAYIDVYVNYwgqgtqvtvssggggs ggggsggggsggggsggggsggggsggggsevqllesggglvqpggslrlscaasgtfdkINN MGwyrqapgkqrdlvaQITPGGITDYADSVKGrftisrdnakdtmylqmnslkpedtavyfcn aEILKRAYIDVYVNYwgqgtqvtvss	88
Tag1	EQKLISEEDLN	91
Tag2	HHHHHH	92
Tag3	AAAEQKLISEEDLNGAAHHHHHH	93
Tag4	GAAEQKLISEEDLNGAAHHHHHH	94
Tag5	GGGC	95

Table 3: Human Optimized Nucleotide (NT) and Polypeptide (AA) Sequences

Name	Sequence	ID:
4E6 hu (AA)	evqllesggglvqpggslrlscaasgrtfgSIRVGwfrqapgkgrefvsAINRNDGTTYYADS VKGrftisrdnskntvylqmnslrpedtavyycaaGLQYNRAADRVPVGAVYwgqgtlvtvss	26
4E6 hu trimer (AA)	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRTFGSIRVGWFRQAPGKGREFVSAINRNDGTTYYADS VKGRFTISRDNSKNTVYLQMNSLRPEDTAVYYCAAGLQYNRAADRVPVGAVYWGQGTLVTVSS GGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSEVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRT FGSIRVGWFRQAPGKGREFVSAINRNDGTTYYADSVKGRFTISRDNSKNTVYLQMNSLRPEDT AVYYCAAGLQYNRAADRVPVGAVYWGQGTLVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGG GSGGGGSEVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRTFGSIRVGWFRQAPGKGREFVSAINRNDG TTYYADSVKGRFTISRDNSKNTVYLQMNSLRPEDTAVYYCAAGLQYNRAADRVPVGAVYWGQG TLVTVSS	27
4E6 hu tetramer (AA)	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRTFGSIRVGWFRQAPGKGREFVSAINRNDGTTYYADS VKGRFTISRDNSKNTVYLQMNSLRPEDTAVYYCAAGLQYNRAADRVPVGAVYWGQGTLVTVSS GGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSEVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRT FGSIRVGWFRQAPGKGREFVSAINRNDGTTYYADSVKGRFTISRDNSKNTVYLQMNSLRPEDT AVYYCAAGLQYNRAADRVPVGAVYWGQGTLVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGG GSGGGGSEVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRTFGSIRVGWFRQAPGKGREFVSAINRNDG TTYYADSVKGRFTISRDNSKNTVYLQMNSLRPEDTAVYYCAAGLQYNRAADRVPVGAVYWGQG TLVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSEVQLLESGGGLVQPGGSLRLS CAASGRTFGSIRVGWFRQAPGKGREFVSAINRNDGTTYYADSVKGRFTISRDNSKNTVYLQMN SLRPEDTAVYYCAAGLQYNRAADRVPVGAVYWGQGTLVTVSS	28
4E6 hu pentamer (AA)	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRTFGSIRVGWFRQAPGKGREFVSAINRNDGTTYYADS VKGRFTISRDNSKNTVYLQMNSLRPEDTAVYYCAAGLQYNRAADRVPVGAVYWGQGTLVTVSS GGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSEVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRT FGSIRVGWFRQAPGKGREFVSAINRNDGTTYYADSVKGRFTISRDNSKNTVYLQMNSLRPEDT AVYYCAAGLQYNRAADRVPVGAVYWGQGTLVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGG GSGGGGSEVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRTFGSIRVGWFRQAPGKGREFVSAINRNDG TTYYADSVKGRFTISRDNSKNTVYLQMNSLRPEDTAVYYCAAGLQYNRAADRVPVGAVYWGQG TLVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSEVQLLESGGGLVQPGGSLRLS CAASGRTFGSIRVGWFRQAPGKGREFVSAINRNDGTTYYADSVKGRFTISRDNSKNTVYLQMN SLRPEDTAVYYCAAGLQYNRAADRVPVGAVYWGQGTLVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSG GGGSGGGGSGGGGSEVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRTFGSIRVGWFRQAPGKGREFVS AINRNDGTTYYADSVKGRFTISRDNSKNTVYLQMNSLRPEDTAVYYCAAGLQYNRAADRVPVG AVYWGQGTLVTVSS	29
4E6 hu Monomer (NT)	gaggtgcagctgctggagtctggcggcggactggtgcagcctggcggctccctgagactgtcctgcgccg cctccggccggaccttcggctccatcagagtgggctggttccggcaggcccctggcaagggccgggagtt cgtgtccgccatcaaccggaacgacggcaccacctactacgccgactccgtgaagggccggttcaccatc tcccgggacaactccaagaacaccgtgtacctgcagatgaactccctgcggcccgaggacaccgccgtgt actactgcgccgctggcctgcagtacaacagagccgccgacagagtgcctgtgggcgctgtgtactgggg ccagggcaccctggtgaccgtgtcctct	96

4E6 hu Monomer (NT)	gaggtgcagctgctggagtctggcggcggactggtgcagcctggcggctccctgagactgtcctgcgccg cctccggccggaccttcggctccatcagagtgggctggttccggcaggcccctggcaagggccgggagtt cgtgtccgccatcaaccggaacgacggcaccacctactacgccgactccgtgaagggccggttcaccatc tcccgggacaactccaagaacaccgtgtacctgcagatgaactccctgcggcccgaggacaccgccgtgt actactgcgccgctggcctgcagtacaacagagccgccgacagagtgcctgtgggcgctgtgtactgggg ccagggcaccctggtgaccgtgtcctctggcggcggaggatctggaggggggaggaagcggcggaggagga tctggcggcggaggaagtgggggcggagggagtggcggaggtggaagtggtggaggggggcagcgaggtgc agctgctggagagcggcggaggactggtgcagccaggcggatctctgcgcctgagctgcgccgccagcgg cagaacctttggcagcatccgcgtgggatggttcagacaggctcccggaaagggacgcgagtttgtgtct gctatcaatcgcaatgatggcaccacatactatgctgatagcgtgaagggaagattcaccatcagccgcg acaatagcaagaatacagtgtatctgcagatgaatagcctgcgcccagaggatacagctgtgtattactg tgctgccggactgcagtataaccgggctgccgatcgggtgcccgtgggagccgtgtattggggacaggga acactggtgacagtgtcctctggcggcggaggatctgggggtggcggatctggcggcggaggaagcggtg gcggaggatctggcggcggaggaagcggaggggggaggatctggcggcggaggatctgaggtgcagctgct ggagtccggcggaggactggtgcagccaggcggcagcctgcggctgtcttgcgccgcttctggcagaaca ttcggctctatccgcgtgggctggtttaggcaggctccaggcaagggacgcgagttcgtgagcgctatca acagaaacgatggcacaacctattatgctgattctgtgaagggcaggtttacaatcagcagggataattc taagaataccgtgtacctgcagatgaactctctgaggccagaggataccgctgtgtactattgcgctgcc ggcctgcagtataatagggccgctgaccgcgtgccagtgggcgccgtgtattggggccagggcaccctgg tgacagtgtcctctggcggaggtggcagcggcggtggcggatctggcggcggaggaagtgggggcggagg atctggcggcggaggaagcggcggaggggggatctggcggcggaggatctgaggtgcagctgctggagtct ggcggaggactggtgcagcctggcggaagcctgagactgagctgtgctgcttctggccgcaccttcggaa gcatcagagtgggatggtttcgccaggctccaggaaagggccgggagttcgtctctgctatcaatagaaa tgacggaacaacatattacgccgacagcgtgaagggacgctttacaatctctagggataacagcaagaac accgtgtatctgcagatgaacagcctgcggcccgaggataccgccgtgtattattgtgccgctggactgc agtacaatcgggccgctgatagagtgcctgtgggagccgtgtactggggccagggcacactggtgacagt gtctagc	97
11H6 hu (AA)	evqllesggglvqpggslrlscaasgtfdkINNMGwyrqapgkqrdlvaQITPGGITDYADSV KGrftisrdnskntlylqmnslrpedtavyycnaEILKRAYIDVYVNYwgqgtlvtvss	30
11H6 hu trimer (AA)	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGTFDKINNMGWYRQAPGKQRDLVAQITPGGITDYADSV KGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRPEDTAVYYCNAEILKRAYIDVYVNYWGQGTLVTVSSGGGG SGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSEVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGTFDKIN NMGWYRQAPGKQRDLVAQITPGGITDYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRPEDTAVYYC NAEILKRAYIDVYVNYWGQGTLVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSE VQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGTFDKINNMGWYRQAPGKQRDLVAQITPGGITDYADSVK GRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRPEDTAVYYCNAEILKRAYIDVYVNYWGQGTLVTVSS	31
11H6 hu tetramer (AA)	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGTFDKINNMGWYRQAPGKQRDLVAQITPGGITDYADSV KGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRPEDTAVYYCNAEILKRAYIDVYVNYWGQGTLVTVSSGGGG SGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSEVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGTFDKIN NMGWYRQAPGKQRDLVAQITPGGITDYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRPEDTAVYYC NAEILKRAYIDVYVNYWGQGTLVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSE VQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGTFDKINNMGWYRQAPGKQRDLVAQITPGGITDYADSVK GRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRPEDTAVYYCNAEILKRAYIDVYVNYWGQGTLVTVSSGGGGS GGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSEVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGTFDKINN MGWYRQAPGKQRDLVAQITPGGITDYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRPEDTAVYYCN AEILKRAYIDVYVNYWGQGTLVTVSS	32

11H6 hu pentamer (AA)	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGTFDKINNMGWYRQAPGKQRDLVAQITPGGITDYADSV KGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRPEDTAVYYCNAEILKRAYIDVYVNYWGQGTLVTVSSGGGG SGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSEVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGTFDKIN NMGWYRQAPGKQRDLVAQITPGGITDYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRPEDTAVYYC NAEILKRAYIDVYVNYWGQGTLVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSE VQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGTFDKINNMGWYRQAPGKQRDLVAQITPGGITDYADSVK GRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRPEDTAVYYCNAEILKRAYIDVYVNYWGQGTLVTVSSGGGGS GGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSEVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGTFDKINN MGWYRQAPGKQRDLVAQITPGGITDYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRPEDTAVYYCN AEILKRAYIDVYVNYWGQGTLVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSEV QLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGTFDKINNMGWYRQAPGKQRDLVAQITPGGITDYADSVKG RFTISRDNSKNTLYLQMNSLRPEDTAVYYCNAEILKRAYIDVYVNYWGQGTLVTVSS	33
11H6 hu monomer (NT)	gaggtgcagctgctggagtctggcggcggactggtgcagcctggcggctccctgagactgtcctgcgccg cctccggcaccttcgacaagatcaacaacatgggctggtacaggcaggcccctggcaagcagagggacct ggtggcccagatcacccctggcggcatcaccgactacgccgactccgtgaagggccggttcaccatctcc cgggacaactccaagaacaccctgtacctgcagatgaactccctgcggcccgaggacaccgccgtgtact actgcaacgccgagatcctgaagcgggcctacatcgacgtgtacgtgaactactggggccagggcaccct ggtgaccgtgtcctct	98
11H6 hu tetramer (NT)	gaggtgcagctgctggagtctggcggcggactggtgcagcctggcggctccctgagactgtcctgcgccg cctccggcaccttcgacaagatcaacaacatgggctggtacaggcaggcccctggcaagcagagggacct ggtggcccagatcacccctggcggcatcaccgactacgccgactccgtgaagggccggttcaccatctcc cgggacaactccaagaacaccctgtacctgcagatgaactccctgcggcccgaggacaccgccgtgtact actgcaacgccgagatcctgaagcgggcctacatcgacgtgtacgtgaactactggggccagggcaccct ggtgaccgtgtcctctggcggcggaggatctggaggggaggaagcggcggaggaggatctggcggcgga ggaagtgggggcggagggagtggcggaggtggaagtggtggaggggcagcgaggtgcagctgctggaga gcggcggaggactggtgcagccaggcggatctctgcgcctgagctgcgccgccagcggcacatttgataa gatcaataatatgggatggtatcgccaggctccaggcaagcagcgcgatctggtggctcagatcacacca ggcggaatcacagattatgccgatagcgtgaagggaagattcaccatcagccgcgacaatagcaagaata cactgtatctgcagatgaatagcctgcgcccagaggatacagctgtgtattactgtaatgctgagatcct gaagcgcgcttatatcgatgtgtatgtgaattattggggacagggaacactggtgacagtgtcctctggc ggcggaggatctgggggtggcggatctggcggcggaggaagcggtggcggaggatctggcggcggaggaa gcggaggggggaggatctggcggcggaggatctgaggtgcagctgctggagtccggcggaggactggtgca gccaggcggcagcctgcggctgtcttgcgccgcttctggcaccttcgataagatcaacaatatgggatgg tacagacaggctcccggaaagcagcgggatctggtggcccagatcaccccaggcggcatcacagattacg ctgattctgtgaagggcaggtttacaatcagcagggataattctaagaataccctgtacctgcagatgaa ctctctgaggccagaggataccgctgtgtactattgtaacgccgagatcctgaagagggcttacatcgat gtgtacgtgaattattggggccagggcaccctggtgacagtgtcctctggcggaggtggcagcggcggtg gcggatctggcggcggaggaagtgggggcggaggatctggcggcggaggaagcggcggaggggggatctgg cggcggaggatctgaggtgcagctgctggagtctggcggaggactggtgcagcctggcggaagcctgaga ctgagctgtgctgcttctggcaccttcgacaagatcaataatatgggctggtatagacaggccccaggaa agcagagggacctggtcgctcagatcacacccggcggaatcaccgactacgctgacagcgtgaagggacg ctttacaatctctagggataacagcaagaacaccctgtatctgcagatgaacagcctgcggcccgaggat accgccgtgtattattgcaatgctgagatcctgaagagggcctatatcgacgtgtatgtgaattactggg gccagggcacactggtgacagtgtcctct	99

Table 4: Sequences for CDRs and frameworks, plus preferred combinations as provided in for formula I, namely FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4

Clone	FR1	ID	CDR1	ID	FR2	ID
7A12	evqlvesggglvqaggslrlscaasgrtfs	34	NYAMG	41	wfrqapgkerefva	45
4E6 hu	evqllesggglvqpggslrlscaasgrtfg	35	SIRVG	42	wfrqapgkgrefvs	46
4E6	evqlvesgggsvqagdslrlscaasgrtfg	36	SIRVG	42	wfrqtpgkerefva	47
11H6 hu	evqllesggglvqpggslrlscaasgtfdk	37	INNMG	43	wyrqapgkqrdlva	48
11H6	evqlvesggglvqpggslrlscaasgtfdk	38	INNMG	43	wyrqapgkqrdlva	48
11D1	evqlvesggglvqpggslrlscaasgsids	39	INNMG	43	wyrqapgkqrelva	49

10F1	evqlvesgggl vqpggslrlscaasgftfs	40	RYWMY	44	wvrqapgkglewvs	50

Table 4 (cont.)

Clone	CDR2	ID	FR3	ID
7A12	ALNWSGGSTYYVDSVKG	51	rftisrdnakntvylqmnslkpedtavyycaa	56
4E6 hu	AINRNDGTTYYADSVKG	52	rftisrdnskntvylqmnslrpedtavyycaa	57
4E6	AINRNDGTTYYADSVKG	52	rftisrdnakntvymqmaslkpedtavyycaa	58
11H6 hu	QITPGGITDYADSVKG	53	rftisrdnskntlylqmnslrpedtavyycna	59
11H6	QITPGGITDYADSVKG	53	rftisrdnakdtmylqmnslkpedtavyfcna	60
11D1	EITPRGRTNYADSEKS	54	rftisrdnakrtvnlqmnslkpedtavyycna	61
10F1	AINSGGGDTYYRDSVRG	55	rftisrdnfkntlylqmnslksedtavyycak	62

Table 4 (cont.)

Clone	CDR3	ID	FR4	ID
7A12	AGSFSLGGRPYGDDY	**63**	wgkgtlvtvss	**69**
4E6 hu	GLQYNRAADRVPVGAVY	**64**	wgqgtlvtvss	**70**
4E6	GLQYNRSADRVPVGAVY	**65**	wgqgtqvtvss	**71**
11H6 hu	EILKRAYIDVYVNY	**66**	wgqgtlvtvss	**70**
11H6	EILKRAYIDVYVNY	**66**	wgqgtqvtvss	**71**
11D1	EVRERGTSWYRPDY	**67**	wgqgtqvtvss	**71**
10F1	AEGPPTFSLIRTMTVDP	**68**	gaqgtqvtvss	**72**

[0051] Further aspects of the NB agents of the invention are provided below.

[0052] The compounds, (monovalent or multivalent) polypeptides and compositions described herein may be such that they bind DR5 but not to the binding site of TRAIL on the DR5, and/or may be such that they do not compete with TRAIL for binding to the DR5. Such compounds and polypeptides may be such that their binding to the DR5 induces, triggers, increases or enhances the signaling mediated by the DR5, and in particular triggers or induces apoptosis in the cell on which the DR5 is present. Such compounds and polypeptides may also be such that they increase or enhance the signaling that is mediated by TRAIL and the DR5 upon binding of TRAIL to its receptor. According to this aspect, binding of both TRAIL as well as the compounds/polypeptides described herein to the same receptor may lead to a synergistic effect on such signaling.

[0053] In one specific aspect, the compounds and polypeptides described herein are multimeric compounds and polypeptides (as described herein) directed against DR5. In particular, the compounds and polypeptides described herein may be multimeric polypeptides that are capable of multimerizing DR5 on a cell membrane and as such are capable of inducing, triggering, increasing or enhancing the signaling mediated by the DR5, and more in particular of triggering or inducing apoptosis in the cell on which the DR5 is present. In one embodiment, such monomeric or multimeric compounds or polypeptides disclosed herein may bind DR5 at or near the binding site of TRAIL on the DR5, and/or

may compete with TRAIL for binding to DR5. In one embodiment, they do not bind to the binding site for TRAIL on the DR5, essentially do not hinder or prevent binding of TRAIL to the DR5, and/or do not compete with TRAIL for binding to the DR5, and even be such that they increase or enhance the signaling that is mediated by TRAIL and the DR5 upon binding of TRAIL to its receptor (which may again result in a synergistic effect upon the signaling mediated by the DR5). In one embodiment, the amino acid sequence contains a portion derived from naturally occurring TRAIL ligand, i.e., it comprises a segment made up of a natural TRAIL ligand polypeptide or any TRAIL-receptor binding fragment of such TRAIL-ligand.

[0054] The polypeptides and compositions of the present invention can be used for the prevention and treatment of diseases and disorders associated with DR5. Specifically, "diseases and disorders associated with DR5" are defined as those that can be prevented and/or treated, respectively, by suitably administering to a subject in need thereof (i.e., having the disease or disorder or at least one symptom thereof and/or at risk of attracting or developing the disease or disorder) of either a polypeptide or composition of the invention (and in particular, of a pharmaceutically active amount thereof) and/or of a known active principle active against DR5 or a biological pathway or mechanism in which DR5 is involved (and in particular, of a pharmaceutically active amount thereof), which results in the modulation, i.e., agonism or antagonism, of DN5-mediated signaling. As listed below, diseases and disorders treatable by the induction of apoptosis in the cell or tissue targetted in the disease are particularly included herein as being associated with DR5.

[0055] Diseases and disorders associated with DR5 may in particular be diseases and disorders that can be treated by triggering, initiating, increasing or enhancing the signaling, mechanisms, responses and effects in which a DR5 is involved (in other words, by effecting an agonistic effect on a DR5 or on DR5 mediated signaling). More in particular, diseases and disorders associated with DR5 may be diseases and disorders that can be treated by triggering, initiating, increasing or enhancing cell apoptosis in one or more cells or tissues in the subject to be treated.

[0056] In one embodiment, the NB agents of the invention are agonists of the TRAIL receptors DR5, having the potential to be used in therapy against a wide range of diseases associated with DR5. Examples of diseases and disorders associated with DR5 will be clear to the skilled person based on the disclosure herein. In one embodiment, inventive NB agents have utility in the treatment of proliferative diseases including, e.g., cancers such as solid tumors, primary and metastatic cancers such as renal cell carcinoma, and cancers of the lung (e.g., small cell lung cancer "SCLC" and non-small cell lung cancer "NSCLC"), pancreas, hematopoietic malignancy, glioma, astrocytoma, mesothelioma, colorectal cancers, prostate cancer, osteosarcoma, melanoma, lymphoma (including but

not limited to Burkitt's Lymphoma), breast cancer, endometrial cancer, liver cancer, gastric cancer, skin cancer, ovarian cancer and squamous cell cancers of any origin (e.g., lung, head and neck, breast, thyroid, cervix, skin, esophageal, etc.), as well as liquid cancers, e.g., such as leukemias including especially a T-cell leukemia such as acute T-cell leukemia (T-ALL), acute B-cell leukemia (B-ALL), chronic myelogenous leukemia (CML), acute myelogenous leukemia (AML), plasma cell myeloma and multiple myeloma (MM). In one embodiment, the inventive NB agents have utility in the treatment of non-cancer indications including, but not limited to, e.g., inflammatory and autoimmune diseases, such as systemic lupus erythematosus, Hashimoto's disease, rheumatoid arthritis, graft-versus-host disease, Sjogren's syndrome, pernicious anemia, Addison disease, scleroderma, Goodpasture's syndrome, Crohn's disease, autoimmune hemolytic anemia, sterility, myasthenia gravis, multiple sclerosis, Basedow's disease, thrombotic throbocytopenia, thrombopenia purpurea, insulin-dependent diabetes mellitus, allergy; asthma, atopic disease; arteriosclerosis; myocarditis; cardiomyopathy; globerula nephritis; and hypoplastic anemia.

[0057] Thus, without being limited thereto, the amino acid sequences and polypeptides of the invention can, e.g., be used to prevent and/or to treat all diseases and disorders that are currently being prevented or treated with active principles that can modulate DR5-mediated signaling, such as those mentioned herein and in the art references cited. In one embodiment the polypeptides of the invention can be used to prevent and/or to treat all diseases and disorders for which treatment with such active principles is currently being developed, has been proposed, or will be proposed or developed in future. In one embodiment, it is envisaged that, because of their favorable properties as further described herein, the polypeptides herein may be used for the prevention and treatment of other diseases and disorders than those for which these known active principles are being used or will be proposed or developed; and/or that the polypeptides of the present invention may provide new methods and regimens for treating the diseases and disorders described herein.

[0058] Other applications and uses of the amino acid sequences and polypeptides of the invention will become clear to the skilled person from the further disclosure herein.

[0059] In one embodiment, the invention provides pharmacologically active agents, as well as compositions comprising the same (whether or not complete polypeptides as described herein, and / or fragments and/or multimeric variants of said polypeptides or fragment, all of which are broadly referred to herein as "inventive compositions"), that can be used in the diagnosis, prevention and/or treatment of diseases and disorders associated with DR5 and of the further diseases and disorders mentioned herein; and to

provide methods for the diagnosis, prevention and/or treatment of such diseases and disorders that involve the administration and/or use of such agents and compositions.

[0060] In one embodiment the invention provides such pharmacologically active agents, compositions and/or methods that have certain advantages compared to the agents, compositions and/or methods that are currently used and/or known in the art. These advantages will become clear from the further description below.

[0061] In one embodiment, the invention provides amino acid sequences that are directed against DR5, in particular against DR5 from a warm-blooded animal, more in particular against DR5 from a mammal, and especially against human DR5; and to provide proteins and polypeptides comprising or essentially consisting of at least one such amino acid sequence.

[0062] In one embodiment the invention provides such amino acid sequences and such proteins and/or polypeptides that are suitable for prophylactic, therapeutic and/or diagnostic use in a warm-blooded animal, and in particular in a mammal, and especially in a human being.

[0063] In one embodiment the invention provides such amino acid sequences and such proteins and/or polypeptides that can be used for the prevention, treatment, alleviation and/or diagnosis of one or more diseases, disorders or conditions associated with DR5 and/or mediated by DR5 (such as the diseases, disorders and conditions mentioned herein) in a warm-blooded animal, in particular in a mammal, and more in particular in a human being.

[0064] In one embodiment the invention provides such inventive compositions that for use in the preparation of pharmaceutical or veterinary compositions for the prevention and/or treatment of one or more diseases, disorders or conditions associated with and/or mediated by DR5 (such as the diseases, disorders and conditions mentioned herein) in a warm-blooded animal, in particular in a mammal, and more in particular in a human being.

[0065] In one embodiment, the invention provides inventive compositions that are directed against and/or can specifically bind to DR5; as well as compounds and constructs, and in particular proteins and polypeptides, that comprise at least one such amino acid sequence. More specifically, the invention provides amino acid sequences that can specifically bind to DR5 cell surface receptor as e.g., defined with the accession number "BAA33723" to be found at e.g. the NCBI protein database. In particular, the invention provides amino acid sequences that can specifically bind to DR5 cell surface receptor as e.g. defined with the accession number "BAA33723" to be found at e.g. the NCBI protein database and that does not bind to at least another TRAIL-receptor, such as TRAIL-R3 and TRAIL-R4. A short from splice variant of human DR5 is also known (GenBank entry NP_671716).

[0066] In one embodiment, the invention provides amino acid sequences that can bind to DR5 with an affinity (suitably measured and/or expressed as a K_D-value (actual or apparent), a K_A-value (actual or apparent), a k_{on}-rate and/or a k_{off}-rate, or alternatively as an IC_{50} value, in the pharmaceutically acceptable range as provided herein; as well as compounds and constructs, and in particular proteins and polypeptides, that comprise at least one such amino acid sequence.

[0067] In one embodiment, inventive compositions are such that they:

a) bind to DR5 with a dissociation constant (K_D) of 10^{-5} to 10^{-12} moles/liter or less, and preferably 10^{-7} to 10^{-12} moles/liter or less and more preferably 10^{-8} to 10^{-12} moles/liter (i.e., with an association constant (K_A) of 10^5 to 10^{12} liter/ moles or more, and preferably 10^7 to 10^{12} liter/moles or more and more preferably 10^8 to 10^{12} liter/moles); and/or

b) bind to DR5 with a k_{on}-rate of between 10^2 $M^{-1}s^{-1}$ to about 10^7 $M^{-1}s^{-1}$, preferably between 10^3 $M^{-1}s^{-1}$ and 10^7 $M^{-1}s^{-1}$, more preferably between 10^4 $M^{-1}s^{-1}$ and 10^7 $M^{-1}s^{-1}$, such as between 10^5 $M^{-1}s^{-1}$ and 10^7 $M^{-1}s^{-1}$; and/or

c) bind to DR5 with a k_{off} rate between $1s^{-1}$ ($t_{1/2}$=0.69 s) and 10^{-6} s^{-1} (providing a near irreversible complex with a $t_{1/2}$ of multiple days), preferably between 10^{-2} s^{-1} and 10^{-6} s^{-1}, more preferably between 10^{-3} s^{-1} and 10^{-6} s^{-1}, such as between 10^{-4} s^{-1} and 10^{-6} s^{-1}.

[0068] In one embodiment, an inventive composition, whether monovalent or multivalent, binds to DR5 with an affinity less than 100 nM, and/or less than 10 nM, and/or less than 1 nM, such as less than 500 pM. In one embodiment, the inventive composition is a tetravalent composition. In one embodiment, the inventive composition is a pentavalent composition.

[0069] In one embodiment, an inventive composition, whether monovalent or multivalent, will specifically induce apoptosis in various cancer cell types (e.g., at least one type) with an IC_{50} less than 100 nM, preferably less than 10 nM, more preferably less than 1 nM, such as less than 500 pM. In one embodiment, a multivalent amino acid sequence of the invention is at least 10 fold more potent in tumor cell line than in normal (non-tumor) cell line, or at least 100 fold more potent than in normal (non-tumor) cell line, as measured, e.g., in non-tumor cell lines mentioned in the experimental part, e.g. Huvec, IMR-90 and ARPE-19. See examples and Table 13.

[0070] For binding to DR5, an inventive composition will usually contain within its amino acid sequence one or more amino acid residues or one or more stretches of amino acid residues (i.e., with each "stretch" comprising two or more amino acid residues that are adjacent to each other or in close proximity to each other, i.e., in the primary (linear) or tertiary (conformational) structure of the amino acid sequence) via which the amino acid sequence of the invention can bind to DR5, which amino acid residues or stretches of amino acid residues thus form the "site" for binding to DR5 (also referred to herein as the

"antigen binding site" or "epitope"). Epitope mapping experiments are provided herein in the Examples.

[0071] In one embodiment the inventive compositions provided herein are in essentially isolated form, or form part of a protein or polypeptide of the invention that may comprise or essentially consist of one or more amino acid sequences herein disclosed. In one embodiment the inventive compositions may further comprise one or more additional amino acid sequences. In one embodiment, such additional sequences are linked via one or more suitable linkers. Without limitation, the inventive compositions may be used as a binding unit in such a protein or polypeptide. Such inventive compositions may contain one or more further amino acid sequences that can serve as an additional binding unit (i.e., against one or more other targets than DR5), so as to provide a monovalent, multivalent or multispecific polypeptide of the invention, respectively. Such a protein or polypeptide may also be in essentially isolated form.

[0072] In one embodiment the inventive compositions essentially consist of a single amino acid chain that is not linked via disulphide bridges to any other amino acid sequence or chain (but that may or may not contain one or more intramolecular disulphide bridges) or pharmaceutically relevant composition. As an example of an intramolecular disulfide bridge, it is known that camelid V_{HH} constructs may sometimes contain a disulphide bridge between CDR3 and CDR1 or FR2. In one embodiment, inventive compositions may be linked to each other and/or to other amino acid sequences (e.g. via disulphide bridges) to provide alternative peptide constructs (for example Fab' fragments, $F(ab')_2$ fragments, ScFv constructs, "diabodies" and other multivalent and/or multispecific constructs. See review by Holliger and Hudson, Nat Biotechnol. 2005 Sep;23(9): 1126-36). Examples of pharmaceutically relevant compositions include drugs that treat a disease, or compositions that increase half life, target specific tissues, and/or kill the target cell.

[0073] In one embodiment the inventive compositions essentially consist of a single amino acid chain that is linked via at least one intermolecular disulphide bridge to any other amino acid sequence or chain (either of which may or may not contain one or more intramolecular disulphide bridges) or pharmaceutically relevant composition.

[0074] In one embodiment, when an inventive composition is intended for administration to a subject (for example for therapeutic and/or diagnostic purposes as described herein), it is either an amino acid sequence that does not occur naturally in said subject; or, when it does occur naturally in said subject, is in essentially isolated form.

[0075] In one embodiment for pharmaceutical use, the disclosed amino acid sequences of the invention (as well as compounds, constructs and polypeptides comprising the same) are directed against human DR5. In one embodiment for veterinary purposes, such disclosed compositions are directed against DR5 from the species to be

treated. In one embodiment for veterinary purposes, such disclosed compositions are cross-reactive with DR5 from the species to be treated.

[0076] In one embodiment, an inventive amino acid sequence has at least one binding site for binding against DR5, and may contain one or more further binding sites for binding against other epitopes, antigens, proteins or targets.

[0077] The efficacy of the amino acid sequences and polypeptides of the invention, and of compositions comprising the same, can be tested using any suitable in vitro assay, cell-based assay, in vivo assay and/or animal model known per se, or any combination thereof, depending on the specific disease or disorder involved. These may, e.g., be assays or models for measuring the influence of the amino acid sequences or compounds described herein on apoptosis, on the proliferation of tumor cells, and/or on the growth of tumors in an animal model for such a tumor. Suitable assays and animal models will be clear to the skilled person, and, e.g., include assays and animal models used in the experimental part below and in the art references cited herein. Examples are binding assays such as ELISA, FACS or surface plasmon resonance methodology; functional *in vitro* assays such as *in vitro* cell survival assay with a panel of tumor and normal cell lines, *in vitro* efficacy assay with Jurkat cell survival detection; functional *in vivo* assays such as single dose *in vivo* study combined with a caspase 3/7 activation read out providing various efficacy, PK and PD data.

[0078] In one embodiment according to the invention, amino acid sequences and polypeptides that are directed against DR5 from a first species of warm-blooded animal may or may not show cross-reactivity with DR5 from one or more other species of warm-blooded animal. For example, amino acid sequences and polypeptides directed against human DR5 may or may not show cross reactivity with DR5 from one or more other species of primates (such as, without limitation, monkeys from the genus Macaca (such as, and in particular, cynomologus monkeys (*Macaca fascicularis*, a.k.a., "cyno") and/or rhesus monkeys (*Macaca mulatta*)) and baboon (*Papio ursinus*)) and/or with DR5 from one or more species of animals that are often used in animal models for diseases (for example mouse, rat, rabbit, pig or dog), and in particular in animal models for diseases and disorders associated with DR5 (such as the species and animal models mentioned herein). In this respect, it will be clear to the skilled person that such cross-reactivity, when present, may have advantages from a drug development point of view, since it allows the amino acid sequences and polypeptides against human DR5 to be tested in such disease models. Various inventive constructs provided herein show specific cross-reactivity with cyno DR5.

[0079] In one embodiment, amino acid sequences and polypeptides of the invention that are cross-reactive with DR5 from multiple species of mammal will usually be

advantageous for use in veterinary applications, since it will allow the same amino acid sequence or polypeptide to be used across multiple species. Thus, in one embodiment amino acid sequences and polypeptides directed against DR5 from one species of animal (such as amino acid sequences and polypeptides against human DR5) can be used in the treatment of another species of animal, as long as the use of the amino acid sequences and/or polypeptides provide the desired effects in the species to be treated.

[0080] The present invention is in its broadest sense also not particularly limited to or defined by a specific antigenic determinant, epitope, part, domain, subunit or confirmation (where applicable) of DR5 against which the amino acid sequences and polypeptides of the invention are directed. However, in one embodiment the inventive amino acid sequences and polypeptides are directed against the extracellular domain of the DR5. In one non-limiting aspect, the inventive amino acid sequences and polypeptides are directed against the DR5-binding domain of DR5, and are as further defined herein. In one embodiment, a monovalent or multivalent amino acid sequence and polypeptides of the invention compete with the natural ligand of the DR5 in a competitive binding assay as described in the experimental part. In one embodiment, a monovalent or multivalent amino acid sequence and polypeptides of the invention binds synergistically with the natural ligand of the DR5 in a competitive binding assay.

[0081] In one embodiment of the invention, where applicable, an amino acid sequence of the invention can bind to two or more antigenic determinants, epitopes, parts, domains, subunits or confirmations of DR5. In such a case, the antigenic determinants, epitopes, parts, domains or subunits of DR5 to which the amino acid sequences and/or polypeptides of the invention bind may be essentially the same (for example, if DR5 contains repeated structural motifs or occurs in a multimeric form) or may be different (and in the latter case, the amino acid sequences and polypeptides of the invention may bind to such different antigenic determinants, epitopes, parts, domains, subunits of DR5 with an affinity and/or specificity which may be the same or different). Also, e.g., when DR5 exists in an activated conformation and in an inactive conformation, the amino acid sequences and polypeptides of the invention may bind to either one of these confirmation, or may bind to both these confirmations (i.e., with an affinity and/or specificity which may be the same or different). Also, e.g., the amino acid sequences and polypeptides of the invention may bind to a conformation of DR5 in which it is bound to a pertinent ligand, may bind to a conformation of DR5 in which it not bound to a pertinent ligand, or may bind to both such conformations (again with an affinity and/or specificity which may be the same or different).

[0082] It is also expected that the amino acid sequences and polypeptides of the invention will generally bind to all naturally occurring or synthetic analogs, variants, mutants, alleles, parts and fragments of DR5; or at least to those analogs, variants,

mutants, alleles, parts and fragments of DR5 that contain one or more antigenic determinants or epitopes that are essentially the same as the antigenic determinant(s) or epitope(s) to which the amino acid sequences and polypeptides of the invention bind in DR5 (e.g. in wild-type DR5). Again, in such a case, the amino acid sequences and polypeptides of the invention may bind to such analogs, variants, mutants, alleles, parts and fragments with an affinity and/or specificity that are the same as, or that are different from (i.e., higher than or lower than), the affinity and specificity with which the amino acid sequences of the invention bind to (wild-type) DR5. Also included within the inventive scope is that the amino acid sequences and polypeptides of the invention bind to some analogs, variants, mutants, alleles, parts and fragments of DR5, but not to others.

[0083] In general, when DR5 exists in a monomeric form and in one or more multimeric forms, it is within the scope of the invention that the amino acid sequences and polypeptides of the invention only bind to DR5 in monomeric form, only bind to DR5 in multimeric form, or bind to both the monomeric and the multimeric form. Again, in such a case, the amino acid sequences and polypeptides of the invention may bind to the monomeric form with an affinity and/or specificity that are the same as, or that are different from (i.e., higher than or lower than), the affinity and specificity with which the amino acid sequences of the invention bind to the multimeric form.

[0084] Also, when DR5 can associate with other proteins or polypeptides to form protein complexes (e.g. with multiple subunits), it is within the scope of the invention that the amino acid sequences and polypeptides of the invention bind to DR5 in its non-associated state, bind to DR5 in its associated state, or bind to both. In all these cases, the amino acid sequences and polypeptides of the invention may bind to such multimers or associated protein complexes with an affinity and/or specificity that may be the same as or different from (i.e., higher than or lower than) the affinity and/or specificity with which the amino acid sequences and polypeptides of the invention bind to DR5 in its monomeric and non-associated state.

[0085] In one embodiment, as will be clear to the skilled person, inventive compositions that contain two or more amino acid sequences directed against DR5 may bind with higher avidity to DR5 than the corresponding monomeric amino acid sequence(s). For example, and without limitation, proteins or polypeptides that contain two, three, four, five, six, eight, ten or more operably linked monomeric units of amino acid sequences directed against the same or different epitopes of DR5 may (and usually will) bind with higher avidity than each of the different monomers, and proteins or polypeptides that contain two, three, four or more amino acid sequences directed against DR5 may (and usually will) bind also with higher avidity to a multimer of DR5. In one embodiment, the inventive composition is a single polypeptide chain made of four monomers directed

against DR5 connected by amino acid linkers. In one embodiment, the inventive composition is a single polypeptide chain made of five monomers directed against DR5 connected by amino acid linkers.

[0086] Generally, amino acid sequences and polypeptides of the invention will at least bind to those forms of DR5 (including monomeric, multimeric and associated forms) that are the most relevant from a biological and/or therapeutic point of view, as will be clear to the skilled person.

[0087] It is within the scope of the invention to use compositions comprising parts, fragments, analogs, mutants, variants, alleles and/or derivatives of the amino acid sequences and polypeptides of the invention, and/or to use proteins or polypeptides comprising or essentially consisting of one or more of such compositions as long as these are suitable for the uses envisaged herein. In one embodiment such compositions will contain (at least part of) a functional antigen-binding site for binding against DR5. In one embodiment such compositions will be capable of specific binding to DR5. In one embodiment such compositions will be capable of binding to DR5 with an affinity (suitably measured and/or expressed as a K_D-value (actual or apparent), a K_A-value (actual or apparent), a k_{on}-rate and/or a k_{off}-rate, or alternatively as an IC_{50} value, as further described herein) that is as provided herein. Some non-limiting examples of such compositions will become clear from the further description herein. Additional fragments or polypeptides of the invention may also be provided by suitably combining (i.e., by linking or genetic fusion) one or more (smaller) compositions as described herein.

[0088] In one non-limiting aspect of the invention, analogs, mutants, variants, alleles, and/or derivatives of the polypeptides of the invention have an increased half-life in serum (as further described herein) compared to the amino acid sequence from which they have been derived. For example, an amino acid sequence of the invention may be linked (chemically or otherwise) to one or more groups or moieties that extend the half-life (such as PEG), so as to provide a derivative of an amino acid sequence of the invention with increased half-life.

[0089] In one specific, but non-limiting aspect, the amino acid sequence of the invention may be an amino acid sequence that comprises an immunoglobulin fold or may be an amino acid sequence that, under suitable conditions (such as physiological conditions) is capable of forming an immunoglobulin fold (i.e., by folding). Reference is made inter alia to the review by Halaby et al., J. (1999) Protein Eng. 12, 563-71. In one embodiment, when properly folded so as to form an immunoglobulin fold, such an amino acid sequence is capable of specific binding to DR5. In one further embodiment, such a construct is capable of binding to DR5 with an affinity (suitably measured and/or expressed as a K_D-value (actual or apparent), a K_A-value (actual or apparent), a k_{on}-rate and/or a k_{off}-

rate, or alternatively as an IC_{50} value, as further described herein) that is as provided herein. In one embodiment, parts, fragments, analogs, mutants, variants, alleles and/or derivatives of such amino acid sequences are such that they comprise an immunoglobulin fold or are capable for forming, under suitable conditions, an immunoglobulin fold.

[0090] In particular, but without limitation, the amino acid sequences of the invention may be amino acid sequences that essentially consist of four framework regions (FR1, FR2, FR3 and FR4 respectively) and three interspersed complementarity determining regions (CDR1, CDR2 and CDR3 respectively); or any suitable fragment of such an amino acid sequence (which will then usually contain at least some of the amino acid residues that form at least one of the CDR's, as further described herein). In one embodiment these regions are arranged as shown in formula I:

FR1 - CDR1 - FR2 - CDR2 - FR3 - CDR3 - FR4 (formula I)

[0091] The amino acid sequences of the invention may in particular be an immunoglobulin sequence or a suitable fragment thereof, and more in particular be an immunoglobulin variable domain sequence or a suitable fragment thereof, such as light chain variable domain sequence (e.g. a V_L sequence) or a suitable fragment thereof; or a heavy chain variable domain sequence (e.g. a V_H sequence) or a suitable fragment thereof. When the amino acid sequence of the invention is a heavy chain variable domain sequence, it may be a heavy chain variable domain sequence that is derived from a conventional four-chain antibody (such as, without limitation, a V_H sequence that is derived from a human antibody) or be a so-called V_{HH}-sequence that is derived from a so-called "heavy chain antibody".

[0092] It should be noted that the invention is not limited as to the origin of the amino acid sequence of the invention (or of the nucleotide sequence of the invention used to express it), nor as to the way that the amino acid sequence or nucleotide sequence of the invention is (or has been) generated or obtained. Thus, the amino acid sequences of the invention may contain naturally occurring amino acid sequences (from any suitable species) or synthetic or semi-synthetic amino acid sequences. In a specific but non-limiting aspect of the invention, the amino acid sequence is a naturally occurring immunoglobulin sequence (from any suitable species) or a synthetic or semi-synthetic immunoglobulin sequence, including but not limited to "humanized" immunoglobulin sequences (e.g., such as partially or fully humanized mouse, rabbit or monkey immunoglobulin sequences (or immunoglobulin sequences of any other mammalian species contemplated by one skilled in the art), and in particular partially or fully humanized camelid V_{HH} sequences or fragments thereof), "camelized" immunoglobulin sequences, as well as immunoglobulin sequences that have been obtained by techniques such as affinity maturation (for example, starting from synthetic, random or naturally occurring immunoglobulin

sequences), CDR grafting, veneering, combining fragments derived from different immunoglobulin sequences, PCR assembly using overlapping primers, and similar techniques for engineering immunoglobulin sequences well known to the skilled person; or any suitable combination of any of the above. Reference is, e.g., made to standard handbooks, as well as to the further description and art references mentioned herein.

[0093] Similarly, the nucleotide sequences of the invention may be naturally occurring nucleotide sequences or synthetic or semi-synthetic sequences, and may, e.g., be sequences that are isolated by PCR from a suitable naturally occurring template (e.g. DNA or RNA isolated from a cell), nucleotide sequences that have been isolated from a library (and in particular, an expression library), nucleotide sequences that have been prepared by introducing mutations into a naturally occurring nucleotide sequence (using any suitable technique known per se, such as mismatch PCR), nucleotide sequence that have been prepared by PCR using overlapping primers, or nucleotide sequences that have been prepared using techniques for DNA synthesis known per se.

[0094] The amino acid sequence of the invention may in particular be a domain antibody (or an amino acid sequence that is suitable for use as a domain antibody), a single domain antibody (or an amino acid sequence that is suitable for use as a single domain antibody), a "dAb" (or an amino acid sequence that is suitable for use as a dAb) or a camelid antibody (and including but not limited to a V_{HH} sequence or variants thereof); other single variable domains, or any suitable fragment of any one thereof. For a general description of (single) domain antibodies, reference is also made to the art references cited above, as well as to EP 0 368 684. For the term "dAb's", reference is, e.g., made to Ward et al. (Nature 1989 Oct 12; 341 (6242): 544-6), to Holt et al., Trends Biotechnol., 2003, 21(11): 484-490; as well as to, e.g., WO 06/030220, WO 06/003388 and other published patent applications of Domantis Ltd. In one embodiment of the invention, single domain antibodies or single variable domains can be derived from certain species of shark (for example, the so-called "IgNAR domains", see e.g., WO 05/18629).

[0095] In particular, the amino acid sequence of the invention may be a camelid heavy chain variable domain construct (e.g., a V_{HH} or variables thereof, including variables optimized for use as a human therapeutic, e.g., as defined in, e.g., WO 2008/020079) or a suitable fragment or variant thereof. In one embodiment, the amino acid sequence is a NANOBODY$^{(R)}$ or a construct thereof. Note that NANOBODY™, NANOBODIES™ and NANOCLONE™ are registered trademarks of Ablynx N.V. Specific heavy chain variable domain constructs directed against DR5, whether or not "humanized" or otherwise altered or optimized, will be referred to herein as a "NB Sequence" of the invention.

[0096] As used herein, the phrase "sequence optimized", or alternatively sequences that are "altered or optimized" is defined to refer to the replacement of residues of a NB

agent, especially in the framework region, to reduce the occurrence of an immunogenic response to the NB agent by the subject to which it is administered. In the case where the subject is a human, the phrase includes any technique known in the art to humanize the sequence.

[0097] In one embodiment, NB agents are so-called "V_H3 class" (i.e., a NB construct with a high degree of sequence homology to human germline sequences of the V_H3 class such as DP-47, DP-51 or DP-29). In one embodiment, this V_H3 class of NB constructs comprise the framework regions of this invention. However, the invention in its broadest sense generally covers any type of NB agents directed against DR5. For example, in one embodiment, the invention also covers the NB constructs belonging to the so-called "V_H4 class" (i.e., NB constructs with a high degree of sequence homology to human germline sequences of the V_H4 class such as DP-78). See e.g., WO 07/118670.

[0098] In one embodiment, NB constructs (in particular fully humanized and partially humanized constructs) are characterized by the presence of one or more "Hallmark residues" in one or more of the framework sequences. In one embodiment, the framework sequences present in the NB constructs of the invention may be such that the amino acid sequence is a variant of a camelid V_{HH} construct. Some non-limiting examples of (suitable combinations of) such framework sequences and alternative Hallmark residues appear, e.g., in WO 2008/020079, pages 65 - 98, which pages are incorporated by reference in their entirety. Other humanized or partially humanized residues known in the art are also contemplated as encompassed within the invention.

[0099] Generally, a V_H or a V_{HH} construct can be defined as an amino acid sequence with the (general) structure of formula I, in which FR1 to FR4 refer to framework regions 1 to 4, respectively, and in which CDR1 to CDR3 refer to the complementarity determining regions 1 to 3, respectively.

[00100] In one embodiment an inventive composition may be a NB construct with an amino acid sequence with the (general) structure of formula I in which one or more of the amino acid residues at positions 11, 37, 44, 45, 47, 83, 84, 103, 104 and 108 according to the Kabat numbering are chosen from the Hallmark residues mentioned in Table A-3 in WO 2008/020079 and in which said amino acid sequence has at least 80%, 85%, 90%, 95%, 98%, 99% or 100% amino acid identity with at least one of the framework amino acid sequences of SEQ ID NO's: 1 to 22 in WO 2008/020079, in which for the purposes of determining the degree of amino acid identity, the amino acid residues that form the CDR sequences (indicated with X in the sequences) are disregarded.

[00101] In the NB agents of the invention, including without limitation the various formats or scaffolds, the CDR sequences are generally as provided in Tables 1-3 and especially as specifically designated by SEQ ID NO in Table 4. In particular, CDR1 may

be any one of SEQ ID NOs: 41 to 44; CDR2 may be any one of SEQ ID NOs: 51 to 55; and CDR3 may be any one of SEQ ID NOs: 63 to 68.

[00102] Thus, in one embodiment the invention relates to such V_H constructs that can bind to and/or are directed against DR5, to suitable fragments thereof, as well as to polypeptides that comprise or essentially consist of one or more of such V_H constructs and/or suitable fragments.

[00103] In general, SEQ ID NOs: 1 - 22, 26 – 40, 87-88, and 103-104 provide the amino acid sequences of a number of NB Agents that have been raised against DR5 (see Tables 1-4). SEQ ID NOs: 96-99 provide specific nucleic acid sequences that encode specific NB Agents as provided herein.

[00104] In some embodiments, inventive compositions are NB agents, e.g., as shown in Tables 1 through 4, that can bind to and/or are directed against to DR5 and that have at least 90% amino acid identity with at least one of the amino acid sequences of SEQ ID NOs: 1 - 22, 26 - 40, 87-88 and 103-104, in which for the purposes of determining the degree of amino acid identity, the amino acid residues that form the CDR sequences are disregarded and in which one or more of the amino acid residues at positions 11, 37, 44, 45, 47, 83, 84, 103, 104 and 108 according to the Kabat numbering are Hallmark residues.

[00105] In various embodiments and as provided in Table 4, the NB constructs comprise framework 1 sequences of SEQ ID NO's: 34 to 40), framework 2 sequences of SEQ ID NO's: 45 to 50, framework 3 sequences of SEQ ID NO's: 56 to 62 and framework 4 sequences of SEQ ID NO's: 69 to 72. In one embodiment, amino acid residues at positions 1 to 4 and 27 to 30 of the framework 1 sequences of NB constructs of SEQ ID NO's: 1 - 22, 26 - 40, 87-88 and 103-104 are disregarded for determining the degree of amino acid identity.

[00106] In one embodiment, inventive NB agents and compositions may be derived in any suitable manner and from any suitable source, and may, e.g., be naturally occurring V_{HH} sequences (i.e., from a suitable species of Camelid) or synthetic or semi-synthetic amino acid sequences, including but not limited to "humanized" NB agents, "camelized" immunoglobulin sequences (and in particular camelized heavy chain variable domain sequences), as well as NB agents that have been obtained by techniques such as affinity maturation (for example, starting from synthetic, random or naturally occurring immunoglobulin sequences), CDR grafting, veneering, combining fragments derived from different immunoglobulin sequences, PCR assembly using overlapping primers, and similar techniques for engineering immunoglobulin sequences well known to the skilled person; or any suitable combination of any of the foregoing as further described herein. Also, when an inventive composition comprises a V_{HH} sequence, said composition may be suitably humanized, as described herein, so as to provide one or more further (partially or

fully) humanized composition of the invention. In one embodiment, when an inventive composition comprises a synthetic or semi-synthetic sequence (such as a partially humanized sequence), said composition may optionally be further suitably humanized, e.g., again either partially or fully humanized.

[00107] In one embodiment, humanized compositions are amino acid sequences that have at least one amino acid residue present (and in particular, in at least one of the framework residues) that is and/or that corresponds to a humanizing substitution . In such a non-limiting embodiment, humanizing substitutions (and suitable combinations thereof) will be clear to the skilled person based on the disclosure herein. In one embodiment, potentially useful humanizing substitutions can be ascertained by comparing the sequence of the framework regions of a naturally occurring V_{HH} sequence with the corresponding framework sequence of one or more closely related human V_H sequences, after which one or more of the potentially useful humanizing substitutions (or combinations thereof) thus determined can be introduced into said V_{HH} sequence in any manner known per se. In one embodiment, the resulting humanized V_{HH} sequences are tested for affinity for the target, for stability, for ease and level of expression, and/or for other desired properties. In this way, by means of a limited degree of trial and error, other suitable humanizing substitutions (or suitable combinations thereof) can be determined by the skilled person based on the disclosure herein. Also, based on the foregoing, (the framework regions of) an inventive composition of the invention may be partially humanized or fully humanized.

[00108] In one embodiment, humanized compositions herein are humanized variants of the compositions of SEQ ID NOs: 1 - 22, 26 - 40, 87-88, and 103-104 and of SEQ ID NOS: 96-99. In one embodiment, humanized NB constructs are as provided in Table 3.

[00109] Thus, some other preferred compositions of the invention are compositions which can bind (as further defined herein) to DR5 and which (a) are a humanized variant of one of the amino acid sequences of SEQ ID NO's: 1 - 22, 26 - 40, 87-88, and 103-104; and/or (b) have at least 90% amino acid identity with at least one of the amino acid sequences of SEQ ID NO's: 1 - 22, 26 - 40, 87-88, and 103-104. In one embodiment, for the purposes of determining the degree of amino acid identity, the amino acid residues that form the CDR sequences are disregarded.

[00110] In one embodiment, one or more of the amino acid residues at positions 11, 37, 44, 45, 47, 83, 84, 103, 104 and 108 according to the Kabat numbering are chosen from the Hallmark residues mentioned in Table A-3 in WO 2008/020079.

[00111] In one embodiment, the invention provides a number of stretches of amino acid residues (i.e., small peptides) that are particularly suited for binding to DR5. These stretches of amino acid residues may be present in, and/or may be incorporated into, an amino acid sequence of the invention, in particular in such a way that they form (part of)

the antigen binding site of an amino acid sequence of the invention. As these stretches of amino acid residues are first generated as CDR sequences of heavy chain antibodies or V_{HH} sequences that are raised against DR5 (or may be based on and/or derived from such CDR sequences, as further described herein), they will also generally be referred to herein as "CDR sequences" (i.e., as CDR1 sequences, CDR2 sequences and CDR3 sequences, respectively). It should however be noted that the invention in its broadest sense is not limited to a specific structural role or function that these stretches of amino acid residues may have in an amino acid sequence of the invention, as long as these stretches of amino acid residues allow the amino acid sequence of the invention to bind to DR5. Thus, generally, the invention in its broadest sense comprises any amino acid sequence that is capable of binding to DR5 and that comprises one or more CDR sequences as described herein, and in particular a suitable combination of two or more such CDR sequences, that are suitably linked to each other via one or more further amino acid sequences, such that the entire amino acid sequence forms a binding domain and/or binding unit that is capable of binding to DR5. It should however also be noted that the presence of only one such CDR sequence in an amino acid sequence of the invention may by itself already be sufficient to provide an amino acid sequence of the invention that is capable of binding to DR5; reference is, e.g., again made to the so-called "Expedite fragments" described in WO 03/050531.

[00112] In one embodiment, the amino acid sequence of the invention may be an amino acid sequence that comprises at least one amino acid sequence that is chosen from the group consisting of the CDR1 sequences, CDR2 sequences and CDR3 sequences that are described herein (or any suitable combination thereof). In particular, an amino acid sequence of the invention may be an amino acid sequence that comprises at least one antigen binding site, wherein said antigen binding site comprises at least one amino acid sequence that is chosen from the group consisting of the CDR1 sequences, CDR2 sequences and CDR3 sequences that are described herein (or any suitable combination thereof).

[00113] In one embodiment, the amino acid sequence of the invention may be any amino acid sequence that comprises at least one stretch of amino acid residues, in which said stretch of amino acid residues has an amino acid sequence that corresponds to the sequence of at least one of the CDR sequences described herein. Such an amino acid sequence may or may not comprise an immunoglobulin fold. For example, and without limitation, such an amino acid sequence may be a suitable fragment of an immunoglobulin sequence that comprises at least one such CDR sequence, but that is not large enough to form a (complete) immunoglobulin fold (reference is, e.g., again made to the "Expedite fragments" described in WO 03/050531). Alternatively, such an amino acid sequence may

be a suitable "protein scaffold" that comprises least one stretch of amino acid residues that corresponds to such a CDR sequence (i.e., as part of its antigen binding site). Suitable scaffolds for presenting amino acid sequences will be clear to the skilled person, and, e.g., comprise, without limitation, to binding scaffolds based on or derived from immunoglobulins (i.e., other than the immunoglobulin sequences already described herein), protein scaffolds derived from protein A domains (e.g., such as AFFIBODIES™), tendamistat, fibronectin, including fibronectin type III domain, lipocalin, CTLA-4, T-cell receptors, designed ankyrin repeats, avimers and PDZ domains (Binz et al., Nat. Biotech 2005, Vol. 23: 1257), and binding moieties based on DNA or RNA including but not limited to DNA or RNA aptamers (Ulrich et al., Comb Chem. High Throughput Screen 2006 9(8): 619-32).

[00114] In one embodiment, any amino acid sequence herein that comprises one or more of these CDR sequences can specifically bind to DR5. In one embodiment it can bind to DR5 with an affinity (suitably measured and/or expressed as a K_D-value (actual or apparent), a K_A-value (actual or apparent), a k_{on}-rate and/or a k_{off}-rate, or alternatively as an IC_{50} value) as provided herein.

[00115] In one embodiment, an inventive composition herein may be any amino acid sequence that comprises at least one antigen binding site, wherein said antigen binding site comprises at least two amino acid sequences that are chosen from the group consisting of the CDR1 sequences described herein, the CDR2 sequences described herein and the CDR3 sequences described herein, such that (1) when the first amino acid sequence is chosen from the CDR1 sequences described herein, the second amino acid sequence is chosen from the CDR2 sequences described herein or the CDR3 sequences described herein; (2) when the first amino acid sequence is chosen from the CDR2 sequences described herein, the second amino acid sequence is chosen from the CDR1 sequences described herein or the CDR3 sequences described herein; or (3) when the first amino acid sequence is chosen from the CDR3 sequences described herein, the second amino acid sequence is chosen from the CDR1 sequences described herein or the CDR3 sequences described herein.

[00116] In one embodiment, an inventive composition herein may be amino acid sequences that comprise at least one antigen binding site, wherein said antigen binding site comprises at least three amino acid sequences that are chosen from the group consisting of the CDR1 sequences described herein, the CDR2 sequences described herein and the CDR3 sequences described herein, such that the first amino acid sequence is chosen from the CDR1 sequences described herein, the second amino acid sequence is chosen from the CDR2 sequences described herein, and the third amino acid sequence is chosen from the CDR3 sequences described herein. Preferred combinations of CDR1,

CDR2 and CDR3 sequences will become clear from the further description herein. As will be clear to the skilled person, such an amino acid sequence is preferably an immunoglobulin sequence (as further described herein), but it may, e.g., also be any other amino acid sequence that comprises a suitable scaffold for presenting said CDR sequences.

[00117] In one embodiment, an inventive composition herein relates to an amino acid sequence directed against DR5, and in particular against DR5 as provided in public databases such as the e.g. NCBI protein database accession number BAA33723, wherein the amino acid sequence comprises one or more stretches of amino acid residues chosen from the group consisting of:

(a) the amino acid sequences of SEQ ID NO's: 41 to 44;

(b) amino acid sequences that have at least 90% amino acid identity with at least one of the amino acid sequences of SEQ ID NO's: 41 to 44;

(c) amino acid sequences that have 3, 2, or 1 amino acid difference with at least one of the amino acid sequences of SEQ ID NO's: 41 to 44;

(d) amino acid sequences of SEQ ID NO's: 51 to 55;

(e) amino acid sequences that have at least 90% amino acid identity with at least one of the amino acid sequences of SEQ ID NO's: 51 to 55;

(f) amino acid sequences that have 3, 2, or 1 amino acid difference with at least one of the amino acid sequences of SEQ ID NO's: 51 to 55;

(g) the amino acid sequences of SEQ ID NO's: 63 to 68;

(h) amino acid sequences that have at least 90% amino acid identity with at least one of the amino acid sequences of SEQ ID NO's: 63 to 68;

(i) amino acid sequences that have 3, 2, or 1 amino acid difference with at least one of the amino acid sequences of SEQ ID NO's: 63 to 68;

or any suitable combination thereof.

[00118] When an amino acid sequence of the invention contains one or more amino acid sequences according to b) and/or c):

(1) any amino acid substitution in such an amino acid sequence according to b) and/or c) is preferably, and compared to the corresponding amino acid sequence according to a), a conservative amino acid substitution; and/or

(2) the amino acid sequence according to b) and/or c) preferably only contains amino acid substitutions, and no amino acid deletions or insertions, compared to the corresponding amino acid sequence according to a); and/or

(3) the amino acid sequence according to b) and/or c) may be an amino acid sequence that is derived from an amino acid sequence according to a) by means of affinity maturation using one or more techniques of affinity maturation known per se.

[00119] Similarly, when an amino acid sequence of the invention contains one or more amino acid sequences according to e) and/or f):

(1) any amino acid substitution in such an amino acid sequence according to e) and/or f) is preferably, and compared to the corresponding amino acid sequence according to d), a conservative amino acid substitution; and/or

(2) the amino acid sequence according to e) and/or f) preferably only contains amino acid substitutions, and no amino acid deletions or insertions, compared to the corresponding amino acid sequence according to d); and/or

(3) the amino acid sequence according to e) and/or f) may be an amino acid sequence that is derived from an amino acid sequence according to d) by means of affinity maturation using one or more techniques of affinity maturation known per se.

[00120] Also, similarly, when an amino acid sequence of the invention contains one or more amino acid sequences according to h) and/or i):

(1) any amino acid substitution in such an amino acid sequence according to h) and/or i) is preferably, and compared to the corresponding amino acid sequence according to g), a conservative amino acid substitution; and/or

(2) the amino acid sequence according to h) and/or i) preferably only contains amino acid substitutions, and no amino acid deletions or insertions, compared to the corresponding amino acid sequence according to g); and/or

(3) the amino acid sequence according to h) and/or i) may be an amino acid sequence that is derived from an amino acid sequence according to g) by means of affinity maturation using one or more techniques of affinity maturation known per se.

[00121] It should be understood that the last preceding paragraphs also generally apply to any amino acid sequences of the invention that comprise one or more amino acid sequences according to a), b), c), d), e), f), g), h) or i), respectively.

[00122] In this specific aspect, the amino acid sequence preferably comprises one or more stretches of amino acid residues chosen from the group consisting of:

(i) the amino acid sequences of SEQ ID NO's: 41 to 44;

(ii) the amino acid sequences of SEQ ID NO's: 51 to 55; and

(iii) the amino acid sequences of SEQ ID NO's: 63 to 68;

or any suitable combination thereof.

[00123] Also, preferably, in such an amino acid sequence, at least one of said stretches of amino acid residues forms part of the antigen binding site for binding against DR5.

[00124] In one non-limiting aspect, the invention relates to an amino acid sequence directed against DR5, that comprises two or more stretches of amino acid residues chosen from the group consisting of:

a) the amino acid sequences of SEQ ID NO's: 41 to 44;

b) amino acid sequences that have at least 90% amino acid identity with at least one of the amino acid sequences of SEQ ID NO's: 41 to 44;

c) amino acid sequences that have 3, 2, or 1 amino acid difference with at least one of the amino acid sequences of SEQ ID NO's: 41 to 44;

d) the amino acid sequences of SEQ ID NO's: 51 to 55;

e) amino acid sequences that have at least 90% amino acid identity with at least one of the amino acid sequences of SEQ ID NO's: 51 to 55;

f) amino acid sequences that have 3, 2, or 1 amino acid difference with at least one of the amino acid sequences of SEQ ID NO's: 51 to 55;

g) the amino acid sequences of SEQ ID NO's: 63 to 68;

h) amino acid sequences that have at least 90% amino acid identity with at least one of the amino acid sequences of SEQ ID NO's: 63 to 68;

i) amino acid sequences that have 3, 2, or 1 amino acid difference with at least one of the amino acid sequences of SEQ ID NO's: 63 to 68;

such that (1) when the first stretch of amino acid residues corresponds to one of the amino acid sequences according to a), b) or c), the second stretch of amino acid residues corresponds to one of the amino acid sequences according to d), e), f), g), h) or i); (2) when the first stretch of amino acid residues corresponds to one of the amino acid sequences according to d), e) or f), the second stretch of amino acid residues corresponds to one of the amino acid sequences according to a), b), c), g), h) or i); or (3) when the first stretch of amino acid residues corresponds to one of the amino acid sequences according to g), h) or i), the second stretch of amino acid residues corresponds to one of the amino acid sequences according to a), b), c), d), e) or f).

[00125] In this specific aspect, the amino acid sequence preferably comprises two or more stretches of amino acid residues chosen from the group consisting of:

(i) the amino acid sequences of SEQ ID NO's: 41 to 44;

(ii) the amino acid sequences of SEQ ID NO's: 51 to 55; and

(iii) the amino acid sequences of SEQ ID NO's: 63 to 68;

such that, (1) when the first stretch of amino acid residues corresponds to one of the amino acid sequences of SEQ ID NO's: 41 to 44, the second stretch of amino acid residues corresponds to one of the amino acid sequences of SEQ ID NO's: 51 to 55 or of SEQ ID NO's: 63 to 68; (2) when the first stretch of amino acid residues corresponds to one of the amino acid sequences of SEQ ID NO's: 51 to 55, the second stretch of amino acid residues corresponds to one of the amino acid sequences of SEQ ID NO's: 41 to 44 or of SEQ ID NO's: 63 to 68; or (3) when the first stretch of amino acid residues corresponds to one of the amino acid sequences of SEQ ID NO's: 63 to 68, the second

stretch of amino acid residues corresponds to one of the amino acid sequences of SEQ ID NO's: 41 to 44 or of SEQ ID NO's: 51 to 55.

[00126] Also, in such an amino acid sequence, the at least two stretches of amino acid residues again preferably form part of the antigen binding site for binding against DR5.

[00127] In one embodiment, in particular as it relates to the preceding paragraphs, the invention related to an amino acid comprising two or more amino acid sequences according to a), b), c), d), e), f), g), h) or i), respectively. In one embodiment, the amino acid sequence is a dimeric variant of a NB agent. In one embodiment, the monomers that comprise the dimer are operably linked in a single reading frame. In one embodiment, the linker sequence joining the monomers is a multimer of the sequence GGGGS (SEQ ID NO: 81) or GGGS (SEQ ID NO: 82), or a combination of both, or is selected from a linker sequences provided herein as SEQ ID NOs: 44, 45 or 46, or as known in the art.

[00128] In one embodiment, in particular as it relates to the preceding paragraphs, the invention related to an amino acid comprising three or more amino acid sequences according to a), b), c), d), e), f), g), h) or i), respectively. In one embodiment, the amino acid sequence is a trimeric variant of a NB agent. In one embodiment, the monomers that comprise the trimer are operably linked in a single reading frame. In one embodiment, the linker sequence joining the monomers is a multimer of the sequence GGGGS (SEQ ID NO: 81) or GGGS (SEQ ID NO: 82), or a combination of both, or is selected from a linker sequences provided herein as SEQ ID NOs: 44, 45 or 46, or as known in the art.

[00129] In one embodiment, in particular as it relates to the preceding paragraphs, the invention related to an amino acid comprising four or more amino acid sequences according to a), b), c), d), e), f), g), h) or i), respectively. In one embodiment, the amino acid sequence is a tetrameric variant of a NB agent. In one embodiment, the monomers that comprise the tetramer are operably linked in a single reading frame. In one embodiment, the linker sequence joining the monomers is a multimer of the sequence GGGGS (SEQ ID NO: 81) or GGGS (SEQ ID NO: 82), or a combination of both, or is selected from a linker sequences provided herein as SEQ ID NOs: 44, 45 or 46, or as known in the art.

[00130] In one embodiment, in particular as it relates to the preceding paragraphs, the invention related to an amino acid comprising five or more amino acid sequences according to a), b), c), d), e), f), g), h) or i), respectively. In one embodiment, the amino acid sequence is a pentameric variant of a NB agent. In one embodiment, the monomers that comprise the pentamer are operably linked in a single reading frame. In one embodiment, the linker sequence joining the monomers is a multimer of the sequence GGGGS (SEQ ID NO: 81) or GGGS (SEQ ID NO: 82), or a combination of both, or is

selected from a linker sequences provided herein as SEQ ID NOs: 44, 45 or 46, or as known in the art.

[00131] In one embodiment, in particular as it relates to the preceding paragraphs, the invention related to an amino acid comprising six or more amino acid sequences according to a), b), c), d), e), f), g), h) or i), respectively. In one embodiment, the amino acid sequence is a hexameric variant of a NB agent. In one embodiment, the monomers that comprise the hexamer are operably linked in a single reading frame. In one embodiment, the linker sequence joining the monomers is a multimer of the sequence GGGGS (SEQ ID NO: 81) or GGGS (SEQ ID NO: 82), or a combination of both, or is selected from a linker sequences provided herein as SEQ ID NOs: 44, 45 or 46, or as known in the art.

[00132] In one embodiment, in particular as it relates to the preceding paragraphs, the invention related to an amino acid comprising two, three, four, five six, seven, eight, nine, ten or more amino acid sequences according to a), b), c), d), e), f), g), h) or i), respectively. In one embodiment, the amino acid sequence is a multimeric variant of a NB agent. In one embodiment, monomers that comprise the multimer are operably linked in a single reading frame. In one embodiment, the linker sequence joining the monomers is selected from at least one of the sequence GGGGS (SEQ ID NO: 81) or GGGS (SEQ ID NO: 82), or a combination of both, or is selected from a linker sequences provided herein as SEQ ID NOs: 44, 45 or 46, or as known to one skilled in the art.

[00133] Preferably, in such amino acid sequences the CDR sequences have at least 70% amino acid identity, preferably at least 90% amino acid identity, more preferably at least 90% amino acid identity, such as at least 95% amino acid identity or more or even essentially 100% amino acid identity with the CDR sequences of at least one of the amino acid sequences of SEQ ID NO's: 1 - 22, 26 - 40, 87-88, and 103-104. This degree of amino acid identity can, e.g., be determined by determining the degree of amino acid identity (in a manner described herein) between said amino acid sequence and one or more of the sequences of SEQ ID NO's: 1 - 22, 26 - 40, 87-88, and 103-104, in which the amino acid residues that form the framework regions are disregarded. Also, such amino acid sequences can be humanized or modified as further described herein.

[00134] Also, such amino acid sequences are preferably such that they can specifically bind to DR5; and more in particular bind to DR5 with an affinity (suitably measured and/or expressed as a K_D-value (actual or apparent), a K_A-value (actual or apparent), a k_{on}-rate and/or a k_{off}-rate, or alternatively as an IC_{50} value, as further described herein) that is as provided herein.

[00135] In one non-limiting aspect, the invention relates to an amino acid sequence that essentially consists of four framework regions (FR1 to FR4, respectively) and three complementarity determining regions (CDR1 to CDR3, respectively), in which the CDR

sequences of said amino acid sequence have at least 70% amino acid identity, preferably at least 90% amino acid identity, more preferably at least 90% amino acid identity, such as at least 95% amino acid identity or more, at least 98% amino acid identity or more, at least 99% amino acid identity or more, or even essentially 100% amino acid identity with the CDR sequences of at least one of the amino acid sequences of SEQ ID NO's: 1-22, 26-40, 87-88, and 103-104. This degree of amino acid identity can, e.g., be determined by determining the degree of amino acid identity (in a manner described herein) between said amino acid sequence and one or more of the sequences of SEQ ID NO's: 1-22, 26-40, 87-88, and 103-104, in which the amino acid residues that form the framework regions are disregarded. Such amino acid sequences of the invention can be as further modified as described herein.

[00136] In such an amino acid sequence of the invention, the framework sequences may be any suitable framework sequences, and examples of suitable framework sequences will be clear to the skilled person, e.g., on the basis the standard handbooks and the further disclosure and art references mentioned herein.

[00137] The framework sequences are preferably (a suitable combination of) immunoglobulin framework sequences or framework sequences that have been derived from immunoglobulin framework sequences (for example, by humanization or camelization). For example, the framework sequences may be framework sequences derived from a light chain variable domain (e.g. a V_L-sequence) and/or from a heavy chain variable domain (e.g. a V_H-sequence). In one particularly preferred aspect, the framework sequences are either framework sequences that have been derived from a V_{HH}-sequence (in which said framework sequences may optionally have been partially or fully humanized) or are conventional VH sequences that have been camelized .

[00138] The framework sequences are preferably such that the amino acid sequence of the invention is a domain antibody (or an amino acid sequence that is suitable for use as a domain antibody); is a single domain antibody (or an amino acid sequence that is suitable for use as a single domain antibody); is a "dAb" (or an amino acid sequence that is suitable for use as a dAb); or is a NB agent (including but not limited to V_H and/or V_{HH} sequence). Again, suitable framework sequences will be clear to the skilled person, e.g., on the basis the standard handbooks and the further disclosure and art references mentioned herein.

[00139] In one embodiment, as generally described herein for the amino acid sequences of the invention, it is possible to use suitable fragments (or combinations of fragments) of any of the foregoing, such as fragments that contain one or more CDR sequences, suitably flanked by and/or linked via one or more framework sequences (for example, in the same order as these CDR's and framework sequences may occur in the

full-sized immunoglobulin sequence from which the fragment has been derived). Such fragments may also again be such that they comprise or can form an immunoglobulin fold, or alternatively be such that they do not comprise or cannot form an immunoglobulin fold.

[00140] In one aspect, such a fragment comprises a single CDR sequence as described herein (and in particular a CDR3 sequence), that is flanked on each side by (part of) a framework sequence (and in particular, part of the framework sequence(s) that, in the immunoglobulin sequence from which the fragment is derived, are adjacent to said CDR sequence. For example, a CDR3 sequence may be preceded by (part of) a FR3 sequence and followed by (part of) a FR4 sequence). Such a fragment may also contain a disulphide bridge, and in particular a disulphide bridge that links the two framework regions that precede and follow the CDR sequence, respectively (for the purpose of forming such a disulphide bridge, cysteine residues that naturally occur in said framework regions may be used, or alternatively cysteine residues may be synthetically added to or introduced into said framework regions). In one embodiment, such a construct is an Expedite fragment. For a further description of these "Expedite fragments", reference is again made to WO 03/050531, as well as to the US provisional application of Ablynx N.V. entitled "Peptides capable of binding to serum proteins" of Ablynx N.V. (inventors: Revets et al.) filed on December 5, 2006.

[00141] In one aspect, the invention relates to a NB agent, and in particular a protein or polypeptide that comprises or essentially consists of one or more amino acid sequences of the invention (or suitable fragments thereof), and optionally further comprises one or more other groups, residues, moieties or binding units. As will become clear to the skilled person from the further disclosure herein, such further groups, residues, moieties, binding units or amino acid sequences may or may not provide further functionality to the amino acid sequence of the invention (and/or to the compound or construct in which it is present) and may or may not modify the properties of the amino acid sequence of the invention.

[00142] For example, such further groups, residues, moieties or binding units may be one or more additional amino acid sequences, such that the compound or construct is a (fusion) protein or (fusion) polypeptide. In a preferred but non-limiting aspect, said one or more other groups, residues, moieties or binding units are immunoglobulin sequences. Even more preferably, said one or more other groups, residues, moieties or binding units are chosen from the group consisting of domain antibodies, amino acid sequences that are suitable for use as a domain antibody, single domain antibodies, amino acid sequences that are suitable for use as a single domain antibody, "dAb's", amino acid sequences that are suitable for use as a dAb, or camelid V_{HH} constructs.

[00143] In one embodiment, such groups, residues, moieties or binding units may e.g., be chemical groups, residues, moieties, which may or may not by themselves be

biologically and/or pharmacologically active. For example, and without limitation, such groups may be linked to the one or more amino acid sequences of the invention so as to provide a "derivative" of an amino acid sequence or polypeptide of the invention, as further described herein.

[00144] Also within the scope of the present invention are compounds or constructs, that comprises or essentially consists of one or more derivatives as described herein, and optionally further comprises one or more other groups, residues, moieties or binding units, optionally linked via one or more linkers. Preferably, said one or more other groups, residues, moieties or binding units are amino acid sequences.

[00145] In the compounds or constructs described above, the one or more amino acid sequences of the invention and the one or more groups, residues, moieties or binding units may be linked directly to each other and/or via one or more suitable linkers or spacers. For example, when the one or more groups, residues, moieties or binding units are amino acid sequences, the linkers may also be amino acid sequences, so that the resulting compound or construct is a fusion protein or fusion polypeptide. The amino acid sequences of such linkers may be as provided herein, or may be one known to a person skilled in the art.

[00146] The compounds or polypeptides of the invention can generally be prepared by a method which comprises at least one step of suitably linking the one or more amino acid sequences of the invention to the one or more further groups, residues, moieties or binding units, optionally via the one or more suitable linkers, so as to provide the compound or polypeptide of the invention. Polypeptides of the invention can also be prepared by a method which generally comprises at least the steps of providing a nucleic acid that encodes a polypeptide of the invention, expressing said nucleic acid in a suitable manner, and recovering the expressed polypeptide of the invention. Such methods can be performed in a manner known per se, which will be clear to the skilled person, e.g., on the basis of the methods and techniques further described herein.

[00147] The process of designing/selecting and/or preparing a compound or polypeptide of the invention, starting from an amino acid sequence of the invention, is also referred to herein as "formatting" said amino acid sequence of the invention; and an amino acid of the invention that is made part of a compound or polypeptide of the invention is said to be "formatted" or to be "in the format of" said compound or polypeptide of the invention. Examples of ways in which an amino acid sequence of the invention can be formatted and examples of such formats will be clear to the skilled person based on the disclosure herein; and such formatted amino acid sequences form a further aspect of the invention.

[00148] According to one preferred aspect, a compound of the invention is a multivalent polypeptide that contains two or more (preferably three or more, four or more,

five or more, six or more, eight or more, and/or ten or more) amino acid sequences directed against the DR5 (e.g. amino acid sequences as provided herein), optionally linked via one or more suitable linkers (which may be as further described herein) or via a cross-linking technique or covalent bond created in a manner known to one skilled in the art. In one or more alternative embodiments, the multivalent polypeptide contains an optional subunit that binds to a target other than DR5.

[00149] In particular, a compound of the invention may be such a multivalent polypeptide which is capable of inducing, triggering, increasing or enhancing the signaling mediated by the DR5, and more in particular of triggering or inducing apoptosis in the cell on which the DR5 is present. In one embodiment, the multivalent polypeptide consists of three monomeric DR5 binding units that are operably linked, thereby creating a trimeric polypeptide. In one embodiment, the multivalent polypeptide consists of four monomeric DR5 binding units that are operably linked, thereby creating a tetrameric polypeptide. In one embodiment, the multivalent polypeptide consists of five monomeric DR5 binding units that are operably linked, thereby creating a pentameric polypeptide. In one embodiment, the multivalent polypeptide consists of six monomeric DR5 binding units that are operably linked, thereby creating a hexameric polypeptide. In one embodiment, the multivalent polypeptide consists of seven, eight, nine, ten or more monomeric DR5 binding units that are operably linked, thereby creating additional variants of a multimeric protein.

[00150] As already mentioned herein, such multimeric polypeptide may be further such that it can bind to the binding site of TRAIL on the DR5, and/or such that they can compete with TRAIL for binding to the DR5.

[00151] The multivalent polypeptide may also be such that it does not bind to the binding site for TRAIL on the DR5, and/or essentially does not prevent or inhibit the binding of TRAIL to the DR5, and/or does not compete with TRAIL for binding to the DR5, and/or even be such that they increase or enhance the signaling that is mediated by TRAIL and the DR5 upon binding of TRAIL to its receptor (which may again result in a synergistic effect upon the signaling mediated by the DR5). In one embodiment, said multivalent polypeptide binds to DR5 with a higher affinity than a monovalent composition.

[00152] In the multivalent polypeptides of the invention, the amino acid sequences of the invention that form the binding units may each be directed against the same epitope on the DR5 receptor, e.g., an epitope of DR5, or against different epitopes on the DR5.

[00153] In one specific aspect of the invention, a compound of the invention or a polypeptide of the invention may have an increased half-life, compared to the corresponding amino acid sequence of the invention. Some non-limiting examples of such compounds and polypeptides will become clear to the skilled person based on the further disclosure herein, and e.g., comprise amino acid sequences or polypeptides of the

invention that have been chemically modified to increase the half-life thereof (for example, by means of pegylation); amino acid sequences of the invention that comprise at least one additional binding site for binding to a serum protein (such as serum albumin); or polypeptides of the invention that comprise at least one amino acid sequence of the invention that is linked to at least one moiety (and in particular at least one amino acid sequence) that increases the half-life of the amino acid sequence of the invention. Examples of polypeptides of the invention that comprise such half-life extending moieties or amino acid sequences will become clear to the skilled person based on the further disclosure herein; and, e.g., include, without limitation, polypeptides in which the one or more amino acid sequences of the invention are suitable linked to one or more serum proteins or fragments thereof (such as (human) serum albumin or suitable fragments thereof) or to one or more binding units that can bind to serum proteins (such as, e.g., domain antibodies, amino acid sequences that are suitable for use as a domain antibody, single domain antibodies, amino acid sequences that are suitable for use as a single domain antibody, (dAb's), amino acid sequences that are suitable for use as a dAb, or NANOBODIES™ that can bind to serum proteins such as serum albumin (such as human serum albumin), serum immunoglobulins such as IgG, or transferrine; reference is made to the further description and references mentioned herein); polypeptides in which an amino acid sequence of the invention is linked to an Fc portion (such as a human Fc) or a suitable part or fragment thereof; or polypeptides in which the one or more amino acid sequences of the invention are suitable linked to one or more small proteins or peptides that can bind to serum proteins (such as, without limitation, the proteins and peptides described in WO 91/01743, WO 01/45746, WO 02/076489 and to the US provisional application of Ablynx N.V. entitled *"Peptides capable of binding to serum proteins"* of Ablynx N.V. filed on December 5, 2006.

[00154] Generally, the compounds or polypeptides of the invention with increased half-life preferably have a half-life that is at least 1.5 times, preferably at least 2 times, such as at least 5 times, e.g., at least 10 times or more than 20 times, greater than the half-life of the corresponding amino acid sequence of the invention per se. For example, the compounds or polypeptides of the invention with increased half-life may have a half-life that is increased with more than 1 hours, preferably more than 2 hours, more preferably more than 6 hours, such as more than 12 hours, or even more than 24, 48 or 72 hours, compared to the corresponding amino acid sequence of the invention per se.

[00155] In a preferred, but non-limiting aspect of the invention, such compounds or polypeptides of the invention have a serum half-life that is increased with more than 1 hours, preferably more than 2 hours, more preferably more than 6 hours, such as more

than 12 hours, or even more than 24, 48 or 72 hours, compared to the corresponding amino acid sequence of the invention per se.

[00156] In another preferred, but non-limiting aspect of the invention, such compounds or polypeptides of the invention exhibit a serum half-life in human of at least about 12 hours, preferably at least 24 hours, more preferably at least 48 hours, even more preferably at least 72 hours or more. For example, compounds or polypeptides of the invention may have a half-life of at least 5 days (such as about 5 to 10 days), preferably at least 9 days (such as about 9 to 14 days), more preferably at least about 10 days (such as about 10 to 15 days), or at least about 11 days (such as about 11 to 16 days), more preferably at least about 12 days (such as about 12 to 18 days or more), or more than 14 days (such as about 14 to 19 days).

[00157] In another aspect, the invention relates to a nucleic acid that encodes an amino acid sequence of the invention or a polypeptide of the invention (or a suitable fragment thereof). Such a nucleic acid will also be referred to herein as a "*nucleic acid of the invention*" and may, e.g., be in the form of a genetic construct, e.g., a CDR fragment or in a vector, as further described herein. In one embodiment, the nucleic acid sequences of the invention encode the NB constructs of any one or more polypeptide disclosed in any one or more of Tables 1 through 4. In one embodiment, the nucleic acid sequence of the invention encodes any one or more construct provided in SEQ ID NOs: 1-72, 81-82 and 87-92. In one embodiment, the nucleic acid sequences of the invention are codon optimized for expression in the host cell or host organism of interest. In one embodiment, the codon optimization is for expression in a mammalian cell. In one embodiment, the codon optimization is for expression in a yeast cell. In one embodiment, the codon optimization is for expression in *E. coli*.

[00158] In another aspect, the invention relates to a host or host cell that expresses (or that under suitable circumstances is capable of expressing) an amino acid sequence of the invention and/or a polypeptide of the invention; and/or that contains a nucleic acid of the invention. Some preferred but non-limiting examples of such hosts or host cells will become clear from the further description herein.

[00159] The invention further relates to a product or composition containing or comprising at least one amino acid sequence of the invention, at least one polypeptide of the invention (or a suitable fragment thereof), at least one compound of the invention and/or at least one nucleic acid of the invention, and optionally one or more further components of such compositions known per se, i.e., depending on the intended use of the composition. Such a product or composition may, e.g., be a pharmaceutical composition (as described herein), a veterinary composition or a product or composition

for diagnostic use (as also described herein). Some non-limiting examples of such products or compositions are provided herein.

[00160] In one embodiment the invention relates to the use of a NB construct, or of a composition comprising the same, in methods or compositions for modulating DR5, either *in vitro* (e.g. in an *in vitro* or cellular assay) or *in vivo* (e.g. in an a single cell or in a multicellular organism, and in particular in a mammal, and more in particular in a human being, such as in a human being that is at risk of or suffers from a diseases and disorders associated with DR5).

[00161] The invention also relates to methods for modulating DR5, either in vitro (e.g. in an in vitro or cellular assay) or in vivo (e.g. in an a single cell or multicellular organism, and in particular in a mammal, and more in particular in a human being, such as in a human being that is at risk of or suffers from a diseases and disorders associated with DR5), which method comprises at least the step of contacting DR5 with at least one amino acid sequence, NB construct of the invention, or with a composition comprising the same, in a manner and in an amount suitable to modulate DR5, with at least one amino acid sequence, NB construct of the invention.

[00162] The invention also relates to the use of an one amino acid sequence, NB construct of the invention in the preparation of a composition (such as, without limitation, a pharmaceutical composition or preparation as further described herein) for modulating DR5, either in vitro (e.g. in an in vitro or cellular assay) or in vivo (e.g. in an a single cell or multicellular organism, and in particular in a mammal, and more in particular in a human being, such as in a human being that is at risk of or suffers from a diseases and disorders associated with DR5).

[00163] In the context of the present invention, "modulating" or "to modulate" generally means either reducing or completely inhibiting the activity of, or alternatively increasing the activity of, DR5, as measured using a suitable in vitro, cellular or in vivo assay (such as those mentioned herein). In particular, "modulating" or "to modulate" may mean either reducing or completely inhibiting the activity of, or alternatively increasing the activity of DR5, as measured using a suitable in vitro, cellular or in vivo assay (such as those mentioned herein), by at least 1%, preferably at least 5%, such as at least 10% or at least 25%, e.g., by at least 50%, at least 60%, at least 70%, at least 80%, or at least 90% or more, compared to activity of DR5 in the same assay under the same conditions but without the presence of the NB construct of the invention. In a main embodiment, DR5 activity, especially including DR5-mediated signaling, requires the formation of a trimer of DR5 on the cell surface. In one embodiment, a NB construct herein acts to modulate DR5 activity by promoting the formation of a DR5 homotrimer and thereby increasing the DR5-mediated initiation of apoptosis, e.g., via the extrinsic cell death pathway.

[00164] As will be clear to the skilled person, "modulating" may also involve effecting a change (which may either be an increase or a decrease) in affinity, avidity, specificity and/or selectivity of DR5 for one or more of its targets, ligands or substrates; and/or effecting a change (which may either be an increase or a decrease) in the sensitivity of DR5 for one or more conditions in the medium or surroundings in which DR5 is present (such as pH, ion strength, the presence of co-factors, etc.), compared to the same conditions but without the presence of the amino acid sequence, NB construct of the invention. As will be clear to the skilled person, this may again be determined in any suitable manner and/or using any suitable assay known per se, such as the assays described herein or in the art references cited herein.

[00165] "Modulating" may also mean effecting a change (i.e., an activity as an agonist or as an antagonist, respectively) with respect to one or more biological or physiological mechanisms, effects, responses, functions, pathways or activities in which DR5 (or in which its substrate(s), ligand(s) or pathway(s) are involved, such as its signaling pathway or metabolic pathway and their associated biological or physiological effects) is involved. Again, as will be clear to the skilled person, such an action as an agonist or an antagonist may be determined in any suitable manner and/or using any suitable (in vitro and usually cellular or in assay) assay known per se, such as the assays described herein or in the art references cited herein. In particular, an action as an agonist or antagonist may be such that an intended biological or physiological activity is increased or decreased, respectively, by at least 1%, preferably at least 5%, such as at least 10% or at least 25%, e.g., by at least 50%, at least 60%, at least 70%, at least 80%, or at least 90% or more, compared to the biological or physiological activity in the same assay under the same conditions but without the presence of the NB construct of the invention.

[00166] Modulating may, e.g., involve reducing or inhibiting the binding of DR5 to one of its substrates or ligands and/or competing with a natural ligand, substrate for binding to DR5. Modulating may also involve activating DR5 or the mechanism or pathway in which it is involved. Modulating may be reversible or irreversible, but for pharmaceutical and pharmacological purposes will usually be in a reversible manner.

[00167] The invention further relates to methods for preparing or generating the amino acid sequences, polypeptides, nucleic acids, host cells, products and compositions described herein. Some preferred but non-limiting examples of such methods will become clear from the further description herein.

[00168] Generally, these methods may comprise the steps of:

a) providing a set, collection or library of amino acid sequences;

b) screening said set, collection or library of amino acid sequences for amino acid sequences that can bind to and/or have affinity for DR5; and

c) isolating the amino acid sequence(s) that bind to and/or have affinity for DR5.

[00169] In such a method, the set, collection or library of amino acid sequences may be any suitable set, collection or library of amino acid sequences. For example, the set, collection or library of amino acid sequences may be a set, collection or library of immunoglobulin sequences (as described herein), such as a naïve set, collection or library of immunoglobulin sequences; a synthetic or semi-synthetic set, collection or library of immunoglobulin sequences; and/or a set, collection or library of immunoglobulin sequences that have been subjected to affinity maturation.

[00170] Also, in such a method, the set, collection or library of amino acid sequences may be a set, collection or library of heavy chain variable domains (such as V_H domains or V_{HH} domains) or of light chain variable domains. For example, the set, collection or library of amino acid sequences may be a set, collection or library of domain antibodies or single domain antibodies, or may be a set, collection or library of amino acid sequences that are capable of functioning as a domain antibody or single domain antibody.

[00171] In a preferred aspect of this method, the set, collection or library of amino acid sequences may be an immune set, collection or library of immunoglobulin sequences, e.g., derived from a mammal that has been suitably immunized with DR5 or with a suitable antigenic determinant based thereon or derived therefrom, such as an antigenic part, fragment, region, domain, loop or other epitope thereof. In one particular aspect, said antigenic determinant may be an extracellular part, region, domain, loop or other extracellular epitope(s).

[00172] In the above methods, the set, collection or library of amino acid sequences may be displayed on a phage, phagemid, ribosome or suitable micro-organism (such as yeast), such as to facilitate screening. Suitable methods, techniques and host organisms for displaying and screening (a set, collection or library of) amino acid sequences will be clear to the person skilled in the art, e.g., on the basis of the further disclosure herein. Reference is also made to the review by Hoogenboom in Nature Biotechnology, 23(9): 1105-1116 (2005).

[00173] In another aspect, the method for generating amino acid sequences comprises at least the steps of:

a) providing a collection or sample of cells expressing amino acid sequences;

b) screening said collection or sample of cells for cells that express an amino acid sequence that can bind to and/or have affinity for DR5; and

c) either (1) isolating said amino acid sequence; or (2) isolating from said cell a nucleic acid sequence that encodes said amino acid sequence, followed by expressing said amino acid sequence.

[00174] For example, when the desired amino acid sequence is an immunoglobulin sequence, the collection or sample of cells may, e.g., be a collection or sample of B-cells. Also, in this method, the sample of cells may be derived from a mammal that has been suitably immunized with DR5 or with a suitable antigenic determinant based thereon or derived therefrom, such as an antigenic part, fragment, region, domain, loop or other epitope thereof. In one particular aspect, said antigenic determinant may be an extracellular part, region, domain, loop or other extracellular epitope(s).

[00175] The above method may be performed in any suitable manner, as will be clear to the skilled person. Reference is, e.g., made to EP 0 542 810, WO 05/19824, WO 04/051268 and WO 04/106377. The screening of step b) is preferably performed using a flow cytometry technique such as FACS. For this, reference is, e.g., made to Lieby et al., Blood, 97(12), 3820 (2001).

[00176] In another aspect, the method for generating an amino acid sequence directed against DR5 may comprise at least the steps of:

a) providing a set, collection or library of nucleic acid sequences encoding amino acid sequences;

b) screening said set, collection or library of nucleic acid sequences for nucleic acid sequences that encode an amino acid sequence that can bind to and/or has affinity for DR5; and

c) isolating said nucleic acid sequence, followed by expressing said amino acid sequence.

[00177] In such a method, the set, collection or library of nucleic acid sequences encoding amino acid sequences may, e.g., be a set, collection or library of nucleic acid sequences encoding a naïve set, collection or library of immunoglobulin sequences; a set, collection or library of nucleic acid sequences encoding a synthetic or semi-synthetic set, collection or library of immunoglobulin sequences; and/or a set, collection or library of nucleic acid sequences encoding a set, collection or library of immunoglobulin sequences that have been subjected to affinity maturation.

[00178] Also, in such a method, the set, collection or library of nucleic acid sequences may encode a set, collection or library of heavy chain variable domains (such as V_H domains or V_{HH} domains) or of light chain variable domains. In one example, the set, collection or library of nucleic acid sequences encode a set, collection or library of domain antibodies or single domain antibodies, or a set, collection or library of amino acid sequences that are capable of functioning as a domain antibody or single domain antibody.

[00179] In one aspect of this method, the set, collection or library of amino acid sequences may be an immune set, collection or library of nucleic acid sequences, e.g.,

derived from a mammal that has been suitably immunized with DR5 or with a suitable antigenic determinant based thereon or derived therefrom, such as an antigenic part, fragment, region, domain, loop or other epitope thereof. In one particular aspect, said antigenic determinant may be an extracellular part, region, domain, loop or other extracellular epitope(s).

[00180] The set, collection or library of nucleic acid sequences may, e.g., encode an immune set, collection or library of heavy chain variable domains or of light chain variable domains. In one specific aspect, the set, collection or library of nucleotide sequences may encode a set, collection or library of V_{HH} sequences.

[00181] In the above methods, the set, collection or library of nucleotide sequences may be displayed on a phage, phagemid, ribosome or suitable micro-organism (such as yeast), such as to facilitate screening. Suitable methods, techniques and host organisms for displaying and screening (a set, collection or library of) nucleotide sequences encoding amino acid sequences will be clear to the person skilled in the art, e.g., on the basis of the further disclosure herein. Reference is also made to the review by Hoogenboom in Nature Biotechnology, 23(9): 1105-1116 (2005).

[00182] The invention also relates to amino acid sequences that are obtained by the above methods, or alternatively by a method that comprises one of the above methods and in addition at least the steps of determining the nucleotide sequence or amino acid sequence of said immunoglobulin sequence; and of expressing or synthesizing said amino acid sequence in a known manner, such as by expression in a suitable host cell or host organism or by chemical synthesis.

[00183] Also, following the steps above, one or more amino acid sequences of the invention may be suitably humanized (or alternatively camelized); and/or the amino acid sequence(s) thus obtained may be linked to each other or to one or more other suitable amino acid sequences (optionally via one or more suitable linkers) so as to provide a polypeptide of the invention. Also, a nucleic acid sequence encoding an amino acid sequence of the invention may be suitably humanized (or alternatively camelized) and suitably expressed; and/or one or more nucleic acid sequences encoding an amino acid sequence of the invention may be linked to each other or to one or more nucleic acid sequences that encode other suitable amino acid sequences (optionally via nucleotide sequences that encode one or more suitable linkers), after which the nucleotide sequence thus obtained may be suitably expressed so as to provide a polypeptide of the invention.

[00184] The invention further relates to applications and uses of the amino acid sequences, compounds, constructs, polypeptides, nucleic acids, host cells, products and compositions described herein, as well as to methods for the prevention and/or treatment

for diseases and disorders associated with DR5. Some preferred but non-limiting applications and uses will become clear from the further description herein.

[00185] In one embodiment, the invention relates to the amino acid sequences, compounds, constructs, polypeptides, nucleic acids, host cells, products and compositions described herein for use in therapy of a disease or disorder.

[00186] In one embodiment, the invention relates to one or more of the amino acid sequences, compounds, constructs, polypeptides, nucleic acids, host cells, products and compositions described herein for use in therapy of a subject at risk for or suffering from a disease or disorder that can be prevented or treated by administering, to the subject in need thereof, a pharmaceutically effective amount of an amino acid sequence, compound, construct or polypeptide as described herein as an NB agent or NB construct.

[00187] In one embodiment, the invention relates to the amino acid sequences, compounds, constructs, polypeptides, nucleic acids, host cells, products and compositions described herein for use in therapy of diseases and disorders associated with DR5.

[00188] Other aspects, embodiments, advantages and applications of the invention will become clear from the further description herein, in which the invention is described and discussed in more detail.

[00189] In certain embodiments, inventive V_{HH} variants of the NB agents generally offer certain advantages (outlined herein) compared to "dAb's" or similar (single) domain antibodies or immunoglobulin sequences, which advantages are also provided by the inventive compositions of the invention. However, it will be clear to the skilled person that the more general aspects of the teaching below can also be applied (either directly or analogously) to other amino acid sequences of the invention.

Definitions

[00190] In the present description, examples and claims, the following definitions are generally applied, unless indicated otherwise. As used below and throughout the text, the use of a term or phrase in the singular is meant to incorporate the meaning of the plural, and vice versa, unless noted otherwise or apparent through context.

[00191] Unless indicated or defined otherwise, all terms used have their usual meaning in the art, which will be clear to the skilled person. Reference is made, e.g., to the standard handbooks, such as Sambrook et al, "Molecular Cloning: A Laboratory Manual" (2nd.Ed.), Vols. 1-3, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989); F. Ausubel et al, eds., "Current protocols in molecular biology", Green Publishing and Wiley Interscience, New York (1987); Lewin, "Genes II", John Wiley & Sons, New York, N.Y., (1985); Old et al., "Principles of Gene Manipulation: An Introduction to Genetic Engineering", 2nd edition,

University of California Press, Berkeley, CA (1981); Roitt et al., "Immunology" (6th. Ed.), Mosby/Elsevier, Edinburgh (2001); Roitt et al., Roitt's Essential Immunology, 10 Ed. Blackwell Publishing, UK (2001); and Janeway et al., "Immunobiology" (6th Ed.), Garland Science Publishing/Churchill Livingstone, New York (2005), as well as to the general background art cited herein. Additional references include, e.g., the following reviews: Presta, Adv. Drug Deliv. Rev. 2006, 58 (5-6): 640-56; Levin and Weiss, Mol. Biosyst. 2006, 2(1): 49-57; Irving et al., J. Immunol. Methods, 2001, 248(1-2), 31-45; Schmitz et al., Placenta, 2000, 21 Suppl. A, S106-12, Gonzales et al., Tumour Biol., 2005, 26(1), 31-43, which describe techniques for protein engineering, such as affinity maturation and other techniques for improving the specificity and other desired properties of proteins such as immunoglobulins.

[00192] Unless indicated otherwise, it is believed that all methods, steps, techniques and manipulations that are not specifically described in detail can be performed and have been performed in a manner known per se, and will be clear to the skilled person. Reference is again made, e.g., to the standard handbooks and the general background art mentioned herein and to the further references cited therein. Amino acid residues will be indicated according to the standard three-letter or one-letter amino acid code as provided by the IUPAC Code Tables.

[00193] Unless indicated otherwise, the term "immunoglobulin sequence", whether used herein to refer to a heavy chain antibody or to a conventional four-chain antibody, is used as a general term to include both the full-size antibody, the individual chains thereof, as well as all parts, domains or fragments thereof (including but not limited to antigen-binding domains or fragments such as V_{HH} domains or V_H/V_L domains, respectively).

[00194] The term "sequence" as used herein (for example in terms like "immunoglobulin sequence", "antibody sequence", "variable domain sequence", "sdAb sequence", "V_H sequence", "V_{HH} sequence" or "protein sequence"), is generally used to include both the relevant amino acid sequence as well as nucleic acid sequences or nucleotide sequences encoding the same, unless the context requires a more limited interpretation.

[00195] Unless indicated otherwise, the terms "nucleotide sequence" and "nucleic acid" generally is used interchangeably to refer to a polymer of deoxyribonucleic acids (DNA) or ribonucleic acids (RNA), unless the context requires a more limited interpretation.

[00196] For the purposes of comparing two or more nucleotide sequences, the percentage of "*sequence identity*" between a first nucleotide sequence and a second nucleotide sequence may be calculated or determined, e.g., by taking the number of nucleotides in the first nucleotide sequence that are identical to the nucleotides at the corresponding positions in the second nucleotide sequence, dividing that number by the

total number of nucleotides in the first nucleotide sequence and then multiplying by 100%. Each deletion, insertion, substitution or addition of a nucleotide in the second nucleotide sequence - when compared to the first nucleotide sequence - is considered as a difference at a single nucleotide position. One skilled in the art may also use a suitable computer algorithm or technique such as, e.g., NCBI Blast v2.0, using standard settings.

[00197] With regard to framework 1 (FR1), it should be clear to the skilled person that, for determining the degree of amino acid identity, the amino acid residues on positions 1 to 4 and 27 to 30 are preferably disregarded.

[00198] In one embodiment, in determining the degree of sequence identity between two amino acid sequences, the skilled person may take into account so-called "conservative" amino acid substitutions. Conservative substitutions are known in that art and are substitutions in which one amino acid is substituted by another amino acid residue within the same group that have a common property. Conserved amino acid groups and their common properties are as follows: (a) small aliphatic, nonpolar or slightly polar residues, including Ala, Ser, Thr, Pro and Gly; (b) polar, negatively charged residues and their (uncharged) amides, including Asp, Asn, Glu and Gln; (c) polar, positively charged residues, including His, Arg and Lys; (d) large aliphatic, nonpolar residues, including Met, Leu, He, Val and Cys; and (e) aromatic residues, including Phe, Tyr and Trp.

[00199] Particularly preferred conservative substitutions are as follows: Ala into Gly or into Ser; Arg into Lys; Asn into Gln or into His; Asp into Glu; Cys into Ser; Gln into Asn; Glu into Asp; Gly into Ala or into Pro; His into Asn or into Gln; Ile into Leu or into Val; Leu into Ile or into Val; Lys into Arg, into Gln or into Glu; Met into Leu, into Tyr or into Ile; Phe into Met, into Leu or into Tyr; Ser into Thr; Thr into Ser; Trp into Tyr; Tyr into Trp; and/or Phe into Val, into Ile or into Leu.

[00200] Any amino acid substitutions applied to the polypeptides described herein may also be based on the analysis of the frequencies of amino acid variations between homologous proteins of different species developed by Schulz et al., Principles of Protein Structure, Springer-Verlag, 1978, on the analyses of structure forming potentials developed by Chou and Fasman, Biochemistry 13: 211, 1974 and Adv. Enzymol., 47: 45-149, 1978, and on the analysis of hydrophobicity patterns in proteins developed by Eisenberg et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81: 140-144, 1984; Kyte & Doolittle; J Molec. Biol. 157: 105-132, 198 1, and Goldman et al., Ann. Rev. Biophys. Chem. 15: 321-353, 1986. Information on the primary, secondary and tertiary structure of camelid V_{HH} constructs is given in the general background art cited above, and the crystal structure of such a V_{HH} construct from a llama is, e.g., given by Desmyter et al., Nature Structural Biology, Vol. 3, 9, 803 (1996); Spinelli et al., Natural Structural Biology (1996); 3, 752-757; and Decanniere et al., Structure, Vol. 7, 4, 361 (1999). Further information about some of

the amino acid residues that in conventional V_H domains form the V_H/V_L interface and potential camelizing substitutions on these positions can be found in the art cited above.

[00201] Amino acid sequences and nucleic acid sequences are said to be "*exactly the same*" if they have 100% sequence identity over their entire length.

[00202] When comparing two amino acid sequences, the term "*amino acid difference*" refers to an insertion, deletion or substitution of a single amino acid residue on a position of the first sequence, compared to the second sequence; it being understood that two amino acid sequences can contain one, two or more such amino acid differences;

[00203] When a nucleotide sequence or amino acid sequence is said to "comprise" another nucleotide sequence or amino acid sequence, respectively, or to "essentially consist of another nucleotide sequence or amino acid sequence, this generally means that the first mentioned nucleotide sequence or amino acid sequence has within its sequence a stretch of nucleotides or amino acid residues, respectively, that has the same nucleotide sequence or amino acid sequence, respectively, as the latter sequence, irrespective of how the first mentioned sequence has actually been generated or obtained (which may, e.g., be by any suitable method described herein).

[00204] The term "in essentially isolated form" for a nucleic acid or amino acid sequence is separated from at least one other component with which it is usually associated in a source or medium, compared to its native biological source and/or the reaction medium or cultivation medium from which it has been obtained. The "at least one other component" may be another nucleic acid, another protein/polypeptide, another biological component or macromolecule or at least one contaminant, impurity or minor component. In one embodiment, a nucleic acid sequence or amino acid sequence is considered "essentially isolated" when it has been purified at least 2-fold, in particular at least 10-fold, more in particular at least 100-fold, and up to 1000-fold or more. A nucleic acid sequence or amino acid sequence that is "in essentially isolated form" is preferably essentially homogeneous, as determined using a suitable technique, such as a suitable chromatographical technique, such as polyacrylamide-gel electrophoresis.

[00205] The terms "domain" and "binding domain" as used herein generally refers to a globular region of an antibody chain, and in particular to a globular region of a heavy chain antibody, or to a polypeptide that essentially consists of such a globular region. Usually, such a domain will comprise peptide loops (for example 3 or 4 peptide loops) stabilized, e.g., as a sheet or by disulfide bonds.

[00206] The terms "antigenic determinant" and "epitope", which may also be used interchangeably herein, refers to the epitope on the antigen recognized by the antigen-binding molecule (such as a NB construct of the invention) and more in particular by the antigen-binding site of said molecule.

[00207] An amino acid sequence (such as a NB construct of the invention, a V_{HH} or V_H construct, an antibody, or generally an antigen binding protein or polypeptide or a fragment thereof) that can (specifically) bind to, that has affinity for, and/or that has specificity for a particular antigenic determinant, epitope, antigen or protein (or for at least one part, fragment or epitope thereof) is said to be "*against*" or "*directed against*" said antigenic determinant, epitope, antigen or protein.

[00208] The term "*specificity*" as mentioned therein refers to the number of different types of antigens or antigenic determinants to which a particular antigen-binding molecule or antigen-binding protein (such as a NB construct of the invention) molecule can bind. The specificity of an antigen-binding protein can be determined based on affinity and/or avidity. Typically, antigen-binding proteins (such as the NB construct of the invention) will bind to their antigen with a dissociation constant (K_D) of 10^{-5} to 10^{-12} moles/liter or less, and preferably 10^{-7} to 10^{-12} moles/liter or less and more preferably 10^{-8} to 10^{-12} moles/liter (i.e., with an association constant (K_A) of 10^5 to 10^{12} liter/ moles or more, and preferably 10^7 to 10^{12} liter/moles or more and more preferably 10^8 to 10^{12} liter/moles). Any K_D value greater than 10^4 mol/liter (or any K_A value lower than 10^4 M^{-1}) liters/mol is generally considered to indicate non-specific binding. Preferably, a NB construct of the invention will bind to its desired antigen with an affinity less than 500 nM, preferably less than 200 nM, more preferably less than 10 nM, such as less than 500 pM. "Specific binding" of an antigen-binding protein to an antigen or antigenic determinant can be determined in any suitable manner known per se, including, e.g., Scatchard analysis and/or competitive binding assays, such as radioimmunoassays (RIA), enzyme immunoassays (EIA) and sandwich competition assays, and the different variants thereof known per se in the art; as well as the other techniques mentioned herein.

[00209] "Affinity", represented by the equilibrium constant for the dissociation of an antigen with an antigen-binding protein (K_D), is a measure for the binding strength between an antigenic determinant and an antigen-binding site on the antigen-binding protein: the lesser the value of the K_D, the stronger the binding strength between an antigenic determinant and the antigen-binding molecule (alternatively, the affinity can also be expressed as the affinity constant (K_A), which is $1/K_D$). As will be clear to the skilled person, affinity can be determined in a manner known per se, depending on the specific antigen of interest.

[00210] "Avidity" is the measure of the strength of binding between an antigen-binding molecule (such as a NB construct of the invention) and the pertinent antigen. Avidity is related to both the affinity between an antigenic determinant and its antigen binding site on the antigen-binding molecule and the number of pertinent binding sites present on the antigen-binding molecule.

[00211] The dissociation constant may be the actual or apparent dissociation constant. Methods for determining the dissociation constant are known in the art.

[00212] The phrase "specifically binds" or "selectively binds," when used in the context of describing the interaction between an antigen (*e.g.*, a protein) and an NB construct, or functional fragment thereof, e.g., having the disclosed CDRs in the framework of an antibody, antibody fragment, or antibody-derived binding agent, refers to a binding reaction that is determinative of the presence of the antigen in a heterogeneous population of proteins and other biologics, *e.g.*, in a biological sample, *e.g.*, a blood, serum, plasma or tissue sample. Thus, under certain designated immunoassay conditions, the NB construct, antibodies or binding agents with a particular binding specificity bind to a particular antigen at least two times the background and do not substantially bind in a significant amount to other antigens present in the sample. In one embodiment, under designated immunoassay conditions, the NB construct, antibody or binding agents with a particular binding specificity bind to a particular antigen at least ten (10) times the background and do not substantially bind in a significant amount to other antigens present in the sample. Specific binding to an NB construct, antibody or binding agent under such conditions may require the NB construct, antibody or binding agent to have been selected for its specificity for a particular protein. As desired or appropriate, this selection may be achieved by subtracting out NB constructs or antibodies that cross-react with, *e.g.*, DR5 molecules from other species (*e.g.*, mouse or rat) or other polypeptides that are Death Receptor family members or subtypes. Alternatively, in some embodiments, NB constructs, antibodies or antibody fragments are selected that cross-react with certain desired molecules.

[00213] A variety of immunoassay formats may be used to select NB constructs that are specifically immunoreactive with a particular protein. For example, solid-phase ELISA immunoassays are routinely used to select antibodies specifically immunoreactive with a protein (see, *e.g.*, Harlow & Lane, Using Antibodies, A Laboratory Manual (1998), for a description of immunoassay formats and conditions that can be used to determine specific immunoreactivity) and can likewise be used for NB construct binding analysis. Typically a specific or selective binding reaction will produce a signal at least twice over the background signal and more typically at least than 10 to 100 times over the background. In addition to the affinity constant (K_A) described herein, an DR5-binding NB construct of the invention typically also has a dissociation rate constant (K_D) (k_{off}/k_{on}) of less than $5x10^{-2}$M, less than 10^{-2}M, less than $5x10^{-3}$M, less than 10^{-3}M, less than $5x10^{-4}$M, less than 10^{-4}M, less than $5x10^{-5}$M, less than 10^{-5}M, less than $5x10^{-6}$M, less than 10^{-6}M, less than $5x10^{-7}$M, less than 10^{-7}M, less than $5x10^{-8}$M, less than 10^{-8}M, less than $5x10^{-9}$M, less than 10^{-9}M, less than $5x10^{-10}$M, less than 10^{-10}M, less than $5x10^{-11}$M, less than 10^{-11}M, less than $5x10^{-12}$M, less than 10^{-12}M, less than $5x10^{-13}$M, less than 10^{-13}M, less than $5x10^{-14}$M, less

than 10^{-14}M, less than $5x10^{-15}$M, or less than 10^{-15}M or lower, and binds to DR5 with an affinity that is at least two-fold greater than its affinity for binding to a non-specific antigen (*e.g.*, human serum albumin "HSA").

[00214] The half-life of an amino acid sequence, compound or polypeptide of the invention generally refers to the time taken for the serum concentration of the construct to be reduced by 50%, in vivo, e.g., due to degradation of the sequence or compound and/or clearance or sequestration of the sequence or compound by natural mechanisms. The in vivo half-life of an amino acid sequence, compound or polypeptide of the invention can be determined in any manner known per se, such as by pharmacokinetic analysis. Suitable techniques will be clear to the person skilled in the art. Half-life can be expressed using parameters such as the $t_{1/2}$-alpha, $t_{1/2}$-beta and the area under the curve (AUC). See the Experimental Part below, plus standard handbooks, such as Kenneth et al., Chemical Stability of Pharmaceuticals: A Handbook for Pharmacists, and Peters et al., Pharmacokinetic analysis: A Practical Approach (1996); Gibaldi & Perron, "Pharmacokinetics", published by Marcel Dekker, 2nd Rev. edition (1982). The terms "increase in half-life" or "increased half-life" refer to an increase in the $t_{1/2}$-beta, either with or without an increase in the $t_{1/2}$-alpha and/or the AUC or both.

[00215] "Diseases and disorders associated with DR5" are as defined above and throughout the specification, e.g., in paragraphs [0051]. While not being limited by theory, the mechanism of action of DR5 in such diseases and/or disorders is believed to be as provided, e.g., in paragraph [0052]. Nonlimiting examples of contemplated diseases and disorders associated with DR5 are as provided and throughout the specification, including e.g., in paragraph [0053], and others may become apparent to one skilled in the art based upon the teachings provided herein.

[00216] In the context of the present invention, "modulating" or "to modulate" generally means either reducing or inhibiting the activity of, or alternatively increasing the activity of, a target or antigen, as measured using a suitable in vitro, cellular or in vivo assay. In particular, "modulating" or "to modulate" may mean either reducing or inhibiting the activity of, or alternatively increasing a (relevant or intended) biological activity of, a target or antigen, as measured using a suitable in vitro, cellular or in vivo assay (which will usually depend on the target or antigen involved), by at least 1%, preferably at least 5%, such as at least 10% or at least 25%, e.g., by at least 50%, at least 60%, at least 70%, at least 80%, or at least 90% or more, compared to activity of the target or antigen in the same assay under the same conditions but without the presence of the construct of the invention.

[00217] As will be clear to the skilled person, "modulating" may also involve effecting a change (which may either be an increase or a decrease) in affinity, avidity, specificity

and/or selectivity of a target or antigen for one or more of its ligands, binding partners, partners for association into a homomultimeric or heteromultimeric form, or substrates; and/or effecting a change (which may either be an increase or a decrease) in the sensitivity of the target or antigen for one or more conditions in the medium or surroundings in which the target or antigen is present (such as pH, ion strength, the presence of co-factors, etc.), compared to the same conditions but without the presence of the construct of the invention. As will be clear to the skilled person, this may again be determined in any suitable manner and/or using any suitable assay known per se, depending on the target or antigen involved.

[00218] In one embodiment, "modulating" may also mean effecting a change (i.e., an activity as a neutralizing agent, as an agonist, as an antagonist or as a reverse agonist, respectively, depending on the target or antigen and the desired biological or physiological effect) with respect to one or more biological or physiological mechanisms, effects, responses, functions, pathways or activities in which the target or antigen (or in which its substrate(s), ligand(s) or pathway(s) are involved, such as its signaling pathway or metabolic pathway and their associated biological or physiological effects) is involved. As will be clear to the skilled person, such an action as a neutralizing agent, as an agonist or an antagonist may be determined in any suitable manner and/or using any suitable (in vitro and usually cellular or in assay) assay known per se, depending on the target or antigen involved. In particular, an action as an agonist or antagonist may be such that an intended biological or physiological activity is increased or decreased, respectively, by at least 1%, preferably at least 5%, such as at least 10% or at least 25%, e.g., by at least 50%, at least 60%, at least 70%, at least 80%, or at least 90% or more, compared to the biological or physiological activity in the same assay under the same conditions but without the presence of the construct of the invention.

[00219] Modulating may involve, e.g., allosteric modulation of the target or antigen; and/or reducing or inhibiting the binding of the target or antigen to one of its substrates or ligands and/or competing with a natural ligand, substrate for binding to the target or antigen. Modulating may also involve activating the target or antigen or the mechanism or pathway in which it is involved. Modulating may also involve, e.g., effecting a change in respect of the folding or confirmation of the target or antigen, or in respect of the ability of the target or antigen to fold, to change its confirmation (for example, upon binding of a ligand), to associate with other (sub)units, or to disassociate. Modulating may involve, e.g., effecting a change in the ability of the target or antigen to transport other compounds or to serve as a channel for other compounds (such as ions).

[00220] Modulating may be reversible or irreversible, but for pharmaceutical and pharmacological purposes will usually be in a reversible manner.

[00221] In respect of a target or antigen, the term "interaction site" on the target or antigen means a site, epitope, antigenic determinant, part, domain or stretch of amino acid residues on the target or antigen that is a site for binding to a ligand, receptor or other binding partner, a catalytic site, a cleavage site, a site for allosteric interaction, a site involved in multimerization (such as homomerization or heteromerization) of the target or antigen; or any other site, epitope, antigenic determinant, part, domain or stretch of amino acid residues on the target or antigen that is involved in a biological action or mechanism of the target or antigen. More generally, an "interaction site" can be any site, epitope, antigenic determinant, part, domain or stretch of amino acid residues on the target or antigen to which an amino acid sequence or polypeptide of the invention can bind such that the target or antigen (and/or any pathway, interaction, signaling, biological mechanism or biological effect in which the target or antigen is involved) is modulated.

[00222] An amino acid sequence or polypeptide is said to be "*specific for*" a first target or antigen compared to a second target or antigen when is binds to the first antigen with an affinity (as described above, and suitably expressed as a K_D value, K_A value, K_{off} rate and/or K_{on} rate) that is at least 10 times, such as at least 100 times, and preferably at least 1000 times, and up to 10,000 times or more better than the affinity with which said amino acid sequence or polypeptide binds to the second target or polypeptide. For example, the first antigen may bind to the target or antigen with a K_D value that is at least 10 times less, e.g., at least 100 times less, and preferably at least 1000 times less, such as 10,000 times less or even a greater fold difference, than the K_D with which said amino acid sequence or polypeptide binds to the second target or polypeptide. In one embodiment, when an amino acid sequence or polypeptide is "specific for" a first target or antigen compared to a second target or antigen, it is directed against said first target or antigen, but not directed against said second target or antigen.

[00223] The terms "*cross-block*", "*cross-blocked*" and "*cross-blocking*" are used interchangeably herein to mean the ability of an amino acid sequence or other binding agents (such as a polypeptide of the invention) to interfere with the binding of other amino acid sequences or binding agents of the invention to a given target. The extend to which an amino acid sequence or other binding agents of the invention is able to interfere with the binding of another to DR5, and therefore whether it can be said to cross-block according to the invention, can be determined using competition binding assays. One particularly suitable quantitative assay uses a Biacore machine which can measure the extent of interactions using surface plasmon resonance technology. Another suitable quantitative cross-blocking assay uses an ELISA-based approach to measure competition between amino acid sequence or another binding agents in terms of their binding to the target.

[00224] A suitable assay for determining whether an amino acid sequence or other binding agent cross-blocks or is capable of cross-blocking according to the invention is an exemplary Biacore assay or an exemplary ELISA assay.

[00225] An amino acid sequence is said to be "*cross-reactive*" for two different antigens or antigenic determinants (such as serum albumin from two different species of mammal, such as human serum albumin and cyno serum albumin) if it is specific for both these different antigens or antigenic determinants.

[00226] By binding that is "*essentially independent of the pH*" is generally meant herein that the association constant (K_A) of the amino acid sequence with respect to the serum protein (such as serum albumin) at the pH value(s) that occur in a cell of an animal or human body (as further described herein) is at least 5%, such as at least 10%, preferably at least 25%, more preferably at least 50%, even more preferably at least 60%, such as even more preferably at least 70%, such as at least 80% or at least 90% or more (or even more than 100%, such as more than 110%, more than 120% or even 130% or more, or even more than 150%, or even more than 200%) of the association constant (K_A) of the amino acid sequence with respect to the same serum protein at the pH value(s) that occur outside said cell. Alternatively, by binding that is "*essentially independent of the pH*" is generally meant herein that the k_{off} rate (measured by Biacore – see e.g. Experiment 2) of the amino acid sequence with respect to the serum protein (such as serum albumin) at the pH value(s) that occur in a cell of an animal or human body (as e.g. further described herein, e.g. pH around 5.5, e.g. 5.3 to 5.7) is at least 5%, such as at least 10%, preferably at least 25%, more preferably at least 50%, even more preferably at least 60%, such as even more preferably at least 70%, such as at least 80% or at least 90% or more (or even more than 100%, such as more than 110%, more than 120% or even 130% or more, or even more than 150%, or even more than 200%) of the k_{off} rate of the amino acid sequence with respect to the same serum protein at the pH value(s) that occur outside said cell, e.g. pH 7.2 to 7.4. By "*the pH value(s) that occur in a cell of an animal or human body*" is meant the pH value(s) that may occur inside a cell, and in particular inside a cell that is involved in the recycling of the serum protein. In particular, by "*the pH value(s) that occur in a cell of an animal or human body*" is meant the pH value(s) that may occur inside a (sub)cellular compartment or vesicle that is involved in recycling of the serum protein (e.g. as a result of pinocytosis, endocytosis, transcytosis, exocytosis and phagocytosis or a similar mechanism of uptake or internalization into said cell), such as an endosome, lysosome or pinosome.

[00227] As further described herein, the total number of amino acid residues in a NB construct can be in the region of 110-120, is preferably 112-115, and is most preferably 113. It should however be noted that parts, fragments, analogs or derivatives (as further

described herein) of a NB construct are not particularly limited as to their length and/or size, as long as such parts, fragments, analogs or derivatives meet the further requirements outlined herein, and are optionally suitable for the purposes herein.

[00228] As mentioned herein "preferred" (or "more preferred", "even more preferred", etc.) apply to specific NB compounds or variants thereof, or their uses, for a variety of embodiments described herein, or for particular embodiments if so described.

[00229] The amino acid residues of a NB construct are numbered according to the general numbering for V_H domains as given by Kabat et al. "Sequence of proteins of immunological interest", US Public Health Services, NIH Bethesda, MD, Publication No. 91, as applied to V_{HH} domains from Camelids in the article of Riechmann and Muyldermans, J. Immunol. Methods 2000 Jun 23; 240 (1-2): 185-195 (see, e.g., Figure 2 of this publication). Accordingly, in general a FR1 of a NB construct comprises the amino acid residues at positions 1-30, a CDR1 of a NB construct comprises the amino acid residues at positions 31-35, a FR2 of a NB construct comprises the amino acids at positions 36-49, a CDR2 of a NB construct comprises the amino acid residues at positions 50-65, a FR3 of a NB construct comprises the amino acid residues at positions 66-94, a CDR3 of a NB construct comprises the amino acid residues at positions 95-102, and a FR4 of a NB construct comprises the amino acid residues at positions 103-113. However, it is well known in the art for V_H domains and for V_{HH} domains that the total number of amino acid residues in each of the CDR's may vary and therefore may not correspond to the total number of amino acid residues indicated by the Kabat numbering. By way of example, for an inventive NB construct described herein, the amino acid residues and their position in the NB construct for their particular FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3 and FR4 are as provided in Table 4 herein. Other methods such as Kabat and Chothia may be used to define alternative versions of the particular CDRs, and crystalographic determination of contact points and interaction sites may further inform one skilled in the art as to the extent of each particular CDR and/or FR region.

[00230] The Figures, Sequence Listing and the Experimental Part/Examples are given to further illustrate the invention and should not be interpreted or construed as limiting the scope of the invention and/or of the appended claims in any way, except if explicitly indicated otherwise herein.

[00231] For a general description of heavy chain antibodies and the variable domains thereof, reference is inter alia made to the art references cited herein.

[00232] In accordance with the terminology used in the art, the variable domains present in naturally occurring heavy chain antibodies will also be referred to as "*V_{HH} domains*", in order to distinguish them from the heavy chain variable domains that are present in conventional 4-chain antibodies (which will be referred to herein as "*V_H*

domains") and from the light chain variable domains that are present in conventional 4-chain antibodies (which will be referred to herein as "*V_L domains*"). In general, V_{HH} domains have been "designed" by nature to functionally bind to an antigen without the presence of, and without any interaction with, a light chain variable domain.

[00233] As mentioned in the art references cited above, V_{HH} domains have a number of unique structural characteristics and functional properties. These make isolated V_{HH} domains (as well as inventive compositions based thereon that share these structural characteristics and functional properties with the naturally occurring V_{HH} domains) and proteins containing the same highly advantageous for use as functional antigen-binding domains or proteins. In particular, and without being limited thereto, V_{HH} domains and inventive compositions can function as a single, relatively small, functional antigen-binding structural unit, domain or protein. This distinguishes the V_{HH} domains from the V_H and V_L domains of conventional 4-chain antibodies, which by themselves are generally not suited for practical application as single antigen-binding proteins or domains, but need to be combined in some form or another to provide a functional antigen-binding unit (as in, e.g., conventional antibody fragments such as Fab fragments; in ScFv's fragments, which consist of a V_H domain covalently linked to a V_L domain).

[00234] Because of these unique properties, the use of V_{HH} domains, and of inventive NB agents and compositions based thereon, as single antigen-binding proteins or as antigen-binding domains (i.e., as part of a larger protein or polypeptide) offers a number of significant advantages over the use of conventional V_H and V_L domains, ScFv's or conventional antibody fragments (such as Fab- or $F(ab')_2$-fragments). Advantages of a camelid V_{HH} variant of a NB construct are e.g., only a single domain is required to bind an antigen with high affinity and with high selectivity, so there is no need to manufacture or combine multiple separate domains nor is there a need to assure that these two domains are present in the right spacial conformation and configuration; V_{HH} domains can be expressed from a single transcript and require no post- translational folding or modifications; V_{HH} domains can easily be engineered into multivalent and multispecific formats (as further discussed herein); V_{HH} domains are highly soluble and do not have a tendency to aggregate; V_{HH} domains are highly stable to heat, pH, proteases and other denaturing agents or conditions; V_{HH} domains are easy and relatively cheap to prepare and to scale up for production; V_{HH} domains are relatively small (monomers are approximately 15 kDa, or 10 times smaller than a conventional IgG) compared to conventional 4-chain antibodies and antigen-binding fragments thereof, and therefore show high(er) penetration into tissues (including but not limited to solid tumors and other dense tissues) than such conventional 4-chain antibodies and antigen-binding fragments thereof; V_{HH} domains can show so-called cavity-binding properties (inter alia due to their

extended CDR3 loop, compared to conventional V_H domains) and can therefore also access targets and epitopes not accessible to conventional 4-chain antibodies and antigen-binding fragments thereof.

NB constructs against DR5

[00235] In a specific and preferred aspect, the invention provides NB agents against DR5, and in particular NB agents against DR5 from a warm-blooded animal, and more in particular NB agents against DR5 from a mammal, and especially NB agents against human DR5, such as provided in public databases, e.g. in NCBI Protein database accession number BAA33723 (SEQ ID NO: 89); as well as proteins and/or polypeptides comprising at least one such NB agent.

[00236] In particular, the invention provides NB agents against DR5, and proteins and/or polypeptides comprising the same, that have improved therapeutic and/or pharmacological properties and/or other advantageous properties (such as, e.g., improved ease of preparation and/or reduced costs of goods), compared to conventional antibodies against DR5, or fragments thereof, compared to constructs that could be based on such conventional antibodies or antibody fragments (such as F_{ab}' fragments, $F_{(ab')2}$ fragments, ScFv constructs, "diabodies" and other multispecific constructs (see, e.g., the review by Holliger and Hudson, Nat Biotechnol. 2005 Sep; 23(9): 1126-36)), and also compared to the so-called "dAb's" or similar (single) domain antibodies that may be derived from variable domains of conventional antibodies.

[00237] In one embodiment and as generally described herein for the therapeutically useful amino acid sequences of the invention, the NB agents and variants thereof of the invention are in essentially isolated form, or form part of a protein or polypeptide of the invention that may comprise or essentially consist of one or more NB agents of the invention. In one embodiment, the NB agent variant may further comprise one or more additional amino acid sequences. In one embodiment, the one or more additional amino acid sequences are linked via one or more suitable linkers. In one embodiment, and without limitation, the one or more amino acid sequences of the invention may be used as a binding unit in such a protein or polypeptide, which may optionally contain one or more further amino acid sequences that can serve as a binding unit (i.e., against one or more other targets than DR5), so as to provide a monovalent, multivalent or multispecific polypeptide of the invention, respectively. In one embodiment, such a protein or polypeptide may comprise or essentially consist of one or more NB agents of the invention and optionally one or more (other) polypeptide domains or epitope binding compositions (i.e., directed against other targets than DR5), all optionally linked via one or more suitable linkers, so as to provide a monovalent, multivalent or multispecific NB agent, respectively.

[00238] In one embodiment, the binding site for binding against DR5 is formed by the CDR sequences. In one embodiment, an inventive composition may, in addition to the at least one binding site for binding against DR5, contain one or more further binding sites for binding against other antigens, proteins or targets. For methods and positions for introducing such second binding sites, reference is, e.g., made to Keck and Huston, Biophysical Journal, 71, October 1996, 2002-2011; EP 0 640 130; WO 06/07260 and the US provisional application by Ablynx N.V. entitled "Immunoglobulin domains with multiple binding sites" filed on November 27, 2006.

[00239] In one embodiment when the inventive amino acid sequences (or a polypeptide of the invention comprising the same) is intended for administration to a subject (for example for therapeutic and/or diagnostic purposes as described herein), it is directed against human DR5. In one embodiment for veterinary purposes, the inventive composition is directed against DR5 from the species to be treated. The inventive compositions herein may or may not be cross-reactive (i.e., active against DR5 from two or more species of mammal, such as against human DR5 and DR5 from at least one of the species of mammal mentioned herein). In one embodiment, a NB construct of the invention can specifically bind to DR5 but does not bind to DR-4, TRAIL-R3 or TRAIL-R4.

[00240] In one embodiment, the compositions of the invention is generally directed against any antigenic determinant, epitope, part, domain, subunit or confirmation (where applicable) of DR5. In one embodiment, the inventive NB agents are directed against the extracellular domain portion of DR5.

[00241] In one specific embodiment, inventive compositions herein compete with the natural ligand of DR5 in a competitive binding assay. In one embodiment, an inventive NB agent competes with TRAIL for binding to DR5. In one embodiment, an inventive composition of the invention does not compete with TRAIL- for binding to DR5. In one embodiment, an inventive NB agent synergizes with TRAIL for binding to DR5.

[00242] In one non-limiting embodiment, the amino acid sequence and structure of an inventive composition are comprised of four framework regions or "FR's" (or sometimes also referred to as "FW's"), which are referred to in the art and herein as "Framework region 1" or "FR1"; as "Framework region 2" or "FR2"; as "Framework region 3" or "FR3"; and as "Framework region 4" or "FR4", respectively; which framework regions are interrupted by three complementary determining regions or "CDRs", which are referred to in the art as "Complementarity Determining Region 1"or "CDR1"; as "Complementarity Determining Region 2" or "CDR2"; and as "Complementarity Determining Region 3" or "CDR3", respectively. In one embodiment, the framework sequences and CDR's (and combinations thereof) are those present in the NB constructs of the invention as described

herein and especially in Table 4. Other suitable CDR sequences can be obtained by the methods described herein.

[00243] In one non-limiting embodiment, the CDR sequences of the invention are such that:

a) the NB constructs can bind to DR5 with a dissociation constant (K_D) of 10^{-5} to 10^{-12} moles/liter or less, and preferably 10^{-7} to 10^{-12} moles/liter or less and more preferably 10^{-8} to 10^{-12} moles/liter (i.e., with an association constant (K_A) of 10^5 to 10^{12} liter/ moles or more, and preferably 10^7 to 10^{12} liter/moles or more and more preferably 10^8 to 10^{12} liter/moles); and/or such that

b) the NB constructs can bind to DR5 with a k_{on}-rate of between 10^2 $M^{-1}s^{-1}$ to about 10^7 $M^{-1}s^{-1}$, preferably between 10^3 $M^{-1}s^{-1}$ and 10^7 $M^{-1}s^{-1}$, more preferably between 10^4 $M^{-1}s^{-1}$ and 10^7 $M^{-1}s^{-1}$, such as between 10^5 $M^{-1}s^{-1}$ and 10^7 $M^{-1}s^{-1}$; and/or such that

c) the NB constructs can bind to DR5 with a k_{off} rate between 1 s^{-1} ($t_{1/2}$=0.69 s) and 10^{-6} s^{-1} (providing a near irreversible complex with a $t_{1/2}$ of multiple days), preferably between 10^{-2} s^{-1} and 10^{-6} s^{-1}, more preferably between 10^{-3} s^{-1} and 10^{-6} s^{-1}, such as between 10^{-4} s^{-1} and 10^{-6} s^{-1}.

[00244] In one embodiment, the CDR sequences herein are such that: a monovalent composition of the invention (or a polypeptide that contains only one NB construct of the invention) will bind to DR5 with an affinity less than 100 nM, preferably less than 10 nM, more preferably less than 1 nM, such as less than 500 pM.

[00245] The affinity of the NB agents of the invention against DR5 can be determined in a manner known per se, e.g., using the general techniques for measuring K_D. K_A, k_{off} or k_{on} mentioned herein, as well as some of the specific assays described herein.

[00246] In one non-limiting aspect, the invention relates to a NB agent against DR5, which consists of four framework regions (FR1 to FR4 respectively) and three complementarity determining regions (CDR1 to CDR3 respectively). In one embodiment, the NB agent is a NB construct in which:

CDR1 is chosen from the group consisting of:

a) the amino acid sequences of SEQ ID NO's: 41 to 44;

b) amino acid sequences that have at least 90% amino acid identity with at least one of the amino acid sequences of SEQ ID NO's: 41 to 44;

c) amino acid sequences that have 3, 2, or 1 amino acid difference with at least one of the amino acid sequences of SEQ ID NO's: 41 to 44;

and/or

CDR2 is chosen from the group consisting of:

a) the amino acid sequences of SEQ ID NO's: 51 to 55;

b) amino acid sequences that have at least 90% amino acid identity with at least one of the amino acid sequences of SEQ ID NO's: 51 to 55;

c) amino acid sequences that have 3, 2, or 1 amino acid difference with at least one of the amino acid sequences of SEQ ID NO's: 51 to 55;

and/or

CDR3 is chosen from the group consisting of:

a) the amino acid sequences of SEQ ID NO's: 63 to 68;

b) amino acid sequences that have at least 90% amino acid identity with at least one of the amino acid sequences of SEQ ID NO's: 63 to 68

c) amino acid sequences that have 3, 2, or 1 amino acid difference with at least one of the amino acid sequences of SEQ ID NO's: 63 to 68;

or any suitable fragment of such an amino acid sequence.

[00247] Of the NB agents of the invention, NB construct comprising one or more of the CDR's explicitly listed above are particularly preferred; NB construct comprising two or more of the CDR's explicitly listed above are more particularly preferred; and NB construct comprising three of the CDR's explicitly listed above are most particularly preferred.

[00248] Some particularly preferred, but non-limiting combinations of CDR sequences, as well as preferred combinations of CDR sequences and framework sequences, are mentioned in Table 4 below, which lists the CDR sequences and framework sequences that are present in a number of preferred (but non-limiting) NB construct of the invention. As will be clear to the skilled person, a combination of CDR1, CDR2 and CDR3 sequences that occur in the same clone (i.e., CDR1, CDR2 and CDR3 sequences that are mentioned on the same line in Table 4, and especially as provided in SEQ ID NOS: 1-22, 26-40, 87-88, and 103-104) will usually be preferred (although the invention in its broadest sense is not limited thereto, and also comprises other suitable combinations of the CDR sequences mentioned in Table 4). Also, a combination of CDR sequences and framework sequences that occur in the same clone (i.e., CDR sequences and framework sequences that are mentioned on the same line in Table 4, and especially as provided in context within SEQ ID NOS: 1 – 22, 26 – 40, 87-88, and 103-104)) will usually be preferred (although the invention in its broadest sense is not limited thereto, and also comprises other suitable combinations of the CDR sequences and framework sequences mentioned in Table 4, as well as combinations of such CDR sequences and other suitable framework sequences.

[00249] In one embodiment, in the NB constructs that comprise the combinations of CDR's mentioned in Table 4, each CDR can be replaced by a CDR chosen from the group consisting of amino acid sequences that have at least 80%, preferably at least 90%, more preferably at least 95%, even more preferably at least 99% sequence identity with the mentioned CDR's.

[00250] Thus, in the NB constructs of the invention, at least one of the CDR1, CDR2 and CDR3 sequences present is suitably chosen from the group consisting of the CDR1, CDR2 and CDR3 sequences, respectively, listed in Table 4; or from the group of CDR1, CDR2 and CDR3 sequences, respectively, that have at least 80%, preferably at least 90%, more preferably at least 95%, even more preferably at least 99% "sequence identity" with at least one of the CDR1, CDR2 and CDR3 sequences, respectively, listed in Table 4; and/or from the group consisting of the CDR1, CDR2 and CDR3 sequences, respectively, that have 3, 2 or only 1 "amino acid difference(s)" with at least one of the CDR1, CDR2 and CDR3 sequences, respectively, listed in Table 4.

[00251] In this context, by "suitably chosen" is meant that, as applicable, a CDR1 sequence is chosen from suitable CDR1 sequences (i.e., as defined herein), a CDR2 sequence is chosen from suitable CDR2 sequences (i.e., as defined herein), and a CDR3 sequence is chosen from suitable CDR3 sequence (i.e., as defined herein), respectively. In one embodiment, the CDR sequences are chosen such that the NB constructs of the invention bind to DR5 with an affinity (suitably measured and/or expressed as a K_D-value (actual or apparent), a K_A-value (actual or apparent), a k_{on}-rate and/or a k_{off}-rate, or alternatively as an IC_{50} value that is as provided herein.

[00252] In one embodiment of the NB constructs of the invention, at least the CDR3 sequence present is suitably chosen from the group consisting of the CDR3 sequences listed in Table 4 or from the group of CDR3 sequences that have at least 80%, preferably at least 90%, more preferably at least 95%, even more preferably at least 99% sequence identity with at least one of the CDR3 sequences listed in Table 4; and/or from the group consisting of the CDR3 sequences that have 3, or have 2 or have only 1 amino acid difference(s) with at least one of the CDR3 sequences listed in Table 4.

[00253] In one embodiment of the NB constructs of the invention, at least two of the CDR1, CDR2 and CDR3 sequences present are suitably chosen from the group consisting of the CDR1, CDR2 and CDR3 sequences, respectively, listed in Table 4 or from the group consisting of CDR1, CDR2 and CDR3 sequences, respectively, that have at least 80%, and/or at least 90%, and/or at least 95%, and/or at least 99% sequence identity with at least one of the CDR1, CDR2 and CDR3 sequences, respectively, listed in Table 4; and/or from the group consisting of the CDR1, CDR2 and CDR3 sequences, respectively, that have 3, 2 or only 1 "amino acid difference(s)" with at least one of the CDR1, CDR2 and CDR3 sequences, respectively, listed in Table 4.

[00254] In one embodiment of the NB constructs of the invention, at least the CDR3 sequence present is suitably chosen from the group consisting of the CDR3 sequences listed in Table 4 or from the group of CDR3 sequences that have at least 80%, and/or at least 90%, and/or at least 95%, and/or at least 99% sequence identity with at least one of

the CDR3 sequences listed in Table 4, respectively; and at least one of the CDR1 and CDR2 sequences present is suitably chosen from the group consisting of the CDR1 and CDR2 sequences, respectively, listed in Table 4 or from the group of CDR1 and CDR2 sequences, respectively, that have at least 80%, and/or at least 90%, and/or at least 95%, and/or at least 99% sequence identity with at least one of the CDR1 and CDR2 sequences, respectively, listed in Table 4; and/or from the group consisting of the CDR1 and CDR2 sequences, respectively, that have 3, 2 or only 1 amino acid difference(s) with at least one of the CDR1 and CDR2 sequences, respectively, listed in Table 4.

[00255] In one embodiment of the NB constructs of the invention, all three CDR1, CDR2 and CDR3 sequences present are suitably chosen from the group consisting of the CDR1, CDR2 and CDR3 sequences, respectively, listed in Table 4.

[00256] In one embodiment, the combinations of CDR's listed in Table 4 (i.e., those mentioned for the same construct in Table 4) are preferred. Thus, in one aspect, when a CDR in a NB construct of the invention is a CDR sequence mentioned in Table 4 or is suitably chosen from the group of CDR sequences that have at least 80%, preferably at least 90%, more preferably at least 95%, even more preferably at least 99% sequence identity with a CDR sequence listed in Table 4; and/or from the group consisting of CDR sequences that have 3, 2 or only 1 amino acid difference(s) with a CDR sequence listed in Table 4, that at least one and preferably both of the other CDR's are suitably chosen from the CDR sequences that belong to the same combination in Table 4 (i.e., mentioned on the same line in Table 4) or are suitably chosen from the group of CDR sequences that have at least 80%, preferably at least 90%, more preferably at least 95%, even more preferably at least 99% sequence identity with the CDR sequence(s) belonging to the same combination and/or from the group consisting of CDR sequences that have 3, 2 or only 1 amino acid difference(s) with the CDR sequence(s) belonging to the same combination. The other preferences indicated in the above paragraphs also apply to the combinations of CDR's mentioned in Table 4.

[00257] In one embodiment of a NB construct of the invention, the CDR1, CDR2 and CDR3 sequences present are suitably chosen from one of the combinations of CDR1, CDR2 and CDR3 sequences, respectively, listed in Table 4.

[00258] According to one non-limiting aspect of a NB construct of the invention (a) CDR1 has a length of between 1 and 12 amino acid residues, and usually between 2 and 9 amino acid residues, such as 5, 6 or 7 amino acid residues; and/or (b) CDR2 has a length of between 13 and 24 amino acid residues, and usually between 15 and 21 amino acid residues, such as 16 and 17 amino acid residues; and/or (c) CDR3 has a length of between 2 and 35 amino acid residues, and usually between 3 and 30 amino acid residues, such as between 6 and 23 amino acid residues.

[00259] In one non-limiting aspect, the invention relates to a NB construct in which the CDR sequences have more than 80%, preferably more than 90%, more preferably more than 95%, such as at least 99% or more sequence identity with the CDR sequences of at least one of the amino acid sequences of SEQ ID NO's: 1-22, 26-40, 87-88, and 103-104.

[00260] Generally, NB agents with the above CDR sequences may be as further described herein. In one embodiment the NB agents have framework sequences that are also as further described herein. Thus, e.g., and as mentioned herein, such NB agents may be naturally occurring single domain antibodies (from any suitable species), naturally occurring V_{HH} sequences (i.e., from a suitable species of Camelid) or synthetic or semi-synthetic amino acid sequences or NB agents, including but not limited to partially humanized NB constructs or V_{HH} sequences, fully humanized NB constructs or V_{HH} sequences, camelized heavy chain variable domain sequences, as well as NB agents that have been obtained by the techniques mentioned herein.

[00261] Thus, in one non-limiting aspect, the invention relates to a humanized NB agent, which consists of four framework regions (FR1 to FR4 respectively) and three complementarity determining regions (CDR1 to CDR3 respectively), in which CDR1 to CDR3 are as defined herein and in which said humanized NB agent comprises at least one humanizing substitution, and in particular at least one humanizing substitution in at least one of its framework sequences.

[00262] In another preferred, but non-limiting aspect, the invention relates to a NB agent in which the CDR sequences have at least 70% amino acid identity, preferably at least 80% amino acid identity, more preferably at least 90% amino acid identity, such as 95% amino acid identity or more or even essentially 100% amino acid identity with the CDR sequences of at least one of the amino acid sequences of SEQ ID NO's: 1-22, 26-40, 87-88, and 103-104. This degree of amino acid identity can, e.g., be determined by determining the degree of amino acid identity (in a manner described herein) between said NB agent and one or more of the sequences of SEQ ID NO's: 1-22, 26-40, 87-88, and 103-104, in which the amino acid residues that form the framework regions are disregarded. Such NB agents can be as further described herein.

[00263] In one non-limiting aspect, the invention relates to an NB agent, including but not limited to a NB construct, with an amino acid sequence that is chosen from the group consisting of SEQ ID NO's: 1-22, 26-40, 87-88, and 103-104 or from the group consisting of from amino acid sequences that have more than 80%, preferably more than 90%, more preferably more than 95%, such as at least 99% or more sequence identity with at least one of the amino acid sequences of SEQ ID NO's: 1-22, 26-40, 87-88, and 103-104.

[00264] Another non-limiting aspect of the invention relates to humanized or further humanized variants of the NB constructs of SEQ ID NO's: 1-22, 26-40, 87-88, and 103-104

that comprise, compared to the corresponding native sequence, at least one humanizing substitution, and in particular at least one humanizing substitution in at least one of its framework sequences.

Monovalent and Multivalent binding polypeptides

[00265] The invention further relates to a compound that comprises or essentially consists of one or more polypeptides of the invention against DR5, and more specifically against human DR5, and optionally comprises one or more other groups, residues, moieties or binding units, wherein said compound is capable of enhancing apoptosis. In one embodiment, some NB agents of the invention are proteins that comprise at least three, four, five or more monovalent binding polypeptides against the DR5 receptor, such as NB agents of the invention directed against the DR5. As mentioned herein, in such multivalent polypeptides of the invention, each monovalent binding polypeptide, such as a NB construct, may be directed against the same epitope on the DR5, or against different epitopes on the DR5. Some non-limiting examples of such NB polypeptides of the invention are given in SEQ ID NO's: 1-22, 26-40, 87-88, and 103-104.

[00266] Generally, proteins or polypeptides that comprise or essentially consist of a single binding polypeptide (such as a single DR5 binding subunit of a NB agent of the invention) will be referred to herein as "monovalent" proteins or polypeptides or as "monovalent constructs". Proteins and polypeptides that comprise or essentially consist of two or more binding polypeptides (such as at least two joined NB agents of the invention or at least one NB agent of the invention and at least one other NB agent or polypeptide construct) will be referred to herein as "multivalent" proteins or polypeptides or as "multivalent constructs", and these may provide certain advantages compared to the corresponding monovalent binding polypeptides of the invention. Particular non-limiting examples of such multivalent constructs are as provided herein.

[00267] Specific examples of multivalent NB agent include a dimer or divalent construct comprising two polypeptide subunits, a trimer or trivalent NB agent comprising three polypeptide subunits, a tetramer or tetravalent NB agent comprising four polypeptide subunits, a pentamer or pentavalent NB agent comprising five polypeptide subunits, a hexamer or hexavalent NB agent comprising six polypeptide subunits, or additional multimeric variants thereof.

[00268] In one non-limiting aspect, a trimeric NB agent of the invention comprises or essentially consists of three monovalent polypeptide subunits of the invention. In one embodiment, the trimeric NB agent comprises three identical DR5 binding monovalent polypeptide subunits of the invention, in which case the NB agent is a trimer that is multivalent but monospecific. In one embodiment a trimeric NB agent comprises or

essentially consists of a first and/or second DR5 binding subunit and a second or third subunit, respectively, that is optionally a subunit that binds specifically to a different epitope (either on DR5 or on another target), e.g., in which case the NB agent is a trimer that is multivalent and multispecific.

[00269] In one non-limiting embodiment, a NB agent comprises or essentially consists of at least four monovalent DR5 binding polypeptide subunits of the invention. Such a tetrameric NB agent of the invention may be monospecific or may be converted to a multispecific construct by optionally joining additional subunits that bind specifically to the same or a different DR5 epitope from the first and/or to a target other than DR5.

[00270] In one non-limiting embodiment, a NB agent comprises or essentially consists of at least five monovalent DR5 binding polypeptide subunits of the invention. Such a pentameric NB agent of the invention may be monospecific or may be converted to a multispecific construct by optionally joining additional subunits that bind specifically to a different DR5 epitope from the first and/or to a target other than DR5.

[00271] In one non-limiting embodiment, a NB agent comprises or essentially consists of six, eight or ten monovalent DR5 binding polypeptide subunits of the invention. Such a multimeric NB agent of the invention may be monospecific or may be converted to a multispecific construct by optionally joining additional subunits that bind specifically to a different DR5 epitope from the first and/or to a target other than DR5.

[00272] In one embodiment, such multimeric NB agents, whether monospecific or multispecific, provide certain advantages compared to a protein or polypeptide comprising or essentially consisting of a monomeric NB agent of the invention, In one embodiment, advantages include, but are not limited to, a much improved avidity for DR5, e.g., for human DR5. Some specific, but non-limiting examples of multimeric NB agents are the NB constructs of SEQ ID NO's: 6 to 22, 27-29, 31-33 and 88.

[00273] In one non-limiting aspect, a polypeptide of the invention comprises or essentially consists of at least one NB agent of the invention, optionally one or more further NB agents, and at least one other amino acid sequence (such as a protein or polypeptide) that confers at least one desired property to the NB agent of the invention and/or to the resulting fusion protein. Again, such fusion proteins may provide certain advantages compared to the corresponding monovalent NB agent of the invention. Some non-limiting examples of such amino acid sequences and of such fusion constructs will become clear from the further description herein.

[00274] In one embodiment, it is possible to combine two or more of the above aspects, e.g., to provide a trivalent bispecific construct comprising two NB agents of the invention and one other NB agent, and optionally one or more other amino acid

sequences. Further non-limiting examples of such constructs, as well as some constructs that are particularly preferred within the context of the present invention, will become clear from the further description herein.

[00275] In the above constructs, the one or more binding polypeptides against DR5 and/or other amino acid sequences may be operably linked to each other and/or suitably linked to each other via one or more linker sequences. Some suitable but non-limiting examples of such linkers will become clear from the further description herein.

[00276] In one specific aspect, the multivalent compound of the invention comprises at least three, four, five or more monovalent binding polypeptides (i.e., subunits) and has an IC_{50} less than 100 nM, preferably less than 10 nM, more preferably less than 1nM, even more preferably less than 100 pM, e.g., below 10 pM as measured, e.g., in Colo205 or Jurkat cell survival assay. Other cancer cell lines can be used for determining IC_{50}, e.g., such as mentioned in the Examples. Furthermore, possible cancer cell lines that may be used in cell survival assays include, but are not limited to, e.g., Jurkat, Molt4, Colo205, BxPC3, T24, Panc-1, M30, H226, H2122, H2052, and MiaPaCa-2.

[00277] In one embodiment, the multivalent compound of the invention are at least 10 fold, preferably at least 100 fold more potent in a tumor cell line than in a non-tumor cell line and measured in a cell survival assay such as Colo205 or Jurkat cell survival assay.

[00278] In one specific aspect of the invention, a NB agent of the invention or a compound, construct or polypeptide of the invention comprising at least one NB agent of the invention may have an increased half-life, compared to the corresponding amino acid sequence of the invention. Some non-limiting examples of such NB agents, compounds and polypeptides will become clear to the skilled person based on the further disclosure herein, and, e.g., comprise NB agent sequences or polypeptides of the invention that have been chemically modified to increase the half-life thereof (for example, by means of pegylation); amino acid sequences of the invention that comprise at least one additional binding site for binding to a serum protein (such as serum albumin. or polypeptides of the invention that comprise at least one NB agent of the invention that is linked to at least one moiety (and in particular at least one amino acid sequence) that increases the half-life of the NB agent of the invention. Examples of polypeptides of the invention that comprise such half-life extending moieties or amino acid sequences will become clear to the skilled person based on the further disclosure herein; and, e.g., include, without limitation, polypeptides in which the one or more NB agents of the invention are suitable linked to one or more serum proteins or fragments thereof (such as serum albumin or suitable fragments thereof) or to one or more binding units that can bind to serum proteins (such as, e.g., NB agents, camelid V_{HH} constructs or (single) domain antibodies that can bind to serum proteins such as serum albumin, serum immunoglobulins such as IgG, or

transferrine); polypeptides in which a NB agent of the invention is linked to an Fc portion (such as a human Fc) or a suitable part or fragment thereof; or polypeptides in which the one or more NB agents of the invention are suitable linked to one or more small proteins or peptides that can bind to serum proteins (such as, without limitation, the proteins and peptides described in WO 91/01743, WO 01/45746, WO 02/076489 and to WO 2006/122787, WO 2008/028977, WO 2008/043821, WO 2008/068280 and WO 2009/127691 filed by Ablynx N.V.

[00279] Again, as will be clear to the skilled person, such NB agents may contain one or more additional groups, residues, moieties or binding units, such as one or more further amino acid sequences and in particular one or more additional NB agents (i.e., not directed against DR5), so as to provide a di-, tri- or higher multispecific NB agent construct.

[00280] Generally, the NB agents of the invention (or compounds, constructs or polypeptides comprising the same) with increased half-life preferably have a half-life that is at least 1.5 times, preferably at least 2 times, such as at least 5 times, e.g., at least 10 times or more than 20 times, greater than the half-life of the corresponding amino acid sequence of the invention per se. For example, the NB agents, compounds, constructs or polypeptides of the invention with increased half-life may have a half-life that is increased with more than 1 hours, preferably more than 2 hours, more preferably more than 6 hours, such as more than 12 hours, or even more than 24, 48 or 72 hours, compared to the corresponding amino acid sequence of the invention per se.

[00281] In a preferred, but non-limiting aspect of the invention, such NB agents, compound, constructs or polypeptides of the invention exhibit a serum half-life in human of at least about 12 hours, preferably at least 24 hours, more preferably at least 48 hours, even more preferably at least 72 hours or more. For example, compounds or polypeptides of the invention may have a half-life of at least 5 days (such as about 5 to 10 days), preferably at least 9 days (such as about 9 to 14 days), more preferably at least about 10 days (such as about 10 to 15 days), or at least about 11 days (such as about 11 to 16 days), more preferably at least about 12 days (such as about 12 to 18 days or more), or more than 14 days (such as about 14 to 19 days).

[00282] In another one aspect of the invention, a polypeptide of the invention comprises one or more (such as two or preferably one) NB agents of the invention linked (optionally via one or more suitable linker sequences) to one or more (such as two and preferably one) amino acid sequences that allow the resulting polypeptide of the invention to cross the blood brain barrier. In particular, said one or more amino acid sequences that allow the resulting polypeptides of the invention to cross the blood brain barrier may be one or more (such as two and preferably one) NANOBODIES™, such as the

NANOBODIES™ described in WO 02/057445, of which FC44 (SEQ ID NO: 189 of WO 06/040153) and FC5 (SEQ ID NO: 190 of WO 06/040154) are particular examples.

[00283] In one embodiment, polypeptides comprising one or more NB agents of the invention are such that they:

a) bind to DR5 with a dissociation constant (K_D) of 10^{-5} to 10^{-12} moles/liter or less, and preferably 10^{-7} to 10^{-12} moles/liter or less and more preferably 10^{-8} to 10^{-12} moles/liter (i.e., with an association constant (K_A) of 10^5 to 10^{12} liter/ moles or more, and preferably 10^7 to 10^{12} liter/moles or more and more preferably 10^8 to 10^{12} liter/moles);

and/or such that they:

b) bind to DR5 with a k_{on}-rate of between 10^2 $M^{-1}s^{-1}$ to about 10^7 $M^{-1}s^{-1}$, preferably between 10^3 $M^{-1}s^{-1}$ and 10^7 $M^{-1}s^{-1}$, more preferably between 10^4 $M^{-1}s^{-1}$ and 10^7 $M^{-1}s^{-1}$, such as between 10^5 $M^{-1}s^{-1}$ and 10^7 $M^{-1}s^{-1}$;

and/or such that they:

c) bind to DR5 with a k_{off} rate between $1s^{-1}$ ($t_{1/2}$=0.69 s) and 10^{-6} s^{-1} (providing a near irreversible complex with a $t_{1/2}$ of multiple days), preferably between 10^{-2} s^{-1} and 10^{-6} s^{-1}, more preferably between 10^{-3} s^{-1} and 10^{-6} s^{-1}, such as between 10^{-4} s^{-1} and 10^{-6} s^{-1}.

[00284] In one embodiment, a polypeptide that contains only one amino acid sequence of the invention is such that it will bind to DR5 with an affinity less than 500 nM, preferably less than 200 nM, more preferably less than 10 nM, such as less than 500 pM. In this respect, it will be clear to the skilled person that a polypeptide that contains two or more NB agents of the invention may bind to DR5 with an increased avidity, compared to a polypeptide that contains only one amino acid sequence of the invention.

[00285] Other polypeptides according to this preferred aspect of the invention may, e.g., be chosen from the group consisting of amino acid sequences that have more than 80%, preferably more than 90%, more preferably more than 95%, such as at least 99% or more "sequence identity" with one or more of the amino acid sequences of SEQ ID NO's: 1-22, 26-40 and 87-88, in which the NB agents comprised within said amino acid sequences are preferably as further defined herein.

Nucleic acids, host cells and method for generating NB constructs of the invention

[00286] Another aspect of this invention relates to a nucleic acid that encodes a NB agent of the invention or a polypeptide of the invention comprising the same. Again, as generally described herein for the nucleic acids of the invention, such a nucleic acid may be in the form of a genetic construct, as provided herein.

[00287] In another aspect, the invention relates to host or host cell that expresses or that is capable of expressing a NB agent of the invention and/or a polypeptide of the invention comprising the same; and/or that contains a nucleic acid of the invention. Some preferred but non-limiting examples of such hosts or host cells will become clear from the further description herein.

[00288] Another aspect of the invention relates to a product or composition containing or comprising at least one NB agent of the invention, at least one polypeptide of the invention and/or at least one nucleic acid of the invention, and optionally one or more further components of such compositions known per se, i.e., depending on the intended use of the composition. Such a product or composition may, e.g., be a pharmaceutical composition (as described herein), a veterinary composition or a product or composition for diagnostic use (as also described herein). Some preferred but non-limiting examples of such products or compositions will become clear from the further description herein.

[00289] The invention further relates to methods for preparing or generating the NB agents, polypeptides, nucleic acids, host cells, products and compositions described herein. Some preferred but non-limiting examples of such methods will become clear from the further description herein.

[00290] The invention further relates to applications and uses of the NB agents, polypeptides, nucleic acids, host cells, products and compositions described herein, as well as to methods for the prevention and/or treatment for diseases and disorders associated with DR5. Particular non-limiting applications and uses will become clear from the further description herein.

[00291] Other aspects, embodiments, advantages and applications of the invention will also become clear from the further description hereinbelow.

[00292] Generally, it should be noted that the term "NB agent" as used herein in its broadest sense is not limited to a specific biological source or to a specific method of preparation. For example, as will be discussed in more detail below, the NB agents of the invention can generally be obtained by any of the techniques (1) to (8) mentioned on pages 61 and 62 of WO 08/020079, or any other suitable technique known per se. One preferred class of NB agents corresponds to the V_{HH} or V_H domains of naturally occurring heavy chain antibodies directed against DR5. As further described herein, V_{HH} sequences can generally be generated or obtained by suitably immunizing a species of Camelid with DR5 (i.e., so as to raise an immune response and/or heavy chain antibodies directed against DR5), by obtaining a suitable biological sample from said Camelid (such as a blood sample, serum sample or sample of B-cells), and by generating V_{HH} sequences directed against DR5, starting from said sample, using any suitable technique known per se. Such techniques will be clear to the skilled person and/or are further described herein.

[00293] Alternatively, such naturally occurring V_{HH} domains against DR5, can be obtained from naïve libraries of Camelid V_{HH} sequences, e.g., by screening such a library using DR5, or at least one part, fragment, antigenic determinant or epitope thereof using one or more screening techniques known per se. Such libraries and techniques are, e.g., described in WO 99/37681, WO 01/90190, WO 03/025020 and WO 03/035694. Alternatively, improved synthetic or semi-synthetic libraries derived from naïve V_{HH} libraries may be used, such as V_{HH} libraries obtained from naïve V_{HH} libraries by techniques such as random mutagenesis and/or CDR shuffling, as, e.g., described in WO 00/43507.

[00294] Thus, in another aspect, the invention relates to a method for generating NB agents that are directed against DR5. In one aspect, said method at least comprises the steps of:

a) providing a set, collection or library of NB agent sequences;

b) screening said set, collection or library of NB agent sequences for NB agent sequences that can bind to and/or have affinity for DR5;

and

c) isolating the amino acid sequence(s) that can bind to and/or have affinity for DR5.

[00295] In such a method, the set, collection or library of NB agent sequences may be a naïve set, collection or library of NB agent sequences; a synthetic or semi-synthetic set, collection or library of NB agent sequences; and/or a set, collection or library of NB agent sequences that have been subjected to affinity maturation.

[00296] In a particular aspect of this method, the set, collection or library of NB agent sequences may be an immune set, collection or library of NB agent sequences, and in particular an immune set, collection or library of V_{HH} sequences, that have been derived from a species of Camelid that has been suitably immunized with DR5 or with a suitable antigenic determinant based thereon or derived therefrom, such as an antigenic part, fragment, region, domain, loop or other epitope thereof. In one particular aspect, said antigenic determinant may be an extracellular part, region, domain, loop or other extracellular epitope(s).

[00297] In the above methods, the set, collection or library of V_{HH} sequences may be displayed on a phage, phagemid, ribosome or suitable micro-organism (such as yeast), such as to facilitate screening. Suitable methods, techniques and host organisms for displaying and screening (a set, collection or library of) sequences will be clear to the person skilled in the art, e.g., on the basis of the further disclosure herein. Reference is also made to WO 03/054016 and to the review by Hoogenboom in Nature Biotechnology, 23, 9, 1105-1116 (2005).

[00298] In one embodiment, the method for generating V_{HH} sequences comprises at least the steps of:

a) providing a collection or sample of cells derived from a species of Camelid that express immunoglobulin sequences;

b) screening said collection or sample of cells for (1) cells that express an immunoglobulin sequence that can bind to and/or have affinity for DR5; and (2) cells that express heavy chain antibodies, in which substeps (1) and (2) can be performed essentially as a single screening step or in any suitable order as two separate screening steps, so as to provide at least one cell that expresses a heavy chain antibody that can bind to and/or has affinity for DR5;

and

c) either (1) isolating from said cell the V_{HH} sequence present in said heavy chain antibody; or (2) isolating from said cell a nucleic acid sequence that encodes the V_{HH} sequence present in said heavy chain antibody, followed by expressing said V_{HH} domain.

[00299] In the method according to this aspect, the collection or sample of cells may, e.g., be a collection or sample of B-cells. Also, in this method, the sample of cells may be derived from a Camelid that has been suitably immunized with DR5 or a suitable antigenic determinant based thereon or derived therefrom, such as an antigenic part, fragment, region, domain, loop or other epitope thereof. In one particular aspect, said antigenic determinant may be an extracellular part, region, domain, loop or other extracellular epitope(s).

[00300] The above method may be performed in any suitable manner, as will be clear to the skilled person. Reference is, e.g., made to EP 0 542 810, WO 05/19824, WO 04/051268 and WO 04/106377. The screening of step b) is preferably performed using a flow cytometry technique such as FACS. For this, reference is, e.g., made to Lieby et al., Blood, Vol. 97, No. 12, 3820. See, e.g., the so-called "Nanoclone™" technique described in International application WO 06/079372 by Ablynx N.V.

[00301] In another aspect, the method for generating an amino acid sequence directed against DR5 may comprise at least the steps of:

a) providing a set, collection or library of nucleic acid sequences encoding heavy chain antibodies or V_{HH} sequences;

b) screening said set, collection or library of nucleic acid sequences for nucleic acid sequences that encode a heavy chain antibody or a V_{HH} sequence that can bind to and/or has affinity for DR5; and

c) isolating said nucleic acid sequence, followed by expressing the V_{HH} sequence present in said heavy chain antibody or by expressing said NB construct sequence, respectively.

[00302] In such a method, the set, collection or library of nucleic acid sequences encoding heavy chain antibodies or V_{HH} sequences may, e.g., be a set, collection or library of nucleic acid sequences encoding a naïve set, collection or library of heavy chain antibodies or V_{HH} sequences; a set, collection or library of nucleic acid sequences encoding a synthetic or semi-synthetic set, collection or library of V_{HH} sequences; and/or a set, collection or library of nucleic acid sequences encoding a set, collection or library of V_{HH} sequences that have been subjected to affinity maturation.

[00303] In one embodiment of this method, the set, collection or library of amino acid sequences may be an immune set, collection or library of nucleic acid sequences encoding heavy chain antibodies or V_{HH} sequences derived from a Camelid that has been suitably immunized with DR5 or with a suitable antigenic determinant based thereon or derived therefrom, such as an antigenic part, fragment, region, domain, loop or other epitope thereof. In one aspect, said antigenic determinant may be an extracellular part, region, domain, loop or other extracellular epitope(s).

[00304] In the above methods, the set, collection or library of nucleotide sequences may be displayed on a phage, phagemid, ribosome or suitable micro-organism (such as yeast), such as to facilitate screening. Suitable methods, techniques and host organisms for displaying and screening (a set, collection or library of) nucleotide sequences encoding amino acid sequences will be clear to the person skilled in the art, e.g., on the basis of the further disclosure herein. Reference is also made to WO 03/054016 and to Hoogenboom in Nature Biotechnology, 23, 9, 1105-1116 (2005).

[00305] In one embodiment, the screening step of the methods described herein can also be performed as a selection step. Accordingly the term "screening" as used in the present description can comprise selection, screening or any suitable combination of selection and/or screening techniques. Also, when a set, collection or library of sequences is used, it may contain any suitable number of sequences, such as 1, 2, 3 or about 5, 10, 50, 100, 500, 1000, 5000, 10^4, 10^5, 10^6, 10^7, 10^8 or more sequences.

[00306] In one embodiment, one or more or all of the sequences in the above set, collection or library of amino acid sequences may be obtained or defined by rational, or semi-empirical approaches such as computer modeling techniques or biostatics or data mining techniques.

[00307] Furthermore, such a set, collection or library can comprise one, two or more sequences that are variants from one another (e.g. with designed point mutations or with randomized positions), compromise multiple sequences derived from a diverse set of

naturally diversified sequences (e.g. an immune library)), or any other source of diverse sequences (as described, e.g., in Hoogenboom et al, Nat Biotechnol 23: 1105, 2005 and Binz et al, Nat Biotechnol 2005, 23: 1247). Such set, collection or library of sequences can be displayed on the surface of a phage particle, a ribosome, a bacterium, a yeast cell, a mammalian cell, and linked to the nucleotide sequence encoding the amino acid sequence within these carriers. This makes such set, collection or library amenable to selection procedures to isolate the desired amino acid sequences of the invention. More generally, when a sequence is displayed on a suitable host or host cell, it is also possible (and customary) to first isolate from said host or host cell a nucleotide sequence that encodes the desired sequence, and then to obtain the desired sequence by suitably expressing said nucleotide sequence in a suitable host organism. Again, this can be performed in any suitable manner known per se, as will be clear to the skilled person.

[00308] Yet another technique for obtaining V_{HH} sequences, V_H sequences, or some other variant of NB agent sequences directed against DR5 involves suitably immunizing a transgenic mammal that is capable of expressing heavy chain antibodies (i.e., so as to raise an immune response and/or heavy chain antibodies directed against DR5), obtaining a suitable biological sample from said transgenic mammal that contains (nucleic acid sequences encoding) said sequences (such as a blood sample, serum sample or sample of B-cells), and then generating NB agent sequences directed against DR5, starting from said sample, using any suitable technique known per se (such as any of the methods described herein or a hybridoma technique). For example, for this purpose, the heavy chain antibody-expressing mice and the further methods and techniques described in WO 02/085945, WO 04/049794 and WO 06/008548 and Janssen's et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2006 Oct 10;103(41): 15130-5 can be used. For example, such heavy chain antibody expressing mice can express heavy chain antibodies with any suitable (single) variable domain, such as (single) variable domains from natural sources (e.g. human (single) variable domains, Camelid (single) variable domains or shark (single) variable domains), as well as, e.g., synthetic or semi-synthetic (single) variable domains.

[00309] In one embodiment the invention relates to the NB agent sequences that are obtained by the above methods, or alternatively by a method that comprises the one of the above methods and in addition at least the steps of determining the nucleotide sequence or amino acid sequence of said NB agent sequence; and of expressing or synthesizing said NB agent sequence in a manner known per se, such as by expression in a suitable host cell or host organism or by chemical synthesis.

[00310] In one embodiment the invention provides a class of NB agents that comprises camelid V_{HH} constructs with an amino acid sequence that corresponds to the amino acid sequence of a naturally occurring llama V_{HH} domain, but that has been "humanized", i.e.,

by replacing one or more amino acid residues in the amino acid sequence of said naturally occurring V_{HH} sequence (and in particular in the framework sequences, but also optionally in one or more CDR) by one or more of the amino acid residues that occur at the corresponding position(s) in a V_H domain from a conventional four-chain antibody from a human being, e.g. as indicated above, and e.g., as further described on, and using the techniques mentioned on, page 63 of WO 08/020079. In one embodiment the invention provides a class of NB agents that comprises an amino acid sequence that corresponds to the amino acid sequence of a naturally occurring V_H domain, but that has been "camelized", i.e., by replacing one or more amino acid residues in the amino acid sequence of a naturally occurring V_H domain from a conventional four-chain antibody by one or more of the amino acid residues that occur at the corresponding position(s) in V_{HH} domain of a heavy chain antibody, e.g., as further described on, and using the techniques mentioned on, page 63 of WO 08/020079.

[00311] Other suitable methods and techniques for obtaining the NB agents of the invention (including polypeptides and/or nucleic acids encoding the same), starting from naturally occurring V_H sequences or V_{HH} sequences, will be clear to the skilled person, and may, e.g., include the techniques that are mentioned on page 64 of WO 08/020079.

[00312] As mentioned herein, NB agents may in particular be characterized by the presence of one or more "*Hallmark residues*" (as described in WO 2008/020079, pages 65-98) in one or more of the framework sequences.

[00313] In one embodiment NB agents may, e.g., be V_{HH} sequences or may be humanized or further humanized NB constructs. When the NB agent sequences are V_{HH} sequences, they may be suitably humanized. When the NB agents are partially humanized NB constructs, they may optionally be further suitably humanized. In the above NB agents, one or more of the further Hallmark residues are preferably as described (for example, when they are V_{HH} sequences or partially or fully humanized NB constructs).

[00314] The NB agents herein may, e.g., be V_{HH} sequences or may be humanized or humaneered. When the above NB agents sequences are V_{HH} sequences, they may be suitably humanized, as provided herein. When the NB agents are partially humanized, they may optionally be further suitably humanized, as described herein. One nonlimiting and exemplary method of humanization is provided in the examples, but other methods known in the art may be contemplated.

[00315] In one embodiment of the above NB agents, one or more of the (further) Hallmark residues are as described herein (for example, when they are camelid V_{HH} sequences or partially or fully humanized V_{HH} constructs).

[00316] In one non-limiting aspect, the invention relates to a NB agents as described above, in which the CDR sequences have at least 70% amino acid identity, preferably at least 80% amino acid identity, more preferably at least 90% amino acid identity, such as at least 95% amino acid identity or more or even essentially 100% amino acid identity with the CDR sequences of at least one of the amino acid sequences of SEQ ID NO's: 1-22, 26-40, 87-88, and 103-104. This degree of amino acid identity can, e.g., be determined by determining the degree of amino acid identity (in a manner described herein) between said NB agents and one or more of the sequences of SEQ ID NO's: 1-22, 26-40, 87-88, and 103-104, in which the amino acid residues that form the framework regions are disregarded. Such NB agents can be modified as further described herein.

[00317] As already mentioned herein, another preferred but non-limiting aspect of the invention relates to a NB agent with an amino acid sequence that is chosen from the group consisting of SEQ ID NO's: 1-22, 26-40, 87-88, and 103-104 or from the group consisting of from amino acid sequences that have more than 80%, preferably more than 90%, more preferably more than 95%, such as at least 99% or more sequence identity with at least one of the amino acid sequences of SEQ ID NO's: 1-22, 26-40, 87-88, and 103-104.

[00318] In particular embodiments of the above NB agents:

i) any amino acid substitution (when it is not a humanizing substitution as defined herein) is preferably, and compared to the corresponding amino acid sequence of SEQ ID NO's: 1-22, 26-40 and 87-88, a conservative amino acid substitution;

and/or:

ii) its amino acid sequence preferably contains either only amino acid substitutions, or otherwise preferably no more than 5, preferably no more than 3, and more preferably only 1 or 2 amino acid deletions or insertions, compared to the corresponding amino acid sequence of SEQ ID NO's: 1-22, 26-40 and 87-88;

and/or

iii) the CDR's may be CDR's that are derived by means of affinity maturation, e.g., starting from the CDR's of to the corresponding amino acid sequence of SEQ ID NO's: 1-22, 26-40 and 87-88.

[00319] Preferably, the CDR sequences and FR sequences in the NB agents of the invention are such that the NB agents of the invention (and polypeptides comprising the same):

a) bind to a DR5, e.g., human DR5, with a dissociation constant (K_D) of 10^{-5} to 10^{-12} moles/liter or less, and preferably 10^{-7} to 10^{-12} moles/liter or less and more preferably 10^{-8} to 10^{-12} moles/liter (i.e., with an association constant (K_A) of 10^5 to 10^{12} liter/ moles or more, and preferably 10^7 to 10^{12} liter/moles or more and more preferably 10^8 to 10^{12} liter/moles);

and/or such that they:

b) bind to a DR5, e.g., human DR5, with a k_{on}-rate of between 10^2 $M^{-1}s^{-1}$ to about 10^7 $M^{-1}s^{-1}$, preferably between 10^3 $M^{-1}s^{-1}$ and 10^7 $M^{-1}s^{-1}$, more preferably between 10^4 $M^{-1}s^{-1}$ and 10^7 $M^{-1}s^{-1}$, such as between 10^5 $M^{-1}s^{-1}$ and 10^7 $M^{-1}s^{-1}$;

and/or such that they:

c) bind to a DR5, e.g., human DR5, with a k_{off} rate between $1s^{-1}$ ($t_{1/2}$=0.69 s) and 10^{-6} s^{-1} (providing a near irreversible complex with a $t_{1/2}$ of multiple days), preferably between 10^{-2} s^{-1} and 10^{-6} s^{-1}, more preferably between 10^{-3} s^{-1} and 10^{-6} s^{-1}, such as between 10^{-4} s^{-1} and 10^{-6} s^{-1}.

[00320] In one embodiment, CDR sequences and FR sequences present in the NB agents of the invention are such that the NB agents of the invention will bind to a DR5, e.g., human DR5, with an affinity less than 500 nM, preferably less than 200 nM, more preferably less than 10 nM, such as less than 500 pM.

[00321] In one non-limiting aspect of the invention, a NB agent may be as provided herein, but with the proviso that it has at least "one amino acid difference" in at least one of the framework regions compared to the corresponding framework region of a naturally occurring human V_H domain, and in particular compared to the corresponding framework region of DP-47. More specifically, according to one non-limiting aspect of the invention, a NB agent may be as provided herein, but with the proviso that it has at least "one amino acid difference" at at least one of the Hallmark residues (including those at positions 108, 103 and/or 45) compared to the corresponding framework region of a naturally occurring human V_H domain, and in particular compared to the corresponding framework region of DP-47. Usually, a NB agent will have at least one such amino acid difference with a naturally occurring V_H domain in at least one of FR2 and/or FR4, and in particular at at least one of the Hallmark residues in FR2 and/or FR4 (again, including those at positions 108, 103 and/or 45).

[00322] In one embodiment, a humanized NB agent of the invention may be as provided herein, but with the proviso that it has at least "one amino acid difference" in at least one of the framework regions compared to the corresponding framework region of a naturally occurring V_{HH} domain. More specifically, according to one non-limiting aspect of the invention, a humanized NB agent may be as provided herein, but with the proviso that it has at least "one amino acid difference" at at least one of the Hallmark residues (including those at positions 108, 103 and/or 45) compared to the corresponding framework region of a naturally occurring V_{HH} domain. Usually, a humanized NB agent will have at least one such amino acid difference with a naturally occurring V_{HH} domain in at least one of FR2 and/or FR4, and in particular at at least one of the Hallmark residues in FR2 and/or FR4 (again, including those at positions 108, 103 and/or 45).

[00323] As will be clear from the disclosure herein, it is within the scope of the invention to use natural or synthetic analogs, mutants, variants, alleles, homologs and orthologs (herein collectively referred to as "analogs") of the NB agents of the invention as provided herein, and in particular analogs of the NB constructs of SEQ ID NO's 1-22, 26-40, 87-88, and 103-104 and of SEQ ID NOS: 96-99. Thus, according to one aspect of the invention, the term "NB agents of the invention" and the term "NB constructs of the invention" in its broadest sense also covers such analogs.

[00324] Generally, in such analogs, one or more amino acid residues may have been replaced, deleted and/or added, compared to the NB agents of the invention as provided herein. Such substitutions, insertions or deletions may be made in one or more of the framework regions and/or in one or more of the CDR's. When such substitutions, insertions or deletions are made in one or more of the framework regions, they may be made at one or more of the Hallmark residues and/or at one or more of the other positions in the framework residues, although substitutions, insertions or deletions at the Hallmark residues are generally less preferred (unless these are suitable humanizing substitutions as described herein).

[00325] By means of non-limiting examples, a substitution may, e.g., be a conservative substitution (as described herein) and/or an amino acid residue may be replaced by another amino acid residue that naturally occurs at the same position in another V_{HH} domain (see e.g., WO 2008/020079 for non-limiting examples of such substitutions), although the invention is generally not limited thereto. Thus, any one or more substitutions, deletions or insertions, or any combination thereof, that either improve the properties of the NB agents of the invention or that at least do not detract too much from the desired properties or from the balance or combination of desired properties of the NB agents of the invention (i.e., to the extent that the NB agent is no longer suited for its intended use) are included within the scope of the invention. A skilled person will generally be able to determine and select suitable substitutions, deletions or insertions, or suitable combinations of thereof, based on the disclosure herein and optionally after a limited degree of routine experimentation, which may, e.g., involve introducing a limited number of possible substitutions and determining their influence on the properties of the NB agents thus obtained.

[00326] In one aspect, depending on the host organism used to express the NB agent (i.e., a polynucleotide or polypeptide of the invention), such deletions and/or substitutions may be designed in such a way that one or more sites for post-translational modification (such as one or more glycosylation sites) are removed, as will be within the ability of the person skilled in the art. Alternatively, substitutions or insertions may be designed so as to

introduce one or more sites for attachment of functional groups (as described herein), e.g., to allow site-specific pegylation (again as described herein).

[00327] As provided in WO 2008/020079 regarding possible amino acid substitutions and as presented above, some amino acid residues in the framework regions are more conserved than others. In one aspect, although the invention in its broadest sense is not limited thereto, any substitutions, deletions or insertions are preferably made at positions that are less conserved. In one nonlimiting aspect, amino acid substitutions are preferred over amino acid deletions or insertions.

[00328] In one nonlimiting aspect, the analogs are such that they can bind to DR5 with an affinity (suitably measured and/or expressed as a K_D-value (actual or apparent), a K_A-value (actual or apparent), a k_{on}-rate and/or a k_{off}-rate, or alternatively as an IC_{50} value, as further described herein) that is as provided herein for the NB agents of the invention.

[00329] In one nonlimiting aspect, the analogs are such that they retain the favorable properties of the NB agents, as described herein.

[00330] In one embodiment, the analogs have a degree of sequence identity of at least 70%, preferably at least 80%, more preferably at least 90%, such as at least 95% or 99% or more; and/or preferably have at most 20, preferably at most 10, even more preferably at most 5, such as 4, 3, 2 or only 1 amino acid difference, with one of the NB constructs of SEQ ID NOs: 1-22, 26-40, 87-88, and 103-104.

[00331] In a nonlimiting aspect, the framework sequences and CDR's of the analogs will have (a) a Q at position 108; and/or (b) a charged amino acid or a cysteine residue at position 45 and preferably an E at position 44, and more preferably E at position 44 and R at position 45; and/or (c) P, R or S at position 103.

[00332] In one nonlimiting aspect, one class of analogs of the NB agents of the invention comprise NB agents that have been humanized (i.e., compared to the sequence of a naturally occurring NB agents of the invention). As mentioned in the background art cited herein, such humanization generally involves replacing one or more amino acid residues in the sequence of a naturally occurring V_{HH} with the amino acid residues that occur at the same position in a human V_H domain, such as a human V_H3 domain. Examples of possible humanizing substitutions or combinations of humanizing substitutions will be clear to the skilled person, e.g., from the Tables herein, from the possible humanizing substitutions mentioned in the background art cited herein, and/or from a comparison between the sequence of a NB agent and the sequence of a naturally occurring human V_H domain.

[00333] In one nonlimiting aspect, the humanizing substitutions are chosen such that the resulting humanized NB agents still retain the favorable properties of NB agents as provided herein, and further such that they are as described for analogs in the preceding

paragraphs. A skilled person will generally be able to determine and select suitable humanizing substitutions or suitable combinations of humanizing substitutions, based on the disclosure herein and optionally after a limited degree of routine experimentation, which may, e.g., involve introducing a limited number of possible humanizing substitutions and determining their influence on the properties of the NB agents thus obtained.

[00334] In one nonlimiting aspect, as a result of humanization, the NB agents of the invention may become more "human-like", while still retaining the favorable properties of the NB agents of the invention as described herein. As a result, such humanized NB agents may have several advantages, such as a reduced immunogenicity, compared to the corresponding naturally occurring V_{HH} domains. Again, based on the disclosure herein and optionally after a limited degree of routine experimentation, the skilled person will be able to select humanizing substitutions or suitable combinations of humanizing substitutions which optimize or achieve a desired or suitable balance between the favorable properties provided by the humanizing substitutions on the one hand and the favorable properties of naturally occurring V_{HH} domains on the other hand.

[00335] The NB agents of the invention may be suitably humanized at any framework residue(s), such as at one or more Hallmark residues or at one or more other framework residues (i.e., non-Hallmark residues) or any suitable combination thereof. One preferred humanizing substitution for NB agents of the "P,R,S-103 group" or the "KERE group" is Q108 into L108. NB agents of the "GLEW class" may also be humanized by a Q108 into L108 substitution, provided at least one of the other Hallmark residues contains a camelid (camelizing) substitution. For example, as mentioned herein, one particularly preferred class of humanized NB agents has GLEW or a GLEW-like sequence at positions 44-47; P, R or S (and in particular R) at position 103, and an L at position 108.

[00336] The humanized and other analogs, and nucleic acid sequences encoding the same, can be provided in any manner known per se, e.g., using one or more of the techniques mentioned on pages 103 and 104 of WO 08/020079.

[00337] In one nonlimiting aspect, one class of analogs of the NB agents of the invention comprise NB agents that have been humanized (i.e., compared to the sequence of a naturally occurring NB agent of the invention). As mentioned in the background art cited herein, such humanization generally involves replacing one or more amino acid residues in the sequence of a naturally occurring V_{HH} with the amino acid residues that occur at the same position in a human V_H domain, such as a human V_H3 domain. Examples of possible humanizing substitutions or combinations of humanizing substitutions will be clear to the skilled person, e.g., from the Tables herein, from the possible humanizing substitutions mentioned in the background art cited herein, and/or

from a comparison between the sequence of a NB agent and the sequence of a naturally occurring human V_H domain.

[00338] In one nonlimiting aspect, the humanizing substitutions are chosen such that the resulting humanized NB agents still retain the favorable properties of NB agents as provided herein, and more preferably such that they are as described for analogs in the preceding paragraphs. A skilled person will generally be able to determine and select suitable humanizing substitutions or suitable combinations of humanizing substitutions, based on the disclosure herein and optionally after a limited degree of routine experimentation, which may, e.g., involve introducing a limited number of possible humanizing substitutions and determining their influence on the properties of the NB agents thus obtained.

[00339] Generally, as a result of humanization, the NB agents of the invention may become more "human-like", while still retaining the favorable properties of the NB agents of the invention as described herein. As a result, such humanized NB agents may have several advantages, such as a reduced immunogenicity, compared to the corresponding naturally occurring V_{HH} domains. Again, based on the disclosure herein and optionally after a limited degree of routine experimentation, the skilled person will be able to select humanizing substitutions or suitable combinations of humanizing substitutions which optimize or achieve a desired or suitable balance between the favorable properties provided by the humanizing substitutions on the one hand and the favorable properties of naturally occurring V_{HH} domains on the other hand.

[00340] The NB agents of the invention may be suitably humanized at any framework residue(s), such as at one or more Hallmark residues (as defined in WO 2008/020079) or at one or more other framework residues (i.e., non-Hallmark residues) or any suitable combination thereof.

[00341] The humanized and other analogs, and nucleic acid sequences encoding the same, can be provided in any manner known per se. For example, the analogs can be obtained by providing a nucleic acid that encodes a naturally occurring V_{HH} domain, changing the codons for the one or more amino acid residues that are to be substituted into the codons for the corresponding desired amino acid residues (e.g. by site-directed mutagenesis or by PCR using suitable mismatch primers), expressing the nucleic acid/nucleotide sequence thus obtained in a suitable host or expression system; and optionally isolating and/or purifying the analog thus obtained to provide said analog in essentially isolated form (e.g. as further described herein).

[00342] This can generally be performed using methods and techniques known per se, which will be clear to the skilled person, e.g., from the handbooks and references cited herein, the background art cited herein and/or from the further description herein.

Alternatively, a nucleic acid encoding the desired analog can be synthesized in a manner known per se (for example using an automated apparatus for synthesizing nucleic acid sequences with a predefined amino acid sequence) and can then be expressed as described herein. Yet another technique may involve combining one or more naturally occurring and/or synthetic nucleic acid sequences each encoding a part of the desired analog, and then expressing the combined nucleic acid sequence as described herein. Also, the analogs can be provided using chemical synthesis of the pertinent amino acid sequence using techniques for peptide synthesis known per se, such as those mentioned herein.

[00343] In this respect, it will be also be clear to the skilled person that the NB agents of the invention (including their analogs) can be designed and/or prepared starting from human V_H sequences (i.e., amino acid sequences or the corresponding nucleotide sequences), such as, e.g., from human V_H3 sequences such as DP-47, DP-51 or DP-29, i.e., by introducing one or more camelizing substitutions (i.e., changing one or more amino acid residues in the amino acid sequence of said human V_H domain into the amino acid residues that occur at the corresponding position in a V_{HH} domain), so as to provide the sequence of a NB agent of the invention and/or so as to confer the favorable properties of a NB agent to the sequence thus obtained. Again, this can generally be performed using the various methods and techniques referred to in the previous paragraph, using an amino acid sequence and/or nucleotide sequence for a human V_H domain as a starting point.

[00344] As mentioned there, it will be clear to the skilled person that the NB agents of the invention (including their analogs) can be designed and/or prepared starting from human V_H sequences (i.e., amino acid sequences or the corresponding nucleotide sequences), such as, e.g., from human V_H3 sequences such as DP-47, DP-51 or DP-29, i.e., by introducing one or more camelizing substitutions (i.e., changing one or more amino acid residues in the amino acid sequence of said human V_H domain into the amino acid residues that occur at the corresponding position in a V_{HH} domain), so as to provide the sequence of a NB agent of the invention and/or so as to confer the favorable properties of a NB agents to the sequence thus obtained. Again, this can generally be performed using the various methods and techniques referred to in the previous paragraph, using an amino acid sequence and/or nucleotide sequence for a human V_H domain as a starting point.

[00345] Some non-limiting camelizing substitutions can be derived from WO 2008/020079. It will be clear that camelizing substitutions at one or more of the Hallmark residues will generally have a greater influence on the desired properties than substitutions at one or more of the other amino acid positions, although both and any suitable combination thereof are included within the scope of the invention. For example, it is possible to introduce one or more camelizing substitutions that already confer at least

some the desired properties, and then to introduce further camelizing substitutions that either further improve said properties and/or confer additional favorable properties. Again, the skilled person will generally be able to determine and select suitable camelizing substitutions or suitable combinations of camelizing substitutions, based on the disclosure herein and optionally after a limited degree of routine experimentation, which may, e.g., involve introducing a limited number of possible camelizing substitutions and determining whether the favorable properties of NB agents are obtained or improved (i.e., compared to the original V_H domain).

[00346] In one nonlimiting aspect, such camelizing substitutions are such that the resulting an amino acid sequence at least contains (a) a Q at position 108; and/or (b) a charged amino acid or a cysteine residue at position 45 and preferably also an E at position 44, and more preferably E at position 44 and R at position 45; and/or (c) P, R or S at position 103; and optionally one or more further camelizing substitutions. In one nonlimiting aspect, the camelizing substitutions are such that they result in a NB agent of the invention and/or in an analog thereof, such as in a humanized analog and/or preferably in an analog that is as provided in the preceding paragraphs.

[00347] As will also be clear from the disclosure herein, it is also within the scope of the invention to use parts or fragments, or combinations of two or more parts or fragments, of the NB agents of the invention as provided herein, and in particular parts or fragments of the NB agents of SEQ ID NO's: 1-22, 26-40, 87-88, and 103-104 and of SEQ ID NOS: 96-99. Thus, according to one aspect of the invention, the term "NB agents of the invention" in its broadest sense also covers such parts or fragments.

[00348] Generally, such parts or fragments of the NB agents of the invention (including analogs thereof) have amino acid sequences in which, compared to the amino acid sequence of the corresponding full length NB agent of the invention (or analog thereof), one or more of the amino acid residues at the N-terminal end, one or more amino acid residues at the C-terminal end, one or more contiguous internal amino acid residues, or any combination thereof, have been deleted and/or removed.

[00349] The parts or fragments are preferably such that they can bind to a DR5, e.g., human DR5 with an affinity (suitably measured and/or expressed as a K_D-value (actual or apparent), a K_A-value (actual or apparent), a k_{on}-rate and/or a k_{off}-rate, or alternatively as an IC_{50} value, as further described herein) that is as provided herein for the NB agents of the invention.

[00350] Any part or fragment is preferably such that it comprises at least 10 contiguous amino acid residues, preferably at least 20 contiguous amino acid residues, more preferably at least 30 contiguous amino acid residues, such as at least 40 contiguous

amino acid residues, of the amino acid sequence of the corresponding full length NB agent of the invention.

[00351] Also, any part or fragment is such preferably that it comprises at least one of CDR1, CDR2 and/or CDR3 or at least part thereof (and in particular at least CDR3 or at least part thereof). More preferably, any part or fragment is such that it comprises at least one of the CDR's (and preferably at least CDR3 or part thereof) and at least one other CDR (i.e., CDR1 or CDR2) or at least part thereof, preferably connected by suitable framework sequence(s) or at least part thereof. More preferably, any part or fragment is such that it comprises at least one of the CDR's (and preferably at least CDR3 or part thereof) and at least part of the two remaining CDR's, again preferably connected by suitable framework sequence(s) or at least part thereof.

[00352] According to another particularly preferred, but non-limiting aspect, such a part or fragment comprises at least CDR3, such as FR3, CDR3 and FR4 of the corresponding full length NB agent of the invention, i.e., as, e.g., described in the International application WO 03/050531 (Lasters et al.).

[00353] As already mentioned herein, it is also possible to combine two or more of such parts or fragments (i.e., from the same or different NB agents of the invention), i.e., to provide an analog and/or to provide further parts or fragments of a NB agent of the invention. It is, e.g., also possible to combine one or more parts or fragments of a NB agent of the invention with one or more parts or fragments of a human V_H domain.

[00354] According to one aspect, the parts or fragments have a degree of sequence identity of at least 50%, at least 60%, at least 70%, at least 80%, and/or at least 90%, 95% or 99% or more with one of the NB agents of SEQ ID NOs 1-22, 26-40, 87-88, and 103-104, and with SEQ ID NOs: 96-99.

[00355] The parts and fragments, and nucleic acid sequences encoding the same, can be provided and optionally combined in any manner known per se. For example, such parts or fragments can be obtained by inserting a stop codon in a nucleic acid that encodes a full-sized NB agent of the invention, and then expressing the nucleic acid thus obtained in a manner known per se (e.g. as described herein). Alternatively, nucleic acids encoding such parts or fragments can be obtained by suitably restricting a nucleic acid that encodes a full-sized NB agent of the invention or by synthesizing such a nucleic acid in a manner known per se. Parts or fragments may also be provided using techniques for peptide synthesis known per se.

[00356] The invention in its broadest sense also comprises derivatives of the NB agents of the invention. Such derivatives can generally be obtained by modification, and in particular by chemical and/or biological (e.g. enzymatic) modification, of the NB agents of

the invention and/or of one or more of the amino acid residues that form the NB agents of the invention.

[00357] Examples of such modifications, as well as examples of amino acid residues within the NB agent sequence that can be modified in such a manner (i.e., either on the polypeptide backbone but preferably on a side chain), methods and techniques that can be used to introduce such modifications and the potential uses and advantages of such modifications will be clear to the skilled person.

[00358] In one nonlimiting aspect, such a modification involves the introduction (e.g. by covalent linking or in an other suitable manner) of one or more functional groups, residues or moieties into or onto the NB agent of the invention, and in particular of one or more functional groups, residues or moieties that confer one or more desired properties or functionalities to the NB agent of the invention. Example of such functional groups will be clear to the skilled person.

[00359] In one nonlimiting aspect, such modification comprise the introduction (e.g. by covalent binding or in any other suitable manner) of one or more functional groups that increase the half-life, the solubility and/or the absorption of the NB agent of the invention, that reduce the immunogenicity and/or the toxicity of the NB agent of the invention, that eliminate or attenuate any undesirable side effects of the NB agent of the invention, and/or that confer other advantageous properties to and/or reduce the undesired properties of the NB agents and/or polypeptides of the invention; or any combination of two or more of the foregoing. Examples of such functional groups and of techniques for introducing them will be clear to the skilled person, and can generally comprise all functional groups and techniques mentioned in the general background art cited hereinabove as well as the functional groups and techniques known per se for the modification of pharmaceutical proteins, and in particular for the modification of antibodies or antibody fragments (including ScFv's and single domain antibodies), for which reference is, e.g., made to Remington's Pharmaceutical Sciences, 16th ed., Mack Publishing Co., Easton, PA (1980). Such functional groups may, e.g., be linked directly (for example covalently) to a NB agent of the invention, or optionally via a suitable linker or spacer, as will again be clear to the skilled person.

[00360] One of the most widely used techniques for increasing the half-life and/or reducing the immunogenicity of pharmaceutical proteins comprises attachment of a suitable pharmacologically acceptable polymer, such as poly(ethylene glycol) (PEG) or derivatives thereof (such as methoxypoly(ethylene glycol) or mPEG). Generally, any suitable form of pegylation can be used, such as the pegylation used in the art for antibodies and antibody fragments (including but not limited to (single) domain antibodies and ScFv's); See, e.g., Chapman, Nat. Biotechnol., 54, 531-545 (2002); by Veronese and

Harris, Adv. Drug Deliv. Rev. 54, 453-456 (2003), by Harris and Chess, Nat. Rev. Drug. Discov., 2, (2003) and in WO 04/060965. Various reagents for pegylation of proteins are also commercially available, e.g., from Nektar Therapeutics, USA.

[00361] In one embodiment, site-directed pegylation is used, in particular via a cysteine-residue (see, e.g., Yang et al., Protein Engineering, 16, 10, 761-770 (2003). In various embodiments, for this purpose, PEG is attached to a cysteine residue that naturally occurs in a NB agent of the invention. A NB agent of the invention may be modified so as to suitably introduce one or more cysteine residues for attachment of PEG, or an amino acid sequence comprising one or more cysteine residues for attachment of PEG may be fused to the N- and/or C-terminus of a NB agent of the invention, all using techniques of protein engineering known per se to the skilled person.

[00362] In one embodiment, for the NB agents and proteins of the invention, a PEG is used with a molecular weight of more than 5000, such as more than 10,000 and less than 200,000, such as less than 100,000;, e.g., in the range of 20,000-80,000.

[00363] In one embodiment, modification comprises N-linked or O-linked glycosylation, usually as part of co-translational and/or post-translational modification, depending on the host cell used for expressing the NB agent or polypeptide of the invention.

[00364] In one embodiment, modification may comprise the introduction of one or more detectable labels or other signal-generating groups or moieties, depending on the intended use of the labeled NB agent. Suitable labels and techniques for attaching, using and detecting them will be clear to the skilled person, and, e.g., include, but are not limited to, the fluorescent labels, phosphorescent labels, chemiluminescent labels, bioluminescent labels, radio-isotopes, metals, metal chelates, metallic cations, chromophores and enzymes, such as those mentioned on page 109 of WO 08/020079. Other suitable labels will be clear to the skilled person, and, e.g., include moieties that can be detected using NMR or ESR spectroscopy.

[00365] Such labeled NB agents and polypeptides of the invention may, e.g., be used for in vitro, in vivo or in situ assays (including immunoassays known per se such as ELISA, RIA, EIA and other "sandwich assays", etc.) as well as in vivo diagnostic and imaging purposes, depending on the choice of the specific label.

[00366] In one embodiment, modification may involve the introduction of a chelating group, e.g., to chelate one of the metals or metallic cations referred to above. Suitable chelating groups, e.g., include, without limitation, diethyl-enetriaminepentaacetic acid (DTPA) or ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA).

[00367] In one embodiment, modification may comprise the introduction of a functional group that is one part of a specific binding pair, such as the biotin-(strept)avidin binding pair. Such a functional group may be used to link the NB agent of the invention to another

protein, polypeptide or chemical compound that is bound to the other half of the binding pair, i.e., through formation of the binding pair. For example, a NB agent of the invention may be conjugated to biotin, and linked to another protein, polypeptide, compound or carrier conjugated to avidin or streptavidin. For example, such a conjugated NB agent may be used as a reporter, e.g., in a diagnostic system where a detectable signal-producing agent is conjugated to avidin or streptavidin. Such binding pairs may, e.g., also be used to bind the NB agent of the invention to a carrier, including carriers suitable for pharmaceutical purposes. One non-limiting example are the liposomal formulations described by Cao and Suresh, Journal of Drug Targeting, 8, 4, 257 (2000). Such binding pairs may also be used to link a therapeutically active agent to the inventive NB agent.

[00368] For some applications, in particular for those applications in which it is intended to kill a cell that expresses the target against which the NB agents of the invention are directed (e.g. in the treatment of cancer), or to reduce or slow the growth and/or proliferation of such a cell, the NB agents of the invention may also be linked to a toxin or to a (cyto)toxic residue or moiety. Examples of toxic moieties, compounds or residues which can be linked to a NB agent of the invention to provide –, e.g., – a cytotoxic compound will be clear to the skilled person and can, e.g., be found in the art references cited above and/or in the further description herein. One example is the so-called ADEPT™ technology described in WO 03/055527.

[00369] Other potential chemical and enzymatic modifications will be clear to the skilled person and are within the scope of the invention. Such modifications may also be introduced for research purposes (e.g. to study function-activity relationships). Reference is, e.g., made to Lundblad and Bradshaw, Biotechnol. Appl. Biochem., 26, 143-151 (1997).

[00370] In one nonlimiting aspect, the derivatives are such that they bind to a DR5, e.g., human DR5, with an affinity (suitably measured and/or expressed as a K_D-value (actual or apparent), a K_A-value (actual or apparent), a k_{on}-rate and/or a k_{off}-rate, or alternatively as an IC_{50} value, as further described herein) that is as provided herein for the NB agents of the invention.

[00371] As mentioned herein, the invention also relates to proteins or polypeptides that essentially consist of or comprise at least one NB agent of the invention. By "essentially consist of" is meant that the amino acid sequence of the polypeptide of the invention either is exactly the same as the amino acid sequence of a NB agent of the invention or corresponds to the amino acid sequence of a NB agent of the invention which has a limited number of amino acid residues, such as 1-20 amino acid residues, e.g., 1-10 amino acid residues and preferably 1-6 amino acid residues, such as 1, 2, 3, 4, 5 or 6 amino acid residues, added at the amino terminal end, at the carboxy terminal end, or at both the

amino terminal end and the carboxy terminal end of the amino acid sequence of the NB agent.

[00372] Said amino acid residues may or may not change, alter or otherwise appreciably influence the (biological) properties of the NB agent, and may or may not add further functionality to the NB agent. For example, such amino acid residues:

a) can comprise an N-terminal Met residue, e.g., as result of expression in a heterologous host cell or host organism; or

b) may form a signal sequence or leader sequence that directs secretion of the NB agent from a host cell upon synthesis. Suitable secretory leader peptides will be clear to the skilled person, and may be as further described herein. Usually, such a leader sequence will be linked to the N-terminus of the NB agent, although the invention in its broadest sense is not limited thereto; or

c) may form a sequence or signal that allows the NB agent to be directed towards and/or to penetrate or enter into specific organs, tissues, cells, or parts or compartments of cells, and/or that allows the NB agent to penetrate or cross a biological barrier such as a cell membrane, a cell layer such as a layer of epithelial cells, a tumor including solid tumors, or the blood-brain-barrier. Examples of such amino acid sequences will be clear to the skilled person and include those mentioned in paragraph c) on page 112 of WO 08/020079; or

d) may form a "tag", e.g., an amino acid sequence or residue that allows or facilitates the purification of the NB agent, e.g., using affinity techniques directed against said sequence or residue. Thereafter, said sequence or residue may be removed (e.g. by chemical or enzymatic cleavage) to provide the NB agent sequence (for this purpose, the tag may optionally be linked to the NB agent sequence via a cleavable linker sequence or contain a cleavable motif). Some non-limiting examples of such residues are one or more of each of a cMyc tag (SEQ ID NO: 91), multiple histidine residues such as the Hisx6 tag (SEQ ID NO: 92), or a combination of a cMyc tag and the Hisx6 tag (SEQ ID NO: 93 or SEQ ID NO: 94), PEGylation substrate tag (SEQ ID NO: 95), glutathione residues and other myc-tag (see, e.g., SEQ ID NO: 31 of WO 06/12282); or

e) may be one or more amino acid residues that have been functionalized and/or that can serve as a site for attachment of functional groups. Suitable amino acid residues and functional groups will be clear to the skilled person and include, but are not limited to, the amino acid residues and functional groups mentioned herein for the derivatives of the NB agents of the invention.

[00373] According to one aspect, a polypeptide of the invention comprises a NB agent of the invention that is fused at its amino terminal end, at its carboxy terminal end, or both at its amino terminal end and at its carboxy terminal end, to at least one further amino acid

sequence, i.e., so as to provide a fusion protein comprising said NB agent of the invention and the one or more further amino acid sequences. Such a fusion is referred to herein as a "NB agent fusion".

[00374] The one or more further amino acid sequence may be any suitable and/or desired amino acid sequences. The further amino acid sequences may or may not change, alter or otherwise influence the (biological) properties of the NB agent, and may or may not add further functionality to the NB agent or the polypeptide of the invention. Preferably, the further amino acid sequence is such that it confers one or more desired properties or functionalities to the NB agent or the polypeptide of the invention.

[00375] For example, the further amino acid sequence may also provide a second binding site, which binding site may be directed against any desired protein, polypeptide, antigen, antigenic determinant or epitope (including but not limited to the same protein, polypeptide, antigen, antigenic determinant or epitope against which the NB agent of the invention is directed, or a different protein, polypeptide, antigen, antigenic determinant or epitope).

[00376] Example of such amino acid sequences will be clear to the skilled person, and may generally comprise all amino acid sequences that are used in peptide fusions based on conventional antibodies and fragments thereof (including but not limited to ScFv's and single domain antibodies). Reference is, e.g., made to the review by Holliger and Hudson, Nature Biotechnology, 23, 9, 1126-1136 (2005).

[00377] In one nonlimiting aspect, such an amino acid sequence is an amino acid sequence that increases the half-life, the solubility, or the absorption, reduces the immunogenicity or the toxicity, eliminates or attenuates undesirable side effects, and/or confers other advantageous properties to and/or reduces the undesired properties of the polypeptides of the invention, compared to the NB agent of the invention per se. Some non-limiting examples of such amino acid sequences are serum proteins, such as human serum albumin (see, e.g., WO 00/27435) or haptenic molecules (for example haptens that are recognized by circulating antibodies, see, e.g., WO 98/22141).

[00378] In particular, it has been described in the art that linking fragments of immunoglobulins (such as V_H domains) to serum albumin or to fragments thereof can be used to increase the half-life. Reference is made, e.g., to WO 00/27435 and WO 01/077137. According to the invention, a NB agent of the invention is preferably either directly linked to serum albumin (or to a suitable fragment thereof) or via a suitable linker, and in particular via a suitable peptide linked so that the polypeptide of the invention can be expressed as a genetic fusion (protein). According to one specific aspect, the NB agent of the invention may be linked to a fragment of serum albumin that at least comprises the

domain III of serum albumin or part thereof. Reference is, e.g., made to WO 07/112940 of Ablynx N.V.

[00379] Alternatively, the further amino acid sequence may provide a second binding site or binding unit that is directed against a serum protein (such as, e.g., human serum albumin or another serum protein such as IgG), so as to provide increased half-life in serum. Such amino acid sequences, e.g., include the NB agent described below, as well as the small peptides and binding proteins described in WO 91/01743, WO 01/45746 and WO 02/076489 and the dAb's described in WO 03/002609 and WO 04/003019. Reference is also made to Harmsen et al., Vaccine, 23 (41); 4926-42, 2005, as well as to EP 0 368 684, and to WO 2006/122787, WO 2008/028977, WO 2008/043821, WO 2008/068280 and WO 2009/127691 by Ablynx N.V.

[00380] Such amino acid sequences may in particular be directed against serum albumin (and more in particular human serum albumin) and/or against IgG (and more in particular human IgG). For example, such amino acid sequences may be amino acid sequences that are directed against (human) serum albumin and amino acid sequences that can bind to amino acid residues on (human) serum albumin that are not involved in binding of serum albumin to FcRn (see, e.g., WO 06/0122787) and/or amino acid sequences that are capable of binding to amino acid residues on serum albumin that do not form part of domain III of serum albumin (see again, e.g., WO 06/0122787); amino acid sequences that have or can provide an increased half-life (see, e.g., WO 08/028977 by Ablynx N.V); amino acid sequences against human serum albumin that are cross-reactive with serum albumin from at least one species of mammal, and in particular with at least one species of primate (such as, without limitation, monkeys from the genus *Macaca* (such as, and in particular, cynomologus monkeys, a.k.a. "cyno" (*Macaca fascicularis*) and/or rhesus monkeys (*Macaca mulatta*)) and baboon (*Papio ursinus*), reference is again made to the US provisional application 60/843,349); amino acid sequences that can bind to serum albumin in a pH independent manner (see, e.g., the US provisional application 60/850,774 by Ablynx N.V. entitled "*Amino acid sequences that bind to serum proteins in a manner that is essentially independent of the pH, compounds comprising the same, and uses thereof*", filed on October 11, 2006) and/or amino acid sequences that are conditional binders (see, e.g., the US provisional application 60/850,775 by Ablynx N.V. entitled "*Amino acid sequences that bind to a desired molecule in a conditional manner*", filed on October 11, 2006) and to WO 2006/122787, WO 2008/028977, WO 2008/043821, WO 2008/068280 and WO 2009/127691.

[00381] According to another aspect, the one or more further amino acid sequences may comprise one or more parts, fragments or domains of conventional four-chain antibodies (and in particular human antibodies) and/or of heavy chain antibodies. For

example, although usually less preferred, a NB agent of the invention may be linked to a conventional (preferably human) V_H or V_L domain or to a natural or synthetic analog of a V_H or V_L domain, again optionally via a linker sequence (including but not limited to other (single) domain antibodies, such as the dAb's described by Ward et al.).

[00382] The at least one NB agent may be linked to one or more (preferably human) C_H1, C_H2 and/or C_H3 domains, optionally via a linker sequence. For instance, a NB agent linked to a suitable C_H1 domain could be used - together with suitable light chains - to generate antibody fragments/structures analogous to conventional Fab fragments or $F(ab')_2$ fragments, but in which one or (in case of an $F(ab')_2$ fragment) one or both of the conventional V_H domains have been replaced by a NB agent of the invention. Also, two NB agents could be linked to a C_H3 domain (optionally via a linker) to provide a construct with increased half-life in vivo.

[00383] In one aspect of the invention, one or more NB agents of the invention are linked to one or more antibody parts, fragments or domains that confer one or more effector functions to the polypeptide of the invention and/or may confer the ability to bind to one or more Fc receptors. For example, for this purpose, and without being limited thereto, the one or more further amino acid sequences may comprise one or more C_H2 and/or C_H3 domains of an antibody, such as from a heavy chain antibody (as described herein) and more preferably from a conventional human 4-chain antibody; and/or may form (part of) and Fc region, e.g., from IgG, from IgE or from another human Ig. For example, WO 94/04678 describes heavy chain antibodies comprising a Camelid V_{HH} domain or a humanized derivative thereof, in which the Camelidae C_H2 and/or C_H3 domain have been replaced by human C_H2 and C_H3 domains, so as to provide an immunoglobulin that consists of two heavy chains each comprising a V_{HH} and human C_H2 and C_H3 domains (but no C_H1 domain), which immunoglobulin has the effector function provided by the C_H2 and C_H3 domains and which immunoglobulin can function without the presence of any light chains. Other amino acid sequences that can be suitably linked to the NB agents of the invention so as to provide an effector function will be clear to the skilled person, and may be chosen on the basis of the desired effector function(s). Reference is, e.g., made to WO 04/058820, WO 99/42077 and WO 05/017148, as well as the review by Holliger and Hudson, supra. Coupling of a NB agent of the invention to an Fc portion may also lead to an increased half-life, compared to the corresponding NB agent of the invention. For some applications, the use of an Fc portion and/or of constant domains (i.e., C_H2 and/or C_H3 domains) that confer increased half-life without any biologically significant effector function may also be suitable or even preferred. Other suitable constructs comprising one or more NB agents and one or more constant domains with increased half-life in vivo will be clear to the skilled person, and may, e.g., comprise two NB agents linked to a C_H3 domain,

optionally via a linker sequence. Generally, any fusion protein or derivatives with increased half-life will preferably have a molecular weight of more than 50 kD, the cut-off value for renal absorption.

[00384] The further amino acid sequences may also form a signal sequence or leader sequence that directs secretion of the NB agent or the polypeptide of the invention from a host cell upon synthesis (for example to provide a pre-, pro- or prepro- form of the polypeptide of the invention, depending on the host cell used to express the polypeptide of the invention).

[00385] In one aspect, a further amino acid sequence forms a sequence or signal that allows the NB agent or polypeptide of the invention to be directed towards and/or to penetrate or enter into specific organs, tissues, cells, or parts or compartments of cells, and/or that allows the NB agent or polypeptide of the invention to penetrate or cross a biological barrier such as a cell membrane, a cell layer such as a layer of epithelial cells, a tumor including solid tumors, or the blood-brain-barrier. Suitable examples of such amino acid sequences will be clear to the skilled person, and, e.g., include, but are not limited to, those mentioned on page 118 of WO 08/020079. For some applications, in particular for those applications in which it is intended to kill a cell that expresses the target against which the NB agents of the invention are directed (e.g. in the treatment of cancer), or to reduce or slow the growth and/or proliferation of such a cell, the NB agents of the invention may also be linked to a (cyto)toxic protein or polypeptide. Examples of such toxic proteins and polypeptides which can be linked to a NB agent of the invention to provide –, e.g., – a cytotoxic polypeptide of the invention will be clear to the skilled person and can, e.g., be found in the art references cited above and/or in the further description herein. One example is the so-called ADEPT™ technology described in WO 03/055527.

[00386] In one non-limiting aspect, said one or more further amino acid sequences comprise at least one further NB agent, so as to provide a polypeptide of the invention that comprises at least two, such as three, four, five or more NB agents, in which said NB agents may optionally be linked via one or more linker sequences. Polypeptides of the invention that comprise one, two or more V_{HH} constructs, e.g., as described on pages 119 and 120 of WO 08/020079, and at least one NB agent of the invention, will also be referred to herein as "multivalent" polypeptides of the invention, and the NB agent(s) present in such polypeptides will also be referred to herein as being in a "multivalent format".

[00387] Polypeptides of that contain at least two NB agents, in which at least one NB agent is directed against a first antigen (i.e., against DR5,) and at least one NB agent is directed against a second antigen (i.e., different from DR5), will also be referred to as "multispecific" polypeptides of the invention, and the NB agent present in such polypeptides will also be referred to herein as being in a "multispecific format". Thus, e.g.,

a "bispecific" polypeptide of the invention is a polypeptide that comprises at least one NB agent directed against a first antigen (i.e., DR5), more preferably three, four, five or more NB agents directed against DR5 and at least one further NB agent directed against a second antigen (i.e., different from DR5), whereas a "trispecific" polypeptide of the invention is a polypeptide that comprises at least one NB agent directed against a first antigen (i.e., one epitope of DR5), at least one further NB agent directed against a second antigen (i.e., a different epitope from DR5 or an antigen different from TRAIIL-receptor,) and at least one further NB agent directed against a third antigen (i.e., different from both DR5 and the second antigen); etc.

[00388] Accordingly, in its simplest form, a bispecific polypeptide of the invention is a bivalent polypeptide of the invention, comprising a first NB agent directed against DR5, and a second NB agent directed against a second antigen, in which said first and second NB agent may optionally be linked via a linker sequence; whereas a trispecific polypeptide of the invention in its simplest form is a trivalent polypeptide of the invention, comprising a first NB agent directed against DR5, a second NB agent directed against a second antigen and a third NB agent directed against a third antigen, in which said first, second and third NB agent may optionally be linked via one or more, and in particular one and more, in particular two, linker sequences.

[00389] As will be clear from the description herein, the invention is not limited the above, in the sense that a multispecific polypeptide of the invention may comprise at least one or more NB agents against DR5, and any number of NB agents directed against one or more antigens different from DR5.

[00390] When reference is made to a specific multivalent or multispecific polypeptide of the invention, it should be noted that this encompasses any order or arrangements of the relevant NB agents, unless explicitly indicated otherwise.

[00391] Furthermore, it is within the scope of the invention that the polypeptides of the invention contain two or more NB agents and one or more further amino acid sequences (as mentioned herein).

[00392] For multivalent and multispecific polypeptides containing one or more V_{HH} domains and their preparation, reference is also made to Conrath et al., J. Biol. Chem., Vol. 276, 10. 7346-7350, 2001; Muyldermans, Reviews in Molecular Biotechnology 74 (2001), 277-302; as well as to, e.g., WO 96/34103 and WO 99/23221. Some other examples of some specific multispecific and/or multivalent polypeptide of the invention can be found in the applications by Ablynx N.V. referred to herein.

[00393] One non-limiting example of a multispecific polypeptide of the invention comprises at least one NB agent of the invention and at least one NB agent that provides for an increased half-life. Such NB agents may, e.g., be NB agents that are directed

against a serum protein, and in particular a human serum protein, such as human serum albumin, thyroxine-binding protein, (human) transferrin, fibrinogen, an immunoglobulin such as IgG, IgE or IgM, or against one of the serum proteins listed in WO 04/003019. Of these, NB agents that can bind to serum albumin (and in particular human serum albumin) or to IgG (and in particular human IgG, see, e.g., NANOBODY™ VH-1 described in the review by Muyldermans, *supra*) are particularly preferred (although, e.g., for experiments in mice or primates, NB agents against or cross-reactive with mouse serum albumin (MSA) or serum albumin from said primate, respectively, can be used. However, for pharmaceutical use, NB agents against human serum albumin or human IgG will usually be preferred). NB agents that provide for increased half-life and that can be used in the polypeptides of the invention include the NB agents directed against serum albumin that are described in WO 04/041865, in WO 06/122787 and in the further patent applications by Ablynx N.V., such as those mentioned herein.

[00394] For example, the some preferred NB agents that provide for increased half-life for use in the present invention include NANOBODIES™ that can bind to amino acid residues on (human) serum albumin that are not involved in binding of serum albumin to FcRn (see, e.g., WO 06/0122787); NANOBODIES™ that are capable of binding to amino acid residues on serum albumin that do not form part of domain III of serum albumin (see, e.g., WO 06/0122787); NANOBODIES™ that have or can provide an increased half-life (see, e.g., the US provisional application 60/843,349 by Ablynx N.V mentioned herein); NANOBODIES™ against human serum albumin that are cross-reactive with serum albumin from at least one species of mammal, and in particular with at least one species of primate (such as, without limitation, monkeys from the genus *Macaca* (such as, and in particular, cynomologus monkeys (*Macaca fascicularis*) and/or rhesus monkeys (*Macaca mulatta*)) and baboon (*Papio ursinus*)) (see, e.g., the US provisional application 60/843,349 by Ablynx N.V); NANOBODIES™ that can bind to serum albumin in a pH independent manner (see, e.g., the US provisional application 60/850,774 by Ablynx N.V. mentioned herein) and/or NANOBODIES™ that are conditional binders (see, e.g., the US provisional application 60/850,775 by Ablynx N.V.).

[00395] Some particularly preferred NANOBODIES™ that provide for increased half-life and that can be used in the polypeptides of the invention include the NANOBODIES™ ALB-1 to ALB-10 disclosed in WO 06/122787 (see Tables II and III therein) of which ALB-8 (SEQ ID NO: 62 in WO 06/122787) is particularly preferred.

[00396] According to a specific, but non-limiting aspect of the invention, the polypeptides of the invention contain, besides the one or more NB agents of the invention, at least one NB agent against human serum albumin.

[00397] In one embodiment, any polypeptides of the invention with increased half-life that contain one or more NB agents of the invention, and any derivatives of NB agents of the invention or of such polypeptides that have an increased half-life, have a half-life that is at least 1.5 times, and/or at least 2 times, and/or at least 5 times, e.g., at least 10 times or more than 20 times, greater than the half-life of the corresponding NB agent of the invention per se. For example, such a derivative or polypeptides with increased half-life may have a half-life that is increased with more than 1 hours, and/or more than 2 hours, and/or more than 6 hours, such as more than 12 hours, or even more than 24, 48 or 72 hours, compared to the corresponding NB agent of the invention per se.

[00398] In one non-limiting aspect of the invention, such derivatives or polypeptides exhibit a serum half-life in human of at least about 12 hours, and/or at least 24 hours, and/or at least 48 hours, and/or at least 72 hours or more. For example, such derivatives or polypeptides may have a half-life of at least 5 days (such as about 5 to 10 days), and/or at least 9 days (such as about 9 to 14 days), and/or at least about 10 days (such as about 10 to 15 days), and/or at least about 11 days (such as about 11 to 16 days), and/or at least about 12 days (such as about 12 to 18 days or more), and/or more than 14 days (such as about 14 to 19 days).

[00399] According to one aspect of the invention, such polypeptides are capable of binding to one or more molecules that can increase the half-life of the polypeptide in vivo.

[00400] Such polypeptides of the invention are stabilized in vivo and their half-life increased by binding to molecules that resist degradation and/or clearance or sequestration. Typically, such molecules are naturally occurring proteins which themselves have a long half-life in vivo.

[00401] Another non-limiting example of a multispecific polypeptide of the invention comprises at least one NB agent of the invention and at least one NB agent that directs the polypeptide of the invention towards, and/or that allows the polypeptide of the invention to penetrate or to enter into specific organs, tissues, cells, or parts or compartments of cells, and/or that allows the NB agent to penetrate or cross a biological barrier such as a cell membrane, a cell layer such as a layer of epithelial cells, a tumor including solid tumors, or the blood-brain-barrier. Examples of such NB agents include NB agents that are directed towards specific cell-surface proteins, markers or epitopes of the desired organ, tissue or cell (for example cell-surface markers associated with tumor cells), and the single-domain brain targeting antibody fragments described in WO 02/057445 and WO 06/040153, of which FC44 (SEQ ID NO: 189 of WO 06/040153) and FC5 (SEQ ID NO: 190 of WO 06/040154) are preferred examples.

Linkers

[00402] In the polypeptides or compounds of the invention, the one or more binding polypeptides against DR5, such as NB agents and the one or more polypeptides may be directly linked to each other (as, e.g., described in WO 99/23221) and/or may be linked to each other via one or more suitable spacers or linkers, or any combination thereof.

[00403] Suitable spacers or linkers for use in multivalent and multispecific polypeptides will be clear to the skilled person, and may generally be any linker or spacer used in the art to link amino acid sequences. Preferably, said linker or spacer is suitable for use in constructing proteins or polypeptides that are intended for pharmaceutical use.

[00404] Some particularly preferred spacers include the spacers and linkers that are used in the art to link antibody fragments or antibody domains. These include the linkers mentioned in the general background art cited above, as well as, e.g., linkers that are used in the art to construct diabodies or ScFv fragments (in this respect, however, its should be noted that, whereas in diabodies and in ScFv fragments, the linker sequence used should have a length, a degree of flexibility and other properties that allow the pertinent V_H and V_L domains to come together to form the complete antigen-binding site, there is no particular limitation on the length or the flexibility of the linker used in the polypeptide of the invention, since each NB agent by itself forms a complete antigen-binding site).

[00405] For example, a linker may be a suitable amino acid sequence, and in particular amino acid sequences of between 1 and 50, e.g., between 5 and 50, preferably between 1 and 35, such as between 1 and 10 amino acid residues. Some preferred examples of such amino acid sequences include gly-ser linkers, e.g., of the type $(gly_xser_y)_z$, such as (for example $(gly_4ser)_3$ or $(gly_3ser_2)_3$, as described in WO 99/42077 and the GS30, GS15, GS9 and GS7 linkers described in the applications by Ablynx mentioned herein (see, e.g., WO 06/040153 and WO 06/122825), as well as hinge-like regions, such as the hinge regions of naturally occurring heavy chain antibodies or similar sequences (e.g., such as described in WO 94/04678).

[00406] Some other particularly preferred linkers are poly-alanine (such as AAA), as well as the linkers GS30 (SEQ ID NO: 85 in WO 06/122825) and GS9 (SEQ ID NO: 84 in WO 06/122825).

[00407] Other suitable linkers generally comprise organic compounds or polymers, in particular those suitable for use in proteins for pharmaceutical use. Nonlimiting examples include, e.g., poly(ethylene glycol) moieties, e.g., such as those used to link antibody domains. See, e.g., WO 04/081026.

[00408] It is encompassed within the scope of the invention that the length, the degree of flexibility and/or other properties of the linker(s) used (although not critical, as it usually is for linkers used in ScFv fragments) may have some influence on the properties of the

final polypeptide of the invention, including but not limited to the affinity, specificity or avidity for DR5, or for one or more of the other antigens. Based on the disclosure herein, the skilled person will be able to determine the optimal linker(s) for use in a specific polypeptide of the invention, optionally after some limited routine experiments.

[00409] In one embodiment, in multivalent polypeptides of the invention that comprise, e.g., NB agents directed against a multimeric antigen (such as a multimeric receptor or other protein), the length and flexibility of the linker may be such that it allows each NB agent of the invention present in the polypeptide to bind to the antigenic determinant on each of the subunits of the multimer. Similarly, in a multispecific polypeptide of the invention that comprises NB agents directed against two or more different antigenic determinants on the same antigen (for example against different epitopes of an antigen and/or against different subunits of a multimeric receptor, channel or protein), the length and flexibility of the linker may be such that it allows each NB agent to bind to its intended antigenic determinant. Again, based on the disclosure herein, the skilled person will be able to determine the optimal linker(s) for use in a specific polypeptide of the invention, optionally after some limited routine experiments.

[00410] It is within the scope of the invention that the linker(s) used confer one or more other favorable properties or functionality to the polypeptides of the invention, and/or provide one or more sites for the formation of derivatives and/or for the attachment of functional groups (e.g. as described herein for the derivatives of the NB agents of the invention). For example, linkers containing one or more charged amino acid residues can provide improved hydrophilic properties, whereas linkers that form or contain small epitopes or tags can be used for the purposes of detection, identification and/or purification. Again, based on the disclosure herein, the skilled person will be able to determine the optimal linkers for use in a specific polypeptide of the invention, optionally after some limited routine experiments.

[00411] Finally, when two or more linkers are used in the polypeptides of the invention, these linkers may be the same or different. Again, based on the disclosure herein, the skilled person will be able to determine the optimal linkers for use in a specific polypeptide of the invention, optionally after some limited routine experiments.

[00412] Usually, for easy of expression and production, a polypeptide of the invention will be a linear polypeptide. However, the invention in its broadest sense is not limited thereto. For example, when a polypeptide of the invention comprises three or more NB agents, it is possible to link them by use of a linker with three or more "arms", with each "arm" being linked to a NB agent, so as to provide a "star-shaped" construct. It is also possible, although usually less preferred, to use circular constructs.

[00413] The invention further comprises derivatives of the polypeptides of the invention, which may be essentially analogous to the derivatives of the NB agents of the invention, i.e., as described herein.

[00414] The invention also comprises proteins or polypeptides that "essentially consist" of a polypeptide of the invention (in which the wording "essentially consist of" has essentially the same meaning as indicated hereinabove).

[00415] According to one aspect of the invention, the polypeptide of the invention is in essentially isolated form, as defined herein.

Method of manufacturing the NB agents of the invention

[00416] The amino acid sequences, NB agents, polypeptides, compounds and nucleic acids of the invention can be prepared in a manner known per se, as will be clear to the skilled person from the further description herein. For example, the NB agents and polypeptides of the invention can be prepared in any manner known per se for the preparation of antibodies and in particular for the preparation of antibody fragments (including but not limited to (single) domain antibodies and ScFv fragments). Some preferred, but non-limiting methods for preparing the amino acid sequences, NB agents, polypeptides and nucleic acids include the methods and techniques described herein.

[00417] As will be clear to the skilled person, one particularly useful method for preparing an amino acid sequence, NB agent and/or a polypeptide of the invention generally comprises the steps of:

a) the expression, in a suitable host cell or host organism (also referred to herein as a "host of the invention") or in another suitable expression system of a nucleic acid that encodes said amino acid sequence, NB agent or polypeptide of the invention (also referred to herein as a "*nucleic acid of the invention*"), optionally followed by:

b) isolating and/or purifying the amino acid sequence, NB agent or polypeptide of the invention thus obtained.

[00418] In particular, such a method may comprise the steps of:

a) cultivating and/or maintaining a host of the invention under conditions that are such that said host of the invention expresses and/or produces at least one amino acid sequence, NB agent and/or polypeptide of the invention;

optionally followed by:

b) isolating and/or purifying the amino acid sequence, NB agent or polypeptide of the invention thus obtained.

[00419] A nucleic acid of the invention can be in the form of single or double stranded DNA or RNA. In one embodiment, a polynucleotide NB agent is in the form of double stranded DNA. For example, the nucleotide NB sequences of the invention may be

genomic DNA, cDNA or synthetic DNA (such as DNA with a codon usage that has been specifically adapted for expression in the intended host cell or host organism).

[00420] According to one aspect of the invention, the nucleic acid of the invention is in essentially isolated form, as defined herein.

[00421] The nucleic acid of the invention may be in the form of, be present in and/or be part of a vector, such as, e.g., a plasmid, cosmid or YAC, which again may be in essentially isolated form.

[00422] The nucleic acids of the invention can be prepared or obtained in a manner known per se, based on the information on the amino acid sequences for the polypeptides of the invention given herein, and/or can be isolated from a suitable natural source. To provide analogs, nucleotide sequences encoding naturally occurring V_{HH} domains can, e.g., be subjected to site-directed mutagenesis, so at to provide a nucleic acid of the invention encoding said analog. As will be clear to the skilled person, to prepare a nucleic acid of the invention, including several nucleotide sequences, e.g., at least one nucleotide sequence encoding a NB agent and, e.g., nucleic acids encoding one or more linkers, such sequences can be linked together in a suitable manner.

[00423] Techniques for generating the nucleic acids of the invention will be clear to the skilled person and may for instance include, but are not limited to, automated DNA synthesis; site-directed mutagenesis; combining two or more naturally occurring and/or synthetic sequences (or two or more parts thereof), introduction of mutations that lead to the expression of a truncated expression product; introduction of one or more restriction sites (e.g. to create cassettes and/or regions that may easily be digested and/or ligated using suitable restriction enzymes), and/or the introduction of mutations by means of a PCR reaction using one or more "mismatched" primers, using, e.g., a sequence of a naturally occurring form of DR5 as a template. These and other techniques will be clear to the skilled person, and reference is again made to the standard handbooks, such as Sambrook et al. and Ausubel et al., mentioned herein, as well as the Examples below.

[00424] The nucleic acid of the invention may be in the form of, be present in and/or be part of a genetic construct, as will be clear to the person skilled in the art and, e.g., as described on pages 131-134 of WO 08/020079. Such genetic constructs generally comprise at least one nucleic acid of the invention that is optionally linked to one or more elements of genetic constructs known per se, such as, e.g., one or more suitable regulatory elements (such as a suitable promoter(s), enhancer(s), terminator(s), etc.) and the further elements of genetic constructs referred to herein. Such genetic constructs comprising at least one nucleic acid of the invention will also be referred to herein as "genetic constructs of the invention".

[00425] The genetic constructs of the invention may be DNA or RNA. The genetic constructs of the invention may be in a form suitable for transformation of the intended host cell or host organism, in a form suitable for integration into the genomic DNA of the intended host cell or in a form suitable for independent replication, maintenance and/or inheritance in the intended host organism. For instance, the genetic constructs of the invention may be in the form of a vector, such as, e.g., a plasmid, cosmid, YAC, a viral vector or transposon. In particular, the vector may be an expression vector, i.e., a vector that can provide for expression in vitro and/or in vivo (e.g. in a suitable host cell, host organism and/or expression system).

[00426] The nucleic acid of the invention may be in the form of, be present in and/or be part of a genetic construct. Such genetic constructs generally comprise at least one nucleic acid of the invention that is optionally linked to one or more elements of genetic constructs known per se, such as, e.g., one or more suitable regulatory elements (such as a suitable promoter(s), enhancer(s), terminator(s), etc.) and the further elements of genetic constructs referred to herein. Other suitable genetic constructs known in the art are contemplated as being within the scope of the invention, including e.g., those described on pages 131-134 of WO 08/020079. Such genetic constructs comprising at least one nucleic acid of the invention will also be referred to herein as "genetic constructs of the invention".

[00427] In one non-limiting embodiment, a genetic construct of the invention comprises a) at least one nucleic acid of the invention; wherein said polynucleotide NB agent is operably connected to b) one or more regulatory elements, such as a promoter and optionally a suitable terminator; and optionally c) one or more further elements of genetic constructs known per se.

[00428] In one embodiment, in the genetic constructs of the invention, said at least one nucleic acid of the invention and said regulatory elements, and optionally said one or more further elements, are "operably linked" to each other, by which is generally meant that they are in a functional relationship with each other. For instance, a promoter is considered "operably linked" to a coding sequence if said promoter is able to initiate or otherwise control/regulate the transcription and/or the expression of a coding sequence (in which said coding sequence should be understood as being "under the control of said promotor). Generally, when two nucleotide sequences are operably linked, they will be in the same orientation and usually also in the same reading frame. They will usually be essentially contiguous, although this may not be required. The phrases "operably connected" and "operably linked" are used in the alternative.

[00429] The terms "regulatory element", "promoter", "terminator" and "operably connected" have their usual meaning in the art. The "further elements" present in the genetic constructs may be, e.g., a 3'- or 5'-UTR sequences, leader sequences, selection

markers, expression markers/reporter genes, and/or elements that may facilitate or increase (the efficiency of) transformation or integration. These and other suitable elements for such genetic constructs will be clear to the skilled person, and may for instance depend upon the type of construct used, the intended host cell or host organism; the manner in which the nucleotide sequences of the invention of interest are to be expressed (e.g. via constitutive, transient or inducible expression); and/or the transformation technique to be used. For example, regulatory sequences, promoters and terminators known per se for the expression and production of antibodies and antibody fragments (including but not limited to (single) domain antibodies and ScFv fragments) may be used in an essentially analogous manner.

[00430] In one embodiment, the regulatory and further elements of the genetic constructs of the invention are such that they are capable of providing their intended biological function in the intended host cell or host organism.

[00431] For instance, a promoter, enhancer or terminator should be "operable" in the intended host cell or host organism, by which is meant that (for example) said promoter should be capable of initiating or otherwise controlling/regulating the transcription and/or the expression of a nucleotide sequence - e.g. a coding sequence - to which it is operably linked (as defined herein). Some particularly preferred promoters include, but are not limited to, promoters known per se for the expression in the host cells mentioned herein; and in particular promoters for the expression in the bacterial cells.

[00432] The nucleic acids of the invention and/or the genetic constructs of the invention may be used to transform a host cell or host organism, i.e., for expression and/or production of the amino acid sequence, NB agent or polypeptide of the invention. Suitable hosts or host cells will be clear to the skilled person, and may, e.g., be any suitable fungal, prokaryotic or eukaryotic cell or cell line or any suitable fungal, prokaryotic or eukaryotic organism, e.g., those described on pages 134 and 135 of WO 08/020079; as well as all other hosts or host cells known per se for the expression and production of antibodies and antibody fragments (including but not limited to (single) domain antibodies and ScFv fragments), which will be clear to the skilled person. Reference is also made to the general background art cited hereinabove, as well as to, e.g., WO 94/29457; WO 96/34103; WO 99/42077; Frenken et al., (1998), supra; Riechmann and Muyldermans, (1999), supra; van der Linden, (2000), supra; Thomassen et al., (2002), supra; Joosten et al., (2003), supra; Joosten et al., (2005), supra; and the further references cited herein.

[00433] The NB amino acid sequences and polypeptides of the invention can be introduced and expressed in one or more cells, tissues or organs of a multicellular organism, e.g., for prophylactic and/or therapeutic purposes (e.g., as a gene therapy), as

further described on pages 135 and 136 of in WO 08/020079 and in the further references cited in WO 08/020079.

[00434] For expression of the NB agents in a cell, they may be expressed as so-called "intrabodies", as, e.g., described in WO 94/02610, WO 95/22618 and US-A-7004940; WO 03/014960; in Cattaneo, A. & Biocca, S. (1997) Intracellular Antibodies: Development and Applications. Landes and Springer-Verlag; and in Kontermann, Methods 34, (2004), 163-170.

[00435] The amino NB acid sequences and polypeptides of the invention can, e.g., also be produced in the milk of transgenic mammals, e.g., in the milk of rabbits, cows, goats or sheep (see, e.g., US6,741,957, US6,304,489 and US6,849,992 for general techniques for introducing transgenes into mammals), in plants or parts of plants including but not limited to their leaves, flowers, fruits, seed, roots or tubers (for example in tobacco, maize, soybean or alfalfa) or in, e.g., pupae of the silkworm *Bombix mori*.

[00436] Furthermore, the NB amino acid sequences and polypeptides of the invention can be expressed and/or produced in cell-free expression systems, and suitable examples of such systems will be clear to the skilled person. Some non-limiting examples include expression in the wheat germ system; in rabbit reticulocyte lysates; or in the *E. coli* Zubay system.

[00437] As mentioned herein, one of the advantages of the use of NB agents expressed from plasmids or vectors is that the polypeptides based thereon can be prepared through expression in a suitable bacterial system, and suitable bacterial expression systems, vectors, host cells, regulatory elements, etc., will be clear to the skilled person, e.g., from the references cited above. It should however be noted that the invention in its broadest sense is not limited to expression in bacterial systems.

[00438] In one embodiment, codon usage for a polynucleotide sequence of the invention is optimization by referring to the frequency of codon usage of the particular host cell/host organism. The resulting nucleotide sequence is a "codon optimized" NB nucleotide sequence. Codon optimized NB sequences may be made for expression in prokaryotic or eukaryotic host cells/host organisms. Particular examples include the expression systems provided herein.

[00439] In one embodiment of the invention an expression system (either in vivo or in vitro), e.g., such as a bacterial expression system, is used that provides the polypeptides of the invention in a form that is suitable for pharmaceutical use, and such expression systems will again be clear to the skilled person. As also will be clear to the skilled person, polypeptides of the invention suitable for pharmaceutical use can be prepared using techniques for peptide synthesis.

[00440] For production on industrial scale, preferred heterologous hosts for the (industrial) production of NB agents or NB agent-containing protein therapeutics include strains of *E. coli*, *Pichia pastoris*, *S. cerevisiae* that are suitable for large scale expression/ production/ fermentation, and in particular for large scale pharmaceutical (i.e., GMP grade) expression/ production/ fermentation. Suitable examples of such strains will be clear to the skilled person. Such strains and production/expression systems are also made available by companies such as Biovitrum (Uppsala, Sweden).

[00441] Alternatively, mammalian cell lines, in particular Chinese hamster ovary (CHO) cells, can be used for large scale expression/production/fermentation, and in particular for large scale pharmaceutical expression/production/fermentation. Again, such expression/production systems are also made available by some of the companies mentioned herein.

[00442] The choice of the specific expression system would depend in part on the requirement for certain post-translational modifications, more specifically glycosylation. The production of a NB agent-containing recombinant protein for which glycosylation is desired or required would necessitate the use of mammalian expression hosts that have the ability to glycosylate the expressed protein. In this respect, it will be clear to the skilled person that the glycosylation pattern obtained (i.e., the kind, number and position of residues attached) will depend on the cell or cell line that is used for the expression. Preferably, either a human cell or cell line is used (i.e., leading to a protein that essentially has a human glycosylation pattern) or another mammalian cell line is used that can provide a glycosylation pattern that is essentially and/or functionally the same as human glycosylation or at least mimics human glycosylation. Generally, prokaryotic hosts such as *E. coli* do not have the ability to glycosylate proteins, and the use of lower eukaryotes such as yeast usually leads to a glycosylation pattern that differs from human glycosylation. Nevertheless, it should be understood that all the foregoing host cells and expression systems can be used in the invention, depending on the desired amino acid sequence, NB agent or polypeptide to be obtained.

[00443] Thus, according to one non-limiting aspect of the invention, the amino acid sequence, NB agent or polypeptide of the invention is glycosylated. According to another non-limiting aspect of the invention, the amino acid sequence, NB agent or polypeptide of the invention is non-glycosylated.

[00444] According to one preferred, but non-limiting aspect of the invention, the amino acid sequence, NB agent or polypeptide of the invention is produced in a bacterial cell, in particular a bacterial cell suitable for large scale pharmaceutical production, such as cells of the strains mentioned herein.

[00445] According to another preferred, but non-limiting aspect of the invention, the amino acid sequence, NB agent or polypeptide of the invention is produced in a yeast cell, in particular a yeast cell suitable for large scale pharmaceutical production, such as cells of the species mentioned herein.

[00446] According to yet another preferred, but non-limiting aspect of the invention, the amino acid sequence, NB agent or polypeptide of the invention is produced in a mammalian cell, in particular in a human cell or in a cell of a human cell line, and more in particular in a human cell or in a cell of a human cell line that is suitable for large scale pharmaceutical production, such as the cell lines mentioned hereinabove.

[00447] When expression in a host cell is used to produce the amino acid sequences, NB agents and the polypeptides of the invention, the NB amino acid sequences and polypeptides of the invention can be produced either intracellullarly (e.g. in the cytosol, in the periplasma or in inclusion bodies) and then isolated from the host cells and optionally further purified; or can be produced extracellularly (e.g. in the medium in which the host cells are cultured) and then isolated from the culture medium and optionally further purified. Thus, according to one non-limiting aspect of the invention, the amino acid sequence, NB agent or polypeptide of the invention is an amino acid sequence, NB agent or polypeptide that has been produced intracellularly and that has been isolated from the host cell, and in particular from a bacterial cell or from an inclusion body in a bacterial cell. According to another non-limiting aspect of the invention, the amino acid sequence, NB agent or polypeptide of the invention is an amino acid sequence, NB agent or polypeptide that has been produced extracellularly, and that has been isolated from the medium in which the host cell is cultivated.

[00448] A more complete discussion of expression systems is provided, e.g., on pages 138 and 139 of WO 08/020079. Included are a non-limiting list of promoters for use with these host cells, e.g., including those mentioned on pages 139 and 140 of WO 08/020079. Also included are a non-limiting list of secretory sequences for use with these host cells, e.g., including those mentioned on page 140 of WO 08/020079.

[00449] Suitable techniques for transforming a host or host cell of the invention will be clear to the skilled person and may depend on the intended host cell/host organism and the genetic construct used. Reference is again made to the handbooks and patent applications mentioned herein.

[00450] It will also be clear to the skilled person that the amino acid sequence, NB agent or polypeptide of the invention may (first) be generated in an immature form (as mentioned herein), which may then be subjected to post-translational modification, depending on the host cell/host organism used. Also, the amino acid sequence, NB agent

or polypeptide of the invention may be glycosylated, again depending on the host cell/host organism used.

[00451] The amino acid sequence, NB agent or polypeptide of the invention may then be isolated from the host cell/host organism and/or from the medium in which said host cell or host organism is cultivated, using protein isolation and/or purification techniques known per se, such as (preparative) chromatography and/or electrophoresis techniques, differential precipitation techniques, affinity techniques (e.g. using a specific, cleavable amino acid sequence fused with the amino acid sequence, NB agent or polypeptide of the invention) and/or preparative immunological techniques (i.e., using antibodies against the amino acid sequence to be isolated).

Pharmaceutical preparation or compositions

[00452] Generally, for pharmaceutical use, the polypeptides of the invention may be formulated as a pharmaceutical preparation or composition comprising at least one polypeptide of the invention and at least one pharmaceutically acceptable carrier, diluent or excipient and/or adjuvant, and optionally one or more further pharmaceutically active polypeptides and/or compounds. By means of non-limiting examples, such a formulation may be in a form suitable for oral administration, for parenteral administration (such as by intravenous, intramuscular or subcutaneous injection or intravenous infusion), for topical administration, for administration by inhalation, by a skin patch, by an implant, by a suppository, etc. Such suitable administration forms - which may be solid, semi-solid or liquid, depending on the manner of administration - as well as methods and carriers for use in the preparation thereof, will be clear to the skilled person, and are further described herein. Such a pharmaceutical preparation or composition will generally be referred to herein as a "pharmaceutical composition". A pharmaceutical preparation or composition for use in a non-human organism will generally be referred to herein as a "veterinary composition".

[00453] Thus, in a further aspect, the invention relates to a pharmaceutical composition that contains at least one amino acid of the invention, at least one NB agent of the invention or at least one polypeptide of the invention and at least one suitable carrier, diluent or excipient (i.e., suitable for pharmaceutical use), and optionally one or more further active substances.

[00454] Generally, the NB amino acid sequences and polypeptides of the invention can be formulated and administered in any suitable manner known per se. Reference is, e.g., made to the general background art cited above (and in particular to WO 04/041862, WO 04/041863, WO 04/041865, WO 04/041867 and WO 08/020079) as well as to the standard handbooks, such as Remington's Pharmaceutical Sciences, 18th Ed., Mack Publishing

Company, USA (1990), Remington, the Science and Practice of Pharmacy, 21th Edition, Lippincott Williams and Wilkins (2005); or the Handbook of Therapeutic Antibodies (S. Dubel, Ed.), Wiley, Weinheim, 2007 (see, e.g., pages 252-255).

[00455] The NB amino acid sequences and polypeptides of the invention may be formulated and administered in any manner known per se for conventional antibodies and antibody fragments (including ScFv's and diabodies) and other pharmaceutically active proteins. Such formulations and methods for preparing the same will be clear to the skilled person, and, e.g., include preparations suitable for parenteral administration (for example intravenous, intraperitoneal, subcutaneous, intramuscular, intraluminal, intra-arterial or intrathecal administration) or for topical (i.e., transdermal or intradermal) administration.

[00456] Preparations for parenteral administration may, e.g., be sterile solutions, suspensions, dispersions or emulsions that are suitable for infusion or injection. Suitable carriers or diluents for such preparations, e.g., include, without limitation, those mentioned on page 143 of WO 08/020079. In one embodiment, the preparation is an aqueous solution or suspension.

[00457] The NB amino acid sequences and polypeptides of the invention can be administered using gene therapy methods of delivery. See, *e.g.*, U.S. Patent No. 5,399,346, which is incorporated by reference for its gene therapy delivery methods. Using a gene therapy method of delivery, primary cells transfected with the gene encoding an amino acid sequence, NB agent or polypeptide of the invention can additionally be transfected with tissue specific promoters to target specific organs, tissue, grafts, tumors, or cells and can additionally be transfected with signal and stabilization sequences for subcellularly localized expression.

[00458] Thus, the NB amino acid sequences and polypeptides of the invention may be systemically administered, *e.g.*, orally, in combination with a pharmaceutically acceptable vehicle such as an inert diluent or an assimilable edible carrier. They may be enclosed in hard or soft shell gelatin capsules, may be compressed into tablets, or may be incorporated directly with the food of the patient's diet. For oral therapeutic administration, the NB amino acid sequences and polypeptides of the invention may be combined with one or more excipients and used in the form of ingestible tablets, buccal tablets, troches, capsules, elixirs, suspensions, syrups, wafers, and the like. Such compositions and preparations should contain at least 0.1% of the amino acid sequence, NB agent or polypeptide of the invention. Their percentage in the compositions and preparations may, of course, be varied and may conveniently be between about 2 to about 60% of the weight of a given unit dosage form. The amount of the amino acid sequence, NB agent or polypeptide of the invention in such therapeutically useful compositions is such that an effective dosage level will be obtained.

[00459] The tablets, troches, pills, capsules, and the like may also contain binders, excipients, disintegrating agents, lubricants and sweetening or flavoring agents, e.g., those mentioned on pages 143-144 of WO 08/020079. When the unit dosage form is a capsule, it may contain, in addition to materials of the above type, a liquid carrier, such as a vegetable oil or a polyethylene glycol. Various other materials may be present as coatings or to otherwise modify the physical form of the solid unit dosage form. For instance, tablets, pills, or capsules may be coated with gelatin, wax, shellac or sugar and the like. A syrup or elixir may contain the NB amino acid sequences and polypeptides of the invention, sucrose or fructose as a sweetening agent, methyl and propylparabens as preservatives, a dye and flavoring such as cherry or orange flavor. Of course, any material used in preparing any unit dosage form should be pharmaceutically acceptable and substantially non-toxic in the amounts employed. In addition, the NB amino acid sequences and polypeptides of the invention may be incorporated into sustained-release preparations and devices.

[00460] Preparations and formulations for oral administration may also be provided with an enteric coating that will allow the constructs of the invention to resist the gastric environment and pass into the intestines. More generally, preparations and formulations for oral administration may be suitably formulated for delivery into any desired part of the gastrointestinal tract. In addition, suitable suppositories may be used for delivery into the gastrointestinal tract.

[00461] The NB amino acid sequences and polypeptides of the invention may also be administered intravenously or intraperitoneally by infusion or injection. Particular examples are as further described on pages 144 and 145 of WO 08/020079.

[00462] For topical administration, the NB amino acid sequences and polypeptides of the invention may be applied in pure form, i.e., when they are liquids. However, it will generally be desirable to administer them to the skin as compositions or formulations, in combination with a dermatologically acceptable carrier, which may be a solid or a liquid. Particular examples are as further described on page 145 of WO 08/020079.

[00463] Generally, the concentration of the NB amino acid sequences and polypeptides of the invention in a liquid composition, such as a lotion, will be from about 0.1-25 wt-%, preferably from about 0.5-10 wt-%. The concentration in a semi-solid or solid composition such as a gel or a powder will be about 0.1-5 wt-%, preferably about 0.5-2.5 wt-%.

[00464] The amount of the NB amino acid sequences and polypeptides of the invention required for use in treatment will vary not only with the particular amino acid sequence, NB agent or polypeptide selected but also with the route of administration, the nature of the condition being treated and the age and condition of the patient and will be ultimately at the discretion of the attendant physician or clinician. Also the dosage of the NB amino acid

sequences and polypeptides of the invention varies depending on the target cell, tumor, tissue, graft, or organ.

[00465] The desired dose may conveniently be presented in a single dose or as divided doses administered at appropriate intervals, e.g., as two, three, four or more sub-doses per day. The sub-dose itself may be further divided, *e.g.*, into a number of discrete loosely spaced administrations; such as multiple inhalations from an insufflator or by application of a plurality of drops into the eye.

[00466] An administration regimen could include long-term, daily treatment. By "long-term" is meant at least two weeks and preferably, several weeks, months, or years of duration. Necessary modifications in this dosage range may be determined by one of ordinary skill in the art using only routine experimentation given the teachings herein. See Remington's Pharmaceutical Sciences (Martin, E.W., ed. 4), Mack Publishing Co., Easton, PA. The dosage can also be adjusted by the individual physician in the event of any complication.

[00467] In another aspect, the invention relates to a method for the prevention and/or treatment of at least one diseases and disorders associated with DR5, said method comprising administering, to a subject in need thereof, a pharmaceutically active amount of an amino acid sequence of the invention, of a NB agent of the invention, of a polypeptide of the invention, and/or of a pharmaceutical composition comprising the same.

[00468] In the context of the present invention, the term "prevention and/or treatment" not only comprises preventing and/or treating the disease, but also generally comprises preventing the onset of the disease, slowing or reversing the progress of disease, preventing or slowing the onset of one or more symptoms associated with the disease, reducing and/or alleviating one or more symptoms associated with the disease, reducing the severity and/or the duration of the disease and/or of any symptoms associated therewith and/or preventing a further increase in the severity of the disease and/or of any symptoms associated therewith, preventing, reducing or reversing any physiological damage caused by the disease, and generally any pharmacological action that is beneficial to the patient being treated.

[00469] The subject to be treated may be any warm-blooded animal, but is in particular a mammal, and more in particular a human being. As will be clear to the skilled person, the subject to be treated will in particular be a person suffering from, or at risk of, the diseases and disorders mentioned herein.

[00470] The invention relates to a method for the prevention and/or treatment of at least one disease or disorder that is associated with DR5, with its biological or pharmacological activity, and/or with the biological pathways or signaling in which DR5 is involved, said method comprising administering, to a subject in need thereof, a

pharmaceutically active amount of an amino acid sequence of the invention, of a NB agent of the invention, of a polypeptide of the invention, and/or of a pharmaceutical composition comprising the same. In one embodiment, the invention relates to a method for the prevention and/or treatment of at least one disease or disorder that can be treated by modulating DR5, its biological or pharmacological activity, and/or the biological pathways or signaling in which DR5 are involved, said method comprising administering, to a subject in need thereof, a pharmaceutically active amount of an amino acid sequence of the invention, of a NB agent of the invention, of a polypeptide of the invention, and/or of a pharmaceutical composition comprising the same. In one embodiment, said pharmaceutically effective amount may be an amount that is sufficient to modulate DR5, its biological or pharmacological activity, and/or the biological pathways or signaling in which DR5 is involved; and/or an amount that provides a level of the amino acid sequence of the invention, of a NB agent of the invention, of a polypeptide of the invention in the circulation that is sufficient to modulate DR5, its biological or pharmacological activity, and/or the biological pathways or signaling in which DR5 is involved.

[00471] In one embodiment the invention relates to a method for the prevention and/or treatment of at least one disease or disorder that can be prevented and/or treated by administering a NB amino acid sequence or polypeptide of the invention, or a NB nucleotide construct of the invention encoding the same, and/or of a pharmaceutical composition comprising the same, to a patient. In one embodiment, the method comprises administering a pharmaceutically active amount of a NB amino acid sequence or polypeptide of the invention, or a NB nucleotide construct of the invention encoding the same, and/or of a pharmaceutical composition comprising the same to a subject in need thereof.

[00472] In one embodiment the invention relates to a method for the prevention and/or treatment of at least one disease or disorder that can be prevented and/or treated by enhancing cell apoptosis in specific cells or in a specific tissue of a subject to be treated (and in particular, by enhancing cell apoptosis in cancer cells or in a tumor present in the subject to be treated), said method comprising administering a pharmaceutically active amount of a NB amino acid sequence or polypeptide of the invention, or a NB nucleotide construct of the invention encoding the same, and/or of a pharmaceutical composition comprising the same, to a subject in need thereof.

[00473] In one embodiment, the invention relates to a method for the prevention and/or treatment of at least one disease or disorder chosen from the group consisting of the diseases and disorders listed herein, said method comprising administering, to a subject in need thereof, a NB amino acid sequence or polypeptide of the invention, or a NB

nucleotide construct of the invention encoding the same, and/or of a pharmaceutical composition comprising the same.

[00474] In one embodiment, the invention relates to a method for immunotherapy, and in particular for passive immunotherapy, which method comprises administering, to a subject suffering from or at risk of the diseases and disorders mentioned herein, a pharmaceutically active amount of a NB amino acid sequence or polypeptide of the invention, or a NB nucleotide construct of the invention encoding the same, and/or of a pharmaceutical composition comprising the same.

[00475] In the above methods, the amino acid sequences, NB agents and/or polypeptides of the invention and/or the compositions comprising the same can be administered in any suitable manner, depending on the specific pharmaceutical formulation or composition to be used. Thus, the amino acid sequences, NB agents and/or polypeptides of the invention and/or the compositions comprising the same can, e.g., be administered orally, intraperitoneally (e.g. intravenously, subcutaneously, intramuscularly, or via any other route of administration that circumvents the gastrointestinal tract), intranasally, transdermally, topically, by means of a suppository, by inhalation, again depending on the specific pharmaceutical formulation or composition to be used. The clinician will be able to select a suitable route of administration and a suitable pharmaceutical formulation or composition to be used in such administration, depending on the disease or disorder to be prevented or treated and other factors well known to the clinician.

[00476] The amino acid sequences, NB agents and/or polypeptides of the invention and/or the compositions comprising the same are administered according to a regime of treatment that is suitable for preventing and/or treating the disease or disorder to be prevented or treated. The clinician will generally be able to determine a suitable treatment regimen, depending on factors such as the disease or disorder to be prevented or treated, the severity of the disease to be treated and/or the severity of the symptoms thereof, the specific amino acid sequence, NB agent or polypeptide of the invention to be used, the specific route of administration and pharmaceutical formulation or composition to be used, the age, gender, weight, diet, general condition of the patient, and similar factors well known to the clinician.

[00477] Generally, the treatment regimen will comprise the administration of one or more amino acid sequences, NB agents and/or polypeptides of the invention, or of one or more compositions comprising the same, in one or more pharmaceutically effective amounts or doses. The specific amount(s) or doses to administered can be determined by the clinician, again based on the factors cited above.

[00478] Generally, for the prevention and/or treatment of the diseases and disorders mentioned herein and depending on the specific disease or disorder to be treated, the potency of the specific amino acid sequence, NB agent and polypeptide of the invention to be used, the specific route of administration and the specific pharmaceutical formulation or composition used, the NB amino acid sequences and polypeptides of the invention will generally be administered in an amount between 1 gram and 0.01 microgram per kg body weight per day, preferably between 0.1 gram and 0.1 microgram per kg body weight per day, such as about 1, 10, 100 or 1000 microgram per kg body weight per day, either continuously (e.g. by infusion), as a single daily dose or as multiple divided doses during the day. The clinician will generally be able to determine a suitable daily dose, depending on the factors mentioned herein. It will also be clear that in specific cases, the clinician may choose to deviate from these amounts, e.g., on the basis of the factors cited above and his expert judgment. Generally, some guidance on the amounts to be administered can be obtained from the amounts usually administered for comparable conventional antibodies or antibody fragments against the same target administered via essentially the same route, taking into account however differences in affinity/avidity, efficacy, biodistribution, half-life and similar factors well known to the skilled person.

[00479] In one embodiment, a single contiguous amino acid sequence, NB agent or polypeptide of the invention will be used, whether the translated sequences contains a single domain or multiple monovalent or multivalent domains. In one embodiment two or more amino acid sequences, NB agents and/or polypeptides of the invention are provided in combination.

[00480] The NB agents, amino acid sequences and polypeptides of the invention may be used in combination with one or more further pharmaceutically active compounds or principles, i.e., as a combined treatment regimen, which may or may not lead to a synergistic effect. Again, the clinician will be able to select such further compounds or principles, as well as a suitable combined treatment regimen, based on the factors cited above and his expert judgment.

[00481] In particular, the NB amino acid sequences and polypeptides of the invention may be used in combination with other pharmaceutically active compounds or principles that are or can be used for the prevention and/or treatment of the diseases and disorders cited herein, as a result of which a synergistic effect may or may not be obtained. Examples of such compounds and principles, as well as routes, methods and pharmaceutical formulations or compositions for administering them will be clear to the clinician, and generally include the cytostatic active principles usually applied for the treatment of the tumor to be treated.

[00482] Specific contemplated combinations for use with the NB agents of the invention include, but are not limited to, e.g., taxol; gemcitobine; cisplatin; cIAP inhibitors (such as inhibitors to cIAP1, cIAP2 and/or XIAP); MEK inhibitors including but not limited to, e.g., U0126, PD0325901; bRaf inhibitors including but not limited to, e.g., RAF265; and mTOR inhibitors including but not limited to, e.g., RAD001. Specific combinations are provided herein and in the Examples.

[00483] When two or more substances or principles are to be used as part of a combined treatment regimen, they can be administered via the same route of administration or via different routes of administration, at essentially the same time or at different times (e.g. essentially simultaneously, consecutively, or according to an alternating regime). When the substances or principles are to be administered simultaneously via the same route of administration, they may be administered as different pharmaceutical formulations or compositions or part of a combined pharmaceutical formulation or composition, as will be clear to the skilled person.

[00484] Also, when two or more active substances or principles are to be used as part of a combined treatment regimen, each of the substances or principles may be administered in the same amount and according to the same regimen as used when the compound or principle is used on its own, and such combined use may or may not lead to a synergistic effect. However, when the combined use of the two or more active substances or principles leads to a synergistic effect, it may also be possible to reduce the amount of one, more or all of the substances or principles to be administered, while still achieving the desired therapeutic action. This may, e.g., be useful for avoiding, limiting or reducing any unwanted side-effects that are associated with the use of one or more of the substances or principles when they are used in their usual amounts, while still obtaining the desired pharmaceutical or therapeutic effect.

[00485] The effectiveness of the treatment regimen used according to the invention may be determined and/or followed in any manner known per se for the disease or disorder involved, as will be clear to the clinician. The clinician will also be able, where appropriate and on a case-by-case basis, to change or modify a particular treatment regimen, so as to achieve the desired therapeutic effect, to avoid, limit or reduce unwanted side-effects, and/or to achieve an appropriate balance between achieving the desired therapeutic effect on the one hand and avoiding, limiting or reducing undesired side effects on the other hand.

[00486] Generally, the treatment regimen will be followed until the desired therapeutic effect is achieved and/or for as long as the desired therapeutic effect is to be maintained. Again, this can be determined by the clinician.

[00487] In another aspect, the invention relates to the use of an amino acid sequence, NB agent or polypeptide of the invention in the preparation of a pharmaceutical composition for prevention and/or treatment of at least one diseases and disorders associated with DR5; and/or for use in one or more of the methods of treatment mentioned herein.

[00488] The subject to be treated may be any warm-blooded animal, but is in particular a mammal, and more in particular a human being. In veterinary applications, the subject to be treated includes any animal raised for commercial purposes or kept as a pet. As will be clear to the skilled person, the subject to be treated will in particular be a person suffering from, or at risk of, the diseases and disorders mentioned herein.

[00489] The invention relates to the use of a NB amino acid sequence or polypeptide of the invention, or a NB nucleotide encoding the same, in the preparation of a pharmaceutical composition for the prevention and/or treatment of at least one disease or disorder that can be prevented and/or treated by administering a NB amino acid sequence or polypeptide of the invention, or a NB nucleotide encoding the same, and/or a pharmaceutical composition of the same to a patient.

[00490] More in particular, the invention relates to the use of a NB amino acid sequence or polypeptide of the invention, or a NB nucleotide encoding the same, in the preparation of a pharmaceutical composition for the prevention and/or treatment of diseases and disorders associated with DR5, and in particular for the prevention and treatment of one or more of the diseases and disorders listed herein.

[00491] Again, in such a pharmaceutical composition, the one or more NB amino acid sequence or polypeptide of the invention, or NB nucleotide encoding the same, and/or a pharmaceutical composition of the same, may also be suitably combined with one or more other active principles, such as those mentioned herein.

[00492] In one embodiment, although the use of the exemplary NB agents of the invention is much preferred, it will be clear that on the basis of the description herein, the skilled person will be able to design and/or generate, in an analogous manner, other amino acid sequences and in particular (single) domain antibodies against DR5, as well as polypeptides comprising such (single) domain antibodies, and/or nucleotides that encode them.

[00493] For example, it will be clear to the skilled person that it may be possible to "graft" one or more of the CDR's mentioned herein for the NB agents of the invention onto such (single) domain antibodies or other protein scaffolds, including but not limited to human scaffolds or non-immunoglobulin scaffolds. Suitable scaffolds and techniques for such CDR grafting will be clear to the skilled person and are well known in the art, see, e.g., those mentioned in WO 08/020079. For example, techniques known per se for

grafting mouse or rat CDR's onto human frameworks and scaffolds can be used in an analogous manner to provide chimeric proteins comprising one or more of the CDR's of the NB agents of the invention and one or more human framework regions or sequences.

[00494] It should also be noted that, when the NB agents of the inventions contain one or more other CDR sequences than the preferred CDR sequences mentioned herein, these CDR sequences can be obtained in any manner known per se, e.g., using one or more of the techniques described in WO 08/020079.

[00495] Further uses of the amino acid sequences, NB agent s, polypeptides, nucleic acids, genetic constructs and hosts and host cells of the invention will be clear to the skilled person based on the disclosure herein. For example, and without limitation, the amino acid sequences of the invention can be linked to a suitable carrier or solid support so as to provide a medium than can be used in a manner known per se to purify DR5 from compositions and preparations comprising the same. Derivatives of the amino acid sequences of the invention that comprise a suitable detectable label can also be used as markers to determine (qualitatively or quantitatively) the presence of DR5 in a composition or preparation or as a marker to selectively detect the presence of DR5 on the surface of a cell or tissue (for example, in combination with suitable cell sorting techniques).

[00496] The invention will now be further described by means of the following non-limiting experimental part.

1. Example I

1.1. Human and cyno DR5 cloning and protein preparation

1.1.1. Cloning of human long form DR5 extracellular domain (ECD) and cyno long and short form DR5 ECD

[00497] The human long form DR5 ECD (aa55-213) is cloned by RT-PCR. Total RNA are isolated from Jurkat and Raji cells by Qiagen's RNeasy mini Kit (Cat No. 74104). cDNA is made by the SuperScript II First Strand Synthesis System (Invitrogen, Cat: 11904-018) then are amplified by High Fidelity Platinum Taq DNA Polymerase (Invitrogen, Cat no.11304-011) using standard protocol: 94°C for 2 min followed by 30 cycles of 95°C/30 seconds, 55°C/30 seconds, 72°C/60 seconds and a final incubation at 72°C for 7 min. The forward and reverse primers used for PCR are: 5'-CTGATCACCC AACAAGACCT AG-3' (SEQ ID NO: 83) and 5'-GCCTGAGAGA GAACAGGGAG A-3' (SEQ ID NO: 84) respectively. The resulting 476 bp fragment is then ligated into E. coli expression vector pBAD/Thio-TOPO (Invitrogen, Cat No. K370-01). Positive clones are identified by PCR and confirmed by DNA sequencing.

[00498] The full length cyno DR5 gene is originally cloned from cynomolgus liver cDNA (BioChain Institute, Inc. USA) by PR-PCR. The forward (5'-CACCATGGAA CAACGGGGAC AGAACGCC-3') (SEQ ID NO: 85) and reverse (5'-TTAGGACATG GCAGAGTCTG CATTACCTTC-3') (SEQ ID NO: 86) primers are designed based on the human DR5 nucleotide sequence, including the start (ATG) and stop (TAA) codons respectively. High Fidelity Platinum Taq DNA Polymerase (Invitrogen, Cat no.11304-011) is used for PCR and the resulting fragments are ligated into the pcDNA3.1 directional TOPO vector. The positive colonies are identified by DNA sequencing. Similar to human DR5 gene, two splicing alternatives of cyno DR5 gene are identified. One has the long form ECD, and the other has the short form ECD.

[00499] Both cyno long (aa55-213) and short (aa55-174) form of DR5 ECD are further cloned into pBAD/Thio-TOPO vector (Invitrogen, Cat No. K370-01). Positive clones are identified by PCR and are confirmed by DNA sequencing.

1.1.2. Establishment of CHO cell lines expressing cell surface cyno DR5

[00500] Chinese Hamster Ovary cells (CHO-K1) are transfected at 90-95% confluency using FuGENE6 (Roche Applied Sciences) and 1 µg pcDNA3.1-cynoDR5 expression vector. Transfected cells are selected by 500µg/ml Geneticin (G418) and are subcloned by cell sorting.

1.1.3. Expression and purification of thioredoxin-DR5ECD-His6 fusion from E. coli

[00501] For expression of DR5 ECD, pBAD/Thio-DR5ECD is transformed into E. coli strain TOP10 (Invitrogen, Cat No. C4040-03). A single colony is used to inoculate 100ml LB containing 100µg/ml ampicillin. This culture is incubated overnight at 37°C with shaking at 225rpm. Three liters of LB/ampicillin are inoculated with 30 ml of the overnight culture and shaken at 37°C till the OD_{600} reaches 0.5. The culture is then induced with 0.02% arabinose for 3 hours at 37°C. The bacterial pellet is resuspended in 21ml lysis buffer (PBS with 0.3M NaCl, 0.4% Triton X-100 and 10mM imidazole) containing protease inhibitors (Roche, Cat No. 1836153). Lysate is sonicated two times for 60 seconds followed by centrifugation at 20,000 x g for 20 min. Soluble Hisx6 tagged DR5 ECD is purified by nickel chelate affinity chromatography. Soluble Hisx6 tagged DR5 ECD is created by inserting the sequence encoding the polypeptide tag of SEQ ID NO: 91 or 92 at the 3' end of the reading frame of the DR5 construct, wherein the tag is expressed at the C-terminal end of the polypeptide. Clarified lysate is passed over 6ml of Ni-NTA Agarose (Qiagen, Cat No. 30210) equilibrated with lysis buffer. The column is washed with 20ml of lysis buffer followed by 15ml of PBS containing 50mM imidazole and 0.1% Triton X-100. DR5 ECD protein is then eluted with 10ml PBS containing 100mM imidazole and 0.1 % Triton X-100 followed by the same buffer containing 250mM imidazole. Fractions are

checked on 4-12% NuPAGE Bis-Tris gel (Invitrogen, Cat No. NP0329BOX). Positive fractions containing the DR5 ECD protein are pooled, concentrated and stored at -20°C.

[00502] After nickel chelate affinity chromatography, the protein is further purified by size exclusion chromatography done on Amersham AKTA explorer with software program Unicorn. The column is HiPrep 26/60 Sephacryl S-200 HR with bed volume of 320ml (Amersham, Cat No. 17-1195-01). The standard parameters are used according to manufacture's recommendations. Briefly, 1xPBS buffer (pH7.2) flew through the column at 0.5ml/min, and 0.5ml/fraction is collected at 4°C.

[00503] The last step of purification is ion exchange chromatography. The anion-exchanger Mono Q 5/50 GL column (Amersham, Cat No. 17-5166-01) is used with gradient elution at flow rate 1ml/min, and 0.5ml/fraction is collected at 4°C.

1.1.4. Expression and purification of DR5ECD-Fc fusion protein from HEK293 cells

[00504] Both human and cyno, long form and short form DR5 ECD are cloned into pRS5a-IgG expression vector containing a CMV promoter and a human IgG1 Fc gene fragment. Positive clones are identified by PCR and confirmed by DNA sequencing. HEK293 cells are transient transfected with Lipofectamine 2000 (Gibco, lot no.11317078). The medium containing DR5ECD-Fc fusion protein is collected seven days post transfection. The concentrated supernatant is adjusted to pH 7.2, clarified by filtration and loaded onto a 5 ml Protein A-Sepharose FF column at 0.5 ml/min. After baseline washing with PBS, pH 7.3, bound material is eluted with 50 mM Citrate/140 mM NaCl, pH 2.7, neutralized and sterile filtered.

1.2. Immunizations

[00505] Three llamas are immunized with human DR5 antigen. One llama (106) is immunized with the short (133 residues) recombinant human DR5 (Peprotech, Rocky Hill NJ, catalog # 310-19). Two other llamas are immunized with full ectodomain human DR5-thioredoxin fusion. The llamas receives seven weekly doses, injected intramuscularly of 50-100 microgram of antigen (with Stimune (Cedi Diagnostics, Lelystad NL) as an adjuvant), followed by an additional 50 microgram dose two weeks later. Immune blood samples are taken at day 47 and 88 after the start of the immunizations as well as lymph node tissues at day 88.

1.3. Library constructions

[00506] cDNA samples are made from total RNA preparations of the immune blood and lymph node samples. Nucleotide sequences encoding DR5 NB constructs are amplified from the cDNA samples of the three llamas immunized with human DR5 in a one-step RT-PCR reaction using primers ABL051 (SEQ ID NO: 73), ABL052 (SEQ ID NO:

74) and ABL003 (SEQ ID NO: 75). Primer sequences are shown in Table 5. The 700 bp amplicons amplified from the IgG2 and IgG3 cDNA's in the sample are isolated from gel and subsequently used as template in a nested PCR reaction using the ABL050-MfeI primer (SEQ ID NO: 76) containing *Sfi*I and *Mfe*I restriction sites and the ABL003 primer. The PCR products are subsequently digested with *Sfi*I and *BstE*II (naturally occurring in FR4 of V_{HH} genes) and ligated into the corresponding restriction sites of phagemid vector pAX50 to obtain a library after electroporation in *Escherichia coli* TG-1. pAX50 is an expression vector derived from pUC119 which contained the LacZ promoter, a coliphage pIII protein coding sequence, a resistance gene for ampicillin or carbenicillin, a multicloning site and the gen3 leader sequence. In frame with the NB construct coding sequence, the vector coded for a C-terminal c-myc tag and a (His)6 tag. The phagemid vector allows for production of phage particles, expressing the individual DR5 NB constructs as a fusion protein with the *gene*3 product.

Table 5: Primer and linker sequences, with SEQ ID NO

Name	Sequences (5' to 3')	ID
ABL051	GGCTGAGCTG GGTGGTCCTG G	73
ABL052	GGCTGAGTTT GGTGGTCCTG G	74
ABL003	GGTACGTGCT GTTGAACTGT TCC	75
ABL050-MfeI	CATTTGAGTT GGCCTAGCCG GCCATGGCAG AGGTGCAATT GGTGGAGTCT GGGGG	76
M13Fwd	TGTAAAACGA CGGCCAGT	77
M13Rev	CAGGAAACAG CTATGACC	78
Rev_30GlySer	TCAGTAACCT GGATCCCCCG CCACCGCTGC CTCCACCGCC GCTACCCCCG CCACCGCTGC CTCCACCGCC TGAGGAGACG GTGACCTG	79
For_GlySer35	AGGTTACTGA GGATCCGGCG GTGGAGGCAG CGGAGGTGGG GGCTCTGGTG GCGGGGGTAG CGAGGTGCAG CTGGTGGAGT CTGG	80
DR5 ECD For	CTGATCACCC AACAAGACCT AG	83
DR5 ECD Rev	GCCTGAGAGA GAACAGGGAG A	84
DR5 cyno For	CACCATGGAA CAACGGGGAC AGAACGCC	85
DR5 cyno Rev	TTAGGACATG GCAGAGTCTG CATTACCTTC	86

1.4. Selections

[00507] Different concentrations between 0 and 1 microgram/ml short (182 amino acids) human DR5-Fc fusion protein (R&D Systems, Minneapolis MN, catalogue # 631-T2/CF), full-ectodomain human DR5-Fc fusion protein ((human DR5 amino acids 56 to 213 fused with human IgG1 Fc) and biotinylated short (133 residues) recombinant human DR5 (Peprotech, Rocky Hill NJ, catalog # 310-19) are immobilized on plates and streptavidin-coated plates, respectively. Blocking is done using PBS supplemented with 1% casein.

Phages prepared from the three above mentioned pAX50 libraries are added and incubated for 30 minutes (in PBS supplemented with 0.1% casein and 0.1% tween20). Unbound phages are washed away (with PBS supplemented with 0.05% tween20); bound phages are eluted by addition of trypsin (1mg/ml in PBS) and 30 min incubation at 37°C. Eluted phages are allowed to infect exponentially growing TG-1 cells that are then plated on ampicillin containing LB agar plates. Phages prepared from selected outputs are used as inputs in a second selection round on full-length human DR5-Fc fusion protein (human DR5 amino acids 56 to 213 fused with human IgG1 Fc) and biotinylated short (133 residues) recombinant human DR5 (Peprotech, Rocky Hill NJ, catalog # 310-19) as described above.

[00508] Plasmid DNA of the round 1 and 2 selection outputs is prepared, digested with *Sfi*I and *Bst*EII, and the DNA fragments encoding anti-DR5 NB constructs are ligated into pAX51 vector and transformed into TG-1 competent cells. pAX50 is an expression vector derived from pUC119 which contained the LacZ promoter, a resistance gene for ampicillin or carbenicillin, a multicloning site and the gen3 leader sequence. In frame with the NB construct coding sequence, the vector coded for a C-terminal c-myc tag and a (His)6 tag. Carbenicillin resistant clones are analyzed for the presence of insert and sequences of positive clones are verified. TG-1 cells containing the DR5 NB constructs of interest are grown in TB medium supplemented with carbenicillin and induced by addition of IPTG for expression. The expression is allowed to continue for 4 hours at 37°C. After centrifugation, cell pellets are frozen overnight, then resuspended for 1 hour at 4°C in PBS ($1/10^{th}$ of culture volume), again followed by centrifugation. The resulting supernatant is used as periplasmic extract.

1.5. Screening

[00509] Periplasmic extracts (as described above) are analyzed for DR5 binding by ELISA. 10-fold dilutions of periplasmic extracts are added to plates coated with short (133 residues) recombinant human DR5 (Peprotech, Rocky Hill NJ, catalog # 310-19) or cynomolgus DR5-Fc fusion protein (cyno DR5 amino acids 56 to 213 fused with human IgG1 Fc) amino acids 56 to 213, IgG1 NVTS) and incubated for 2 hours (in PBS supplemented with 0.1% casein and 0.1% tween20). Unbound periplasmic extracts are washed away (PBS supplemented with 0.05% tween20) and bound NB constructs are detected using mouse anti-myc (Roche, Basel CH, catalogue # 11667149001) followed by rabbit anti-mouse-alkaline phosphatase (Sigma, St. Louis MO, catalogue # A-1902).

[00510] In another set of experiments, cell lines expressing human DR5 (Colo205) or cynomolgus DR5 (CHO-K1 cells transfected with an expression vector carrying the full length cynoDR5 gene downstream of a CMV promoter) are exposed to the periplasmic extracts (resuspended in PBS supplemented with 10% fetal calf serum). Binding of NB

constructs to cell-bound DR5 is detected using mouse anti-myc (monoclonal antibody, clone 9E10 ATCC (Teddington, UK) number CRL-1729), is produced in mice as ascites and purified in-house using standard affinity chromatography) followed by anti-mouse IgG-phytoerythrin (Jackson ImmunoResearch Laboratories, West Grove, PA, catalogue # 115-115-164). Dead cells are counterstained with TO-PRO-3 (Molecular Probes, Carlsbad CA, catalogue # T3605). Results are shown in Table 6.

Table 6: Binding of monomeric NB constructs to DR5 by ELISA (ABS_{405nm})

NB Construct	Human	Cyno
10F1	0.754	0.124
11D1	0.540	0.213
11H6	0.552	0.133
4E6	0.838	0.313
7A12	0.812	0.341

[00511] Binding of NB constructs to DR5 is evaluated by surface plasmon resonance on a Biacore 3000 instrument. Specificity of binding is analyzed by allowing dilutions of the periplasmic extracts to pass over a CM5 sensor chip coated with 270 RU short (133 residues) recombinant human DR5 (Peprotech, Rocky Hill NJ, catalog # 310-19). The dissociation phases are analyzed and corresponding off-rates (k_{off}) are given in Table 7 and Table 8. Table 7 shows results for the binding of monomeric NB constructs to cell-bound DR5 by FACS (mean count fluorescence). Table 8 shows results for off-rates as determined by Surface Plasmon Resonance. Sequences are provided in Tables 1-4.

Table 7: Binding of monomeric NB constructs to cell-bound DR5 by FACS

NB construct	Human	Cyno
10F1	125	1626
11D1	919	417
11H6	723	292
4E6	972	2868
7A12	1097	24516

Table 8: Off-rates (1/s) as determined by Surface Plasmon Resonance

NB construct	k_{off} (1/s)
10F1	2.34×10^{-03}
11D1	4.44×10^{-04}
11H6	2.12×10^{-03}
4E6	9.54×10^{-05}
7A12	1.90×10^{-04}

2. Example II

2.1. Trimerization

[00512] DNA fragments encoding anti-DR5 NB constructs are digested with *Mfe*I and *Bst*EII and cloned into pAX73, pAX74 and pAX75 vectors in frame with linker sequences. These are transformed into TG-1 competent cells and kanamycin resistant clones are analyzed for the presence of insert and sequence verified. The resulting constructs are digested with *Sfi*I, *Bpu*AI and *Not*I and the NB construct containing fragments are then cloned through a four-point ligation into *Sfi*I–*Not*I digested pAX51 vector. Positive carbenicillin resistant clones, i.e., those encoding trivalent CMYC-HIS6-tagged NB construct constructs (each NB construct building block fused to the next by a linker sequence), are again sequence verified. pAX73, pAX74, pAX75 and pAX83 are pUC-derived cloning vectors that contain a resistance gene for kanamycin or neomycin, multicloning sites and in frame with the NB construct coding sequence, these vectors encode GlySer linker sequences.

2.2. Tetramerization

[00513] DNA fragments encoding anti-DR5 NB constructs are amplified by means of PCR using M13Rev (SEQ ID NO: 78) and Rev_30GlySer (SEQ ID NO: 79) or For_GlySer35 (SEQ ID NO: 80) and M13Fwd (SEQ ID NO: 77) respectively. Both Rev_30GlySer and For_GlySer35 encode linker sequences (primer sequences in Table 5). The PCR products are digested with *Mfe*I, *Bam*HI and *Bst*EII and both fragments are jointly cloned through a three-point ligation in pAX75 and in pAX83, in frame with vector encoded linker sequences. These are transformed into TG-1 competent cells and kanamycin resistant clones are analyzed for the presence of bivalent NB construct insert and sequence verified. Positive bivalent clones are then digested with *Sfi*I, *Bpu*AI and *Not*I and the NB construct containing fragments are then cloned into *Sfi*I–*Not*I digested pAX51 vector. Positive carbenicillin resistant clones, encoding tetravalent NB construct constructs, each NB construct building block fused to the next by a linker sequence, are again sequence verified.

2.3. Pentamerization

[00514] Synthetic genes encoding the fourth GlySer linker sequence and the fifth NB building block are ordered from GeneArt AG (Regensburg, Germany). These fragments are then digested with HgaI and NotI and ligated into BstEII-NotI digested tetravalent NB constructs.

2.4. Small scale expression

[00515] TG-1 cells containing the multivalent anti-DR5 NB constructs of interest are grown in baffled shaker flasks containing TB medium plus 100 μg/ml Carbenicillin and

induced by addition of 1mM IPTG for expression. The expression is allowed to continue for 4 hours at 37°C. After collecting the cells, periplasmic extracts are prepared and the HIS6-tagged NB constructs are purified by immobilized metal affinity chromatography (HisTrap FF Crude, GE Healthcare) followed by gel filtration chromatography (Superdex 75 HR16/10, GE Healthcare) in PBS.

3. Example III

3.1. Binding on Biacore

[00516] Biacore CM5 sensor chips are coated with short (182 amino acids) human DR5-Fc fusion protein (R&D Systems, Minneapolis MN, catalogue # 631-T2/CF) or cynomolgus DR5-Fc fusion protein (amino acids 56 to 213, IgG1 NVTS). Different concentrations (1 to 100nM) of monovalent and multivalent anti-DR5 NB constructs are then floated over the chips for a kinetic analysis of the binding interaction. All multivalent anti-DR5 NB constructs bind to human and cynomolgus DR5 (Table 9).

Table 9: Affinities (M) of anti-DR5 NB constructs as determined by surface plasmon resonance

Clone	Human DR5			Cynomolgus DR5		
	Mono	Tri	Tetra	Mono	Tri	Tetra
11D1	1.0×10^{-9}	$<3.0 \times 10^{-11}$	ND	2.2×10^{-7}	$<2.0 \times 10^{-10}$	ND
7A12	7.3×10^{-9}	$<3.0 \times 10^{-12}$	ND	7.1×10^{-9}	$<3.0 \times 10^{-11}$	ND
10F1	4.2×10^{-9}	$<5.0 \times 10^{-11}$	3.9×10^{-12}	1.4×10^{-7}	$<6.0 \times 10^{-10}$	2.2×10^{-11}
11H6	6.7×10^{-9}	$<2.0 \times 10^{-10}$	ND	9.2×10^{-6}	$<3.0 \times 10^{-10}$	ND
4E6	1.7×10^{-10}	$<5.0 \times 10^{-11}$	ND	1.6×10^{-8}	$<9.0 \times 10^{-11}$	ND

ND: Not determined; BDL: below detection limit

3.2. Binding on FACS

[00517] In another set of experiments, cell lines expressing human (Colo205) or cynomolgus (CHO-K1 cells transfected with an expression vector carrying the full length cynoDR5 gene downstream of a CMV promoter) DR5 are exposed to 1nM of multivalent anti-DR5 NB constructs (resuspended in PBS supplemented with 10% fetal calf serum). Binding of NB constructs to cell-bound DR5 is detected using mouse anti-myc (monoclonal antibody, clone 9E10 ATCC (Teddington, UK) number CRL-1729, is produced in mice as ascites and purified in-house using standard affinity chromatography) followed by anti-mouse IgG-phytoerythrin (Jackson ImmunoResearch Laboratories, West Grove, PA, catalogue # 115-115-164). Dead cells are counterstained with TO-PRO-3 (Molecular Probes, Carlsbad CA, catalogue # T3605). All multivalent NB constructs bind specifically to cell bound human and cynomolgus DR5. Binding of the NB agents to each of the short

form and the long form of DR5 is roughly equivalent for each, suggesting that all epitopes are held in common between the two forms

[00518] In another experiment, apparent binding constants are estimated from saturation binding experiments on FACS (as described above) of 10 to 0.005 nM tetravalent anti-DR5 NB constructs to cell bound human and cynomolgus DR5. Apparent binding constants are calculated using GraphPad Prism 5 (GrafPad Software, San Diego, CA).

3.3. DR5-specificity

[00519] A group of TNF receptor superfamily members are selected for testing the DR5 specificity (Table 10). The extracellular domain of members of the TNF receptor superfamily are cloned into pBadThioTopo and transformed into E. coli strain TOP10 (Invitrogen #C4040-03). The protein is expressed according to the protocol of manufacturer. The cell lysates are collected for ELISA screening. 25 µL of 20 % BSA is added per 10 mL of lysate. His capture plates (Sigma #S-5688) are coated with 100 µL of lysate and incubated 1 hour at room temperature. The remaining solution is aspirated and wells are washed three times with PBS + 0.05 % Tween (PBST). The primary antibodies are diluted as follows in Blocking Buffer (PBS containing 10 % FBS); LBY135 (positive control, anti-DR5 antibody, Novartis AG) is diluted to 0.24 mg/mL and rabbit anti-V5 (Abcam #Ab9116-100) is diluted 1:5000. 100 µL of diluted primary antibody is added per well. Assay plates are incubated at room temperature for one hour and then washed three times with PBST. The secondary antibodies (goat anti-rabbit IgG-HRP) (Jackson Immunoresearch Laboratories #111-035-046) for wells incubated with V5, and goat anti-human IgG-HRP (Jackson Immunoresearch Laboratories #109-035-098) for wells incubated with LBY135) are diluted 1:5000 in PBS containing 5 % FBS and 0.025 % Tween. 100 µL of secondary antibody is added to appropriate wells. After incubation at room temperature for 1 hr, the plates are washed three times with PBST. 100 µL of Sure Blue (KPL #52-00-03) is added and once the color had developed, the plates are read at an absorbance of 650 nm.

Table 10: TNF receptor superfamily members

TNFR number	TNFR name	Accession Number	ECD
TNFRSF1A	TNFR1	NM001065	Leu34-Thr211
TNFRSF1B	TNFR2	M32315	Thr27-Leu241
TNFRSF3	TNFR3	L04270	Pro30-Thr224
TNFRSF4	OX40	X75962	Gly33-Gly212

TNFRSF5	CD40	X60592	Val18-Leu192
TNFRSF6	FAS	M67454	Ser20-Gly175
TNFRSF6B	DcR3	AF104419	Val27-Ala176
TNFRSF7	CD27	M63928	Thr21-Ser187
TNFRSF9	CD137	L12964	Glu19-Ile188
TNFRSF10C	DcR1	AF012536	Thr27-Leu241
TNFRSF10D	DcR2	AF029761	Thr57-Thr198
TNFRSF11B	OPG	U94332	Lys17-Ile197
TNFRSF13	BCMA	NM001192	Met1-Thr56
TNFRSF13B	TACI	NM012452	Met2-Val161
TNFRSF13C	BAFFR	NM052945	Met1-Gly64
TNFRSF16	NGFR	M14764	Lys29-Ile233

[00520] All NB constructs specifically bind to DR5, but not to other TRAIL and TNF receptor family members. See, e.g., Figure 1.

3.4. Biacore epitope mapping

[00521] Biacore off-rate screening (Table 8) on short (133 residues) recombinant human DR5 (Peprotech, Rocky Hill NJ, catalog # 310-19) revealed that all anti-DR5 NB constructs bind to the extracellular domain of DR5 but not to the 29 residue alternatively spliced region (amino acid residues 185 to 231).

[00522] In another experiment, Biacore CM5 sensor chips are coated with monovalent anti-DR5 NB constructs (230 to 520 RU). Then, 500nM of short (133 residues) recombinant human DR5 (Peprotech, Rocky Hill NJ, catalog # 310-19) is floated over the chips until saturation is reached. At this point, 50nM human TRAIL (R&D Systems, Minneapolis MN, catalogue # 375-TEC/CF) is floated over the chips and the increase in binding signal is used to categorize the NB constructs in different epitope classes compared to the TRAIL epitope (Table 11).

Table 11: Epitope mapping of anti-DR5 NB constructs compared to TRAIL

NB construct	Result
11D1	No TRAIL blocking
4E6	Partial TRAIL blocking
10F1	TRAIL blocking
11H6	No TRAIL blocking

7A12	TRAIL blocking

3.5. In vitro cell survival

[00523] Cells are maintained in logarithmic growth phase prior to the experiments. On the day of the assay, cells are transferred to 96-well plates (Corning Inc., Lowell, MA, Cat#3917) at 5,000 - 20,000 cells per well, then series diluted anti-DR5 NB constructs are added at 50 µl/well. After incubation for 24 to 72 hours, the relative number of surviving cells are quantified using a luciferase-based ATP quantification Kit (Cell Titer Glo, Promega, Madison, WI Cat#G7571) and read on a luminescence plate reader (Fluoroskan Ascent FL, Thermo Electron, Waltham, MA).

[00524] A panel of trivalent anti-DR5 NB constructs is screened in a cell survival assay with Colo205 cells. All trivalent constructs induced apoptosis on Colo205 (see Table 12) in contrast to their monovalent counterparts (data not shown) that are not biologically active in this assay. A tetravalent construct of an irrelevant (non-DR5 binding) NB construct did not induce apoptosis.

Table 12: In vitro potency (IC_{50} (M)) of trivalent anti-DR5 NB constructs on Colo205

NB construct	IC_{50} (M)
10F1 tri	4.07×10^{-11}
11D1 tri	1.11×10^{-10}
11H6 tri	4.58×10^{-11}
4E6 tri	3.79×10^{-11}
7A12 tri	1.20×10^{-10}

[00525] In another experiment (Table 13), selected trivalent anti-DR5 NB constructs are screened in cell survival assays against a panel of tumor and normal cell lines.

Table 13: In vitro potency (IC_{50} (M)) of trivalent anti-DR5 NB constructs

	4E6 tri	11D1 tri	10F1 tri	7A12 tri	11H6 tri
Jurkat	20	20	20	20	20
Molt4	20	20	20	20	20
A549	20	20	20	20	20
H226	2.0×10^{-11}	3.0×10^{-11}	2.0×10^{-11}	3.0×10^{-11}	20
H2052	6.0×10^{-12}	1.5×10^{-11}	1.3×10^{-11}	6.4×10^{-11}	3.6×10^{-10}
H2122	2.0×10^{-12}	4.0×10^{-12}	3.0×10^{-12}	8.0×10^{-12}	1.2×10^{-11}
M30	20	20	20	20	20
Panc-1	20	20	20	20	20
MiaPaCa-2	2.3×10^{-11}	20	20	20	20
ARPE-19	20	20	20	20	20
IMR-90	20	20	20	20	20
Huvec	20	20	20	20	20

20: IC_{50} 20nM

[00526] In another experiment (Table 14), selected tetravalent anti-DR5 NB constructs are screened in cell survival assays against a panel of tumor and normal cell lines.

Table 14: In vitro potency (IC_{50} (M)) of tetravalent anti-DR5 NB constructs

	4E6 tetra	11D1 tetra	10F1 tetra	7A12 tetra	11H6 tetra
Colo205	8.0×10^{-13}	8.1×10^{-12}	2.0×10^{-12}	6.6×10^{-12}	3.7×10^{-12}
Jurkat	6.0×10^{-13}	3.5×10^{-11}	3.0×10^{-12}	3.7×10^{-11}	9.1×10^{-12}
Molt4	$<1.0 \times 10^{-13}$	1.5×10^{-11}	2.0×10^{-12}	20	8.0×10^{-13}
A549	3.3×10^{-10}	20	20	20	20
H2122	8.0×10^{-13}	8.0×10^{-12}	1.0×10^{-12}	3.6×10^{-12}	2.8×10^{-12}
H226	1.0×10^{-11}	8.9×10^{-11}	2.4×10^{-11}	20	1.1×10^{-10}
H2052	8.0×10^{-13}	2.5×10^{-11}	4.0×10^{-12}	3.3×10^{-11}	1.5×10^{-11}
M30	20	20	20	20	20
Panc-1	3.0×10^{-12}	20	9.0×10^{-12}	20	2.2×10^{-10}
MiaPaCa-2	1.8×10^{-12}	1.9×10^{-11}	2.8×10^{-11}	4.1×10^{-11}	1.1×10^{-11}
BxPC-3	1.9×10^{-12}	4.1×10^{-11}	3.0×10^{-12}	2.3×10^{-11}	2.7×10^{-11}
Malme-3	20	20	20	20	20
WI-38	20	20	20	20	20
ARPE-19	20	20	20	20	20
184A1	20	20	20	20	20
Huvec	20	20	20	20	20
HAAE-1	20	20	20	20	20

20: IC_{50} 20nM

[00527] Graphic representations showing that increasing the hierarchy of multimers results in increased efficacy and potency is shown in Figures 6A, 6B and 6C, wherein trimeric, tetrameric and pentameric 11H6 and 4E6 NB constructs have increasing potency, respectively, against treated Colo205 and H226 tumor cells in vitro.

[00528] The multivalent anti-DR5 NB constructs display apoptosis-inducing activity on tumor cell lines but not on normal (healthy) cell lines. The general trend is that increased apoptosis-inducing activity is seen with an increased number of subunits in a multimeric NB composition. Increasing from tetrameric to pentameric forms of the NB provides evidence of further increase in potency in cell death assays, as exemplified by lowering the IC50 or increasing the maximum cell death achieved depending on the cell line.

3.6. Cross-linking

[00529] In another experiment, multivalent NB constructs (10 micrograms) that contain a cMYC tag are cross-linked through their CMYC-tag with 1.5 μg up to 150 micrograms of mouse anti-myc (monoclonal antibody, clone 9E10 ATCC (Teddington, UK) number CRL-1729) is produced in mice as ascites and purified in-house using standard affinity

chromatography) during a 30 minute incubation at room temperature. The cross-linked NB constructs are then evaluated in in vitro cell survival assays. Increased cross-linking correlated with improved potency and efficacy (see Tables 15-16). Table 15 provides *in vitro* potency (IC50 (M)) of trivalent anti-DR5 NB constructs cross-linked with different amounts of antibody on Jurkat cells. Table 16 provides *in vitro* efficacy (% dead cells) of tetravalent anti-DR5 NB constructs cross-linked with different amounts of antibody on Jurkat cells. The general trend is that more cells are killed with increased amounts of cross-linking of the tagged NB multimers.

Table 15: In vitro potency (IC_{50} (M)) of cross-linked trivalent anti-DR5 NB constructs

Jurkat cells	Weight ratio (µg/µg)	IC_{50} (M)
11D1 tri	0	No apoptosis observed
11D1 tri	0.15	1.1×10^{-8}
11D1 tri	15.0	7.3×10^{-10}

Ratio: Weight ratio of cross-linking antibody / tetravalent anti-DR5 NB constructs

Table 16: In vitro efficacy (% dead cells) of cross-linked tetravalent anti-DR5 NB constructs

Jurkat cells	Weight ratio (µg/µg)	Efficacy (% dead cells)
11D1 tetra	0	48
11D1 tetra	0.15	48
11D1 tetra	0.75	60
11D1 tetra	1.5	63
11D1 tetra	7.5	88
11D1 tetra	15.0	93

Ratio: Weight ratio of cross-linking antibody / tetravalent anti-DR5 NB constructs

3.7. Serum stability

3.7.1. NB constructs and DR5 binding in ELISA

[00530] NB constructs are pre-incubated with 100% fresh human serum at 37°C for 24 hours. Flat bottom 96-well ELISA plates (Costar, Cambridge, MA, Catalog No.3590) are coated overnight at 4°C with 50µl DR5-Fc fusion protein (DR5 amino acids 56 to 213) at 1µg/ml in PBS. The plates are then blocked with 300 µl 2% BSA (Gibco, Grand Island, NY, Cat#11018-025) in PBS for one hour and washed three times. NB construct samples are serially diluted in the PBS buffer containing 10% human serum, then added in ELISA plates and incubated for one hour at room temperature. After wash, 1:5000 HRP conjugated anti-myc polyclonal antibody (Invitrogen: 460709) or 1:7000 rabbit anti-V_{HH} antibody followed by 1:15000 HRP conjugated anti-rabbit IgG (Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc. West Grove, PA, Cat#115-035-072) is added in plates. After a final set of washes, 100µl/well of TMB Microwell peroxidase substrate (BioFX, Owings Mills, MD, Catalog No.TBNP-1000-01) is added and incubated at room temperature for 10 minutes.

The reaction is stopped with 100µl Stop Reagent (BioFX, Owings Mills, MD, Cat#LSTP-0100-01). Colorimetric detection of the product is done at 450nm in SpectraMax M5 microplate reader (Molecular Devices, Sunnyvale, CA). Data is analyzed with SoftMax Pro software (Molecular Devices, Sunnyvale, CA) according to its user's manual.

[00531] Human serum shows little interference with NB construct trimers or tetramers binding to DR5, detected by either anti-Myc or anti- NB construct-antibody.

3.7.2. NB construct function in cell survival assay

[00532] Cell survival assays are also performed in presence and absence of about 10 - 15% human serum albumin. Tetravalent anti-DR5 NB constructs maintain their in vitro potency compared to control assays in the presence of 10% fetal calf serum.

4. Example IV

4.1. Single dose in vivo trivalent anti-DR5 NB constructs

[00533] Outbred athymic (nu/nu) female mice (Harlan Sprague Dawley, Indianapolis, IN) are anesthetized and implanted s.c. into the right axillary (lateral) region of each animal with 1 x 10^6 Colo205 cells. Tumors are allowed to grow until the size of 200 mm^3 before the dosing is initiated. NB construct is formulated as a solution in PBS and administered single dose at 200ug/mouse by a bolus i.v. injection. Tumor samples are collected from groups of animals (one group per time point, 3 animals per group) at 1h, 2h, 4h and 8h.

[00534] Part of the tissue samples are used for immunohistochemical (IHC) staining of Caspase3. The tissues are immediately put into 10% neutral buffered formalin (NBF, Fisher Scientific, Pittsburgh, PA, Catalog No.SF100-20), processed and embedded into paraffin blocks. Sections of 4.0µm are cut on to SuperFrost Plus charged slides (Fisher Scientific, Catalog No.12-550-15). The sections are deparaffinized in xylene (5 minutes X2) and hydrated in a graded series of alcohols (100% alcohol for 5 minutes, 95% alcohol for 2 minutes, 70% alcohol for 2 minutes, and de-ionized water for 5 minutes). The hydrated sections underwent antigen retrieval which is conducted by microwaving the slides in citric acid buffer (0.01M, pH 6.0, BioGenex, San Ramon, CA, Catalog No.HK080-9K) for 10 minutes. The slides are placed onto the staining racks of the autostainer (Dako Cytomation) after they are washed with de-ionized water for 5 minutes. The following steps are done with the Dako automated system at room temperature. Between each steps, the slides are rinsed with the rinse buffer (OptiMax Wash Buffer, Biogenex, Catalog No.HK583-5K) three times. Endogenous peroxidase is blocked by incubation of the slides with hydrogen peroxide (Dako, Catalog No.S2001) for 10 minutes. The nonspecific antigen reaction is blocked by the Block Serum (Dako, Catalog No.X0909) for 10 minutes. The slides are incubated with the cleaved Caspase3 rabbit polyclonal antibody (Cell Signaling Technology, Beverly, MA, Catalog No.9661) for 60 minutes, then rinsed and exposed to

the peroxidase conjugated antibody (DAKO Envision system, Catalog No.K4003) for 30 minutes. For detection, DAB (3, 3'-diaminobenzidine) solution (Dako Cytomation, Catalog No.K3468) is applied for 2 minutes. Immunostained slides are lightly counterstained with Harris Hematoxylin (SurgiPath, Catalog No.01560), dehydrated through a series of increasing alcohol concentrations (70%, 95 % and 100% alcohol, each for 1 minute) and xylene (5 minutes X2), and mounted with a coversliper (Leica).

[00535] The slides are scanned into the digitized slide database using the Aperio system (Aperio Technologies, Inc. Vista, CA) and image analysis is done by using the optimized Positive Pixel Counting Algorithm from Aperio. The whole sections excluding necrotic areas and host tissue portion "marked out" by using the tools provided by the imaging system are used for image analysis. All multivalent anti-DR5 NB constructs induce Caspase3 activation.

[00536] Part of the tissue samples are mixed with T-per buffer (Pierce, Rockford, IL, Catalog No. 78510) then immediately homogenized in the tissue lyser (Qiagen, Catalog No. 85210). The supernatant of tissue lysate is collected and its protein concentration is determined using a standard BCA assay (Pierce, Catalog No. 1856210). The tissue lysates are used in the following assays to check NB construct and antibody concentration plus Caspase3 activity in tumor.

[00537] NB construct concentration is determined in ELISA. The ELISA plates (Nunc, Rochester NY, Catalog No. 439454) are coated overnight at 4 °C with 100µl human DR5-Fc fusion protein (DR5 amino acids 56 to 213) at 1 µg/ml in PBS, then blocked with 1%BSA (Gibco, Catalog No.11018-025) in PBS for 1 hour at room temperature and then washed three times. The serially diluted serum or tissue lysate samples are transferred into ELISA plates along and incubated 1.5 hours at room temperature. Following three washes, 1/22500 diluted anti-V_{HH} is added to the ELISA plates, and incubated for one hour at room temperature. The plates are washed three more times and then incubated for one hour with 100 µl/well of 1/20000 diluted HRP-goat-anti-rabbit (Pierce, Catalog No. 31462). After a final set of washes, 100 µl/well of TMB Microwell peroxidase substrate (BioFX, Owings Mills, MD, Catalog No.TMBW-0100-01) is added for 10 minutes and the reaction is then stopped with 100 µl stop solution (BioFX, Catalog No. LSTP-1000-01). Colorimetric detection of the product is done at 450 nm in SpectraMax M5 microplate reader (Molecular Devices, Sunnyvale, CA). Data is analyzed in 4-parameter model with SoftMax Pro software (Molecular Devices, Sunnyvale, CA) according to its user's manual. All NB constructs show quick clearance in serum and in tumor tissue, and fast tissue penetration.

[00538] Caspase 3/7 activity in tumor tissue lysate is evaluated by Caspase glo assay (Promega Catalog no. G8092) according to its user's manual. Luminescence is read using

the SpectraMax M5 microplate reader (Molecular Devices, Sunnyvale, CA). Consistent with IHC results, all NB constructs activate Caspase 3 within 8 hours.

4.2. Single dose in vivo tetravalent anti-DR5 NB constructs

[00539] Outbred athymic (nu/nu) female mice (Harlan Sprague Dawley, Indianapolis, IN) are anesthetized and implanted s.c. into the right axillary (lateral) region of each animal with 1 x 10^6 Colo205 cells. Tumors are allowed to grow until the size of 200mm^3 before the dosing is initiated. NB construct is formulated as a solution in PBS and administered single dose at 200ug/mouse by a bolus i.v. injection. Serum and tumor tissue are collected from groups of animals (one group per time point, 3 animals per group) at the following time points: 0.25h, 0.5h, 1h, 2h, 4h, 8h, 24h, and 48h. The tumor tissue sample is mixed with T-per buffer (Pierce, Rockford, IL, Catalog No. 78510) then immediately homogenized in the tissue lyser (Qiagen, Catalog No. 85210). The supernatant of tissue lysate is collected and its protein concentration is determined using a standard BCA assay (Pierce, Catalog No. 1856210).

[00540] NB construct concentration in serum and tissue lysate is determined in ELISA as described above. Mean serum concentration-time profiles are subjected to a two-compartmental pharmacokinetic analysis using model 7 within WinNonlin Professional Software Version 5.1 (Pharsight Corporation, Mountain View California, USA). For each NB construct the concentration-time profile is fit using iterative reweighting 1/y.y, where y is the predicted concentration. The mean residence time (MRT, Table 17) off the different NB constructs ranged from 2.6 to 13.5 hr. The Volume of distribution (Vss) of the different NB constructs is 2-35 times larger than the plasma volume of a 20 g mouse (≈ 1.5 ml), indicating extensive distribution outside the vascular space. The overall clearance rate of the different NB constructs is at least 5 times less than the murine glomerular filtration rate (≈ 15 ml/hr), hence, all tetravalent constructs are highly effective in reducing significantly the urinary filtration and subsequent excretion at the level of the kidney.

Table 17: PK-parameters of tetravalent anti-DR5 NB constructs

Parameter	10F1 tetra	11D1 tetra	11H6 tetra	4E6 tetra	7A12 tetra
$C_{(0)}$ (µg/ml)	114	336	163	25.2	71.7
V_{ss} (mL)	12.5	5.63	2.83	56.8	12.2
V_1 (mL)	1.76	0.595	1.22	7.95	2.79
V_2 (mL)	10.7	5.04	1.61	48.8	9.43
CL (mL/hr)	2.85	2.11	0.211	4.2	1.42
CL_d (mL/hr)	1.29	0.453	0.387	2.89	1.59
$t_{½\alpha}$ (hr)	0.3	0.161	1.04	0.756	0.589
$t_{½\beta}$ (hr)	8.49	9.41	11.1	20.3	9.46
MRT (hr)	4.38	2.68	13.4	13.5	8.57
AUC_{inf} (µg *hr/ml)	70.2	95	947	47.6	140

[00541] Caspase 3/7 activity in tumor tissue lysate is evaluated by Caspase glo assay (Promega Catalog no. G8092) according to its user's manual and described as above. All tetramers have similar PD profile (Figure 2).

[00542] An indirect response model is developed to describe the potency (EC_{50}), efficacy (E_{max}) and time-course of the pharmacological effect of the different NB constructs. The model describes a change in cellular caspase level that results from an enhanced production rate following DR5 receptor binding (i.e., stimulation of the build-up of cellular caspase). The rate of cellular caspase (Response, R) is described by the following equation.

$$\frac{dR}{dt} = k_{in} \bullet \left[1 + \frac{E_{max} \bullet C^{n}}{EC_{50}{}^{n} + C^{n}}\right] - k_{out} \bullet R \qquad \text{(equation 1)}$$

where k_{in} is the zero-order synthesis rate, R is the caspase level, E_{max} is the maximum stimulation, C is the NB construct concentration at the tumor, n is the response shape factor and k_{out} is the caspase first order elimination rate constant.

[00543] The tumor concentration-time profiles are first fitted to the pharmacokinetic function that is minimally necessary to provide a reasonable characterization of the concentration-time data (two-compartmental model 3 or model 11 within WinNonlin Software Version 5.1). The pharmacokinetic function obtained for each NB construct is then used as input function for equation 1. The obtained pharmacodynamic parameters are listed in Table 18.

Table 18: PK/PD-parameters single dose tetravalent anti-DR5 NB constructs

Parameter[1]	10F1 tetra	7A12 tetra	4E6 tetra	11D1 tetra	11H6 tetra
k_{out} (1/hr)	0.319	0.301	0.412	0.416	0.356
EC_{50} (ng/mg tissue)	0.365	1.41	1.36	12.2	8.37
E_{max}	15.8	15.3	4.74	12.2	17.5
N	2.14	3.85	10.1	0.18	4.62

4.3. In vivo test using xenograft model

[00544] Outbred athymic (nu/nu) female mice (Harlan Sprague Dawley, Indianapolis, IN) are implanted s.c. into the right axillary (lateral) region with approximately 1-2x10^6 COLO205 tumor cells suspended in 100% Hanks' balanced salt solution (HBSS) in a total volume of 100ml. Tumors are allowed to grow to 200 mm^3 before the dosing is initiated. NB constructs are formulated as a solution in PBS, and dosed either once per week or three times per week on Monday, Wednesday and Friday. Both treatments are administered i.v. for four weeks. Tumors are measured and individual animal body weights are recorded once or twice per week. Experiments are concluded after seven weeks from

the initial dosing. Anti-tumor activity is expressed as %T/C (comparing change in tumor volume for treatment group versus vehicle control group). Regression is calculated using the formula: (1-T/T0) x 100%, where T is the mean tumor volume for the treatment group at the end of the experiment, and T0 is the mean tumor volume at the beginning of the experiment. Statistical significance of the results is uniformly evaluated using one-way ANOVA test post-hoc Tukey analysis. As shown in Figure 3, the NB constructs induce tumor stasis or regression in the Colo205 tumor model. Pentameric forms of the NB constructs trend toward more potent efficacy than tetrameric forms.

5. Example V

5.1. Humanization of 4E6

5.1.1. Characterization of 4E6 humanization variant

[00545] The protein sequence of parent 4E6 is aligned to the human VH3-23 (DP-47) and JH5 germlines (Table 19). Amino acid differences relative to the human germline sequence are represented by letters, identical amino acids by dots. Amino acid differences in framework regions that are underlined are selected for conversion into the human counterpart whereas the others are left untouched.

Table 19 Alignment of 4E6 parent and humanized N-glycosylation knock out variants

```
Kabat #:     1         10        20        30        40        50        60
             |--------|---------|---------|---------|---------|--a------|
VH3-23/JH5: EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSAISGSGGSTYYA
4E6        : ....v.....s..a.d.........r..g.irvg.f..t...er.f.a..nrnd.t....
4E6-hu     : ........................r..g.irvg.f.......r.f....nrnd.t....

Kabat #:    60        70        80            90        100                110
             |--------|---------|--abc------|---------|abcdefghi---------|---
VH3-23/JH5:  DSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAK----------------WGQGTLVTVSS
4E6        :  ............a...v.m..a..kp.........aglqynrsadrvpvgavy.....g.....
4E6-Hu     :  ................v........p.........aglqynrAadrvpvgavy...........
```

VH3-23/JH5 = SEQ ID NO: 90
4E6 = SEQ ID NO: 1
4E6-Hu = SEQ ID NO: 26

[00546] Purified, monovalent material is produced from 4E6, 4E6-Hu and of variant 4E6hx (wherein 4E6hx has the humanized FR regions identical to 4E6-Hu but has the CDR3 of 4E6). These constructs are then characterized in a number of assays for binding on human and cynomolgus DR5, namely FACS saturation binding (apparent Kd) and SPR kinetics (see Table 20). In addition, the variants are analyzed in the thermal shift assay as well (Table 20). 5µl of each purified monovalent anti-DR5 NB construct (80µg/ml) is incubated with 5µl of the fluorescent probe Sypro Orange (Invitrogen, Carlsbad, CA, catalogue # S6551) (final concentration 10x) in 10µl of buffer (100mM phosphate, 100mM

borate, 100mM citrate, 115mM NaCl, buffered at different pH's ranging from 3.5 to 9). The samples are then heated in a LightCycler 480II machine (Roche, Basel, Switzerland), from 37°C to 90°C at 4.4°C/s, after which they are cooled down to 37°C at 2.2°C/s. Upon heat-induced unfolding, hydrophobic patches of the proteins are exposed, to which the Sypro Orange binds resulting in an increase in fluorescence intensity. The inflection point of the first derivative of the fluorescence intensity curve serves as a measure of the melting temperature (Tm). For more details, please see Ericsson et al. 2006 (Annals of Biochemistry, 357: 289-298). Overall, the 4E6-hx variant displays affinities similar to the 4E6 parent. In addition, this variant has a 7% increase in Tm compared to the 4E6 parent.

Table 20A Monovalent 4E6 humanization and N-glycosylation knock-out variants

	Human DR5				
	Biacore			FACS	Tm @ pH 7(°C)
	k_a (1/Ms)	k_d (1/s)	KD (M)	Apparent KD (M)	
4E6	$4.4 \times 10^{+06}$	1.0×10^{-04}	2.3×10^{-11}	4.2×10^{-10}	73.4
4E6-hx	$6.0 \times 10^{+06}$	1.4×10^{-04}	2.3×10^{-11}	3.4×10^{-10}	79.1
4E6-Hu	$1.1 \times 10^{+07}$	1.1×10^{-04}	9.5×10^{-12}	4.4×10^{-10}	ND

Table 20B Monovalent 4E6 humanization and N-glycosylation knock-out variants

	Cynomolgus DR5				
	Biacore			FACS	Tm @ pH 7(°C)
	k_a (1/Ms)	k_d (1/s)	KD (M)	Apparent KD (M)	
4E6	$2.1 \times 10^{+06}$	1.1×10^{-02}	5.5×10^{-09}	7.3×10^{-09}	73.4
4E6-hx	$6.1 \times 10^{+06}$	2.1×10^{-02}	3.4×10^{-09}	7.1×10^{-09}	79.1
4E6-Hu	$7.0 \times 10^{+06}$	1.1×10^{-02}	1.6×10^{-09}	8.8×10^{-09}	ND

5.1.2. N-glycosylation knock-out variant of humanized 4E6

[00547] Expression of 4E6-hx in *P. pastoris* followed by SDS PAGE and anti-V_{HH} (polyclonal anti-Nanobody®) western reveals the presence of two products (16kDa and 21kDa) compared to only one 16kDa product when *E. coli* is the expression host. Treatment with PNGaseF and staining with concanavalin reveals that the 21kDa product is the N-glycosylated form of the 16kDa product. Cleavage of N-glycosylation moieties from proteins using PNGaseF is done according to the manufacturer's recommendations (New England Biolabs, Ipswich, MA, catalogue # P0704S). PNGaseF is an amidase that cleaves between the innermost GlcNAc and asparagine residues of high mannose, hybrid, and complex oligosaccharides from N-linked glycoproteins. Detection of protein N-glycosylation is done in a Western assay with Concanavalin A, a lectin that recognizes glycoproteins containing α-D-mannose, α-D-glucose. Blotted proteins are blocked for 2

hours with blocking buffer (PBS, 0.05% Tween-20, 1mM $CaCl_2$, 1mM $MnCl_2$), followed by ON incubation with 5µg/ml of Concanavalin A biotin conjugate (Sigma, St. Louis MO, catalogue # C2272) at 4°C in blocking buffer. Detection is done using a 1/2000 dilution of extravidin-HRP conjugate in blocking buffer and DAB as substrate (Sigma, St. Louis MO, catalogue # E2886 and D6815). The 36 kDa band visible in the coomassie stained gel is the PNGaseF enzyme. Off-rate analysis on human DR5 revealed an >8-fold increase for the *P. pastoris* produced material versus the *E. coli* produced material, suggesting that the N-glycosylation interferes with the binding of 4E6-hu to DR5.

[00548] A potential N-glycosylation motif is present in the CDR3 of 4E6 and 4E6-hx (amino acids "nrs"- shown in bold and italics in Table 19). The 4E6-Hu variant (CDR3 with a replaced "A" residue shown in bold capital letter – Table 19) is generated and produced in *E. coli*, purified and assayed for binding to human and cynomolgus DR5 using the FACS saturation binding assay and SPR kinetics (Table 20). The 4E6-Hu has equal binding characteristics to both human and cynomolgus DR5, compared to 4E6-hx. Upon expression in *P. pastoris*, the 4E6-Hu variant yields only the 16kDa product. This confirms the functional knock-out of the glycosylation motif.

5.1.3. In vitro characterization of 4E6-Hu

[00549] Purified, tetravalent material is produced from wild type 4E6 and its humanized variant 4E6-Hu. These are then assayed in cell survival assays in Colo205 and Jurkat (Table 21). The potency and efficacy of the humanized variant is relatively equal to the parent 4E6 construct.

Table 21 - In vitro potency and efficacy of tetravalent wild type 4E6 and 4E6-Hu

	Colo205		Jurkat	
	IC50 (M)	**Efficacy (% dead cells)**	**IC50 (M)**	**Efficacy (% dead cells)**
4E6 tetra	1.9×10^{-11}	94	8.7×10^{-12}	79
4E6-Hu tetra	1.2×10^{-11}	94	2.6×10^{-12}	95

5.2. 11H6 humanization

5.2.1. Characterization of 11H6 humanization variant

[00550] The protein sequence of wild type 11H6 is aligned to the human VH3-23 (DP-47) and JH5 germlines (Table 22). Amino acid differences relative to the human germline sequence are represented by letters, identical amino acids by dots. Amino acid differences in framework regions that are underlined are selected for conversion into the human counterpart whereas the others are left untouched.

Table 22 Alignment 11H6 parent and humanization variant

```
Kabat #     : 1         10        20        30        40        50        60
              |--------|---------|---------|---------|---------|--a------|
VH3-23/JH5  : EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSAISGSGGSTYYA
11H6        : ....v.....................tfdkinn.g.y......qrdl.aq.t-p..i.d..
11H6-hu     : ............................tfdkinn.g.y......qrdl.aq.t-p..i.d..


Kabat #     : 60        70        80            90        100               110
              |---------|---------|--abc------|---------|abcdef---------|---
VH3-23/JH5  :   DSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAK--------------WGQGTLVTVSS
11H6        :    ............a.d.m.......kp......f.naeilkrayidvyvny.....q.....
11H6-hu     :    ..........................p........naeilkrayidvyvny...........
```

VH3-23/JH5 = SEQ ID NO: 90
11H6 = SEQ ID NO: 5
11H6-hu = SEQ ID NO: 30

[00551] Purified, monovalent material is produced for 11H6 and 11H6-Hu, which is then characterized in a number of assays for binding on human and cynomolgus DR5, namely FACS saturation binding (apparent Kd) and SPR kinetics (Table 23). In addition, the variants are analyzed in the thermal shift assay (Table 23). The 11H6-hu variant retains the parental 11H6 binding characteristics. It also has an 8% increase in melting temperature compared to parent 11H6. Tm is determined at pH 7.

Table 23 - Characterization of monovalent 11H6 parent and humanization variants

	Apparent Kd (M)		Kd (M)		Tm (°C)
	Human DR5	Cynomolgus DR5	Human DR5	Cynomolgus DR5	
11H6	4.6×10^{-09}	ND	4.9×10^{-09}	3.2×10^{-07}	68.5
11H6-hu	4.4×10^{-09}	ND	2.3×10^{-09}	1.7×10^{-07}	74.0

5.2.2. In vitro characterization of 11H6-Hu

[00552] Purified, tetravalent material is produced from parental clone 11H6 and its humanized variant 11H6-Hu. These are then assayed in cell survival assays against Colo205 and Jurkat (Table 24). The potency and efficacy of the humanized variant is equal to the parent. Efficacy represents the percentage of dead cells seen.

Table 24 In vitro potency and efficacy of tetravalent wild type 11H6 and 11H6-hum

	Colo205		Jurkat	
	IC50 (M)	Efficacy	IC50 (M)	Efficacy
11H6 tetra	1.4×10^{-11}	92	1.5×10^{-11}	34
11H6-hu tetra	2.0×10^{-11}	94	1.6×10^{-11}	54

5.3. In vitro characterization of 11H6-Hu and 4E6-Hu tetramers and pentamers

[00553] Cells are plated in a 96 well plate (Costar # 3903 white clear bottom) with the intention of achieving about 75% confluence. Cells are plated in a range from 7500-15000 cells/well (depending on cell line) in 100µl media the day prior to the assay. The day of the assay, the media is removed and fresh media is added. Serially diluted NB agent is then added (starting concentrations may vary depending on the cell line), usually between 1-20nM starting concentration, which is then diluted 3-4 fold over 10 dilutions in general for a final volume of 150µl. The cells are then incubated for 24-72 hrs at 37°C in the CO_2 supplied incubator. After incubation, the plated cells and Cell Titer Glo (Promega #G7571) reagents are brought to room temperature (about 30 min). 50 µL of the reconstituted Cell Titer Glo reagent is then added to each well. The plate is shaken for 2-3 minutes and then left to equilibrate in the dark for 10 minutes before reading luminescence on the Spectromax.

[00554] Specific examples are provided in Table 25.

Table 25. In vitro characterization of 11H6-hu and 4E6-hu tetramers and pentamers

	11H6-Hu			4E6-Hu		
IC50 (nM)	tetra	penta	fold improvement	tetra	penta	fold improvement
Jurkat (72)	0.0007	0.0017	4	0.0172	0.0036	5
A549	>10	>10	1	>10	>10	1
Colo205	0.0036	0.0012	3	0.0034	0.0007	5
BxPC-3	0.0154	0.0046	3	0.0292	0.005	6
T24	0.0222	0.0031	7	0.0447	0.0043	10
Panc-1	0.2317	0.0067	35	0.2291	0.0105	22
M30	>10	>10	1	>10	>10	1
H226	0.1718	0.0124	14	0.1293	0.0272	5
H2122	0.0041	0.0017	2	0.0051	0.0008	7
MiaPaCa-2	0.0117	0.0031	4	0.0185	0.0038	5

6. Example VI

6.1. Ex-vivo assay for leukemia patients

[00555] An ex-vivo assay for leukemia patients is provided as a method to predict which patients will respond to treatment with an NB construct. A blood sample is obtained from a patient prior to treatment and used to assay potential treatment response. The degree and direction of response is used as selection criteria for treatment.

[00556] T-cell leukemia (T-ALL) is believed to be generally sensitive to DR5 stimulation. T-ALL samples are treated with NB constructs of the invention and assessed to determine if the number of leukemia cells is decreased (or undergoing apoptosis) with treatment. The assay drug range is from about 20nm to about 0.0001nM for treatments Ex-vivo with NB constructs of the invention.

[00557] Cell samples from patients diagnosed with other indications may also be obtained and similarly tested.

6.2. General Ex-Vivo Sensitivity Assay:

[00558] Tumor samples are tested outside of a patient in a laboratory setting as a method to help predict which patients may respond to one or more NB agents.

[00559] Primary patient tumor material from blood or tissue is treated in a similar manner to the above assays, depending on the tumor type. Tumor is removed via total blood collection or tissue biopsy and plated into an appropriate tissue culture plate for 0-24 hours. The tumor specimen is then treated with varying concentrations of NB agent(s) over a dilution series (e.g., starting concentration could be 20nM diluted 3-4 fold over 10 dilutions). The tissue culture plate is then treated with NB agent(s) for 24-72 hrs or for several hours (1-24) at 37°C in the CO_2 supplied incubator. After incubation, the plated specimen is analyzed using a method to detect the response of the specimen to treatment. Such as in the above examples; Cell Titer Glo (Promega #G7571) for cell viability, or Caspase 3/7 activation, or AnnexinV staining, or Cell counting, or FACS analysis or other method to determine the growth, death, or response to NB agent treatment are provided.

[00560] Either a NB agent-sensitive cell line (e.g., Jurkat) or a NB agent-insensitive cell line (BE13), or PBMC (peripheral blood mononuclear cells, e.g., made fresh from the blood of a healthy volunteer) or the combination of the cell culture (cell line) spiked into the PBMC are treated with various concentrations of NB agent(s) for 3.5 hours at 37°C in the CO_2 supplied incubator, after which Caspase 3/7 activation is assessed (Promega #G7790) by following the directions supplied by the manufacturer.

7. Example VII

7.1. Analysis of the RAF-MEK-ERK pathway and DR5 activity

[00561] Death Receptor 5 (DR5) is of particular interest in cancer drug discovery, since its activation selectively induces apoptosis in cancer cells while sparing many normal cells. A DR5 specific agonist construct may avoid the limitations of the ligand, namely binding to Decoy Receptors such as DcR1, DcR2 and OPG. A major hurdle for the clinical developments of DR5 agonist antibodies has been the difficulty in identifying biomarkers predictive of efficacy in patient subgroups. The analysis of data from 200 cancer cell lines indicated that no obvious genetic mutations, including those in RAS and RAF, are correlative of sensitivity to LBY135, a DR5 agonist antibody (Novartis AG).

[00562] A strategy to screen pooled shRNAs based on DR5 sensitization/rescue is used to identify genes or pathways that modify DR5 mediated apoptosis after genetic perturbation. The screens are conducted in seven cancer cell lines across various

lineages, and Solexa based deep sequencing of the integrated hairpins is used to de-convolute the shRNA compositions.

[00563] A set of common sensitizers and rescuers are identified as known pathway components, such that shRNAs targeting caspase 8, caspase 3 and DR5 itself are the top rescuers and those targeting BCLxl are the top sensitizers, indicating the robustness of the screens. Interestingly, in addition to these sets of common genes, inhibition of BRAF-MEK-ERK exhibits opposing cell-context-dependent phenotypes on DR5 mediated apoptosis. Specifically, inhibition of BRAF-MEK-ERK pathway sensitizes Miapaca2 cells to DR5 mediated apoptosis, but rescues Colo205 cells from it.

[00564] These opposite phenotypes correlate well with different kinetics of caspase 8 and caspase 9 activity, but appear to be independent of DR5 expression level. Pathway dissection reveals that cFLIP and cIAP1, two of the endogenous apoptosis inhibitors, mediate cross-talk between DR5 mediated apoptosis and the BRAF-MEK-ERK pathway. In Miapaca2 cells, combination of U0126 (MEK inhibitor) and DR5 antibody accelerate the degradation of cFLIP and cIAP1 proteins, while in colo205, both cFLIP and cIAP1 mRNAs are up-regulated. Consistently, inhibition of cFLIP or cIAP1 by shRNAs or chemical inhibition eliminate the rescue phenotype in Colo205 cells, and further sensitize Miapaca2 to DR5 mediated apoptosis. Microarray analysis of Miapaca2 and Colo205 cells treated with MEK inhibitor reveal genes that are down-regulated in both cell lines, including DUSP6, ETV5 and ERG1, which are the canonical downstream targets of ERK.

7.2. Bcl-xL, cIAP1 and BRAF-MEK-ERK as cell-context dependent regulators of DR5 mediated apoptosis

[00565] Many proteins work as cell-context dependent regulators, if it is defined broadly. For examples, ABT737, a Bcl-xL inhibitor, showed a range of phenotypes on LBY135 induced apoptosis. Among 35 cell lines to be examined, it strongly sensitizes the effect of LBY135 on 7 cell lines, mildly sensitizes 9 cell lines, but had no effect on the other 19 cell lines. One of the plausible reasons is that parallel pathways are present in some cell lines that compensate the inhibition of Bcl-xL. For example, analysis of our screens reveal that shRNAs against Bcl-xL sensitize all cell lines except for Miapaca2 cells, which actually are sensitized by shRNAs targeting MCL1. Such kind of regulators would not hinder the development of combination therapy. In this aspect, an inhibitor to cIAP1 is a similar regulator that sensitizes a DR5 agonist antibody in a large number of cell lines (Table 26, plus data not shown). Interesting, cIAP1, not x-IAP, is specifically involved in the cross-talk between DR5 and BRAF-MEK-ERK pathway.

[00566] The BRAF-MEK-ERK pathway falls into a category for cell-context-dependent regulators. Its cell-context dependent effects ranged from sensitizer to antagonizer. Such dramatic differences provide an opportunity to gain insight in the signaling networks

regulating DR5 mediated apoptosis. However, biomarker should be identified, or such combination will be difficult to develop, even if the sensitizing effects are strong and desirable. Actually for DR5 resistant cell lines, such as ES2 and A375, BRAF/MEK inhibitors are the only partners in the table below that show strong sensitizing effects, whereas inhibitors to Bcl-xL do not. Downregulation of cIAP1 is associated with the sensitizing effects in multiple cell lines, suggesting it as a PD biomarker for such combination strategy. Our results suggest that a triple combination of a DR5 agonist antibody with inhibitors to c1 and BRAF-MEK could be a solution.

[00567] Table 26 shows the synergistic effect between DR5 agonist antibody and inhibitors to cIAP1 or Bcl-xL. Thirty five cell lines are treated with LBY135 (DR5 agonist antibody, Novartis AG) alone or in combination with LBW242 (cIAP1 inhibitor) or ABT737 (Bcl-xL inhibitor). Cells are labeled as insensitive where the viability is higher than 70% at 5nM of LBY135. For combination effects, it is labeled as '+++' where the combination reduces cell viability by more than 30%; and labeled as '++' where the combination reduces cell viability by between 10-30%. It is labeled as "none" when no synergy is observed with the combination treatment.

Table 26: Synergistic effect between DR5 agonist and cIAP1 or Bcl-xL inhibitors.

Cell line	Tumor type	Sensitivity to LBY135 (5nM)	Sensitized by LBW242	Sensitized by ABT737
A172	CNS	sensitive	++	++
Bxpc3	Pancreatic	insensitive	++	++
Caov3	ovary	sensitive	++	++
H596	NSCLC	insensitive	++	++
panc10.05	Pancreatic	insensitive	++	+++
A375	Melanoma	insensitive	++	none
DU145	Prostate	insensitive	++	none
SK-Mel5	Melanoma	insensitive	++	none
colo741	Colon	insensitive	+++	++
HCT116	Colon	sensitive	+++	++
HT29	Colon	insensitive	+++	++
colo205	Colon	sensitive	+++	+++
EBC1	Lung	sensitive	+++	+++
colo201	Colon	sensitive	+++	none
ES2	ovary	insensitive	+++	none
sw626	Colon	insensitive	none	++
H2452	Mesothelioma	sensitive	none	+++
HPAC	Pancreatic	sensitive	none	+++
LNcap	Prostate	insensitive	none	+++
T24	Bladder	insensitive	none	+++
A549	NSCLC	insensitive	none	none
Calu6	Lung	sensitive	none	none

H146	SCLC	insensitive	none	none
H358	NSCLC	sensitive	none	none
H520	NSCLC	insensitive	none	none
MDAMB361	Breast	insensitive	none	none
MDA-MB-453	Breast	sensitive	none	none
OPM2	Multiple Myeloma	sensitive	none	none
panc2.03	Pancreatic	insensitive	none	none
Panc3.27	Pancreatic	sensitive	none	none
RKO	Colon	insensitive	none	none
RT4	Bladder	insensitive	none	none
SKOV3	ovary	insensitive	none	none
SW480	Colon	sensitive	none	none
U266B1	Multiple Myeloma	insensitive	none	none

++: sensitizing; +++: strong sensitizing;

[00568] In addition, 180 genes are also identified as being differentially regulated by MEK inhibition between the two cell lines. A set of transcription factors that could be responsible for regulating those genes are predicted by gene set enrichment analysis (GSEA), followed by individual examination using shRNA to confirm their involvement. Among many transcription factors, only FOXO3 and SP1 are found to be directly involved in the cross-talk between the two pathways, as shown by their role in the regulation of cFLIP or cIAP1 at the mRNA level in Colo205 cells. However, in Miapcaca2 cells, cFLIP or cIAP1 are regulated at the protein level in proteasome and caspase 8 dependent manners. Finally, reduced cIAP1 protein levels are associated with the sensitizing effects in additional cell lines. These results identify multiple potent combination strategies for the DR5 agonist antibody LBY135, and reveal a cell-context-dependent regulation of DR5 mediated apoptosis by the BRAF-MEK-ERK pathway.

[00569] To validate the shRNA results, chemical inhibitors specific to BRAF and MEK are used to disrupt the BRAF-MEK-ERK pathway. Namely, RAF265 and U0126 are inhibitors of BRAF and MEK, respectively. Inhibition of the BRAF-MEK-ERK pathway with either compound sensitized Miapaca2 cells to LBY135 treatment, but rescued Colo205 cells from it. Other BRAF and MEK specific inhibitors gave similar phenotypes.

[00570] Miapaca2 cells have an activating KRAS mutation (G12C), whereas Colo205 cells have an active BRAF mutation (V600E). So it is possible that these mutations are responsible for the different phenotypes. However, H2122, which has the same KRAS mutation as Miapaca2 cells, did not show any sensitizing effect as in Miapaca2. Furthermore, after screening seven additional cell lines, all with BRAF mutations, we found that MEK inhibitors showed no effect in some cell lines while the others are sensitized as in Miapaca2 cells. Taken together, our results indicate that neither BRAF nor KRAS

mutations explain the cell-context dependent roles of the BRAF-MEK-ERK pathway on DR5 mediated apoptosis.

[00571] Overall, inhibition of BRAF-MEK-ERK is a double-edge sword - it can lead to either a sensitizing or an antagonizing effect when used in combination with a DR5 agonist. Inhibitors of cIAP1 or XIAP, of Bcl-xL or of cFLIP in combination with a DR5 agonist is sufficient for sensitization. However, the combination of a BRAF inhibitor and either a MEK or ERK inhibitor appear to antagonize the effect of pre-treatment with LBY135. While this raises concerns for combination therapy targeting both pathways in the clinic, data suggests that a triple combination with cIAP inhibitors could be a solution for the antagonism. Namely, a triple combination of a DR5 agonist, a cIAP inhibitor (either to cIAP1 or to XIAP) and the choice of a MEK inhibitor or a BRAF inhibitor should also result in synergistic induction of cell death.

7.3. Experimental Protocols

[00572] For the shRNA library screen, target cells are infected with a pooled shRNA library targeting kinome and apotome shRNA, selected with puromycin, then treated with cross-linked LBY135 or PBS control. Samples collected at Day 0, 7 and 14 are subjected to DNA extraction, PCR amplification of integrated shRNAs and purification, followed by solexa sequencing. Comparisons between treatments at the same time points reveal shRNAs modulating DR5 mediated apoptosis. Comparisons between time points in PBS controls reveal effects of shRNAs on cell growth. These hits are then subjected to individual validation.

[00573] To analyze knock-down of LIMK2 sensitized Miapaca2 and Colo205 to LBY135 induced apoptosis, cells are infected with shRNAs against LIMK2 or control hairpins, selected with puromycin for 5 days, then seeded in 96-well-plates for treatments with serial dilutions of cross-linked LBY135 the next day for 36 hours. Cell viabilities are measured by cell-titer-glow reagent, and normalized to the samples not treated with LBY135. Cell survival rate is plotted as a function of concentrations to generate a dose-response curve. Data includes the mean ± SD of triplicates of a representative experiment out of at least two independent experiments.

[00574] Chemical inhibitors of MEK and BRAF are used to validate the phenotype of shRNAs in the screen. Miapaca2 and Colo205 are pre-incubated with DMSO, MEK inhibitor U0126 (10uM) or BRAF inhibitor RAF265 (1uM) overnight, then treated with serial dilutions of cross-linked LBY135 for 36 hours. Cell viabilities are measured by cell-titer-glow reagent, and normalized to the samples not treated with LBY135. Cell survival rate is plotted as a function of concentrations to generate a dose-response curve. Data are the mean ± SD of triplicates of a representative experiment out of at least two independent experiments.

[00575] To show that activation of ERK by DR5 remains intact in both cell lines, Miapaca2 and Colo205 cells are pre-incubated with DMSO or U0126 (10uM) overnight, treated with cross-linked LBY135 (0.25nM), and collected at 0h, 1h, 3h and 6h for western blot analysis for ERK and p-ERK. MEK inhibition decreases DR5 induced activities of caspase-8, caspase-9 and caspase-3/7 in Colo205 cells, whereas it increases them in Miapaca2 cells. Colo205 and Miapaca2 are treated with cross-linked LBY-135 at 0nM, 0.25nM or 1nM for 7 hrs. Cells are lysed for analysis of activities of caspase8, caspase9 and caspase3/7. Caspase activities are plotted as a function of LBY135 concentrations. Data is representative experiment out of at least two independent experiments.

[00576] Microarray analysis is used to reveal those genes with significant correlation between Colo205 and Miapaca2 cells among genes regulated by MEK. Colo205 and Miapaca2 cells are pre-incubated with DMSO or U0126 overnight in five independent experiments. RNA is extracted for microarray analysis. Relative expression level for each gene in U0126 versus DMSO treated cells are plotted as a function of Colo205 cells on Y-axis and Miapaca2 on X-axis.

7.4. Working model for cross-talk between DR5 and RAF-MEK-ERK

[00577] A working model proposes that treatment with a DR5 agonist activates both caspase-8 and ERK. Cross-talks between these two pathways are mediated by cFLIP and cIAP1, which negatively regulate the activation of caspase-8 and caspase-9 that in turn control the apoptosis induced by DR5 agonist. cFLIP and cIAP1 are regulated at different levels in a manner that is cell-context dependent. In Colo205 cells, they are regulated at their RNA levels through transcription factor FOXO3 and SP1, which themselves are regulated by BRAF-MEK-ERK pathway. In Miapaca2 cells, cFLIP and cIAP1 are regulated by BRAF-MEK-ERK pathway at protein level in proteasome and caspase 8 dependent manners.

8. Example VIII

8.1. Exemplary Biacore assay

[00578] A suitable assay for determining whether an amino acid sequence or other binding agent cross-blocks or is capable of cross-blocking is a Biacore assay. It will be appreciated that the assay can be used with any of the amino acid sequences (or other binding agents such as polypeptides of the invention) described herein.

[00579] The Biacore machine (for example the Biacore 3000) is operated in line with the manufacturer's recommendations. In one exemplary cross-blocking assay, the target protein is coupled to a CM5 Biacore chip using standard amine coupling chemistry to generate a surface that is coated with the target. Typically 200- 800 resonance units of the

target would be coupled to the chip (i.e., an amount that gives easily measurable levels of binding but that is readily saturable by the concentrations of test reagent being used).

[00580] Two test amino acid sequences (termed A* and B*) to be assessed for their ability to cross- block each other are mixed at a one to one molar ratio of binding sites in a suitable buffer to create the test mixture. When calculating the concentrations on a binding site basis the molecular weight of an amino acid sequence is assumed to be the total molecular weight of the amino acid sequence divided by the number of target binding sites on that amino acid sequence. The concentration of each amino acid sequence in the test mix should be high enough to readily saturate the binding sites for that amino acid sequence on the target molecules captured on the Biacore chip. The amino acid sequences in the mixture are at the same molar concentration (on a binding basis) and that concentration would typically be between 1.00 and 1.5 micromolar (on a binding site basis). Separate solutions containing A* alone and B* alone are also prepared. A* and B* in these solutions are in the same buffer and at the same concentration as in the test mix.

[00581] The test mixture is passed over the target-coated Biacore chip and the total amount of binding recorded. The chip is then treated in such a way as to remove the bound amino acid sequences without damaging the chip-bound target. Typically this is done by treating the chip with 30 mM HCl for 60 seconds. The solution of A* alone is then passed over the target-coated surface and the amount of binding recorded. The chip is again treated to remove all of the bound amino acid sequences without damaging the chip-bound target. The solution of B* alone is then passed over the target-coated surface and the amount of binding recorded.

[00582] The maximum theoretical binding of the mixture of A* and B* is next calculated, and is the sum of the binding of each amino acid sequence when passed over the target surface alone. If the actual recorded binding of the mixture is less than this theoretical maximum then the two amino acid sequences are cross-blocking each other. Thus, in general, a cross-blocking amino acid sequence or other binding agent according to the invention is one which will bind to the target in the above Biacore cross-blocking assay such that during the assay and in the presence of a second amino acid sequence or other binding agent of the invention the recorded binding is between 80% and 0.1% (e.g. 80% to 4%) of the maximum theoretical binding, specifically between 75% and 0.1% (e.g. 75% to 4%) of the maximum theoretical binding, and more specifically between 70% and 0.1% (e.g. 70% to 4%) of maximum theoretical binding (as just defined above) of the two amino acid sequences or binding agents in combination.

[00583] The Biacore assay described above is a primary assay used to determine if amino acid sequences or other binding agents cross-block each other according to the invention. On rare occasions particular amino acid sequences or other binding agents may

not bind to target coupled via amine chemistry to a CM5 Biacore chip (this usually occurs when the relevant binding site on target is masked or destroyed by the coupling to the chip). In such cases cross-blocking can be determined using a tagged version of the target, e.g., a N-terminal His-tagged version (R & D Systems, Minneapolis, MN, USA; 2005 cat# 1406-ST-025). In this particular format, an anti-His amino acid sequence would be coupled to the Biacore chip and then the His-tagged target would be passed over the surface of the chip and captured by the anti-His amino acid sequence. The cross blocking analysis would be carried out essentially as described above, except that after each chip regeneration cycle, new His-tagged target would be loaded back onto the anti-His amino acid sequence coated surface. In addition to the example given using N-terminal His-tagged DR5, C-terminal His-tagged target could alternatively be used. Furthermore, various other tags and tag binding protein combinations that are known in the art could be used for such a cross-blocking analysis (e.g. HA tag with anti-HA antibodies; FLAG tag with anti-FLAG antibodies; biotin tag with streptavidin).

9. Example IX

9.1. Exemplary ELISA assay

[00584] The following generally describes an ELISA assay for determining whether an amino acid sequence or other binding agent directed against a target cross-blocks or is capable of cross-blocking as defined herein. This assay can be used with any of the amino acid sequences (or other binding agents such as polypeptides of the invention) herein.

[00585] The general principal of the assay is to have an amino acid sequence or binding agent that is directed against the target coated onto the wells of an ELISA plate. An excess amount of a second, potentially cross-blocking, anti-target amino acid sequence is added in solution (i.e., not bound to the ELISA plate). A limited amount of the target is then added to the wells. The coated amino acid sequence and the amino acid sequence in solution compete for binding of the limited number of target molecules. The plate is washed to remove excess target that has not been bound by the coated amino acid sequence and to also remove the second, solution phase amino acid sequence as well as any complexes formed between the second, solution phase amino acid sequence and target. The amount of bound target is then measured using a reagent that is appropriate to detect the target. An amino acid sequence in solution that is able to cross-block the coated amino acid sequence will be able to cause a decrease in the number of target molecules that the coated amino acid sequence can bind relative to the number of target molecules that the coated amino acid sequence can bind in the absence of the second, solution phase, amino acid sequence.

[00586] In the instance where the first amino acid sequence, e.g. an Ab-X, is chosen to be the immobilized amino acid sequence, it is coated onto the wells of the ELISA plate, after which the plates are blocked with a suitable blocking solution to minimize non-specific binding of reagents that are subsequently added. An excess amount of the second amino acid sequence, i.e., Ab-Y, is then added to the ELISA plate such that the moles of Ab-Y [target] binding sites per well are at least 10 fold higher than the moles of Ab-X [target] binding sites that are used, per well, during the coating of the ELISA plate. [target] is then added such that the moles of [target] added per well are at least 25-fold lower than the moles of Ab-X [target] binding sites that are used for coating each well. Following a suitable incubation period the ELISA plate is washed and a reagent for detecting the target is added to measure the amount of target specifically bound by the coated anti-[target] amino acid sequence (in this case Ab-X).

[00587] The background signal for the assay is defined as the signal obtained in wells with the coated amino acid sequence (in this case Ab-X), second solution phase amino acid sequence (in this case Ab-Y), [target] buffer only (i.e., no target) and target detection reagents. The positive control signal for the assay is defined as the signal obtained in wells with the coated amino acid sequence (in this case Ab-X), second solution phase amino acid sequence buffer only (i.e., no second solution phase amino acid sequence), target and target detection reagents. The ELISA assay may be run in a manner so as to have the positive control signal be at least six times the background signal.

[00588] To avoid any artifacts (e.g. significantly different affinities between Ab-X and Ab-Y for [target]) resulting from the choice of which amino acid sequence to use as the coating amino acid sequence and which to use as the second (competitor) amino acid sequence, the cross-blocking assay may to be run in two formats: (1) format 1 is where Ab-X is the amino acid sequence that is coated onto the ELISA plate and Ab-Y is the competitor amino acid sequence that is in solution and (2) format 2 is where Ab-Y is the amino acid sequence that is coated onto the ELISA plate and Ab-X is the competitor amino acid sequence that is in solution. Ab-X and Ab-Y are defined as cross-blocking if, either in format 1 or in format 2, the solution phase anti-target amino acid sequence is able to cause a reduction of between 60% and 100%, specifically between 70% and 100%, and more specifically between 80% and 100%, of the target detection signal {i.e., the amount of target bound by the coated amino acid sequence) as compared to the target detection signal obtained in the absence of the solution phase anti- target amino acid sequence (i.e., the positive control wells).

10. Example X

10.1. Macrophage depletion experiment

[00589] All anti-DR5 antibodies in clinical development to date require cross-linking to achieve optimal potency in vitro and in vivo. In vivo, this crosslinking is believed to be mediated via the binding of the Fc portion of the anti-DR5 antibody to Fc receptor expressing immune cells. To investigate the cross-linking effects in vivo of the anti-DR5 antibody LCR211 compared with an NB construct, which is expected to not require this crosslinking, the activity of the mouse IgG1 anti-DR5 antibody LCR211 is compared to 11H6 tetra under tumor associated macrophage (TAM) depletion conditions in the MiaPaCa-2 xenograft model in the NOD/LtSz-*scid IL2R* gamma^{null} female mice (NSG mouse) background. NSG (NOD-SCID gamma) mice are deficient in T cells, B cells, and have little or no NK cell cytotoxicity activity caused by disrupted cytokine signaling as a result of the deletion of the IL-2R gamma-chain (Shultz, J. of Immunology 2005). Depletion of TAMs is accomplished using a small molecule that inhibits signaling through the CSF-1 receptor. Three doses at 200mg/kg once per day depletes up to 80% of macrophages, as previously shown. Daily dosing is continued throughout the study.

[00590] MiaPaCa cells are harvested in exponential growth. Five million cells mixed 50:50 with Matrigel are subcutaneously implanted into the upper right flank of nude mice. For cell implantation, mice are anesthetized with continuous flow of 2-4% isoflurane/ oxygen mixture using the integrated multi chambers anesthesia center (IMCAC) and induction chamber (Vetequip. Inc., Pleasanton, CA). The tumor take rate is >90% and tumors reach approximately 150-350 mm^3 around 14 days post cell implantation. Animals are randomized according to tumor volume such that the mean tumor volume and range are statistically similar between treatment groups (as determined by a Student's t-test). Tumors are measured with digital calipers twice a week at the start of dosing. Tumor volumes are calculated using the ellipsoid formula: (length x width^2)/2. LCR211 is dosed at 10mg/kg 3qw iv and 11H6 tetra is dosed at 10mg/kg and 40mg/kg qw iv, with or without the CSF1-R inhibitor (CSF-1Ri) at 250mg/kg qd po.

[00591] Percent treatment/control (T/C) values are calculated using the following formula:

$$\% \, T/C = 100 \times \Delta T/\Delta C \text{ if } \Delta T > 0$$

$$\% \text{ Regression} = 100 \times \Delta T/T_{initial} \text{ if } \Delta T < 0$$

where:

T = mean tumor volume of the drug-treated group on the final day of the study;

ΔT = mean tumor volume of the drug-treated group on the final day of the study – mean tumor volume of the drug-treated group on initial day of dosing;

$T_{initial}$ = mean tumor volume of the drug-treated group on initial day of dosing;

C = mean tumor volume of the control group on the final day of the study; and

ΔC = mean tumor volume of the control group on the final day of the study – mean tumor volume of the control group on initial day of dosing.

%T/C calculations are done at the end of study.

[00592] As seen in Table 27 and in Figures 4A and 4B , 11H6 tetra maintains potent single agent activity in the MiaPaCa-2 xenograft under TAM depletion conditions in the NSG mouse background, while under the same conditions the murine anti-DR5 antibody LCR211 loses efficacy.

Table 27: Summary of 11H6 tetra efficacy under TAM depletion conditions

Molecule	%T/C no TAM depletion	%T/C with TAM depletion
LCR211 10 mg/kg 3qw	22%	95%
11H6 tetra 10 mg/kg qw	- 23.64%	- 5.73%
11H6 tetra 40 mg/kg qw	- 67.77%	-9.11%

10.2. Anti-tumor activity of a DR5 Agent in LCR211-insensitive patient-derived tumor model

[00593] TPAN1-IFA, a patient-derived pancreatic tumor (Xentech), is implanted subcutaneously (sc) into (80) female nude mice (Harlan, about 8weeks of age at implant). Animals are randomized at start of treatment into groups of nine. Starting tumor volume is 99 mm^3 (range 63-196 mm^3). Treatment groups are: (1) Vehicle, once a week (qw), intravenously (i.v.), (2) LCR211, 10mg/kg, three times a week (3qw), i.v., (3) 11H6 tetramer, 10mg/kg, qw, i.v., (4) 11H6, 40mg/kg, qw, i.v., 5. Gemcitabine, 60 mg/kg, twice a week (2qw), i.v. Intravenous dosing volume is 5 ml/kg. Mice are weighted twice a week. Tumors are callipered twice a week and tumor volume (TV) calculated using the formula: TV (mm^3) = [length (mm) x width (mm)2] / 2 is used, where the length and the width are the longest and the shortest diameters of each tumor, respectively.

[00594] As shown in Figure 5, after 4 weeks of dosing, LCR211 shows no single agent activity, with the mean change in tumor volume of the treatment group over control (T/C) = 109%. In contrast, 11H6 dosed at 10 mg/kg weekly and at 40 mg/kg weekly results in 1% and 86% regression, respectively ($p<0.05$ vs vehicle). Gemcitabine treatment results in a T/C of 25% ($p<0.05$ vs vehicle). LCR211 and 11H6 treatment is well tolerated with no significant loss of body weight observed. Thus, in a patient-derived cancer that is insensitive to conventional antibody targeting of DR5, the NB constructs show potent tumor regression. In this example, the NB construct has the potential to treat a larger class of patients that could be refractory to conventional targeting approaches for this pathway.

11. Example XI

11.1. X-ray crystallographic structure determination of the human DR5/ NB construct complexes

[00595] Crystal structures of a human DR5 ECD fragment bound to monomeric constructs 11H6 (SEQ ID NO: 103) and 4E6 (SEQ ID NO: 104) are determined. As detailed below, individual DR5 protein fragments are expressed, purified and mixed to form complexes. Protein crystallography is employed to generate atomic resolution data for the DR5 protein bound to the two examples.

[00596] Two variants of DR5 protein are produced for crystallography, namely DR5_54 and DR5_61. Following the sequence numbering of human DR5, GenBank accession number BAA33723.1 (SEQ ID NO: 89), the DR5 sequences correspond to residues 54 to 183, and 61 to 183, respectively. As shown in Table 28, sequences in lower case letters are removed during production. For DR5_54 (SEQ ID NO: 100) and DR5_61 (SEQ ID NO: 101), human DR5 sequence is underlined. In Table 28, "ID" represents the SEQ ID NO.

Table 28: Proteins used for crystal structure determination

Construct	Amino acid sequence in one letter code.	ID
HuDR5 GenBank: BAA33723.1	meqrgqnapaasgarkrhgpgpreargarpglrvpktlvlvvaavlllvsaesali tqqdlapqqrvapqqkrsspseglcppghhisedgrdciscкygqdysthwndllf clrctrcdsgevelspctttrntvcqceegtfreedspemcrkcrtgcprgmvkvg dctpwsdiecvhkesgtkhsgeapaveetvtsspgtpaspcslsgiiigvtvaavv livavfvcksllwkkvlpylkgicsggggdpervdrssqrpgaednvlneivsilq ptqvpeqemevqepaeptgvnmlspgesehllepaeaersqrrrllvpanegdpte tlrqcfddfadlvpfdsweplmrklglmdneikvakaeaaghrdtlytmlikwvnk tgrdasvhtlldaletlgerlakqkiedhllssgkfmylegnadsams	89
DR5_54 gp67DR5a54-s183-PH	mvsaivlyvllaaaahsafaadlgslevlfqALITQQDLAPQQRAAPQQKRSSPSE GLCPPGHHISEDGRDCISCKYGQDYSTHWNDLLFCLRCTRCDSGEVELSPCTTTRN TVCQCEEGTFREEDSPEMCRKCRTGCPRGMVKVGDCTPWSDIECVHKESAAALEVL FQgpssgklghhhhhhhhhh	100
DR5_61 gp67DR5l61-s183-PH	mvsaivlyvllaaaahsafaadlgslevlfqGPSMALAPQQRAAPQQKRSSPSEGL CPPGHHISEDGRDCISCKYGQDYSTHWNDLLFCLRCTRCDSGEVELSPCTTTRNTV CQCEEGTFREEDSPEMCRKCRTGCPRGMVKVGDCTPWSDIECVHKESAAALEVLFQ gpssgklghhhhhhhhhh	101
11H6 hu pAX100-11H6	mkktaiaiavalaglatvaqaEVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGTFDKINNMG WYRQAPGKQRDLVAQITPGGITDYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRPEDTA VYYCNAEILKRAYIDVYVNYWGQGTLVTVSSAAAEQKLISEEDLNGAAHHHHHH	102
4E6 hu pAX111-4E6	mkktaiaiavalaglatvaqaEVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRTFGSIRVG WFRQAPGKGREFVSAINRNDGTTYYADSVKGRFTISRDNSKNTVYLQMNSLRPEDT AVYYCAAGLQYNRAADRVPVGAVYWGQGTLVTVSSHHHHHH	103

[00597]

[00598] The above proteins are expressed in SF9 cells using a baculovirus expression system, with the expression vector containing the GP67 signal peptide. DR5 protein is purified from the cell growth media following a 2.5 day infection. The media is clarified with the addition of 5 mM $CaCl_2$, 1 mM $NiCl_2$, 50 mM Tris pH 8.0, and 1 μM PMSF. The

protein is captured on Ni-NTA resin (Qiagen) equilibrated in 50 mM Tris pH 8.0, 300 mM NaCl using a gravity flow column. The column is washed with 50 mM Tris pH 8.0, 300 mM NaCl, 30 mM imidazole, followed by elution with 50 mM Tris pH 8.0, 300 mM NaCl, 300 mM imidazole. Eluted DR5 from the Ni column is cleaved with PreScission protease (GE Healthcare), followed by gel filtration chromatography using a Superdex 75 column (GE Healthcare) equilibrated in 50 mM HEPES pH 7.6, 150 mM NaCl. DR5 is further purified by ion exchange using a MonoQ column (GE Healthcare) at pH 7.5 with a 20 column volume gradient of 0.03-1M NaCl. Peak fractions are analyzed by SDS-PAGE and LCMS prior to pooling.

11.2. 4E6 and 11H6 crystallization with DR5.

[00599] Both 4E6 (pAX111-4E6, SEQ ID NO:103) and 11H6 (pAX100-11H6, SEQ ID NO:102) are cloned as monomeric NB constructs for expression in *E coli* using BL21(DE3)pLysS cells and BL21(DE3)Star cells, respectively, and both contain signal sequences for periplasmic localization, as provided in Table 28 above. Following a 3 hour induction with IPTG at 37°C, cells are harvested and lysed. Protein is captured on a Ni-NTA column pre-equilibrated in 50 mM Tris pH 8.0, 300 mM NaCl. The column is washed with 50 mM Tris pH 8.0, 300 mM NaCl, 50 mM imidazole, followed by elution with 50 mM Tris pH 8.0, 300 mM NaCl, 300 mM imidazole. The Ni eluate is further purified via gel filtration chromatography using a Superdex 75 column (GE Healthcare). Whereas this is the final purification step for 11H6, the 4E6 underwent an additional purification step via a MonoS cation exchange column (GE Healthcare).

[00600] A complex of DR5_61/4E6 is prepared by mixing DR5_61 and 4E6 in a 1:1 molar ratio (concentration measured via LCUV), incubating on ice for 1 hour, and purifying the complex on a Superdex75 column (GE Healthcare) equilibrated in 20 mM HEPES pH 7.5, 150 mM NaCl. Peak fractions are analyzed by SDS-PAGE and LCMS. Fractions containing DR5_61/4E6 are concentrated to about 10 mg/ml for crystallization.

[00601] A complex of DR5_54/11H6 is prepared by mixing DR5_54 and 11H6 in a molar ration of 1:1.3 (concentration estimated by LCUV), incubating on ice for 1 hour, and purifying the complex on a Superdex75 column (GE Healthcare) equilibrated in 25 mM HEPES pH 7.5, 150 mM NaCl. Peak fractions containing the DR5_54/11H6 dimer are pooled and concentrated to about 12.7 mg/ml. The dimer is then Trypsin-treated as follows: 200 µl of dimer (about 2.5 mg) is used to resuspend 20 µg of lyophylized trypsin, which is then incubated at room temperature for 15 minutes. The DR5_54/11H6/trypsin mixture is centrifuged prior to setting up crystallization screens.

[00602] Crystals are grown by sitting drop vapor diffusion from drops containing equal volumes of protein and reservoir solution. For DR5_61/4E6 complex a reservoir solution of 22% PEG 3350, 150 mM calcium acetate, 100 mM HEPES pH 7. 5 produced crystals

upon incubation at 20 °C. For trypsin-treated DR5_54/11H6 complex a reservoir solution of 0.2 M ammonium sulfate, 0.1M Tris pH 8.5, 25% PEG 3350 produced crystals upon incubation at 20 °C.

[00603] The DR5_61/4E6, crystals are transferred to a cryo solution containing 25% PEG 3350, 50 mM HEPES pH 7.5, 150 mM calcium acetate, 15% glycerol, 10% ethylene glycol and flash cooled in liquid nitrogen. The DR5_a54/11H6, crystals are transferred to reservoir solution containing additional 22% glycerol and flash cooled in liquid nitrogen.

[00604] For DR5_61/4E6 complex, diffraction data are collected at station PXI-X06SA at the Swiss Light Source (Paul Scherrer Institut, Villigen, Switzerland). Data are processed and scaled at 1.9Å using autoPROC (Global Phasing, LTD) in space group C121with cell dimensions a=98.50Å, b=84.65Å, c=64.91Å, alpha=90°, beta=99.38°, gamma=90°. The DR5_61/4E6 structure is solved by molecular replacement using Phaser (McCoy *et al.*, (2007) J. Appl. Cryst. 40: 658-674) with DR5 structure 2H9G and the camelized human VH structure 1OL0 as search models. The final model, which contains 2 molecule of the DR5_61/4E6 complex per asymmetric unit, is built in COOT (Emsley & Cowtan (2004) Acta Cryst. 60: 2126-2132) and refined to R and R_{free} values of 22.2% and 24.1%, respectively, with an rmsd of 0.003Å and 0.69° for bond lengths and bond angles, respectively, using PHENIX (Adams *et al.*, Acta Cryst. D66, 213-221 (2010)).

[00605] For DR5_54/11H6 complex, diffraction data are collected at beamline 17-ID at the Advanced Photon Source (Argonne National Laboratory, USA). Data are processed and scaled at 2.2Å using autoPROC (Global Phasing, LTD) in space group $P6_5$ with cell dimensions a=99.61Å, b=99.61 Å, c=107.73Å, alpha=90°, beta=90°, gamma=120°. The DR5_54/11H6 structure is solved by molecular replacement using Phaser (McCoy *et al.*, (2007) J. Appl. Cryst. 40: 658-674) with DR5 structure 2H9G and NB construct 4E6 as search models. The final model, which contains 2 molecule of the DR5_54/11H6 complex per asymmetric unit, is built in COOT (Emsley & Cowtan (2004) Acta Cryst. 60: 2126-2132) and refined to R and R_{free} values of 19.5% and 22.0%, respectively, with an rmsd of 0.002 Å and 0.64° for bond lengths and bond angles, respectively, using PHENIX (Adams *et al.*, Acta Cryst. D66, 213-221 (2010)).

11.3. <u>4E6 and 11H6 recognize unique epitopes on DR5</u>

[00606] The crystal structure of the 4E6/DR5_61 complex has been used to identify the DR5 epitope for the 4E6 construct. The interaction surface on DR5 is formed by three discontinuous (i.e., noncontiguous) sequences: namely residues 77 through 80, residues 87 through 91, and residues 105 through 114, as detailed in Table 29A. These residues form the three-dimensional surface that is recognized by the NB construct. Interactions include backbone interactions, solvent mediated interactions, and direct sidechain interactions. The amino acids whose sidechains are directly contributing to the

interactions noted in Table 29A. The interaction surface contribution from the 4E6 NB construct is formed by its N-terminal residue 2, and three loop regions: residues 28 through 33, residues 53 through 59, and residues 99 through 115. The contact residues are listed in Table 29B.

[00607] In Table 29A, DR5 residues that contain atoms in contact with the NB construct, 4E6 are listed. Contact is defined to be within 5 Angstroms of the NB construct to account for potential water mediated interactions. Amino acids whose sidechains contribute directly to the interaction surface are noted with a "+".

Table 29A: DR5 Conformational Epitope for 4E6

Protein	Amino acid	Sequence position	Sidechain Interaction
DR5	S	77	
DR5	E	78	+
DR5	G	79	
DR5	L	80	+
DR5	I	87	+
DR5	S	88	
DR5	E	89	
DR5	D	90	
DR5	G	91	+
DR5	T	105	
DR5	H	106	+
DR5	W	107	+
DR5	N	108	
DR5	D	109	+
DR5	L	110	+
DR5	L	111	+
DR5	F	112	+
DR5	L	114	+

[00608] In Table 29B, residues in the NB construct 4E6 that are in contact with DR5 are listed. Contact is defined to be within 5 Angstroms of the NB construct to account for potential water mediated interactions. Amino acids whose sidechains contribute directly to the interaction surface are noted with a "+".

Table 29B: 4E6 amino acids in contact with DR5

Protein	Amino acid	Sequence position	Sidechain Interaction
4E6	V	2	+
4E6	T	28	+
4E6	G	30	+
4E6	S	31	+
4E6	I	32	+

4E6	R	33	+
4E6	R	53	
4E6	N	54	+
4E6	Y	59	
4E6	G	99	+
4E6	L	100	
4E6	Q	101	+
4E6	Y	102	+
4E6	N	103	
4E6	R	104	
4E6	A	105	+
4E6	A	106	+
4E6	V	111	+
4E6	V	114	+
4E6	Y	115	+

[00609] The crystal structure of the 11H6/DR5_54 complex is used to identify the DR5 epitope for the 11H6 construct. The interaction surface on DR5 is formed by two discontinuous sequences, residues 86 through 102 and residues 111 through 118, and two additional residues 74 and 125 as detailed in Table 30A. These residues form the three-dimensional surface that is recognized by the NB construct. Interactions include backbone interactions, solvent mediated interactions, and direct sidechain interactions. The amino acids whose sidechains are directly contributing to the interactions noted in Table 30A. The interaction surface contribution from the 11H6 construct extends beyond the loop regions observed for the 4E6 construct. Residues 30 through 37, residues 44 through 61 and residues 96 through 112 contribute to the binding surface of the 11H6 construct as detailed in Table 30B. The 11H6 construct's loop from residues 98 to 110 is in a very different conformation than the corresponding loop from the 4E6 construct. This alternate loop position provides a unique interaction surface for DR5 binding.

[00610] In Table 30A, DR5 residues that contain atoms in contact with the 11H6 construct are listed. Contact is defined to be within 5 Angstroms of 11H6 to account for potential water mediated interactions. Amino acids whose sidechains contribute directly to the interaction surface are noted with a "+". Buried surface area is determined as a percentage.

Table 30A: DR5 Conformational Epitope for 11H6

Protein	Amino acid	Sequence position	Buried surface area (%)
DR5	S	74	
DR5	H	86	+

DR5	I	87	
DR5	S	88	+
DR5	E	89	+
DR5	D	90	+
DR5	R	92	
DR5	D	93	+
DR5	I	95	+
DR5	S	96	
DR5	K	98	+
DR5	G	100	
DR5	Q	101	+
DR5	D	102	+
DR5	L	111	+
DR5	F	112	+
DR5	C	113	
DR5	R	115	+
DR5	R	118	+
DR5	E	125	

[00611] In Table 30B, residues in 11H6 that are in contact with DR5 are listed. Contact is defined to be within 5 Angstroms of the 11H6 construct to account for potential water mediated interactions. Amino acids whose sidechains contribute directly to the interaction surface are noted with a "+".

Table 30B: 11H6 amino acids in contact with DR5

Protein	Amino acid	Sequence position	Sidechain Interaction
11H6	K	30	+
11H6	N	32	+
11H6	N	33	+
11H6	Y	37	+
11H6	Q	44	+
11H6	R	45	
11H6	D	46	+
11H6	L	47	+
11H6	Q	50	+
11H6	I	51	
11H6	T	52	+
11H6	P	53	
11H6	G	54	
11H6	G	55	
11H6	I	56	+
11H6	T	57	
11H6	D	58	+
11H6	A	60	+
11H6	D	61	

11H6	N	96	+
11H6	E	98	+
11H6	L	100	+
11H6	Y	104	
11H6	D	106	
11H6	V	107	+
11H6	Y	108	+
11H6	N	110	+
11H6	W	112	+

EQUIVALENTS

[00612] One embodiment provides an isolated polypeptide comprising at least one monomer of a single variable domain of a NB agent that specifically binds to human DR5.

[00613] One embodiment provides the polypeptide of paragraph [00612], wherein said single variable domain is selected from the group consisting of a) singe variable domains comprising one or more complementarity determining region 3 (CDR3) sequences selected from any one or more of SEQ ID NOs: 63-68; b) single variable domains comprising one or more complementarity determining region 3 (CDR3) sequences with 90% identity to at least one CDR3 selected from any one or more of SEQ ID NOs: 63-68; and c) single variable domains comprising one or more complementarity determining region 3 (CDR3) sequences with at least 95% identity to at least one CDR3 selected from any one or more of SEQ ID NOs: 63-68.

[00614] One embodiment provides the polypeptide of paragraph [00612], wherein said single variable domain is selected from the group consisting of a) singe variable domains comprising one or more complementarity determining region 3 (CDR3) sequences selected from any one or more of SEQ ID NOs: 41-44, 51-55 and 63-68; b) single variable domains comprising one or more complementarity determining region 3 (CDR3) sequences with at least 90% identity to at least one CDR3 selected from any one or more of SEQ ID NOs: 41-44, 51-55 and 63-68; and c) single variable domains comprising one or more complementarity determining region 3 (CDR3) sequences with at least 95% identity to at least one CDR3 selected from any one or more of SEQ ID NOs: 41-44, 51-55 and 63-68 with at least 90% identity.

[00615] One embodiment provides the polypeptide of paragraph [00612], wherein said single variable domain is selected from the group consisting of a) singe variable domains with SEQ ID NOs: 1 – 5, 26, 30 and 87; and b) single variable domains with at least 95% identity to at least one single variable domain with SEQ ID NOs: 1 – 5, 26, 30 and 87.

[00616] One embodiment provides an isolated polypeptide comprising at least three monomers of a single variables domain that specifically binds to human DR5.

[00617] One embodiment provides the polypeptide of paragraph [00616], wherein said polypeptide comprises three identical monomers of the single variable domain and wherein said single variable domain is selected from the group consisting of a) a single variable domain comprising one or more complementarity determining region 3 (CDR3) sequences selected from any one or more of SEQ ID NOs: 63-68; b) single variable domains comprising one or more complementarity determining region 3 (CDR3) sequences with at least 90% identity to at least one CDR3 selected from any one or more of SEQ ID NOs: 63-68; and c) single variable domains comprising one or more complementarity determining region 3 (CDR3) sequences with at least 95% identity to at least one CDR3 selected from any one or more of SEQ ID NOs: 63-68 with at least 90% identity.

[00618] One embodiment provides the polypeptide of paragraph [00616], wherein said polypeptide comprises three identical monomers of the single variable domain and wherein said single variable domain is selected from the group consisting of a) singe variable domains comprising one or more complementarity determining region 3 (CDR3) sequences selected from any one or more of SEQ ID NOs: 41-44, 51-55 and 63-68; b) single variable domains comprising one or more complementarity determining region 3 (CDR3) sequences with at least 90% identity to at least one CDR3 selected from any one or more of SEQ ID NOs: 41-44, 51-55 and 63-68; and c) single variable domains comprising one or more complementarity determining region 3 (CDR3) sequences with at least 95% identity to at least one CDR3 selected from any one or more of SEQ ID NOs: 41-44, 51-55 and 63-68 with at least 90% identity.

[00619] One embodiment provides the polypeptide of paragraph [00616], wherein said polypeptide comprises three identical monomers of the single variable domain and wherein said single variable domain is selected from the group consisting of a) singe variable domains with SEQ ID NOs: 1 – 5, 26, 30 and 87; b) single variable domains with at least 90% identity to at least one single variable domain with SEQ ID NOs: 1 – 5, 26, 30 and 87and c) single variable domains with at least 95% identity to at least one single variable domain with SEQ ID NOs: 1 – 5, 26, 30 and 87.

[00620] One embodiment provides the polypeptide of paragraph [00616] comprising an amino sequence that is selected from the group consisting of a) amino acid sequences with SEQ ID NO: 6, 9, 12-14, 17, 20, 27 and 31; and b) amino acid sequences with at least 90% identity to said amino acid sequence with SEQ ID NO: 6, 9, 12-14, 17, 20, 27 and 31.

[00621] One embodiment provides the polypeptide of paragraph [00616] comprising an amino sequence that is selected from the group consisting of a) amino acid sequences with SEQ ID NO: 6, 9, 12-14, 17, 20, 27 and 31; and b) amino acid sequences with at least 90% identity to said amino acid sequence with SEQ ID NO: 6, 9, 12-14, 17, 20, 27 and 31.

[00622] The polypeptide of paragraph 5 comprising an amino sequence that is selected from the group consisting of a) amino acid sequences with SEQ ID NO: 6, 9, 12-14, 17, 20, 27 and 31; and b) amino acid sequences with at least 95% identity to said amino acid sequence with SEQ ID NO: 6, 9, 12-14, 17, 20, 27 and 31.

[00623] One embodiment provides an isolated polypeptide comprising at least four monomers of a single variable domain that specifically binds to human DR5.

[00624] One embodiment provides the polypeptide of paragraph [00623], wherein said polypeptide comprises four single variable domains and wherein said single variable domain is selected from one, two, three or four monomers from the group consisting of a) singe variable domains with SEQ ID NOs: 1 – 5, 26, 30 and 87; b) single variable domains with at least 90% identity to said single variable domain with SEQ ID NOs: 1 – 5, 26, 30 and 87; and c) single variable domains with 95% identity to said single variable domain with SEQ ID NOs: 1 – 5, 26, 30 and 87.

[00625] One embodiment provides the polypeptide of paragraph [00623], wherein said polypeptide comprises four identical single variable domains and wherein said single variable domain is selected from the group consisting of a) singe variable domains with SEQ ID NOs: 1 – 5, 26, 30 and 87; b) single variable domains with at least 90% identity to said single variable domain with SEQ ID NOs: 1 – 5, 26, 30 and 87; and c) single variable domains with 95% identity to said single variable domain with SEQ ID NOs: 1 – 5, 26, 30 and 87.

[00626] One embodiment provides the polypeptide of paragraph [00623], wherein said polypeptide comprises four identical single variable domains and wherein said single variable domain is selected from the group consisting of a) singe variable domains with SEQ ID NOs: 1 – 5, 26, 30 and 87; and b) single variable domains with at least 95% identity to at least one single variable domain with SEQ ID NOs: 1 – 5, 26, 30 and 87.

[00627] One embodiment provides the polypeptide of paragraph [00623] comprising an amino sequence that is selected from the group consisting of a) an amino acid sequence of SEQ ID NO: 88; b) amino acid sequences with at least 90% identity to said amino acid sequence with SEQ ID NO: 88; and c) amino acid sequences with 95% identity to said amino acid sequence with SEQ ID NO: 88.

[00628] One embodiment provides the polypeptide of paragraph [00623] comprising an amino sequence that is selected from the group consisting of a) amino acid sequences with SEQ ID NO: 7, 10, 15, 18, 21, 28 and 32; b) amino acid sequences with at least 90% identity to said amino acid sequence with SEQ ID NO: 7, 10, 15, 18, 21, 28 and 32; and c) amino acid sequences with 95% identity to said amino acid sequence with SEQ ID NO: 7, 10, 15, 18, 21, 28 and 32.

[00629] The polypeptide of paragraph [00623] comprising a humanized amino sequence that is selected from the group consisting of a) amino acid sequences with SEQ ID NO: 28; b) amino acid sequences with SEQ ID NO: 32; and b) amino acid sequences with at least 95% identity to said amino acid sequence with SEQ ID NO: 28 and 32.

[00630] One embodiment provides an isolated polypeptide comprising at least five monomers of a single variable domain that specifically binds to human DR5.

[00631] One embodiment provides the polypeptide of paragraph [00630], wherein said polypeptide comprises five single variable domains and wherein said single variable domain is selected from one, two, three, four or five monomers of the group consisting of a) singe variable domains with SEQ ID NOs: 1 – 5, 26, 30 and 87; b) single variable domains with at least 90% identity to said single variable domain with SEQ ID NOs: 1 – 5, 26, 30 and 87; and c) single variable domains with at least 95% identity to said single variable domain with SEQ ID NOs: 1 – 5, 26, 30 and 87 with at least 90% identity.

[00632] One embodiment provides the polypeptide of paragraph [00630], wherein said polypeptide comprises five identical single variable domains and wherein said single variable domain is selected from the group consisting of a) singe variable domains with SEQ ID NOs: 1 – 5, 26, 30 and 87; b) single variable domains with at least 90% identity to said single variable domain with SEQ ID NOs: 1 – 5, 26, 30 and 87; and b) single variable domains with 95% identity to said single variable domain with SEQ ID NOs: 1 – 5, 26, 30 and 87.

[00633] One embodiment provides the polypeptide of paragraph [00630], wherein said polypeptide comprises five single variable domains and wherein said single variable domain is humanized, and said humanized domain is selected from the group consisting of a) singe variable domains with SEQ ID NOs: 26 and 30; b) single variable domains with at least 90% identity to at least one single variable domain with SEQ ID NOs: 26 and 30; and b) single variable domains with at least 95% identity to at least one single variable domain with SEQ ID NOs: 26 and 30.

[00634] One embodiment provides the polypeptide of paragraph [00630] comprising an amino sequence that is selected from the group consisting of a) amino acid sequences with SEQ ID NO: 8, 11, 16, 19, 22, 29 and 33; b) amino acid sequences with at least 90% identity to said amino acid sequence with SEQ ID NO: 8, 11, 16, 19, 22, 29 and 33; and c) amino acid sequences with 95% identity to said amino acid sequence with SEQ ID NO: 8, 11, 16, 19, 22, 29 and 33.

[00635] One embodiment provides the polypeptide of paragraph [00630] comprising an amino sequence that is selected from the group consisting of a) amino acid sequence of SEQ ID NO: 29; b) amino acid sequences with at least 90% identity to said amino acid

sequence with SEQ ID NO: 29; and b) amino acid sequences with 95% identity to said amino acid sequence with SEQ ID NO: 29.

[00636] One embodiment provides the polypeptide of paragraph [00630] comprising an amino sequence that is selected from the group consisting of a) amino acid sequences with SEQ ID NO: 33; b) amino acid sequences with at least 90% identity to said amino acid sequence with SEQ ID NO: 33; and b) amino acid sequences with at least 95% identity to said amino acid sequence with SEQ ID NO: 33.

[00637] One embodiment provides an isolated polypeptide comprising three or four or five monomers of a single variable domain that specifically binds to human DR5 and wherein said polypeptide has an in vitro potency (IC_{50}) against a panel of at least 2 tumor cell lines selected from the group consisting of Colo205, Jurkat, Molt4, H2122, H226 and H2052 that is equal or lower than 100nM.

[00638] One embodiment provides the polypeptide of paragraph [00637], wherein said polypeptide has an in vitro potency that is equal or lower than 10 nM.

[00639] One embodiment provides the polypeptide of paragraph [00637], wherein said polypeptide has an in vitro potency that is equal or lower than 1 nM.

[00640] One embodiment provides the polypeptide of paragraph [00637], wherein said polypeptide has an in vitro potency that is equal or lower than 100 pM.

[00641] One embodiment provides the polypeptide of paragraphs [00637] to [00640], wherein said polypeptide has an in vitro potency (IC_{50}) against a panel of at least 3 non-tumor cell lines selected from the group consisting of Malme-3, WI-38, ARPE-19, 184A1, Huvec, HAAE-1 that is equal of greater than 20nM.

[00642] One embodiment provides the polypeptide of paragraphs [00637] to [00640], wherein said polypeptide has an in vitro potency (IC_{50}) against a panel of at least 3 non-tumor cell lines selected from the group consisting of Malme-3, WI-38, ARPE-19, 184A1, Huvec, HAAE-1 that is equal of greater than 100 nM.

[00643] One embodiment provides the polypeptide of paragraphs [00637] to [00642], wherein said polypeptide comprises three or four or five monomers of a single variable domain and wherein said single variable domain is selected from the group consisting of a) singe variable domains with SEQ ID NOs: 1 – 5, 26, 30 and 87; and b) single variable domains with at least 90% identity to said single variable domain with SEQ ID NOs: 1 – 5, 26, 30 and 87.

[00644] The polypeptide of paragraphs [00637] to [00642], wherein said polypeptide comprises three or four or five monomers of a single variable domain and wherein said single variable domain is humanized and selected from the group consisting of a) singe variable domains with SEQ ID NOs: 26 and 30; b) single variable domains with at least 90% identity to said single variable domain with SEQ ID NOs: 26 and 30; and b) single

variable domains with at least 95% identity to said single variable domain with SEQ ID NOs: 26 and 30.

[00645] One embodiment provides the polypeptide of paragraphs [00637] to [00642], wherein said polypeptide is selected from the group consisting of a) the polypeptide selected from any one or more of SEQ ID NOs: 27, 28 and 29; b) a polypeptide with at least 95% identity to at least one polypeptide selected from any one or more of SEQ ID NOs: 27, 28 and 29; c) the polypeptide selected from any one or more of SEQ ID NOs: 31, 32 and 33; and d) a polypeptide with at least 95% identity to at least one polypeptide selected from any one or more of SEQ ID NOs: 31, 32 and 33.

[00646] One embodiment provides an isolated polypeptide comprising an amino sequence that is selected from the group consisting of one or more amino acid sequences of SEQ ID NO: 1 through 22, 26 through 33, 87 and 88.

[00647] One embodiment provides the isolated polypeptide according to any of the preceding paragraphs [00612] to present, wherein said polypeptide does not fully or partially compete with the natural ligand of the DR5 in a competitive binding assay.

[00648] One embodiment provides the isolated polypeptide according to any of the preceding paragraphs [00612] to present, wherein said polypeptide does fully or partially compete with the natural ligand of the DR5 in a competitive binding assay.

[00649] One embodiment provides the isolated polypeptide according to paragraphs [00612], [00616], [00623], [00630], [00637] or [00648], comprising at least one complementarity determining region (CDR) having at least 60, 70, 80, 90, 95 or 100 percent sequence identity with at least one of the CDR regions depicted in any of SEQ ID NO: 41 to 44 (CDR1); SEQ ID NO: 51 to 55 (CDR2); SEQ ID NO: 63 to 68 (CDR3), more preferably SEQ ID NO: 51 to 55 and SEQ ID NO: 63 to 68.

[00650] One embodiment provides the isolated polypeptide according to paragraphs [00612], [00616], [00623], [00630], [00637] or [00648], comprising CDR1 to CDR3 regions having at least 90, 95 or 100 percent sequence identity respectively with the CDR regions depicted in any of SEQ ID NO: 41 to 44 (CDR1); SEQ ID NO: 51 to 55 (CDR2); SEQ ID NO: 63 to 68 (CDR3).

[00651] One embodiment provides the isolated polypeptide according to any of paragraphs [00612], [00616], [00623], [00630], [00637] or [00648], comprising or essentially consisting of an amino acid sequence having at least 90, 95 or 100 percent sequence identity with any of sequences as depicted in SEQ ID NO: 26 to 33.

[00652] One embodiment provides the isolated polypeptide according to any of paragraphs [00612], [00616], [00623], [00630], [00637] or [00648], comprising a CDR3 region according to SEQ ID NO: 64 or SEQ ID NO: 66.

[00653] One embodiment provides the isolated polypeptide according to any of paragraphs [00612], [00616], [00623], [00630], [00637] or [00648], a CDR1, CDR2 and CDR3 region identical respectively to the CDR regions depicted in SEQ ID NO: 41 to 44 (CDR1); SEQ ID NO: 51 to 55 (CDR2); SEQ ID NO: 63 to 68 (CDR3) or variant CDR regions with 1, 2, 3, 4 or 5 amino acid substituted, deleted or inserted when compared to original CDR regions as depicted therein.

[00654] One embodiment provides the isolated polypeptide according to any preceding paragraphs [00612] to present that is an immunoglobulin or a fragment thereof.

[00655] One embodiment provides the isolated polypeptide according to any preceding paragraphs [00612] to present that is a humanized immunoglobulin, a camelized immunoglobulin or an immunoglobulin obtainable by affinity optimization technique, or a fragment thereof.

[00656] One embodiment provides the isolated polypeptide according to any preceding paragraphs [00612] to present that essentially consists of a light chain variable domain sequence, e.g., a V_L-sequence; or of a heavy chain variable domain sequence, e.g., a V_H-sequence.

[00657] One embodiment provides the isolated polypeptide according to any preceding paragraphs [00612] to present that essentially consists of a heavy chain variable domain sequence that is derived from a conventional four-chain antibody or that essentially consists of a heavy chain variable domain sequence that is derived from heavy chain antibody.

[00658] One embodiment provides the isolated polypeptide according to any preceding paragraphs [00612] to present that essentially consists of a domain antibody, a single domain antibody, a dAb and a camelid antibody or fragment, including but not limited to a V_{HH} sequence.

[00659] One embodiment provides the isolated polypeptide according to any preceding paragraphs [00612] to present that essentially consists of a V_{HH} sequence.

[00660] One embodiment provides the isolated polypeptide according to any preceding paragraphs [00612] to present that essentially consists of a V_{HH} sequence that,

a) has at least 90% amino acid identity with at least one of the amino acid sequences of SEQ ID NO's 1-22, 26-40, 87-88, and 103-104, in which for the purposes of determining the degree of amino acid identity, the amino acid residues that form the CDR sequences are disregarded; and in which:

b) optionally one or more of the amino acid positions 11, 37, 44, 45, 47, 83, 84, 103, 104 and 108 according to Kabat numbering are humaneered.

[00661] One embodiment provides the isolated polypeptide according to any one or more of the preceding paragraphs [00612] to present that essentially consists of a V_{HH} sequence that:

a) has at least 90% amino acid identity with at least one of the amino acid sequences of SEQ ID NO's 1-22, 26-40, 87-88, and 103-104, in which for the purposes of determining the degree of amino acid identity, the amino acid residues that form the CDR sequences are disregarded; and in which

b) optionally the contacts between DR5 and the V_{HH} sequence are selected from:

i) the DR5 conformational epitope comprising the residues in Table 29A;

ii) the DR5 conformational epitope comprising the residues in Table 30A;

iii) the interaction surface of the V_{HH} amino acids as listed in Table 29B; and

iv) the interaction surface of the V_{HH} amino acids as listed in Table 30B.

[00662] One embodiment provides the isolated polypeptide according to any preceding paragraphs [00612] to present that essentially consists of a humanized V_{HH} sequence.

[00663] One embodiment provides the compound that comprises or essentially consists of one or more polypeptide according to any of any preceding paragraphs [00612] to present, and optionally further comprises one or more other groups, residues, moieties or binding units, wherein said compound is capable of enhancing cell apoptosis.

[00664] One embodiment provides the compound of paragraph [00663], which has an IC_{50} less than 100nM, preferably less than 10nM, more preferably less than 1nM, even more preferably less than 100pM, e.g. below 10pM as, e.g., measured in Colo205 cell survival assay.

[00665] One embodiment provides the compound of paragraphs [00663] or [00664], wherein the corresponding monovalent binding polypeptide is not as potent as the multivalent polypeptide as measured, e.g., in Colo205 cell based survival assay.

[00666] One embodiment provides the compound of any of paragraphs [00663] or [00665], wherein said at least three, four, five or more monovalent binding polypeptides can each bind human DR5 in a monovalent format.

[00667] One embodiment provides the compound of any of paragraphs [00663] or [00665], wherein said at least three, four, five or more monovalent binding polypeptides can each bind human DR5 in a monovalent format but does not bind to TRAIL-R3 and/or TRAIL-R4 receptors.

[00668] One embodiment provides the compound of any of paragraphs [00663] or [00665], wherein said at least three, four, five or more monovalent binding polypeptide can each bind DR5 in a monovalent format and competes in a binding assay with natural TRAIL ligand.

[00669] One embodiment provides the compound of any of paragraphs [00663] or [00665], wherein said at least three, four, five or more monovalent binding polypeptides are all directed against the same binding region of human DR5.

[00670] One embodiment provides the compound of any of paragraphs [00663] or [00664], wherein said at least one monovalent binding polypeptide is directed against one binding region of DR5 and at least one other monovalent binding polypeptide is directed against another distinct binding region of DR5 or a binding region of another DR5.

[00671] One embodiment provides the compound of any of paragraphs [00663] or [00664], wherein said at least three, four, five or more monovalent binding polypeptides have substantially identical amino acid sequences.

[00672] One embodiment provides the compound of any of paragraphs [00663] or [00664], which essentially consists of a single chain polypeptide and wherein said at least three, four, five or more monovalent binding single variable domains are linked together via peptidic linker.

[00673] One embodiment provides the compound of paragraph [00672], wherein said linker consists essentially of a peptide comprising between 5 and 50 amino acid residues.

[00674] One embodiment provides the compound of any of paragraphs [00663] or [00665], wherein said one or more other groups, residues, moieties or binding units are polypeptides, optionally linked via one or more linkers.

[00675] One embodiment provides the compound of any one of paragraphs [00612] to [00674], wherein said one or more linkers are peptidic or polypeptidic linkers.

[00676] One embodiment provides the compound of paragraph [00675], wherein said one or more other groups, residues, moieties or binding units are selected from the group consisting of a domain antibody, a single domain antibody, a dAb and a camelid antibody or fragment thereof, including but not limited to a V_{HH} sequence.

[00677] One embodiment provides the compound of any of paragraphs [00663] to [00677], wherein said one or more other groups, residues, moieties or binding units provide the compound with an increased half-life when administered in a mammalian organism, compared to the same compound without said one or more other groups, residues, moieties or binding units.

[00678] One embodiment provides an isolated nucleic acid that encodes either (1) a polypeptide comprising the amino acid sequence of the polypeptide as defined in any of paragraphs [00612]-[00662] or (2) a compound according to any of paragraphs [00663] to [00677].

[00679] One embodiment provides a host cell that expresses, or that under suitable circumstances is capable of expressing the nucleic acid of paragraph [00678].

[00680] One embodiment provides a method for producing the DR5 binding polypeptide of any of paragraphs [00612] to [00662], or the compound of any of paragraphs [00663] to [00677], comprising:

a) expressing, in a suitable host cell or a non-human host organism, the nucleic acid of paragraph [00678]; and

b) isolating and/or purifying said DR5 binding polypeptide or compound.

[00681] One embodiment provides the polypeptide according to any of paragraphs [00612] to [00662] or compound according to any of paragraphs [00663] to [00677], for use as a drug.

[00682] One embodiment provides the polypeptide of paragraph [00681], for use as an anti-cancer therapeutic.

[00683] One embodiment provides a composition comprising at least a polypeptide of any of paragraphs [00612] to [00662], or a compound of any of paragraphs [00663] to [00677] and at least one pharmaceutically acceptable carrier, diluent or excipient and/or adjuvant.

[00684] One embodiment provides a method for the prevention and/or treatment of a disorder that can be treated by enhancement of cell apoptosis, said method comprising administering, to a subject in need thereof, a pharmaceutically effective amount of at least one polypeptide according to any of paragraphs [00612]-[00662], or of at least one compound according to any of paragraphs [00663] to [00677].

[00685] One embodiment provides the method of paragraph [00684], wherein said disorder is a proliferative disease.

[00686] One embodiment provides the method of paragraph [00685], wherein said proliferative disease is selected from:

a) one or more solid cancers selected from primary and metastatic cancers such as renal cell carcinoma, and cancers of the lung (e.g., small cell lung cancer "SCLC" and non-small cell lung cancer "NSCLC"), pancreas, hematopoietic malignancy, glioma, astrocytoma, mesothelioma, colorectal cancers, prostate cancer, osteosarcoma, melanoma, lymphoma lymphoma (including but not limited to Burkitt's Lymphoma), breast cancer, endometrial cancer, liver cancer, gastric cancer, skin cancer, ovarian cancer and squamous cell cancers of any origin (including but not limited to squamous cell cancers of the lung, head and neck, breast, thyroid, cervix, skin, and/or esophageal); and

b) one or more liquid cancers selected from leukemias including especially a T-cell leukemia such as acute T-cell leukemia (T-ALL), acute B-cell leukemia (B-ALL), chronic myelogenous leukemia (CML), acute myelogenous leukemia (AML), plasma cell myeloma and multiple myeloma (MM).

[00687] One embodiment provides the method of paragraph [00685], wherein said proliferative disease is one or more non-cancer indications, said indications comprising one or more of inflammatory and autoimmune diseases, such as systemic lupus erythematosus, Hashimoto's disease, rheumatoid arthritis, graft-versus-host disease, Sjogren's syndrome, pernicious anemia, Addison disease, scleroderma, Goodpasture's syndrome, Crohn's disease, autoimmune hemolytic anemia, sterility, myasthenia gravis, multiple sclerosis, Basedow's disease, thrombotic throbocytopenia, thrombopenia purpurea, insulin-dependent diabetes mellitus, allergy; asthma, atopic disease; arteriosclerosis; myocarditis; cardiomyopathy; globerula nephritis; and hypoplastic anemia.

[00688] One embodiment provides the method of paragraph [00686], wherein the proliferative disease is pancreatic cancer.

[00689] One embodiment provides the method of paragraph [00686], wherein the proliferative disease is T-ALL.

[00690] One embodiment provides the method of paragraph [00686], wherein the proliferative disease is mesothelioma.

[00691] One embodiment provides the method of paragraph [00686], wherein the proliferative disease is squamous cell carcinoma of any tissue origin.

[00692] One embodiment provides the method of paragraph [00686], wherein the proliferative disease is AML.

[00693] One embodiment provides the method of paragraph [00686], wherein the proliferative disease is melanoma.

[00694] One embodiment provides the method of paragraph [00686], wherein the proliferative disease is myeloma.

[00695] One embodiment provides a composition comprising the polypeptide according to any of paragraphs [00612]-[00662] or at least one compound according to any of paragraphs [00663] to [00677], said composition in combination with at least one inhibitor of any one or more genes selected from cIAP1, cIAP2, XIAP, cFLIP and Bcl-xL.

[00696] One embodiment provides the composition of paragraph [00695], wherein the inhibitor is an inhibitor of cIAP1.

[00697] One embodiment provides the composition of paragraph [00696] further comprising an inhibitor of MEK.

[00698] One embodiment provides the composition of paragraph [00696] further comprising an inhibitor of BRAF,

[00699] One embodiment provides the composition of paragraph [00695], wherein the inhibitor is an inhibitor of XIAP.

[00700] One embodiment provides the composition of paragraph [00695], wherein the inhibitor is an inhibitor of cFLIP.

[00701] One embodiment provides the composition of paragraph [00695], wherein the inhibitor is a low molecular weight compound selected from LCL161 and ABT263.

[00702] One embodiment provides the composition of paragraph [00695], wherein the inhibitor is a shRNA.

[00703] One embodiment provides a method for using any one or more of the compositions of paragraph [00683], the method comprising administering to a subject in need thereof a pharmaceutically effected amount of said composition or combination thereof for the treatment of a DR5 associated disease.

[00704] One embodiment provides the method of paragraph [00703] wherein the DR5 associated disease is selected from one or more of the following:

a) one or more proliferative diseases selected from solid and liquid cancers,

(i) wherein solid tumors include primary and metastatic cancers such as renal cell carcinoma, and cancers of the lung (e.g., small cell lung cancer "SCLC" and non-small cell lung cancer "NSCLC"), pancreas, hematopoietic malignancy, glioma, astrocytoma, mesothelioma, colorectal cancers, prostate cancer, osteosarcoma, melanoma, lymphoma including but not limited to Burkitt's lymphoma), breast cancer, endometrial cancer, liver cancer, gastric cancer, skin cancer, ovarian cancer and squamous cell cancers of any origin (including but not limited to squamous cell cancers of the lung, head and neck, breast, thyroid, cervix, skin, and/or esophageal); and

(ii) wherein liquid cancers comprise leukemias including especially a T-cell leukemia such as acute T-cell leukemia (T-ALL), acute B-cell leukemia (B-ALL), chronic myelogenous leukemia (CML), acute myelogenous leukemia (AML), plasma cell myeloma and multiple myeloma (MM); and

b) non-cancer indications comprising one or more of inflammatory and autoimmune diseases, such as systemic lupus erythematosus, Hashimoto's disease, rheumatoid arthritis, graft-versus-host disease, Sjogren's syndrome, pernicious anemia, Addison disease, scleroderma, Goodpasture's syndrome, Crohn's disease, autoimmune hemolytic anemia; sterility, myasthenia gravis, multiple sclerosis, Basedow's disease, thrombotic throbocytopenia, thrombopenia purpurea, insulin-dependent diabetes mellitus, allergy; asthma, atopic disease; arteriosclerosis; myocarditis; cardiomyopathy; globerula nephritis; and hypoplastic anemia.

[00705] One embodiment provides the isolated polypeptides according to any one or more of the preceding paragraphs [00612] to present wherein the CDRs are calculated according to either Kabat and/or Chothia rules.

[00706] One embodiment provides the isolated polypeptides according to any one or more of the preceding paragraphs [00612] through the present wherein the polypeptide

binds one or more epitopes as provided in Tables 29A and/or 30A, and/or comprises the interactive surface residues as provided in Tables 29B and/or 30B.

[00707] The following claims of the invention are non-limiting. Certain variations to the invention may be contemplated that are within the abilities of one skilled in the art, including but not limited to changes in formulations, delivery, humanization, expression systems and the like. Such variations are considered to be within the scope of the invention.

What is claimed is:

1. An isolated polypeptide comprising at least one monomer of a single variable domain of a NB agent that specifically binds to human DR5.

2. The polypeptide of claim 1, wherein said single variable domain is selected from the group consisting of a) singe variable domains comprising one or more complementarity determining region 3 (CDR3) sequences selected from any one or more of SEQ ID NOs: 63-68; b) single variable domains comprising one or more complementarity determining region 3 (CDR3) sequences with 90% identity to at least one CDR3 selected from any one or more of SEQ ID NOs: 63-68; and c) single variable domains comprising one or more complementarity determining region 3 (CDR3) sequences with at least 95% identity to at least one CDR3 selected from any one or more of SEQ ID NOs: 63-68.

3. The polypeptide of claim 1, wherein said single variable domain is selected from the group consisting of a) singe variable domains with SEQ ID NOs: 1 – 5, 26, 30 and 87; and b) single variable domains with at least 95% identity to at least one single variable domain with SEQ ID NOs: 1 – 5, 26, 30 and 87.

4. An isolated polypeptide comprising at least three, at least four, or at least five monomeric subunits of a single variables domain that specifically binds to human DR5, wherein said subunits are optionally linked by a polypeptide linker.

5. The polypeptide of claim 4, wherein said polypeptide comprises identical monomers of the single variable domain and wherein said single variable domain is selected from the group consisting of a) singe variable domains with SEQ ID NOs: 1 – 5, 26, 30 and 87; b) single variable domains with at least 90% identity to at least one single variable domain with SEQ ID NOs: 1 – 5, 26, 30 and 87 and c) single variable domains with at least 95% identity to at least one single variable domain with SEQ ID NOs: 1 – 5, 26, 30 and 87.

6. The polypeptide of claim 4 comprising an amino sequence that is selected from one or more subunits of the group consisting of a) amino acid sequences with SEQ ID NO: 6, 9, 12-14, 17, 20, 27 and 31; and b) amino acid sequences with at least 90% identity to said amino acid sequence with SEQ ID NO: 6, 9, 12-14, 17, 20, 27 and 31.

7. The polypeptide of claim 4 that specifically binds to human DR5 and wherein said polypeptide has an in vitro potency (IC_{50}) against a panel of at least 2 tumor cell lines

selected from the group consisting of Colo205, Jurkat, Molt4, H2122, H226 and H2052 that is equal or lower than 100nM.

8. The polypeptide of claim 7, wherein said polypeptide has an in vitro potency that is equal or lower than 10 nM, that is equal or lower than 1 nM, or that is equal or lower than 100 pM.

9. An isolated polypeptide comprising an amino sequence that is selected from the group consisting of one or more amino acid sequences of SEQ ID NO: 1 through 22, 26 through 33, 87 and 88.

10. The isolated polypeptide according to claim 1, comprising at least one complementarity determining region (CDR) having at least 60, 70, 80, 90, 95 or 100 percent sequence identity with at least one of the CDR regions depicted in any of SEQ ID NO: 41 to 44 (CDR1); SEQ ID NO: 51 to 55 (CDR2); SEQ ID NO: 63 to 68 (CDR3), more preferably SEQ ID NO: 51 to 55 and SEQ ID NO: 63 to 68.

11. The isolated polypeptide according to any of the preceding claims that is a humanized immunoglobulin, a camelized immunoglobulin or an immunoglobulin obtainable by affinity optimization technique, or a fragment thereof.

12. The isolated polypeptide according to any of the preceding claims that essentially consists of a light chain variable domain sequence, e.g., a V_L-sequence; or of a heavy chain variable domain sequence, e.g., a V_H-sequence, or is a domain antibody, a single domain antibody, a dAb and a camelid antibody or fragment, including but not limited to a V_{HH} sequence.

13. The isolated polypeptide according to any of the preceding claims that essentially consists of a V_{HH} sequence that,

(a) has at least 90% amino acid identity with at least one of the amino acid sequences of SEQ ID NO's 1-22, 26-40, 87-88, and 103-104, or of the amino acid sequences encoded by at least one of SEQ ID NOS: 96-99, in which for the purposes of determining the degree of amino acid identity, the amino acid residues that form the CDR sequences are disregarded;

and in which

(b) optionally one or more of the amino acid positions 11, 37, 44, 45, 47, 83, 84, 103, 104 and 108 according to Kabat numbering are humaneered.

14. The compound that comprises or essentially consists of one or more polypeptide according to any of any preceding claims, and optionally further comprises one or more other groups, residues, moieties or binding units, wherein said compound is capable of enhancing cell apoptosis.

15. The compound of any of claims 14, wherein said at least three, four, five or more monovalent binding polypeptides are all directed against the same binding region of human DR5.

16. The compound of any of claims 14, wherein said at least one monovalent binding polypeptide is directed against one binding region of DR5 and at least one other monovalent binding polypeptide is directed against another distinct binding region of DR5 or a binding region of another DR5.

17. The polypeptide according to any of claim 1 for use as a drug.

18. The polypeptide of claim 17, for use as an anti-cancer therapeutic.

19. A polypeptide of claim 18 and at least one pharmaceutically acceptable carrier, diluent or excipient and/or adjuvant.

20. A method for the prevention and/or treatment of a disorder that can be treated by enhancement of cell apoptosis, said method comprising administering, to a subject in need thereof, a pharmaceutically effective amount of at least one polypeptide according to any above claim.

21. The method of claim 20, wherein said disorder is a proliferative disease that is responsive to agonism of DR5 activity.

22. The method of claim 21, wherein said proliferative disease is selected from:

a) one or more solid cancers selected from primary and metastatic cancers such as renal cell carcinoma, and cancers of the lung (e.g., small cell lung cancer "SCLC" and non-small cell lung cancer "NSCLC"), pancreas, hematopoietic malignancy, glioma, astrocytoma, mesothelioma, colorectal cancers, prostate cancer, osteosarcoma, melanoma, lymphoma lymphoma (including but not limited to Burkitt's Lymphoma), breast cancer, endometrial cancer, liver cancer, gastric cancer, skin cancer, ovarian cancer and squamous cell cancers of any origin (including but not limited to squamous cell cancers of the lung, head and neck, breast, thyroid, cervix, skin, and/or esophageal);

b) one or more liquid cancers selected from leukemias including especially a T-cell leukemia such as acute T-cell leukemia (T-ALL), acute B-cell leukemia (B-ALL), chronic

myelogenous leukemia (CML), acute myelogenous leukemia (AML), plasma cell myeloma and multiple myeloma (MM); and

c) one or more non-cancer indications, said indications comprising one or more of inflammatory and autoimmune diseases, such as systemic lupus erythematosus, Hashimoto's disease, rheumatoid arthritis, graft-versus-host disease, Sjogren's syndrome, pernicious anemia, Addison disease, scleroderma, Goodpasture's syndrome, Crohn's disease, autoimmune hemolytic anemia, sterility, myasthenia gravis, multiple sclerosis, Basedow's disease, thrombotic throbocytopenia, thrombopenia purpurea, insulin-dependent diabetes mellitus, allergy; asthma, atopic disease; arteriosclerosis; myocarditis; cardiomyopathy; globerula nephritis; and hypoplastic anemia.

23. The method of claim 22, wherein the proliferative disease is pancreatic cancer.

24. The method of claim 22, wherein the proliferative disease is T-ALL.

25. The method of claim 22, wherein the proliferative disease is mesothelioma.

26. The method of claim 22, wherein the proliferative disease is squamous cell carcinoma of any tissue origin.

27. The method of claim 22, wherein the proliferative disease is AML.

28. The method of claim 22, wherein the proliferative disease is melanoma.

29. The method of claim 22, wherein the proliferative disease is myeloma.

30. The isolated polypeptides according to any one or more of the preceding claims wherein the CDRs are calculated according to either Kabat and/or Chothia rules.

31. The NB construct according to any one or more of the preceding claims that binds the DR5 epitope as provided in Table 29A or that binds the DR5 epitope as provided in Table 30A.

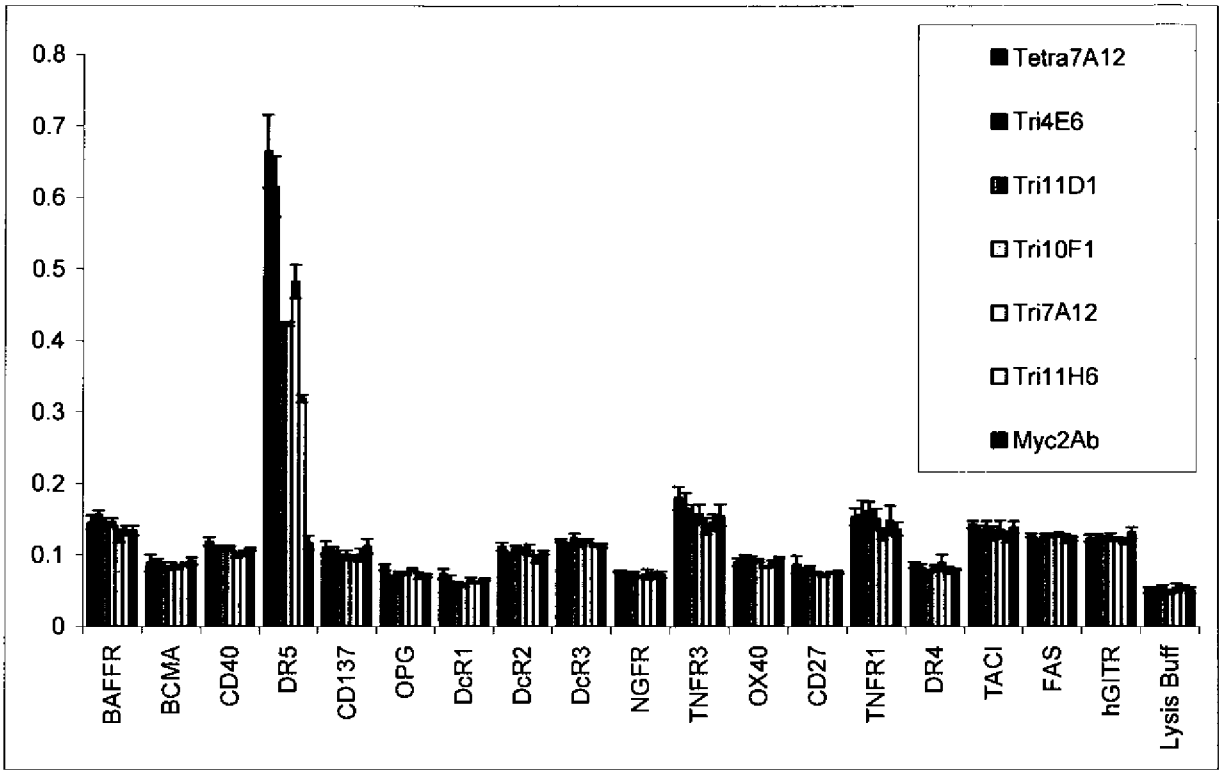

0.8
0.7
0.6
0.5
0.4
0.3
0.2
0.1
0
Tetra7A12
Tri4E6
Tri11D1
Tri10F1
Tri7A12
Tri11H6
Myc2Ab
BAFFR
BCMA
CD40
DR5
CD137
OPG
DcR1
DcR2
DcR3
NGFR
TNFR3
OX40
CD27
TNFR1
DR4
TACI
FAS
hGITR
Lysis Buff

FIGURE 1

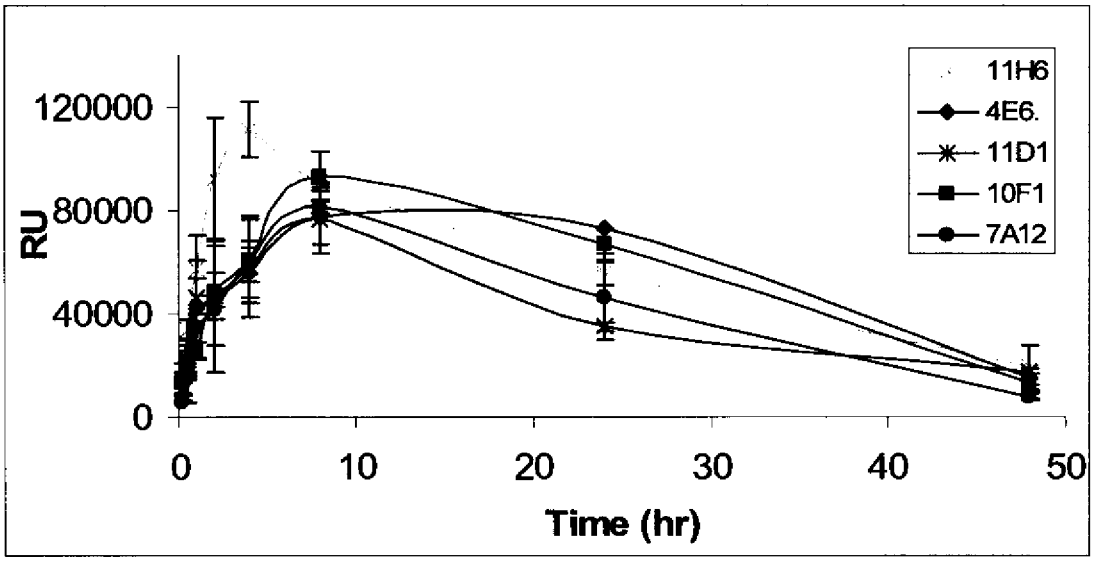


FIGURE 2

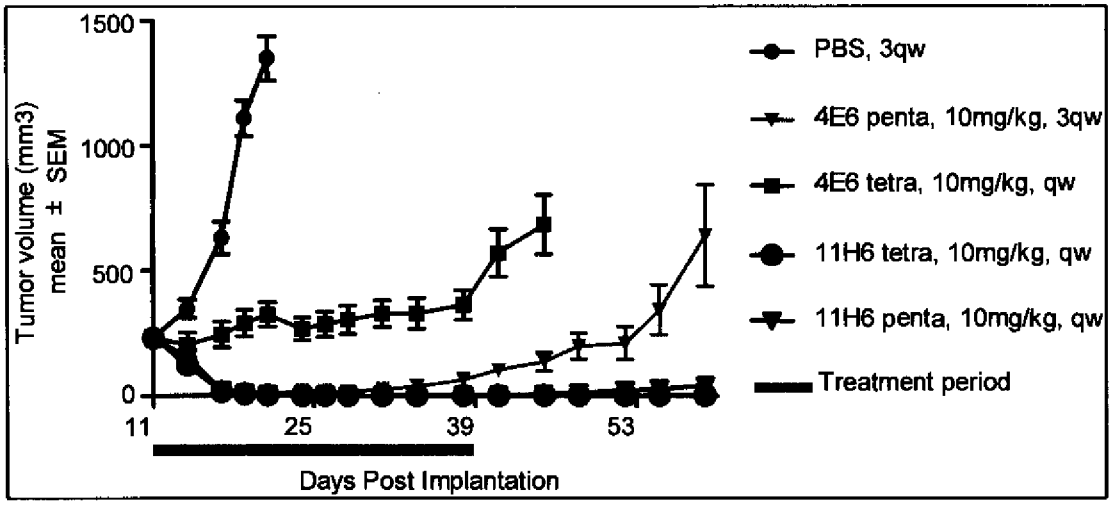


FIGURE 3

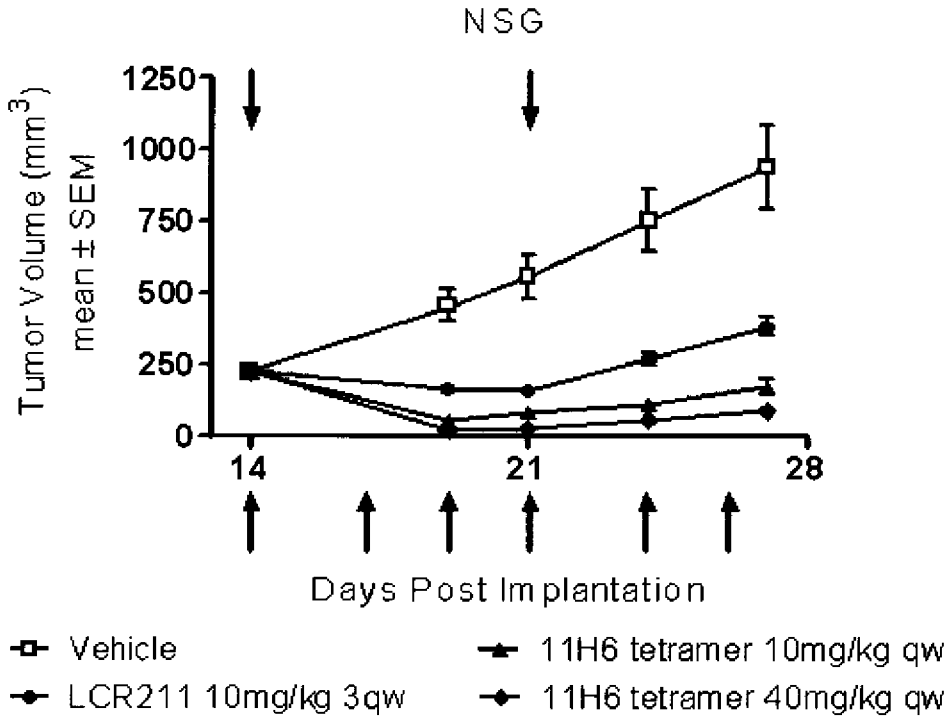


FIGURE 4A

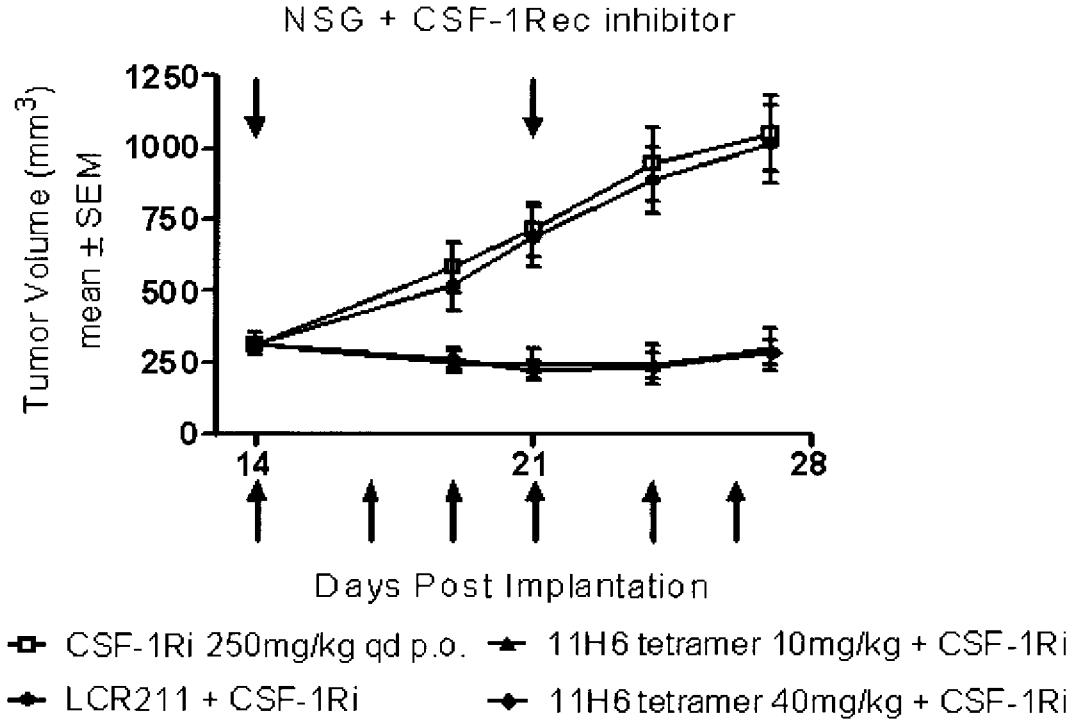


FIGURE 4B

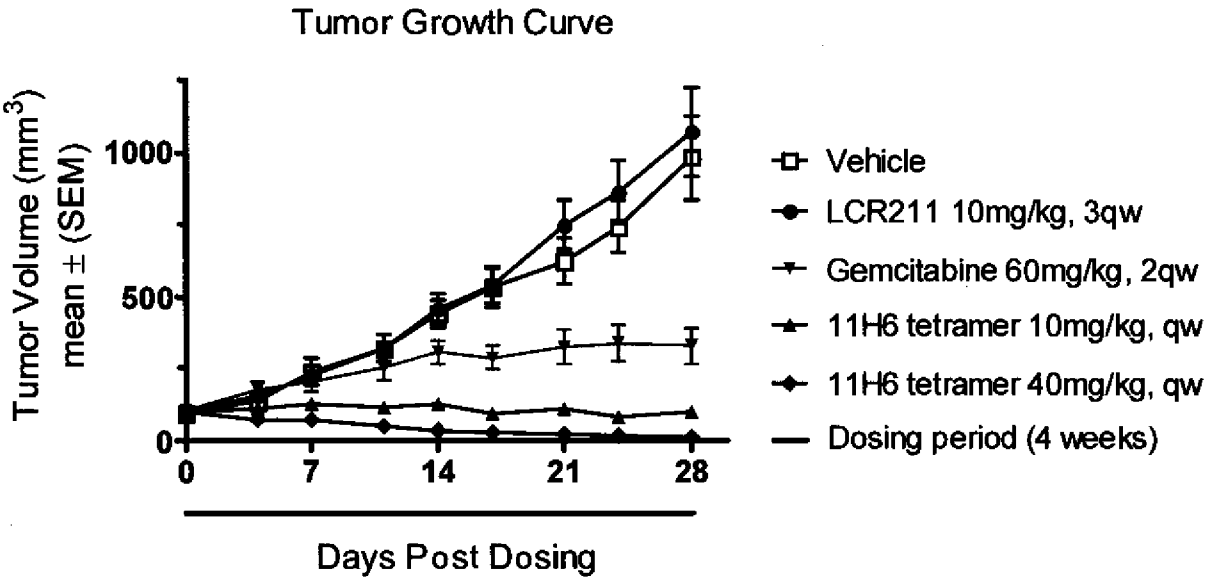


FIGURE 5

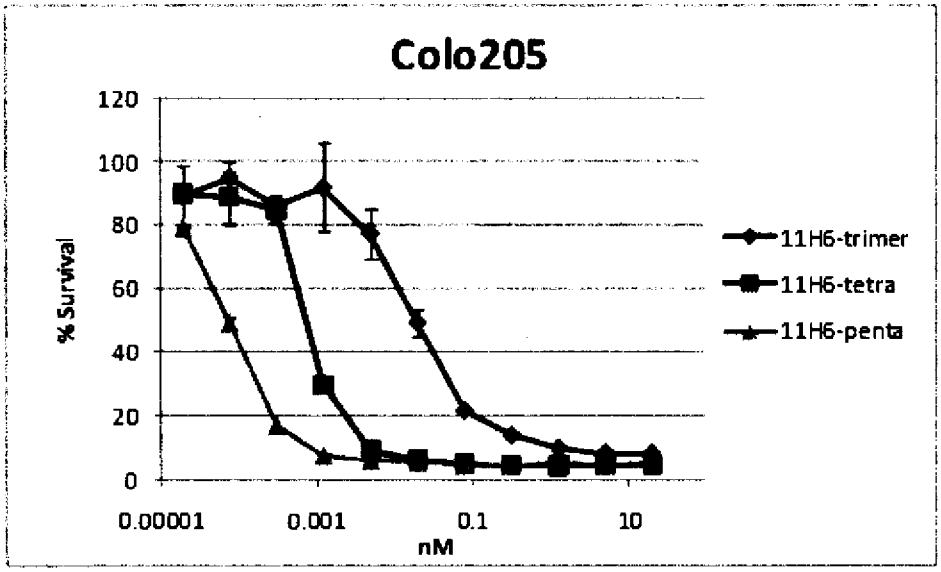


FIGURE 6A

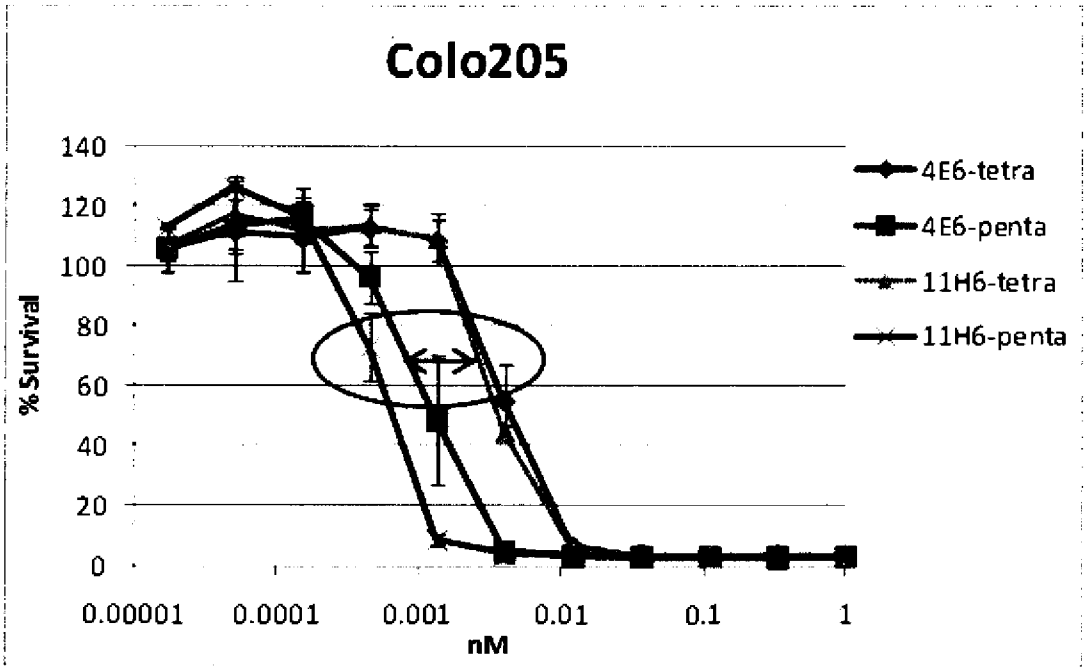


FIGURE 6B

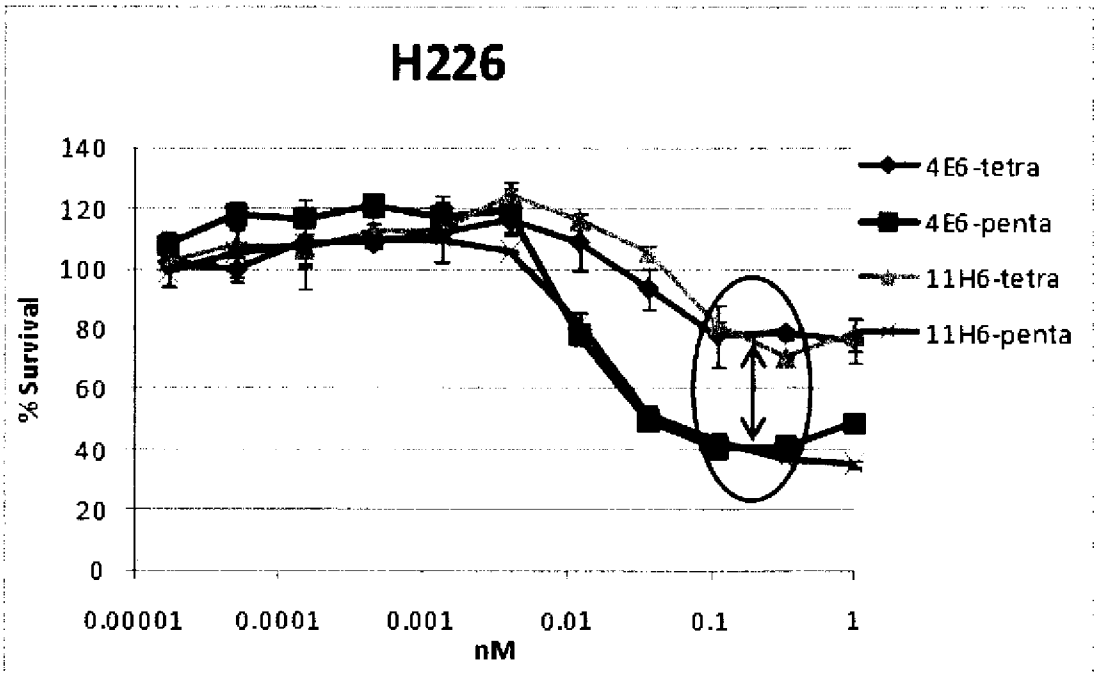


FIGURE 6C

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2011/051958

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
INV. C07K16/28 A61K39/395
ADD.

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
C07K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)
EPO-Internal, WPI Data, BIOSIS

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2009/030285 A1 (ABLYNX NV [BE]; DOLK EDWARD [NL]; SAUNDERS MICHAEL JOHN SCOTT [BE]; DE) 12 March 2009 (2009-03-12) abstract page 64 - page 69 -----	1,17-30
X	LI JING ET AL: "LBY135, a novel anti-DR5 agonistic antibody induces tumor cell-specific cytotoxic activity in human colon tumor cell lines and xenografts", DRUG DEVELOPMENT RESEARCH,, vol. 69, no. 2, 1 March 2008 (2008-03-01), pages 69-82, XP002633902, the whole document ----- -/--	1,17-22

[X] Further documents are listed in the continuation of Box C.

[X] See patent family annex.

* Special categories of cited documents :

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
9 May 2011	25/05/2011

Name and mailing address of the ISA/	Authorized officer
European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016	Kalsner, Inge

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2011/051958

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2008/066854 A2 (NOVARTIS AG [CH]; LI JING [US]; STOVER DAVID RAYMOND [US]) 5 June 2008 (2008-06-05) the whole document	1,17-30
X	LI B ET AL: "Activation of the Proapoptotic Death Receptor DR5 by Oligomeric Peptide and Antibody Agonists", JOURNAL OF MOLECULAR BIOLOGY, LONDON, GB, vol. 361, no. 3, 18 August 2006 (2006-08-18), pages 522-536, XP024951299, ISSN: 0022-2836, DOI: DOI:10.1016/J.JMB.2006.06.042 [retrieved on 2006-08-18] the whole document	1
X	LI JING ET AL: "Antitumor efficacy of LBY135, an anti-DR5 monoclonal antibody, alone or in combination with chemotherapy in human colon tumor cell lines and xenografts", PROCEEDINGS OF THE ANNUAL MEETING OF THE AMERICAN ASSOCIATION FOR CANCER RESEARCH, AMERICAN ASSOCIATION FOR CANCER RESEARCH, US, vol. 48, 18 April 2007 (2007-04-18), page 1153, XP009147613, ISSN: 0197-016X abstract	1,17-30
X	MOTOKI KAZUHIRO ET AL: "Enhanced apoptosis and tumor regression induced by a direct agonist antibody to tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand receptor 2.", CLINICAL CANCER RESEARCH : AN OFFICIAL JOURNAL OF THE AMERICAN ASSOCIATION FOR CANCER RESEARCH 15 APR 2005 LNKD-PUBMED:15837769, vol. 11, no. 8, 15 April 2005 (2005-04-15) , pages 3126-3135, XP002634834, ISSN: 1078-0432 the whole document	1,17-22

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No
PCT/EP2011/051958

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2009030285 A1	12-03-2009	AU 2007358569 A1	12-03-2009
		CA 2698419 A1	12-03-2009
		EP 2195342 A1	16-06-2010
WO 2008066854 A2	05-06-2008	NONE	

SOLICITUD INTERNACIONAL PUBLICADA DE ACUERDO CON EL TRATADO DE COOPERACIÓN EN MATERIA DE PATENTES (TCP)

(19) Organización Mundial de la Propiedad Intelectual
Oficina Internacional

(43) Fecha de Publicación Internacional
18 de agosto de 2011 (18.08.2011)

(10) Número de Publicación Internacional
PCT **WO 2011/098520 A1**

(51) Clasificación Internacional de Patente:
A61K 39/395 (2006.01)
C07K 16/28 (2006.01)

(21) Número de Solicitud Internacional:
PCT/EP2011/051958

(22) Fecha de Presentación Internacional:
10 de febrero de 2011 (10.02.2011)

(25) Idioma de Presentación:
Inglés

(26) Idioma de Publicación:
Inglés

(30) Información de Prioridad

61/303,173	10-febrero-2010 (10.02.2010)	US
61/308,599	26-febrero 2010 (26.02.2010)	US

(71) Solicitantes *(para todos los Estados (Países) designados excepto US)*: **NOVARTIS AG** [CH/CH]; Lichtstrasse 35, CH-4056 Basilea (CH). **ABLYNX NV** [BE/BE]; Technologiepark 4, B-9052 Zwijnaarde (BE).

(72) Inventores; e
(75) Inventores/Solicitantes *(para US solamente)*: **CROMIE, Karen** [GB/BE]; Ablynx NV, Technologiepark 4, B-9052 Zwijnaarde (BE). **DOMBRECHT, Bruno** [BE/BE]; Ablynx NV, Technologiepark 4, B-9052 Zwijnaarde (BE). **ETTENBERG, Seth** [US/US]; Novartis Institutes for BioMedical Research, Inc., 250 Massachusetts Avenue, Cambridge, Massachusetts 02139 (US). **KOLKMAN, Joost** [NL/BE]; Ablynx NV, Technologiepark 4, B-9052 Zwijnaarde (BE). **LI, Jing** [US/US]; Novartis Institutes for BioMedical Research, Inc., 200 Technology Square, Cambridge, Massachusetts 02139 (US). **MEERSCHAERT, Kris** [BE/BE]; Ablynx NV, Technologiepark 4, B-9052 Zwijnaarde (BE). **STOVER, David Raymond** [US/US]; 15093 Hesby ST, Sherman Oaks, California 91403 (US). **ZHANG, Jingxin** [CN/US]; 8 Shoreview Lane, Walpole, Massachusetts 02081 (US).

(74) Agente: KASSOW, Anders; NOVARTIS PHARMA AG, Departamento de Patentes, CH-4002 Basilea (CH).

(81) Estados (Países) Designados (*a menos que se indique de otra manera, para cada tipo de protección nacional disponible*): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PE, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(84) Estados (Países) Designados (*a menos que se indique de otra manera, para cada tipo de protección regional disponible*): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Eurasiáticos (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), Europeos (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Declaraciones de acuerdo con la Regla 4.17:
con respecto al derecho de la solicitante de solicitar y otorgársele una patente (Regla 4.17(ii))

Publicada:
con reporte de búsqueda internacional (Art. 21(3))
con la parte del listado de secuencias de la descripción (Regla 5.2(a))

(54) Título : POLIPÉPTIDOS AGONISTAS QUE SE ENLAZAN A DR5

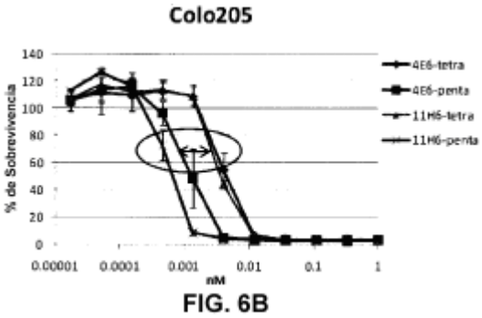


FIG. 6B

(57) Resumen: La presente invención se refiere a las secuencias de aminoácidos que se dirigen contra el receptor de superficie celular 2 de TRAIL (en la presente también "DR5"), así como a los compuestos o construcciones de las mismas, y en particular a las proteínas y los polipéptidos y los nucleótidos que las codifican (referidos en la presente en su totalidad como "agentes NB"), y a los fragmentos de las mismas, y a las variantes farmacéuticamente efectivas de las mismas, y a su uso en el diagnóstico y el tratamiento de las enfermedades y los trastornos asociados con el DR5.

POLIPÉPTIDOS AGONISTAS QUE SE ENLAZAN A DR5

ANTECEDENTES

El ligando inductor de apoptosis relacionado con el factor de necrosis tumoral (TNF) (TRAIL) induce apoptosis en una variedad de líneas celulares tumorigénicas y transformadas con poco o ningún efecto sobre las células normales. se han identificado cuando menos cinco receptores para TRAIL, de los cuales dos, es decir, DR4 (Receptor de Muerte 4, TRAIL-R1), y DR5 (Receptor de Muerte 5, TRAIL-R2; KILLER o TRICK 2), son capaces de transducir una señal de apoptosis, mientras que los otros tres (TRAIL-R3, TRAIL-R4 y OPG soluble) sirven como receptores de señuelo para bloquear la apoptosis mediada por TRAIL. Véase, por ejemplo, Ozoren y El-Deiry, Sem. Cancer Biol 13: 135 (2003); Yagita y colaboradores, Cancer Sci., 95(10): 777 (2004).

TRAIL o Apo2L es un ligando citotóxico de 281 aminoácidos que se encuentra integrado en la membrana citoplásmica con el término C expuesto en la superficie extracelular (ligando Tipo II) de las células. También se pueden detectar pequeñas cantidades del ligando TRAIL soluble. El TRAIL forma una molécula homo-trimérica que se enlaza a sus receptores respectivos, iniciando una cascada de eventos de señalización.

El enlace del ligando TRAIL a los receptores DR4 o DR5 inicia la senda de muerte celular extrínseca, dando como resultado la formación de complejos de señalización inductores de muerte (DISC), que contienen el adaptador FADD (DD activador de Fas), y la pro-caspasa 8 o la pro-caspasa 10. Las interacciones en el DISC y la activación de la cascada corriente abajo son similares a FAS, que da como resultado la activación de las sendas de cinasa N-terminal NFκB y Jun (JNK). Véase, por ejemplo, Mongkolsapaya y colaboradores, Nat. Struct. Biol., 6(11): 1048 (1999); Cha y colaboradores, J. Biol. Chem., 275(40): 31171 (2000). El enlace de TRAIL a DR4 o DR5 también da como resultado una disociación de BID (por la caspasa 8 ó 10), la activación de mitocondrias, y por

consiguiente, la activación de la senda de apoptosis intrínseca.

La capacidad del ligando TRAIL para inducir preferencialmente la apoptosis de las células tumorales, con poco o ningún efecto sobre las células normales, lo convierte en un candidato potencialmente bueno para la terapia de cáncer. Sin embargo, se ha demostrado que el TRAIL soluble induce la apoptosis de los hepatocitos humanos normales *in vitro*, realzando potencialmente las preocupaciones por la toxicidad. Véase, por ejemplo, Jo y colaboradores, Nat Med. 6(5): 564 (2000). Un objetivo más conveniente para la terapia de cáncer es el DR5. Debido a que el DR5 requiere de múltiples receptores para inducir la apoptosis de los hepatocitos normales, se predice que el desarrollo de agonistas contra el DR5 específico responsable de la inducción de apoptosis, eliminará esta toxicidad contra las células normales, mientras que conservará la capacidad para aniquilar las células tumorales.

Se han usado agonistas de péptidos y anticuerpos de DR5 para inducir la apoptosis en las células que expresan DR5. Véase, por ejemplo, Li y colaboradores, J. Mol. Biol., 361, 522-536 (2006); Kajiwara y colaboradores, Biochim. Biophys. Acta 1699: 131-137 (2004); Yang y colaboradores, Cancer Cell, 5, 501-512 (2004). Los agonistas de DR5 tienen el potencial para utilizarse en la terapia de cáncer contra un gran número de cánceres. Por ejemplo, el Lexatumumab, un anticuerpo monoclonal contra DR5, induce la expresión de DR5 y promueve la apoptosis en un modelo de carcinoma de células renales de ratón. Zhang y colaboradores, Cancer Lett. 251(1): 146-57 (2007). Otros anticuerpos monoclonales agonistas contra DR5, o el fragmento Fv de una sola cadena contra DR5, y la actividad tumoricida de los mismos, se describen de una manera similar, por ejemplo, en Takeda y colaboradores, Journal Exp. Medicine, 199, 437-448 (2004); Guo y colaboradores, J. Biol. Chem., 280, 41940-41952 (2005); Motoki y colaboradores, Clin. Cancer Res 11(8): 3126-35 (2005); e Ichikawa y colaboradores, Nature Medicine, 7, 954-960 (2001), Chuntharapai y colaboradores, J. Immunol. 166(8): 4891-8 (2001), Shi y colaboradores, Cancer

Res., 66(24): 11946-11953 (2006).

Se están desarrollando diferentes anticuerpos específicos de DR5 para utilizarse en la clínica, pero ninguno ha sido aprobado todavía.. Se cree que para que se active el DR5, se requieren múltiples anticuerpos reticulantes, y siguen quedando las cuestiones de suficiente suministro de estos anticuerpos en el sitio de acción para lograr efectos terapéuticos reproducibles. Por consiguiente, existe una necesidad de mejores agonistas específicos de DR5 para el tratamiento de las enfermedades asociadas.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LA INVENCIÓN

La presente invención se refiere a uno o más “agentes NB” que comprenden secuencias de aminoácidos que se dirigen contra el Receptor de Muerte 5 (referido en la presente como “DR5”) as se dispone en la presente, así como a los compuestos o construcciones específicas, y en particular proteínas y polipéptidos, que comprenden o que consisten esencialmente en una o más de estas secuencias de aminoácidos (también referidos como “compuestos” y “polipéptidos”, respectivamente), y fragmentos de los mismos, más los ácidos nucleicos que codifican estas construcciones. En la presente se proporcionan variantes monoméricas y multiméricas de las construcciones específicas de DR5 de la invención. Se proporcionan variantes humanizadas y humano-diseñadas (humaneered) de los agentes NB. En una modalidad, los agentes NB farmacéuticamente relevantes de la invención actúan como los agonistas de los receptores DR5 de TRAIL.

La invención también se refiere a ácidos nucleicos que codifican tales secuencias de aminoácidos y polipéptidos; a métodos para la preparación de tales secuencias de aminoácidos y polipéptidos; a células huésped que expresan o que son capaces de expresar tales secuencias de aminoácidos o polipéptidos; a composiciones, y en particular a composiciones farmacéuticas, que comprenden tales secuencias de aminoácidos, polipéptidos, ácidos nucleicos y/o células huésped; y al uso de tales secuencias de aminoácidos o polipéptidos, ácidos nucleicos, células huésped y/o

composiciones, en particular para propósitos profilácticos, terapéuticos, o de diagnóstico, tales como los propósitos mencionados en la presente.

Los agonistas de los receptores DR5 de TRAIL descritos en la presente como agentes NB tienen el potencial para utilizarse en terapia contra un gran número de enfermedades asociadas con DR5. Estos agentes NB de la invención, por consiguiente, tienen utilidad en el tratamiento de las enfermedades proliferativas, incluyendo, por ejemplo, cánceres, tales como tumores sólidos, cánceres primarios y metastásicos, tales como carcinoma de células renales, y cánceres del pulmón (por ejemplo, cáncer pulmonar microcelular “SCLC” y cáncer pulmonar no microcelular “NSCLC”), páncreas, malignidad hematopoiética, glioma, astrocitoma, mesotelioma, cánceres colo-rectales, cáncer de próstata, osteosarcoma, melanoma, linfoma (incluyendo, pero no limitándose a, linfoma de Burkitt), cáncer de mama, cáncer endometrial, cáncer de hígado, cáncer gástrico, cáncer de piel, cáncer de ovario, y cánceres de células escamosas de cualquier origen (por ejemplo, pulmón, cabeza y cuello, mama, tiroides, cérvix, piel, esofágico, etc.), así como cánceres líquidos, por ejemplo, tales como leucemias (véase, por ejemplo, Uno y colaboradores, Nature Medicine, 12(6): 693-698 (2006)) incluyendo en especial una leucemia de células-T, tal como leucemia de células-T aguda (T-ALL), leucemia de células-B aguda (B-ALL), leucemia mielógena crónica (CML), leucemia mielógena aguda (AML), mieloma de células de plasma, y mieloma múltiple (MM). Estos agentes NB de la invención también tienen utilidad en el tratamiento de indicaciones que no son de cáncer, incluyendo enfermedad inflamatoria y autoinmune, tal como lupus eritematoso sistémico, enfermedad de Hashimoto, artritis reumatoide, enfermedad del injerto contra el huésped, síndrome de Sjogren, anemia perniciosa, enfermedad de Addison, esclerodermia, síndrome de Goodpasture, enfermedad de Crohn, anemia hemolítica autoinmune; esterilidad, miastenia grave, esclerosis múltiple, enfermedad de Basedow; trombocitopenia trombótica, trombocitopenia purpúrea, diabetes mellitus dependiente

de insulina, alergia; asma; enfermedad atópica; arterioesclerosis; miocarditis; cardiomiopatía; nefritis glomerular; y anemia hipoplásica.

Las secuencias de aminoácidos y polipéptidos descritos en la presente se pueden dirigir contra, o pueden ser específicos para, cualquier DR5. De acuerdo con un aspecto no limitante, las secuencias de aminoácidos y polipéptidos descritos en la presente se dirigen contra el DR5. En una modalidad, los agentes NB específicamente se enlazan a un dominio extracelular del DR5.

Los polipéptidos y las composiciones de la presente invención se pueden utilizar en términos generales para modular el DR5. En una modalidad, un agente NB desencadenará, activará y/o incrementará o mejorará la señalización que es mediada por el DR5. En una modalidad, el agonismo del DR5 mediante un agente NB modulará, y en particular desencadenará o incrementará, los mecanismos, las respuestas, y los efectos biológicos asociados con el DR5, su señalización y/o las sendas en donde Está involucrado el DR5.

En una modalidad, los compuestos, polipéptidos y las composiciones descritas en la presente inducen, desencadenan, incrementan, o mejoran apoptosis en ciertas células o tejidos. En una modalidad, los compuestos, polipéptidos y las composiciones descritas en la presente, son capaces de enlazarse al DR5 sobre una superficie celular, y en particular de enlazarse al DR5 de tal manera que se induzca, se desencadene, se incremente, o se mejore la señalización mediada por el DR5. En una modalidad, los polipéptidos y las composiciones descritas en la presente pueden ser tales que sean capaces de enlazarse a un DR5, de tal manera que se desencadene o se induzca la apoptosis en la célula en la que esté presente el DR5.

En una modalidad, los compuestos NB, los polipéptidos (monovalentes o multivalentes), y las composiciones descritas en la presente, se pueden enlazar al sitio de enlace de TRAIL sobre el DR5. En una modalidad, los agentes NB compiten con TRAIL para enlazarse al DR5. En una modalidad, el enlace de estos compuestos

y polipéptidos al DR5 induce, desencadena, incrementa, o mejora la señalización mediada por el DR5, y en particular desencadena o induce la apoptosis en la célula en la que esté presente el DR5.

Otros aspectos, modalidades, ventajas y aplicaciones de la invención llegarán a quedar más claros a partir de la descripción adicional en la presente.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

La Figura 1 es una representación gráfica de un experimento ELISA que muestra el enlace de los agentes NB anti-DR5 multivalentes contra los miembros de la familia de los receptores del factor de necrosis tumoral (TNF).

La Figura 2 es una representación gráfica de un tejido tumoral PD (activación de Caspasa3/7) de los agentes NB anti-DR5 tetravalentes.

La Figura 3 es una representación gráfica de la eficacia *in vivo* de los agentes NB anti-DR5 tetravalentes y pentavalentes in un modelo de tumores Colo205.

Las Figuras 4A y 4B son representaciones gráficas del tetrámero 11H6 que exhibe actividad anti-tumoral en un modelo de tumor pancreático MiaPaCa cultivado en huéspedes NSG (es decir, huéspedes deficientes en macrófagos/NK) ya sea sin (Figura 4A) o con (Figura 4B) el inhibidor de CSF-1R.

La Figura 5 muestra la capacidad del tetrámero 11H6 para dar regresión al tumor pancreático derivado del paciente TPAN1-IFA que es insensible a LCR211, un anticuerpo de murino especifico para el DR5.

Las Figuras 6A, 6B y 6C son representaciones gráficas que muestran que un aumento en el número de subunidades en una construcción NB corresponde a una mejor eficacia y potencia para los trímeros, tetrámeros y pentámeros de 11H6 (Figura 6A), en las células Colo205; para los tetrámeros y pentámeros 4E6 y 11H6 (Figura 6B) en las células Colo205; y para los tetrámeros y pentámeros 4E6 y 11H6 (Figura 6C) en las células H226.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCIÓN

Los agentes NB descritos en la presente, es decir, los compuestos, polipéptidos (monovalentes o multivalentes), y composiciones, se enlazan al Receptor de Muerte 5 ("DR5"). En una modalidad, el enlace de los compuestos y polipéptidos que se dan a conocer al DR5, induce, desencadena, incrementa, o mejora la señalización mediada por el DR5, y en particular desencadena o induce la apoptosis en la célula en la que esté presente el DR5.

Como se utiliza en la presente un "agente NB" de la invención se define como un polipéptido que contiene cuando menos una secuencia de CDR3 que se enlaza específicamente a un polipéptido de DR5 y cuyo enlace produce un efecto agonista sobre la actividad del DR5, o de un nucleótido que codifique ese polipéptido. En una modalidad, los agentes NB de la invención son un polipéptido que tiene la estructura general de un dominio V_H. En una modalidad, los agentes NB de la invención son un polipéptido que tiene la estructura general de un dominio V_{HH}. En una modalidad, los agentes NB de la invención son un polipéptido que tiene la estructura general de un dominio V_L. En una modalidad, los agentes NB de la invención contienen cuando menos una secuencia de CDR1 y cuando menos una secuencia de CDR2 en adición a la secuencia de CDR3. En una modalidad, los agentes NB de la invención comprenden cuando menos un polipéptido monovalente que tiene la construcción FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4 como se define más adelante para la fórmula 1. En una modalidad, los agentes NB de la invención son composiciones monoméricas. En una modalidad, los agentes NB son composiciones multiméricas. En una modalidad, los agentes NB de la invención son composiciones monovalentes. En una modalidad, los agentes NB son composiciones multivalentes. En una modalidad, las regiones de estructura contienen residuos que se optimizan en la secuencia para utilizarse en seres humanos. Otros aspectos de los agentes NB de la invención se describen más adelante.

Mientras que el término “agente NB” se utiliza como un término general que pretende abarcar el alcance completo de las

composiciones de la invención, los términos "secuencia de NB" o de una manera alternativa “construcción de NB” se utilizan en la presente para referirse a las variantes de polipéptidos específicas que se dan a conocer en la presente como las SEQ ID NOs: 1-72, 87-88 y 103-104, y los nucleótidos que las codifican, incluyendo los que se dan a conocer específicamente en la presente como las SEQ ID NOs: 96-99 y la secuencias que codifican las mismas secuencias de polipéptidos que las SEQ ID NOs: 96-99 pero que difieren por el código degenerado.

Agentes NB de la Invención

En una modalidad, el agente NB se selecciona a partir del grupo de 11D1, 11H6, 10F1, 7A12, y 4E6, o una variante de los mismos. En una modalidad, el agente NB es una variante cuya secuencia se optimiza para utilizarse en seres humanos, por ejemplo, se humaniza. En una modalidad, los agentes NB humanizados incluyen, sin limitación, el grupo de 4E6hu y 11H6hu. En una modalidad, el agente NB es una variante monomérica del grupo enlistado, o una variante de la misma. En una modalidad, el agente NB es una variante multimérica del grupo enlistado, o una variante de la misma. En una modalidad, la variante multimérica del grupo enlistado es monoespecífica, o una variante de la misma. En una modalidad, la variante multimérica del grupo enlistado es multiespecífica, o una variante de la misma. En una modalidad, los múltiples epítopos reconocidos por un agente NB multiespecífico son diversos epítopos del objetivo del DR5, o una variante de los mismos. En una modalidad, los múltiples epítopos reconocidos por un agente NB multiespecífico es cuando menos un epítopo del objetivo del DR5 y cuando menos un epítopo sobre un objetivo diferente del polipéptido de DR5, o una variante de los mismos.

En una modalidad, el agente NB se selecciona a partir de una o más de las SEQ ID NOs: 1-22, 26–40, 87-88, y 103-104, o de las SEQ ID NOs: 96-99, o una variante de las mismas. Las modalidades específicas de los agentes NB 11D1, 11H6, 10F1, 7A12, y 4E6, o las variantes de los mismos, son como se proporcionan más adelante y

en las Tablas 1 a 4.

Los agentes NB de ejemplo de la invención incluyen las siguientes construcciones de polipéptidos de NB y las variantes de las mismas.

Familia 4E6

En una modalidad, el agente NB es 4E6, o una variante del mismo. En una modalidad, la construcción del 4E6 es el monómero de la SEQ ID NO: 1, o una variante del mismo. En una modalidad, la construcción del 4E6 es el monómero de la SEQ ID NO: 26, o una variante del mismo. En una modalidad, la construcción del 4E6 es un multímero que comprende dos o más monómeros de la SEQ ID NO: 1 que se enlazan operativamente, o una variante de los mismos. En una modalidad, la construcción del 4E6 es un multímero que comprende dos o más monómeros de la SEQ ID NO: 26 que se enlazan operativamente, o una variante de los mismos. En una modalidad, la construcción del 4E6 es un multímero que comprende dos o más monómeros de tanto la SEQ ID NO: 1 como la SEQ ID NO: 26 que se enlazan operativamente, o una variante de los mismos, en donde los monómeros pueden estar en cualquier orden.

En una modalidad, la construcción multimérica del 4E6 es un trímero, un tetrámero, o un pentámero de la SEQ ID NO: 1, o una variante de los mismos. En una modalidad, la construcción multimérica del 4E6 es un trímero, un tetrámero, o un pentámero de la SEQ ID NO: 26, o una variante de los mismos. En una modalidad, la construcción multimérica del 4E6 es un trímero, un tetrámero, o un pentámero de una combinación de tanto la SEQ ID NO: 1 como la SEQ ID NO: 26, o una variante de los mismos, en donde los monómeros pueden estar en cualquier orden. En una modalidad, la construcción del 4E6 es el multímero como se proporciona en cualquiera o más de las SEQ ID NOs: 6-8 y 27-29, o una variante de las mismas. También se contemplan multímeros de orden más alto, tales como los multímeros comprendidos de 6 a 10 subunidades.

En una modalidad, la construcción del 4E6 comprende la SEQ ID NO: 64, o una variante de la misma. En una modalidad, la

construcción del 4E6 comprende la SEQ ID NO: 65, o una variante de la misma. En una modalidad, la construcción del 4E6 comprende una secuencia de CDR1 de la SEQ ID NO: 42, una secuencia de CDR2 de la SEQ ID NO: 52 y una secuencia de CDR3 de cualquiera o más de la SEQ ID NO: 64 y/o la SEQ ID NO: 65, o una variante de las mismas. En una modalidad, la construcción del 4E6 es una secuencia humanizada o humano-diseñada (humaneered), o una variante de la misma. En una modalidad, la construcción del 4E6 es como se proporciona en la SEQ ID NO: 28, o una variante de la misma. En una modalidad, la construcción del 4E6 es como se proporciona en la SEQ ID NO: 29, o una variante de la misma. En una modalidad, la construcción del 4E6 comprende las SEQ ID NOs: 35, 42, 46, 52, 57, 64 y 70, respectivamente, o una variante de las mismas. En una modalidad, la construcción del 4E6 comprende las SEQ ID NOs: 36, 42, 47, 52, 58, 65 y 71, respectivamente, o una variante de las mismas.

En una modalidad, la construcción de NB es un ácido nucleico que codifica el polipéptido de 4E6 de la SEQ ID NO: 1 o las variantes, multímeros o fragmentos del mismo. En una modalidad, la construcción de NB es un ácido nucleico que codifica el polipéptido de 4E6Hu de la SEQ ID NO: 26 o las variantes, multímeros o fragmentos del mismo. En una modalidad, la construcción de NB es un ácido nucleico que codifica una o más de las regiones CDR del polipéptido de 4E6Hu, es decir, SEQ ID NOs: 42, 52 y 64, o las variantes de las mismas. En una modalidad, la construcción de NB es un ácido nucleico que codifica una o más de las regiones CDR del polipéptido de 4E6, es decir, SEQ ID NOs: 42, 52 y 65, o las variantes de las mismas. En una modalidad, la construcción de NB es un ácido nucleico que codifica la región CDR3 de la SEQ ID NO: 64 o las variantes de la misma. En una modalidad, la construcción de NB es un ácido nucleico que codifica la región CDR3 de la SEQ ID NO: 65 o las variantes de la misma.

Familia 7A12

En una modalidad, el agente NB es 7A12, o una variante del mismo. En una modalidad, la construcción del 7A12 es el monómero de la SEQ ID NO: 2, o una variante del mismo. En una modalidad, la construcción del 7A12 es un multímero que comprende dos o más monómeros de la SEQ ID NO: 2 que se enlazan operativamente, o una variante de los mismos. En una modalidad, la construcción multimérica del 7A12 es un trímero, un tetrámero, o un pentámero de la SEQ ID NO: 2, o una variante de los mismos. En una modalidad, la construcción del 7A12 es el multímero como se proporciona en cualquiera o más de las SEQ ID NOs: 9-11, o una variante del mismo. En una modalidad, la construcción del 7A12 comprende la SEQ ID NO: 63. En una modalidad, la construcción del 7A12 comprende una secuencia de CDR1 de la SEQ ID NO: 41, una secuencia de CDR2 de la SEQ ID NO: 51 y una secuencia de CDR3 de la SEQ ID NO: 63, o una variante de las mismas. En una modalidad, la construcción del 7A12 es una secuencia humanizada o humano-diseñada (humaneered), o una variante de la misma. En una modalidad, la construcción del 7A12 es como se proporciona en la SEQ ID NO: 10, o una variante de la misma. En una modalidad, la construcción del 7A12 es como se proporciona en la SEQ ID NO: 11, o una variante de la misma. En una modalidad, la construcción del 7A12 comprende las SEQ ID NOs: 34, 41, 45, 51, 56, 63 y 69, respectivamente, o una variante de las mismas. También se contemplan multímeros de orden más alto, tales como los multímeros comprendidos de 6 a 10 subunidades.

En una modalidad, la construcción de NB es un ácido nucleico que codifica el polipéptido del 7A12 de la SEQ ID NO: 2 o las variantes, multímeros o fragmentos del mismo. En una modalidad, la construcción de NB es un ácido nucleico que codifica una o más de las regiones CDR de las SEQ ID NOs: 41, 51 y 63, o las variantes del mismo. En una modalidad, la construcción de NB es un ácido nucleico que codifica la región CDR3 de la SEQ ID NO: 63 o las variantes del mismo.

Familia 10F1

En una modalidad, el agente NB es 10F1, o una variante del mismo. En una modalidad, la construcción del 10F1 es el monómero de la SEQ ID NO: 3, o una variante del mismo. En una modalidad, la construcción del 10F1 es un multímero que comprende dos o más monómeros de la SEQ ID NO: 3 que se enlazan operativamente, o una variante de los mismos. En una modalidad, la construcción multimérica del 10F1 es un trímero, un tetrámero, o un pentámero de la SEQ ID NO: 3, o una variante de los mismos. En una modalidad, la construcción del 10F1 es el multímero como se proporciona en cualquiera o más de las SEQ ID NOs: 12-16, o una variante del mismo. En una modalidad, la construcción del 10F1 comprende la SEQ ID NO: 68, o una variante de la misma. En una modalidad, la construcción del 10F1 comprende una secuencia de CDR1 de la SEQ ID NO: 44, una secuencia de CDR2 de la SEQ ID NO: 55 y una secuencia de CDR3 de la SEQ ID NO: 68, o una variante de las mismas. En una modalidad, la construcción del 10F1 es una secuencia humanizada o humano-diseñada (humaneered), o una variante de la misma. En una modalidad, la construcción del 10F1 comprende la SEQ ID NO: 15, o una variante de la misma. En una modalidad, la construcción del 10F1 comprende la SEQ ID NO: 16, o una variante de la misma. En una modalidad, la construcción del 10F1 comprende las SEQ ID NOs: 40, 44, 50, 55, 62, 68 y 72, respectivamente, o una variante de las mismas. También se contemplan multímeros de orden más alto, tales como los multímeros comprendidos de 6 a 10 subunidades.

En una modalidad, la construcción de NB es un ácido nucleico que codifica el polipéptido del 10F1 de la SEQ ID NO: 3 o las variantes, multímeros o fragmentos del mismo. En una modalidad, la construcción de NB es un ácido nucleico que codifica una o más de las regiones CDR de la SEQ ID NO: 44, 55 y 68, o las variantes de las mismas. En una modalidad, la construcción de NB es un ácido nucleico que codifica la región CDR3 de la SEQ ID NO: 68 o las variantes de la misma.

Familia 11D1

En una modalidad, el agente NB es 11D1, o una variante del mismo. En una modalidad, la construcción del 11D1 es el monómero de la SEQ ID NO: 4, o una variante del mismo. En una modalidad, la construcción del 11D1 es un multímero que comprende dos o más monómeros de la SEQ ID NO: 4 que se enlazan operativamente, o una variante de los mismos. En una modalidad, la construcción multimérica del 11D1 es un trímero, un tetrámero, o un pentámero de la SEQ ID NO: 4, o una variante de los mismos. En una modalidad, la construcción del 11D1 es el multímero como se proporciona en cualquiera o más de las SEQ ID NOs: 17-19, o una variante del mismo. En una modalidad, la construcción del 11D1 comprende la SEQ ID NO: 67, o una variante de la misma. En una modalidad, la construcción del 11D1 comprende una secuencia de CDR1 de la SEQ ID NO: 43, una secuencia de CDR2 de la SEQ ID NO: 54 y una secuencia de CDR3 de la SEQ ID NO: 67, o una variante de las mismas. En una modalidad, la construcción del 11D1 es una secuencia humanizada o humano-diseñada (humaneered), o una variante de la misma. En una modalidad, la construcción del 11D1 comprende la SEQ ID NO: 18, o una variante de la misma. En una modalidad, la construcción del 11D1 comprende la SEQ ID NO: 19, o una variante de la misma. En una modalidad, la construcción del 11D1 comprende las SEQ ID NOs: 39, 43, 49, 54, 61, 67 y 71, respectivamente, o una variante de las mismas. También se contemplan multímeros de orden más alto, tales como los multímeros comprendidos de 6 a 10 subunidades.

En una modalidad, la construcción de NB es un ácido nucleico que codifica el polipéptido del 11D1 de la SEQ ID NO: 4 o las variantes, multímeros o fragmentos del mismo. En una modalidad, la construcción de NB es un ácido nucleico que codifica una o más de las regiones CDR de la SEQ ID NO: 43, 54 y 67, o las variantes de las mismas. En una modalidad, la construcción de NB es un ácido nucleico que codifica la región CDR3 de la SEQ ID NO: 67 o las variantes del mismo.

Familia 11H6

En una modalidad, el agente NB es 11H6, o una variante del mismo. En una modalidad, la construcción del 11H6 es el monómero de la SEQ ID NO: 5, o una variante del mismo. En una modalidad, la construcción del 11H6 es el monómero de la SEQ ID NO: 30, o una variante del mismo. En una modalidad, la construcción del 11H6 es un multímero que comprende dos o más monómeros de la SEQ ID NO: 5 que se enlazan operativamente, o una variante de los mismos. En una modalidad, la construcción del 11H6 es un multímero que comprende dos o más monómeros de la SEQ ID NO: 30 que se enlazan operativamente, o una variante de los mismos. En una modalidad, la construcción del 11H6 es un multímero que comprende dos o más monómeros de tanto la SEQ ID NO: 5 como la SEQ ID NO: 30 que se enlazan operativamente, o una variante de los mismos (por ejemplo, la SEQ ID NO: 88), en donde los monómeros pueden estar en cualquier orden. También se contemplan multímeros de orden más alto, tales como los multímeros comprendidos de 6 a 10 subunidades.

En una modalidad, la construcción multimérica del 11H6 es un trímero, un tetrámero, o un pentámero de la SEQ ID NO: 5, o una variante de los mismos. En una modalidad, la construcción multimérica del 11H6 es un trímero, un tetrámero, o un pentámero de la SEQ ID NO: 30, o una variante de los mismos. En una modalidad, la construcción multimérica del 11H6 es un trímero, un tetrámero, o un pentámero de una combinación de tanto la SEQ ID NO: 5 como la SEQ ID NO: 30, o una variante de los mismos, en donde los monómeros pueden estar en cualquier orden. En una modalidad, la construcción del 11H6 es el multímero como se proporciona en cualquiera o más de las SEQ ID NOs: 20-22 y 31-33, o una variante del mismo.

En una modalidad, la construcción del 11H6 comprende la SEQ ID NO: 66 u 83, o una variante de la misma. En una modalidad, la construcción del 11H6 comprende una secuencia de CDR1 de la SEQ ID NO: 43, una secuencia de CDR2 de la SEQ ID NO: 53 y una

secuencia de CDR3 de cualquiera o más de la SEQ ID NO: 66, o una variante de las mismas. En una modalidad, la construcción del 11H6 es una secuencia humanizada o humano-diseñada (humaneered), o una variante de la misma. En una modalidad, la construcción del 11H6 es como se proporciona en la SEQ ID NO: 31, o una variante de la misma. En una modalidad, la construcción del 11H6 es como se proporciona en la SEQ ID NO: 32, o una variante de la misma. En una modalidad, la construcción del 11H6 es como se proporciona en la SEQ ID NO: 33, o una variante de la misma. En una modalidad, la construcción del 11H6 comprende las SEQ ID NOs: 37, 43, 48, 53, 59, 66 y 70, respectivamente, o una variante de las mismas. En una modalidad, la construcción del 11H6 comprende las SEQ ID NOs: 38, 43, 48, 53, 60, 66 y 71, respectivamente, o una variante de las mismas.

En una modalidad, la construcción de NB es un ácido nucleico que codifica el polipéptido de 11H6 de la SEQ ID NO: 5 ó variantes, multímeros o fragmentos del mismo. En una modalidad, la construcción de NB es un ácido nucleico que codifica el polipéptido de 11H6Hu de la SEQ ID NO: 30 ó variantes, multímeros o fragmentos del mismo. En una modalidad, la construcción de NB es un ácido nucleico que codifica una o más de las regiones CDR de las SEQ ID NOs: 43, 53 y 66, o las variantes de las mismas. En una modalidad, la construcción de NB es un ácido nucleico que codifica la región CDR3 de la SEQ ID NO: 66 o las variantes del mismo.

Otras variantes contempladas de los agentes NB

En una modalidad, un agente NB de la invención es una construcción multimérica que comprende cuando menos dos subunidades diferentes seleccionadas a partir del grupo de 11D1, 11H6, 10F1, 7A12, y 4E6, o una variante de las mismas. En una modalidad, el orden particular de las construcciones multiméricas comprende subunidades alternadas. Se proporciona una construcción de ejemplo en la SEQ ID NO: 84. Se contemplan otras configuraciones de las subunidades dentro de una construcción de NB multimérica. Una persona experta será capaz de determinar y

seleccionar en general las sustituciones, supresiones o inserciones adecuadas, o las combinaciones adecuadas de las mismas, basándose en la divulgación de la presente y opcionalmente después de un grado limitado de experimentación de rutina, que puede involucrar, por ejemplo, introducir un número limitado de posibles sustituciones y determinar su influencia sobre las propiedades de las construcciones de NB obtenidas de esta manera.

En adición a las construcciones de polipéptidos de NB de ejemplo dadas a conocer y proporcionadas en la presente, la invención abarca nucleótidos que codifican cualquier agente de NB abarcado dentro de la divulgación de la presente invención, incluyendo, sin limitación: secuencias de ADN y de ARN o las variantes de las mismas, en aislamiento o en vectores recombinantes o similares, y/o como regiones codificantes o fragmentos, incluyendo en especial fragmentos que codifiquen la región CDR3 de las construcciones de NB dadas a conocer. En una modalidad, el agente NB es un ácido nucleico que codifica la construcción de NB de cualquiera de las secuencias proporcionadas en las Tablas 1 a 4. En una modalidad, el agente NB es un ácido nucleico que codifica la construcción del 4E6 de cualquiera de las SEQ ID NOs: 1-5, 2, 3, 4, 5, 26, 30 y 87. En una modalidad, el agente NB es un ácido nucleico que codifica cualquiera de las SEQ ID NOs: 41-44, 51-55 y 63-68. En una modalidad, el agente NB es un ácido nucleico que codifica cualquiera de las SEQ ID NOs: 41-44, 51-55 y 63-68.

Las secuencias de ejemplo de la invención se proporcionan en seguida en las Tablas 1 a 4. El término de encabezado “ID” se refiere a la SEQ ID NO dada. Las combinaciones preferidas de secuencias de FR y de CDR para cada construcción de NB se utilizan indistintamente a través de toda la solicitud.

Tabla 1: Secuencias de polipéptidos de los componentes de enlace de DR5 monovalentes/monoméricos a partir del rastreo inicial, con las SEQ ID NOs.

Nombre	Secuencias	ID
4E6	evqlvesgggsvqagdslrlscaasgrtfgSIRVGwfrqtpgkerefvaAINRNDGTTYYADSVKGrftisrdnakntvymqmaslkpedtavyycaaGLQYNRSADRVPVGAVYwgqgtqvtvss	1
7A12	evqlvesggglvqaggslrlscaasgrtfsNYAMGwfrqapgkerefvaALNWSGGSTYYVDSVKGrftisrdnakntvylqmnslkpedtavyycaaAGSFSLGGRPYGDDYwgkgtlvtvss	2
10F1	evqlvesggglvqpggslrlscaasgftfsRYWMYwvrqapgkglewvsAINSGGGDTYYRDSVRGrftisrdnfkntlylqmnslksedtavyycakAEGPPTFSLIRTMTVDPgaqgtqvtvss	3
11D1	evqlvesggglvqpggslrlscaasgsidslNNMGwyrqapgkrelvaEITPRGRTNYADSEKSrftisrdnakrtvnlqmnslkpedtavyycnaEVRERGTSWYRPDYwgqgtqvtvss	4
11H6	evqlvesggglvqpggslrlscaasgtfdkINNMGwyrqapgkqrdlvaQITPGGITDYADSVKGrftisrdnakdtmylqmnslkpedtavyfcnaEILKRAYIDVYVNYwgqgtqvtvss	5
11H6a	evqllesggglvqpggslrlscaasgtfdkINNMGwyrqapgkqrdlvaQITPGGITDYADSVKGrftisrdnakdtmylqmnslkpedtavyfcnaEILKRAYIDVYVNYwgqgtqvtvss	87

Tabla 2: Secuencias de polipéptidos de las construcciones de NB anti-DR5 multivalentes con secuencias enlazadoras opcionales, con las SEQ ID NOs.

Nombre	Secuencia	ID
4E6 tri	evqlvesgggsvqagdslrlscaasgrtfgSIRVGwfrqtpgkerefvaAINRNDGTTYYADSVKGrftisrdnakntvymqmaslkpedtavyycaaGLQYNRSADRVPVGAVYwgqgtqvtvssgggggsggggsggggsggggsggggsggggsevqlvesgggsvqagdslrlscaasgrtfgSIRVGwfrqtpgkerefvaAINRNDGT	6

Nombre	Secuencia	ID
	TYYADSVKGrftisrdnakntvymqmaslkpedtavyycaaGL QYNRSADRVPVGAVYwgqgtqvtvssggggsggggsgggg sggggsggggsggggsggggsevqlvesgggsvqagdslrlscaa sgrtfgSIRVGwfrqtpgkerefvaAINRNDGTTYYADSVKG rftisrdnakntvymqmaslkpedtavyycaaGLQYNRSADRV PVGAVYwgqgtqvtvss	
4E6 tetra	evqlvesgggsvqagdslrlscaasgrtfgSIRVGwfrqtpgkeref vaAINRNDGTTYYADSVKGrftisrdnakntvymqmaslkpe dtavyycaaGLQYNRSADRVPVGAVYwgqgtqvtvssggg gsggggsggggsggggsggggsggggsggggsevqlvesgggsv qagdslrlscaasgrtfgSIRVGwfrqtpgkerefvaAINRNDGT TYYADSVKGrftisrdnakntvymqmaslkpedtavyycaaGL QYNRSADRVPVGAVYwgqgtqvtvssggggsggggsggggsggg sggggsggggsggggsggggsevqlvesgggsvqagdslrlscaa sgrtfgSIRVGwfrqtpgkerefvaAINRNDGTTYYADSVKG rftisrdnakntvymqmaslkpedtavyycaaGLQYNRSADRV PVGAVYwgqgtqvtvssggggsggggsggggsggggsggggs ggggsggggsevqlvesgggsvqagdslrlscaasgrtfgSIRVG wfrqtpgkerefvaAINRNDGTTYYADSVKGrftisrdnakntv ymqmaslkpedtavyycaaGLQYNRSADRVPVGAVYwgq gtqvtvss	7
4E6 penta	evqlvesgggsvqagdslrlscaasgrtfgSIRVGwfrqtpgkeref vaAINRNDGTTYYADSVKGrftisrdnakntvymqmaslkpe dtavyycaaGLQYNRSADRVPVGAVYwgqgtqvtvssggg gsggggsggggsggggsggggsggggsggggsevqlvesgggsv qagdslrlscaasgrtfgSIRVGwfrqtpgkerefvaAINRNDGT TYYADSVKGrftisrdnakntvymqmaslkpedtavyycaaGL QYNRSADRVPVGAVYwgqgtqvtvssggggsggggsggggsggg sggggsggggsggggsggggsevqlvesgggsvqagdslrlscaa sgrtfgSIRVGwfrqtpgkerefvaAINRNDGTTYYADSVKG	8

Nombre	Secuencia	ID
	rftisrdnakntvymqmaslkpedtavyycaaGLQYNRSADRV PVGAVYwgqgtqvtvssggggsggggsggggsggggsgggs ggggsggggsevqlvesgggsvqagdslrlscaasgrtfgSIRVG wfrqtpgkerefvaAINRNDGTTYYADSVKGrftisrdnakntv ymqmaslkpedtavyycaaGLQYNRSADRVPVGAVYwgq gtqvtvssggggsggggsggggsggggsggggsggggse vqlvesgggsvqagdslrlscaasgrtfgSIRVGwfrqtpgkerefv aAINRNDGTTYYADSVKGrftisrdnakntvymqmaslkped tavyycaaGLQYNRSADRVPVGAVYwgqgtqvtvss	
7A12 tri	evqlvesggglvqaggslrlscaasgrtfsNYAMGwfrqapgkere fvaALNWSGGSTYYVDSVKGrftisrdnakntvylqmnslkp edtavyycaaAGSFSLGGRPYGDDYwgkgtlvtvssggggs ggggsggggsggggsggggsggggsevqlvesggglvqa ggslrlscaasgrtfsNYAMGwfrqapgkerefvaALNWSGGS TYYVDSVKGrftisrdnakntvylqmnslkpedtavyycaaAGS FSLGGRPYGDDYwgkgtlvtvssggggsggggsggggsggg gsggggsggggsggggsevqlvesggglvqaggslrlscaasgrtfs NYAMGwfrqapgkerefvaALNWSGGSTYYVDSVKGrfti srdnakntvylqmnslkpedtavyycaaAGSFSLGGRPYGDD Ywgkgtlvtvss	9
7A12 tetra	evqlvesggglvqaggslrlscaasgrtfsNYAMGwfrqapgkere fvaALNWSGGSTYYVDSVKGrftisrdnakntvylqmnslkp edtavyycaaAGSFSLGGRPYGDDYwgkgtlvtvssggggs ggggsggggsggggsggggsggggsevqlvesggglvqa ggslrlscaasgrtfsNYAMGwfrqapgkerefvaALNWSGGS TYYVDSVKGrftisrdnakntvylqmnslkpedtavyycaaAGS FSLGGRPYGDDYwgkgtlvtvssggggsggggsggggsggg gsggggsggggsggggsevqlvesggglvqaggslrlscaasgrtfs NYAMGwfrqapgkerefvaALNWSGGSTYYVDSVKGrfti srdnakntvylqmnslkpedtavyycaaAGSFSLGGRPYGDD	10

Nombre	Secuencia	ID
	Ywgkgtlvtvssggggsggggsggggsggggsggggsggggsgg ggsevqlvesggglvqaggslrlscaasgrtfsNYAMGwfrqapgk erefvaALNWSGGSTYYVDSVKGrftisrdnakntvylqmnsl kpedtavyycaaAGSFSLGGRPYGDDYwgkgtlvtvss	
7A12 penta	evqlvesggglvqaggslrlscaasgrtfsNYAMGwfrqapgkere fvaALNWSGGSTYYVDSVKGrftisrdnakntvylqmnslkp edtavyycaaAGSFSLGGRPYGDDYwgkgtlvtvssggggs ggggsggggsggggsggggsggggsggggsevqlvesggglvqa ggslrlscaasgrtfsNYAMGwfrqapgkerefvaALNWSGGS TYYVDSVKGrftisrdnakntvylqmnslkpedtavyycaaAGS FSLGGRPYGDDYwgkgtlvtvssggggsggggsggggsggg gsggggsggggsggggsevqlvesggglvqaggslrlscaasgrtfs NYAMGwfrqapgkerefvaALNWSGGSTYYVDSVKGrfti srdnakntvylqmnslkpedtavyycaaAGSFSLGGRPYGDD Ywgkgtlvtvssggggsggggsggggsggggsggggsggggsgg ggsevqlvesggglvqaggslrlscaasgrtfsNYAMGwfrqapgk erefvaALNWSGGSTYYVDSVKGrftisrdnakntvylqmnsl kpedtavyycaaAGSFSLGGRPYGDDYwgkgtlvtvssggg gsggggsggggsggggsggggsggggsggggsevqlvesggglv qaggslrlscaasgrtfsNYAMGwfrqapgkerefvaALNWSG GSTYYVDSVKGrftisrdnakntvylqmnslkpedtavyycaaA GSFSLGGRPYGDDYwgkgtlvtvss	11
10F1 tri 9	evqlvesggglvqpggslrlscaasgftfsRYWMYwvrqapgkgle wvsAINSGGGDTYYRDSVRGrftisrdnfkntlylqmnslkse dtavyycakAEGPPTFSLIRTMTVDPgaqgtqvtvssggggs gggsevqlvesggglvqpggslrlscaasgftfsRYWMYwvrqap gkglewvsAINSGGGDTYYRDSVRGrftisrdnfkntlylqmn slksedtavyycakAEGPPTFSLIRTMTVDPgaqgtqvtvss ggggsgggsevqlvesggglvqpggslrlscaasgftfsRYWMYw vrqapgkglewvsAINSGGGDTYYRDSVRGrftisrdnfkntl	12

Nombre	Secuencia	ID
	ylqmnslksedtavyycakAEGPPTFSLIRTMTVDPgaqgtq vtvss	
10F1 tri 20	evqlvesggglvqpggslrlscaasgftfsRYWMYwvrqapgkgle wvsAINSGGGDTYYRDSVRGrftisrdnfkntlylqmnslkse dtavyycakAEGPPTFSLIRTMTVDPgaqgtqvtvssggggs ggggsggggsggggsevqlvesggglvqpggslrlscaasgftfsR YWMYwvrqapgkglewvsAINSGGGDTYYRDSVRGrftis rdnfkntlylqmnslksedtavyycakAEGPPTFSLIRTMTVD Pgaqgtqvtvssggggsggggsggggsggggsevqlvesggglvq pggslrlscaasgftfsRYWMYwvrqapgkglewvsAINSGGG DTYYRDSVRGrftisrdnfkntlylqmnslksedtavyycakAEG PPTFSLIRTMTVDPgaqgtqvtvss	13
10F1 tri	evqlvesggglvqpggslrlscaasgftfsRYWMYwvrqapgkgle wvsAINSGGGDTYYRDSVRGrftisrdnfkntlylqmnslkse dtavyycakAEGPPTFSLIRTMTVDPgaqgtqvtvssggggs ggggsggggsggggsggggsggggsggggsevqlvesggglvqp ggslrlscaasgftfsRYWMYwvrqapgkglewvsAINSGGGD TYYRDSVRGrftisrdnfkntlylqmnslksedtavyycakAEGP PTFSLIRTMTVDPgaqgtqvtvssggggsggggsggggsggg gsggggsggggsggggsevqlvesggglvqpggslrlscaasgftfs RYWMYwvrqapgkglewvsAINSGGGDTYYRDSVRGrft isrdnfkntlylqmnslksedtavyycakAEGPPTFSLIRTMTV DPgaqgtqvtvss	14
10F1 tetra	evqlvesggglvqpggslrlscaasgftfsRYWMYwvrqapgkgle wvsAINSGGGDTYYRDSVRGrftisrdnfkntlylqmnslkse dtavyycakAEGPPTFSLIRTMTVDPgaqgtqvtvssggggs ggggsggggsggggsggggsggggsggggsevqlvesggglvqp ggslrlscaasgftfsRYWMYwvrqapgkglewvsAINSGGGD TYYRDSVRGrftisrdnfkntlylqmnslksedtavyycakAEGP PTFSLIRTMTVDPgaqgtqvtvssggggsggggsggggsggg	15

Nombre	Secuencia	ID
	gsggggsggggsggggsevqlvesggglvqpggslrlscaasgftfs RYWMYwvrqapgkglewvsAINSGGGDTYYRDSVRGrft isrdnfkntlylqmnslksedtavyycakAEGPPTFSLIRTMTV DPgaqgtqvtvssggggsggggsggggsggggsggggsgggs ggggsevqlvesggglvqpggslrlscaasgftfsRYWMYwvrqa pgkglewvsAINSGGGDTYYRDSVRGrftisrdnfkntlylqm nslksedtavyycakAEGPPTFSLIRTMTVDPgaqgtqvtvs s	
10F1 penta	evqlvesggglvqpggslrlscaasgftfsRYWMYwvrqapgkgle wvsAINSGGGDTYYRDSVRGrftisrdnfkntlylqmnslkse dtavyycakAEGPPTFSLIRTMTVDPgaqgtqvtvssggggs ggggsggggsggggsggggsggggsggggsevqlvesggglvqp ggslrlscaasgftfsRYWMYwvrqapgkglewvsAINSGGGD TYYRDSVRGrftisrdnfkntlylqmnslksedtavyycakAEGP PTFSLIRTMTVDPgaqgtqvtvssggggsggggsggggsggg gsggggsggggsggggsevqlvesggglvqpggslrlscaasgftfs RYWMYwvrqapgkglewvsAINSGGGDTYYRDSVRGrft isrdnfkntlylqmnslksedtavyycakAEGPPTFSLIRTMTV DPgaqgtqvtvssggggsggggsggggsggggsggggsggggs ggggsevqlvesggglvqpggslrlscaasgftfsRYWMYwvrqa pgkglewvsAINSGGGDTYYRDSVRGrftisrdnfkntlylqm nslksedtavyycakAEGPPTFSLIRTMTVDPgaqgtqvtvs sggggsggggsggggsggggsggggsggggsggggsevqlvesg gglvqpggslrlscaasgftfsRYWMYwvrqapgkglewvsAINS GGGDTYYRDSVRGrftisrdnfkntlylqmnslksedtavyyca kAEGPPTFSLIRTMTVDPgaqgtqvtvss	16
11D1 tri	evqlvesggglvqpggslrlscaasgsidsINNMGwyrqapgkqre lvaEITPRGRTNYADSEKSrftisrdnakrtvnlqmnslkpedt avyycnaEVRERGTSWYRPDYwgqgtqvtvssggggsggg gsggggsggggsggggsggggsggggsevqlvesggglvqpggsl	17

Nombre	Secuencia	ID
	rlscaasgsidsINNMGwyrqapgkqrelvaEITPRGRTNYA DSEKSrftisrdnakrtvnlqmnslkpedtavyycnaEVRERGT SWYRPDYwgqgtqvtvssggggsggggsggggsggggsgggg sggggsggggsevqlvesggglvqpggslrlscaasgsidsINNM GwyrqapgkqrelvaEITPRGRTNYADSEKSrftisrdnakrtv nlqmnslkpedtavyycnaEVRERGTSWYRPDYwgqgtqvt vss	
11D1 tetra	evqlvesggglvqpggslrlscaasgsidsINNMGwyrqapgkqre lvaEITPRGRTNYADSEKSrftisrdnakrtvnlqmnslkpedt avyycnaEVRERGTSWYRPDYwgqgtqvtvssggggsgggg gsggggsggggsggggsggggsggggsevqlvesggglvqpggsl rlscaasgsidsINNMGwyrqapgkqrelvaEITPRGRTNYA DSEKSrftisrdnakrtvnlqmnslkpedtavyycnaEVRERGT SWYRPDYwgqgtqvtvssggggsggggsggggsggggsgggg sggggsggggsevqlvesggglvqpggslrlscaasgsidsINNM GwyrqapgkqrelvaEITPRGRTNYADSEKSrftisrdnakrtv nlqmnslkpedtavyycnaEVRERGTSWYRPDYwgqgtqvt vssggggsggggsggggsggggsggggsggggsevqlve sggglvqpggslrlscaasgsidsINNMGwyrqapgkqrelvaEIT PRGRTNYADSEKSrftisrdnakrtvnlqmnslkpedtavyycn aEVRERGTSWYRPDYwgqgtqvtvss	18
11D1 penta	evqlvesggglvqpggslrlscaasgsidsINNMGwyrqapgkqre lvaEITPRGRTNYADSEKSrftisrdnakrtvnlqmnslkpedt avyycnaEVRERGTSWYRPDYwgqgtqvtvssggggsggg gsggggsggggsggggsggggsggggsevqlvesggglvqpggsl rlscaasgsidsINNMGwyrqapgkqrelvaEITPRGRTNYA DSEKSrftisrdnakrtvnlqmnslkpedtavyycnaEVRERGT SWYRPDYwgqgtqvtvssggggsggggsggggsggggsgggg sggggsggggsevqlvesggglvqpggslrlscaasgsidsINNM GwyrqapgkqrelvaEITPRGRTNYADSEKSrftisrdnakrtv	19

Nombre	Secuencia	ID
	nlqmnslkpedtavyycnaEVRERGTSWYRPDYwgqgtqvt vssggggsggggsggggsggggsggggsggggsggggsevqlve sggglvqpggslrlscaasgsidslNNMGwyrqapgkqrelvaEIT PRGRTNYADSEKSrftisrdnakrtvnlqmnslkpedtavyycn aEVRERGTSWYRPDYwgqgtqvtvssggggsggggsgggg sggggsggggsggggsggggsevqlvesggglvqpggslrlscaas gsidslNNMGwyrqapgkqrelvaEITPRGRTNYADSEKSr ftisrdnakrtvnlqmnslkpedtavyycnaEVRERGTSWYRP DYwgqgtqvtvss	
11H6 tri	evqlvesggglvqpggslrlscaasgtfdkINNMGwyrqapgkqrd lvaQITPGGITDYADSVKGrftisrdnakdtmylqmnslkpedt avyfcnaEILKRAYIDVYVNYwgqgtqvtvssggggsggggsg gggsggggsggggsggggsggggsevqlvesggglvqpggslrls caasgtfdkINNMGwyrqapgkqrdlvaQITPGGITDYADSV KGrftisrdnakdtmylqmnslkpedtavyfcnaEILKRAYIDVY VNYwgqgtqvtvssggggsggggsggggsggggsggggsgggg sggggsevqlvesggglvqpggslrlscaasgtfdkINNMGwyrqa pgkqrdlvaQITPGGITDYADSVKGrftisrdnakdtmylqmn slkpedtavyfcnaEILKRAYIDVYVNYwgqgtqvtvss	20
11H6 tetra	evqlvesggglvqpggslrlscaasgtfdkINNMGwyrqapgkqrd lvaQITPGGITDYADSVKGrftisrdnakdtmylqmnslkpedt avyfcnaEILKRAYIDVYVNYwgqgtqvtvssggggsggggsg gggsggggsggggsggggsggggsevqlvesggglvqpggslrls caasgtfdkINNMGwyrqapgkqrdlvaQITPGGITDYADSV KGrftisrdnakdtmylqmnslkpedtavyfcnaEILKRAYIDVY VNYwgqgtqvtvssggggsggggsggggsggggsggggsgggg sggggsevqlvesggglvqpggslrlscaasgtfdkINNMGwyrqa pgkqrdlvaQITPGGITDYADSVKGrftisrdnakdtmylqmn slkpedtavyfcnaEILKRAYIDVYVNYwgqgtqvtvssggggs ggggsggggsggggsggggsggggsggggsevqlvesggglvqp	21

Nombre	Secuencia	ID
	ggslrlscaasgtfdkINNMGwyrqapgkqrdlvaQITPGGITD YADSVKGrftisrdnakdtmylqmnslkpedtavyfcnaEILKR AYIDVYVNYwgqgtqvtvss	
11H6 penta	evqlvesggglvqpggslrlscaasgtfdkINNMGwyrqapgkqrd lvaQITPGGITDYADSVKGrftisrdnakdtmylqmnslkpedt avyfcnaEILKRAYIDVYVNYwgqgtqvtvssggggsggggsg gggsggggsggggsggggsggggsevqlvesggglvqpggslrls caasgtfdkINNMGwyrqapgkqrdlvaQITPGGITDYADSV KGrftisrdnakdtmylqmnslkpedtavyfcnaEILKRAYIDVY VNYwgqgtqvtvssggggsggggsggggsggggsggggsgggg sggggsevqlvesggglvqpggslrlscaasgtfdkINNMGwyrqa pgkqrdlvaQITPGGITDYADSVKGrftisrdnakdtmylqmn slkpedtavyfcnaEILKRAYIDVYVNYwgqgtqvtvssggggs ggggsggggsggggsggggsggggsggggsevqlvesggglvqp ggslrlscaasgtfdkINNMGwyrqapgkqrdlvaQITPGGITD YADSVKGrftisrdnakdtmylqmnslkpedtavyfcnaEILKR AYIDVYVNYwgqgtqvtvssggggsggggsggggsggggsgg ggsggggsggggsevqlvesggglvqpggslrlscaasgtfdkINN MGwyrqapgkqrdlvaQITPGGITDYADSVKGrftisrdnak dtmylqmnslkpedtavyfcnaEILKRAYIDVYVNYwgqgtqv tvss	22
Enlace 1	ggggsggggsggggsggggsggggsggggsggggs	23
Enlace 2	ggggsggggsggggsggggs	24
Enlace 3	ggggsgggs	25

Nombre	Secuencia	ID
Enlace 4	GGGGS	81
Enlace 5	GGGS	82
11H6a tetra2	evqlvesggglvqpggslrlscaasgtfdkINNMGwyrqapgkqrdlvaQITPGGITDYADSVKGrftisrdnakdtmylqmnslkpedtavyfcnaEILKRAYIDVYVNYwgqgtqvtvssggggsggggsgggsggggsggggsggggsggggsevqllesggglvqpggslrlscaasgtfdkINNMGwyrqapgkqrdlvaQITPGGITDYADSVKGrftisrdnakdtmylqmnslkpedtavyfcnaEILKRAYIDVYVNYwgqgtqvtvssggggsggggsggggsggggsggggsggggsevqllesggglvqpggslrlscaasgtfdkINNMGwyrqapgkqrdlvaQITPGGITDYADSVKGrftisrdnakdtmylqmnslkpedtavyfcnaEILKRAYIDVYVNYwgqgtqvtvssggggsggggsggggsggggsggggsevqllesggglvqpggslrlscaasgtfdkINNMGwyrqapgkqrdlvaQITPGGITDYADSVKGrftisrdnakdtmylqmnslkpedtavyfcnaEILKRAYIDVYVNYwgqgtqvtvss	88
Tag1	EQKLISEEDLN	91
Tag2	HHHHHH	92
Tag3	AAAEQKLISEEDLNGAAHHHHHH	93
Tag4	GAAEQKLISEEDLNGAAHHHHHH	94
Tag5	GGGC	95

Tabla 3: Secuencias de Nucleótidos (NT) y de Polipéptidos (AA) Optimizadas Humanas

Nombre	Secuencia	ID:

Nombre	Secuencia	ID:
4E6 hu (AA)	evqllesggglvqpggslrlscaasgrtfgSIRVGwfrqapgkgrefv sAINRNDGTTYYADSVKGrftisrdnskntvylqmnslrpedta vyycaaGLQYNRAADRVPVGAVYwgqgtlvtvss	26
4E6 hu trímero (AA)	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRTFGSIRVG WFRQAPGKGREFVSAINRNDGTTYYADSVKGRFTIS RDNSKNTVYLQMNSLRPEDTAVYYCAAGLQYNRAA DRVPVGAVYWGQGTLVTVSSGGGGSGGGGSGGG GSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSEVQLLESGGGL VQPGGSLRLSCAASGRTFGSIRVGWFRQAPGKGRE FVSAINRNDGTTYYADSVKGRFTISRDNSKNTVYLQ MNSLRPEDTAVYYCAAGLQYNRAADRVPVGAVYW GQGTLVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGG GSGGGGSGGGGSEVQLLESGGGLVQPGGSLRLSC AASGRTFGSIRVGWFRQAPGKGREFVSAINRNDGT TYYADSVKGRFTISRDNSKNTVYLQMNSLRPEDTAV YYCAAGLQYNRAADRVPVGAVYWGQGTLVTVSS	27
4E6 hu tetrá-mero (AA)	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRTFGSIRVG WFRQAPGKGREFVSAINRNDGTTYYADSVKGRFTIS RDNSKNTVYLQMNSLRPEDTAVYYCAAGLQYNRAA DRVPVGAVYWGQGTLVTVSSGGGGSGGGGSGGG GSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSEVQLLESGGGL VQPGGSLRLSCAASGRTFGSIRVGWFRQAPGKGRE FVSAINRNDGTTYYADSVKGRFTISRDNSKNTVYLQ MNSLRPEDTAVYYCAAGLQYNRAADRVPVGAVYW GQGTLVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGG GSGGGGSGGGGSEVQLLESGGGLVQPGGSLRLSC AASGRTFGSIRVGWFRQAPGKGREFVSAINRNDGT TYYADSVKGRFTISRDNSKNTVYLQMNSLRPEDTAV YYCAAGLQYNRAADRVPVGAVYWGQGTLVTVSSG GGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGG	28

Nombre	Secuencia	ID:
	GSEVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRTFGSIRV GWFRQAPGKGREFVSAINRNDGTTYYADSVKGRFTI SRDNSKNTVYLQMNSLRPEDTAVYYCAAGLQYNRA ADRVPVGAVYWGQGTLVTVSS	
4E6 hu pentá-mero (AA)	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRTFGSIRVG WFRQAPGKGREFVSAINRNDGTTYYADSVKGRFTIS RDNSKNTVYLQMNSLRPEDTAVYYCAAGLQYNRAA DRVPVGAVYWGQGTLVTVSSGGGGSGGGGSGGG GSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSEVQLLESGGGL VQPGGSLRLSCAASGRTFGSIRVGWFRQAPGKGRE FVSAINRNDGTTYYADSVKGRFTISRDNSKNTVYLQ MNSLRPEDTAVYYCAAGLQYNRAADRVPVGAVYW GQGTLVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGG GSGGGGSGGGGSEVQLLESGGGLVQPGGSLRLSC AASGRTFGSIRVGWFRQAPGKGREFVSAINRNDGT TYYADSVKGRFTISRDNSKNTVYLQMNSLRPEDTAV YYCAAGLQYNRAADRVPVGAVYWGQGTLVTVSSG GGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGG GSEVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRTFGSIRV GWFRQAPGKGREFVSAINRNDGTTYYADSVKGRFTI SRDNSKNTVYLQMNSLRPEDTAVYYCAAGLQYNRA ADRVPVGAVYWGQGTLVTVSSGGGGSGGGGSGG GGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSEVQLLESGGG LVQPGGSLRLSCAASGRTFGSIRVGWFRQAPGKGR EFVSAINRNDGTTYYADSVKGRFTISRDNSKNTVYL QMNSLRPEDTAVYYCAAGLQYNRAADRVPVGAVY WGQGTLVTVSS	29
4E6 hu Monó-mero	gaggtgcagctgctggagtctggcggcggactggtgcagcctggcgg ctccctgagactgtcctgcgccgcctccggccggaccttcggctccatc agagtgggctggttccggcaggcccctggcaagggccgggagttcgt	96

Nombre	Secuencia	ID:
(NT)	gtccgccatcaaccggaacgacggcaccacctactacgccgactcc gtgaagggccggttcaccatctcccgggacaactccaagaacaccgt gtacctgcagatgaactccctgcggcccgaggacaccgccgtgtact actgcgccgctggcctgcagtacaacagagccgccgacagagtgcc tgtgggcgctgtgtactggggccagggcaccctggtgaccgtgtcctct	
4E6 hu Monó-mero (NT)	gaggtgcagctgctggagtctggcggcggactggtgcagcctggcgg ctccctgagactgtcctgcgccgcctccggccggaccttcggctccatc agagtgggctggttccggcaggcccctggcaagggccgggagttcgt gtccgccatcaaccggaacgacggcaccacctactacgccgactcc gtgaagggccggttcaccatctcccgggacaactccaagaacaccgt gtacctgcagatgaactccctgcggcccgaggacaccgccgtgtact actgcgccgctggcctgcagtacaacagagccgccgacagagtgcc tgtgggcgctgtgtactggggccagggcaccctggtgaccgtgtcctct ggcggcggaggatctggaggggaggaagcggcggaggaggatc tggcggcggaggaagtgggggcggagggagtggcggaggtggaa gtggtggaggggcagcgaggtgcagctgctggagagcggcggag gactggtgcagccaggcggatctctgcgcctgagctgcgccgccagc ggcagaacctttggcagcatccgcgtgggatggttcagacaggctcc cggaaagggacgcgagtttgtgtctgctatcaatcgcaatgatggcac cacatactatgctgatagcgtgaagggaagattcaccatcagccgcg acaatagcaagaatacagtgtatctgcagatgaatagcctgcgccca gaggatacagctgtgtattactgtgctgccggactgcagtataaccgg gctgccgatcgggtgcccgtgggagccgtgtattggggacagggaac actggtgacagtgtcctctggcggcggaggatctgggggtggcggat ctggcggcggaggaagcggtggcggaggatctggcggcggaggaa gcggaggggggaggatctggcggcggaggatctgaggtgcagctgct ggagtccggcggaggactggtgcagccaggcggcagcctgcggct gtcttgcgccgcttctggcagaacattcggctctatccgcgtgggctggt ttaggcaggctccaggcaagggacgcgagttcgtgagcgctatcaac agaaacgatggcacaacctattatgctgattctgtgaagggcaggttta caatcagcagggataattctaagaataccgtgtacctgcagatgaact	97

Nombre	Secuencia	ID:
	ctctgaggccagaggataccgctgtgtactattgcgctgccggcctgc agtataatagggccgctgaccgcgtgccagtgggcgccgtgtattgg ggccagggcaccctggtgacagtgtcctctggcggaggtggcagcg gcggtggcggatctggcggcggaggaagtgggggcggaggatctg gcggcggaggaagcggcggaggggatctggcggcggaggatctg aggtgcagctgctggagtctggcggaggactggtgcagcctggcgga agcctgagactgagctgtgctgcttctggccgcaccttcggaagcatc agagtgggatggtttcgccaggctccaggaaagggccgggagttcgt ctctgctatcaatagaaatgacggaacaacatattacgccgacagcgt gaagggacgctttacaatctctagggataacagcaagaacaccgtgt atctgcagatgaacagcctgcggcccgaggataccgccgtgtattatt gtgccgctggactgcagtacaatcgggccgctgatagagtgcctgtgg gagccgtgtactggggccagggcacactggtgacagtgtctagc	
11H6 hu (AA)	evqllesggglvqpggslrlscaasgtfdkINNMGwyrqapgkqrdl vaQITPGGITDYADSVKGrftisrdnskntlylqmnslrpedtav yycnaEILKRAYIDVYVNYwgqgtlvtvss	30
11H6 hu trímero (AA)	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGTFDKINNMG WYRQAPGKQRDLVAQITPGGITDYADSVKGRFTISR DNSKNTLYLQMNSLRPEDTAVYYCNAEILKRAYIDVY VNYWGQGTLVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSGGGG SGGGGSGGGGSGGGGSEVQLLESGGGLVQPGGSL RLSCAASGTFDKINNMGWYRQAPGKQRDLVAQITP GGITDYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRPED TAVYYCNAEILKRAYIDVYVNYWGQGTLVTVSSGGG GSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGS EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGTFDKINNMG WYRQAPGKQRDLVAQITPGGITDYADSVKGRFTISR DNSKNTLYLQMNSLRPEDTAVYYCNAEILKRAYIDVY VNYWGQGTLVTVSS	31

Nombre	Secuencia	ID:
11H6 hu tetrá-mero (AA)	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGTFDKINNMG WYRQAPGKQRDLVAQITPGGITDYADSVKGRFTISR DNSKNTLYLQMNSLRPEDTAVYYCNAEILKRAYIDVY VNYWGQGTLVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSGGGG SGGGGSGGGGSGGGGSEVQLLESGGGLVQPGGSL RLSCAASGTFDKINNMGWYRQAPGKQRDLVAQITP GGITDYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRPED TAVYYCNAEILKRAYIDVYVNYWGQGTLVTVSSGGG GSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGS EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGTFDKINNMG WYRQAPGKQRDLVAQITPGGITDYADSVKGRFTISR DNSKNTLYLQMNSLRPEDTAVYYCNAEILKRAYIDVY VNYWGQGTLVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSGGGG SGGGGSGGGGSGGGGSEVQLLESGGGLVQPGGSL RLSCAASGTFDKINNMGWYRQAPGKQRDLVAQITP GGITDYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRPED TAVYYCNAEILKRAYIDVYVNYWGQGTLVTVSS	32
11H6 hu pentá-mero (AA)	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGTFDKINNMG WYRQAPGKQRDLVAQITPGGITDYADSVKGRFTISR DNSKNTLYLQMNSLRPEDTAVYYCNAEILKRAYIDVY VNYWGQGTLVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSGGGG SGGGGSGGGGSGGGGSEVQLLESGGGLVQPGGSL RLSCAASGTFDKINNMGWYRQAPGKQRDLVAQITP GGITDYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRPED TAVYYCNAEILKRAYIDVYVNYWGQGTLVTVSSGGG GSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGS EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGTFDKINNMG WYRQAPGKQRDLVAQITPGGITDYADSVKGRFTISR DNSKNTLYLQMNSLRPEDTAVYYCNAEILKRAYIDVY VNYWGQGTLVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSGGGG SGGGGSGGGGSGGGGSEVQLLESGGGLVQPGGSL	33

Nombre	Secuencia	ID:
	RLSCAASGTFDKINNMGWYRQAPGKQRDLVAQITP GGITDYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRPED TAVYYCNAEILKRAYIDVYVNYWGQGTLVTVSSGGG GSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGS EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGTFDKINNMG WYRQAPGKQRDLVAQITPGGITDYADSVKGRFTISR DNSKNTLYLQMNSLRPEDTAVYYCNAEILKRAYIDVY VNYWGQGTLVTVSS	
11H6 hu monó-mero (NT)	gaggtgcagctgctggagtctggcggcggactggtgcagcctggcgg ctccctgagactgtcctgcgccgcctccggcaccttcgacaagatcaa caacatgggctggtacaggcaggcccctggcaagcagagggacct ggtggcccagatcacccctggcggcatcaccgactacgccgactccg tgaagggccggttcaccatctcccgggacaactccaagaacaccctg tacctgcagatgaactccctgcggcccgaggacaccgccgtgtacta ctgcaacgccgagatcctgaagcgggcctacatcgacgtgtacgtga actactggggccagggcaccctggtgaccgtgtcctct	98
11H6 hu tetrá-mero (NT)	gaggtgcagctgctggagtctggcggcggactggtgcagcctggcgg ctccctgagactgtcctgcgccgcctccggcaccttcgacaagatcaa caacatgggctggtacaggcaggcccctggcaagcagagggacct ggtggcccagatcacccctggcggcatcaccgactacgccgactccg tgaagggccggttcaccatctcccgggacaactccaagaacaccctg tacctgcagatgaactccctgcggcccgaggacaccgccgtgtacta ctgcaacgccgagatcctgaagcgggcctacatcgacgtgtacgtga actactggggccagggcaccctggtgaccgtgtcctctggcggcgga ggatctggaggggaggaagcggcggaggaggatctggcggcgg aggaagtgggggcggagggagtggcggaggtggaagtggtggagg gggcagcgaggtgcagctgctggagagcggcggaggactggtgca gccaggcggatctctgcgcctgagctgcgccgccagcggcacatttg ataagatcaataatatgggatggtatcgccaggctccaggcaagcag cgcgatctggtggctcagatcacaccaggcggaatcacagattatgc	99

Nombre	Secuencia	ID:
	cgatagcgtgaagggaagattcaccatcagccgcgacaatagcaag aatacactgtatctgcagatgaatagcctgcgcccagaggatacagct gtgtattactgtaatgctgagatcctgaagcgcgcttatatcgatgtgtat gtgaattattggggacagggaacactggtgacagtgtcctctggcggc ggaggatctgggggtggcggatctggcggcggaggaagcggtggc ggaggatctggcggcggaggaagcggaggggggaggatctggcggc ggaggatctgaggtgcagctgctggagtccggcggaggactggtgc agccaggcggcagcctgcggctgtcttgcgccgcttctggcaccttcg ataagatcaacaatatgggatggtacagacaggctcccggaaagca gcgggatctggtggcccagatcaccccaggcggcatcacagattacg ctgattctgtgaagggcaggtttacaatcagcagggataattctaaga ataccctgtacctgcagatgaactctctgaggccagaggataccgctg tgtactattgtaacgccgagatcctgaagagggcttacatcgatgtgta cgtgaattattggggccagggcaccctggtgacagtgtcctctggcgg aggtggcagcggcggtggcggatctggcggcggaggaagtggggg cggaggatctggcggcggaggaagcggcggaggggggatctggcgg cggaggatctgaggtgcagctgctggagtctggcggaggactggtgc agcctggcggaagcctgagactgagctgtgctgcttctggcaccttcg acaagatcaataatatgggctggtatagacaggccccaggaaagca gagggacctggtcgctcagatcacacccggcggaatcaccgactac gctgacagcgtgaagggacgctttacaatctctagggataacagcaa gaacaccctgtatctgcagatgaacagcctgcggcccgaggataccg ccgtgtattattgcaatgctgagatcctgaagagggcctatatcgacgt gtatgtgaattactggggccagggcacactggtgacagtgtcctct	

Tabla 4: Secuencias para CDRs y regiones de estructura, más combinaciones preferidas como se proporcionan para la fórmula I, es decir, FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4

Clon	FR1	ID	CDR1	ID	FR2	ID
7A12	evqlvesggglvqaggslrlscaas	34	NYAMG	41	wfrqapgkerefva	45

Clon	FR1	ID	CDR1	ID	FR2	ID
	grtfs					
4E6 hu	evqllesggglvqpggslrlscaasg rtfg	35	SIRVG	42	wfrqapgkgrefvs	46
4E6	evqlvesgggsvqagdslrlscaas grtfg	36	SIRVG	42	wfrqtpgkerefva	47
11H6 hu	evqllesggglvqpggslrlscaasg tfdk	37	INNMG	43	wyrqapgkqrdlva	48
11H6	evqlvesggglvqpggslrlscaas gtfdk	38	INNMG	43	wyrqapgkqrdlva	48
11D1	evqlvesggglvqpggslrlscaas gsids	39	INNMG	43	wyrqapgkqrelva	49
10F1	evqlvesggglvqpggslrlscaas gftfs	40	RYWMY	44	wvrqapgkglewvs	50

Tabla 4 (cont.)

Clon	CDR2	ID	FR3	ID
7A12	ALNWSGGSTYYVDSVKG	51	rftisrdnakntvylqmnslkpedtavy ycaa	56
4E6 hu	AINRNDGTTYYADSVKG	52	rftisrdnskntvylqmnslrpedtavy ycaa	57
4E6	AINRNDGTTYYADSVKG	52	rftisrdnakntvymqmaslkpedtav yycaa	58
11H6 hu	QITPGGITDYADSVKG	53	rftisrdnskntlylqmnslrpedtavyy cna	59
11H6	QITPGGITDYADSVKG	53	rftisrdnakdtmylqmnslkpedtav yfcna	60

Clon	CDR2	ID	FR3	ID
11D1	EITPRGRTNYADSEKS	54	rftisrdnakrtvnlqmnslkpedtavyycna	61
10F1	AINSGGGDTYYRDSVRG	55	rftisrdnfkntlylqmnslksedtavyycak	62

Tabla 4 (cont.)

Clon	CDR3	ID	FR4	ID
7A12	AGSFSLGGRPYGDDY	**63**	wgkgtlvtvss	**69**
4E6 hu	GLQYNRAADRVPVGAVY	**64**	wgqgtlvtvss	**70**
4E6	GLQYNRSADRVPVGAVY	**65**	wgqgtqvtvss	**71**
11H6 hu	EILKRAYIDVYVNY	**66**	wgqgtlvtvss	**70**
11H6	EILKRAYIDVYVNY	**66**	wgqgtqvtvss	**71**
11D1	EVRERGTSWYRPDY	**67**	wgqgtqvtvss	**71**
10F1	AEGPPTFSLIRTMTVDP	**68**	gaqgtqvtvss	**72**

Los aspectos adicionales de los agentes NB de la invención se proporcionan en seguida.

Los compuestos, los polipéptidos (monovalentes o multivalentes), y las composiciones descritas en la presente, pueden ser tales que se enlacen al DR5 pero que no se enlacen al sitio de TRAIL sobre el DR5, y/o pueden ser tales que no compitan con TRAIL para enlazarse al DR5. Estos compuestos y polipéptidos pueden ser tales que su enlace al DR5 induzca, desencadene, incremente, o mejore la señalización mediada por el DR5, y en particular desencadene o induzca la apoptosis en la célula en la que esté presente el DR5. Estos compuestos y polipéptidos también pueden ser tales que aumenten o mejoren la señalización que es mediada por TRAIL y el DR5 después de enlazar el TRAIL a su receptor. De acuerdo con este aspecto, el enlace tanto de TRAIL así

como de los compuestos/polipéptidos descritos en la presente al mismo receptor puede conducir a un efecto sinérgico sobre la señalización.

En un aspecto específico, los compuestos y polipéptidos descritos en la presente, son son compuestos y polipéptidos multiméricos (como se describen en la presente) dirigidos contra el DR5. En particular, los compuestos y polipéptidos descritos en la presente, pueden ser polipéptidos multiméricos que son capaces de multimerizar el DR5 sobre una membrana celular y, como tales, son capaces de inducir, desencadenar, incrementar o mejorar la señalización mediada por el DR5, y más particularmente, de desencadenar o inducir la apoptosis en la célula en la que esté presente el DR5. En una modalidad, los compuestos o polipéptidos monoméricos o multiméricos que se dan a conocer en la presente se pueden enlazar al DR5 en o cerca del sitio de enlace de TRAIL sobre el DR5, y/o pueden competir con TRAIL para enlazarse al DR5. En una modalidad, no se enlazan al sitio de enlace para TRAIL sobre el DR5, esencialmente no obstaculizan ni impiden el enlace de TRAIL al DR5, y/o no compiten con TRAIL para enlazarse al DR5, e inclusive pueden ser tales que aumenten o mejoren la señalización que es mediada por TRAIL y el DR5 después de enlazar el TRAIL a su receptor (lo cual puede dar nuevamente como resultado un efecto sinérgico después de la señalización mediada por el DR5). En una modalidad, la secuencia de aminoácidos contiene una porción derivada a partir del ligando TRAIL que se presenta naturalmente, es decir, comprende un segmento formado de un polipéptido de ligando TRAIL natural o cualquier fragmento de enlace del receptor de TRAIL de este ligando TRAIL.

Los polipéptidos y las composiciones de la presente invención se pueden utilizar para la prevención y el tratamiento de las enfermedades y los trastornos asociados con DR5. De una manera específica, “las enfermedades y los trastornos asociados con DR5” se definen como aquéllos que se pueden prevenir y/o tratar, respectivamente, mediante la administración adecuada a un sujeto

que lo necesite (es decir, que tenga la enfermedad o el trastorno o cuando menos un síntoma de los mismos, y/o que esté en riesgo de atraer o desarrollar la enfermedad o el trastorno) ya sea de un polipéptido o de una composición de la invención (y en particular, de una cantidad farmacéuticamente activa del mismo) y/o de un principio activo conocido con actividad contra el DR5 o una senda o mecanismo biológico en donde esté involucrado el DR5 (y en particular, de una cantidad farmacéuticamente activa del mismo), lo cual da como resultado la modulación, es decir, el agonismo o antagonismo, de la señalización mediada por el DR5. Como se enlistan más adelante, las enfermedades y los trastornos que se pueden tratar mediante la inducción de apoptosis en la célula o tejido dirigido en la enfermedad se incluyen particularmente en la presente como asociados con DR5.

Las enfermedades y los trastornos asociados con DR5 pueden ser en particular las enfermedades y los trastornos que se puedan tratar mediante el desencadenamiento, el inicio, el incremento, o la mejora de la señalización, de los mecanismos, de las respuestas, y de los efectos en donde esté involucrado el DR5 (en otras palabras, efectuando un efecto agonista sobre el DR5 o sobre la señalización mediada por el DR5). Más particularmente, las enfermedades y los trastornos asociados con DR5 pueden ser las enfermedades y los trastornos que se puedan tratar mediante el desencadenamiento, el inicio, el incremento, o la mejora de la apoptosis celular en una o más células o tejidos en el sujeto que se vaya a tratar.

En una modalidad, los agentes NB de la invención son los agonistas de los receptores DR5 de TRAIL, que tienen el potencial para utilizarse en terapia contra un gran número de enfermedades asociadas con DR5. Los ejemplos de las enfermedades y los trastornos asociados con DR5 estarán claros para la persona experta basándose en la divulgación de la presente. En una modalidad, los agentes NB de la invención tienen utilidad en el tratamiento de las enfermedades proliferativas, incluyendo, por ejemplo, cánceres, tales como tumores sólidos, cánceres primarios y metastásicos, tales

como carcinoma de células renales, y cánceres del pulmón (por ejemplo, cáncer pulmonar microcelular “SCLC” y cáncer pulmonar no microcelular “NSCLC”), páncreas, malignidad hematopoiética, glioma, astrocitoma, mesotelioma, cánceres colo-rectales, cáncer de próstata, osteosarcoma, melanoma, linfoma (incluyendo, pero no limitándose a, linfoma de Burkitt), cáncer de mama, cáncer endometrial, cáncer de hígado, cáncer gástrico, cáncer de piel, cáncer de ovario, y cánceres de células escamosas de cualquier origen (por ejemplo, pulmón, cabeza y cuello, mama, tiroides, cérvix, piel, esofágico, etc.), así como cánceres líquidos, por ejemplo, tales como leucemias, incluyendo en especial una leucemia de células-T, tal como leucemia de células-T aguda (T-ALL), leucemia de células-B aguda (B-ALL), leucemia mielógena crónica (CML), leucemia mielógena aguda (AML), mieloma de células de plasma, y mieloma múltiple (MM). En una modalidad, los agentes NB de la invención tienen utilidad en el tratamiento de indicaciones que no sean de cáncer, incluyendo, pero no limitándose a, por ejemplo, enfermedades inflamatorias y autoinmunes, tales como lupus eritematoso sistémico, enfermedad de Hashimoto, artritis reumatoide, enfermedad del injerto contra el huésped, síndrome de Sjogren, anemia perniciosa, enfermedad de Addison, esclerodermia, síndrome de Goodpasture, enfermedad de Crohn, anemia hemolítica autoinmune, esterilidad, miastenia grave, esclerosis múltiple, enfermedad de Basedow, trombocitopenia trombótica, trombocitopenia purpúrea, diabetes mellitus dependiente de insulina, alergia; asma, enfermedad atópica; arterioesclerosis; miocarditis; cardiomiopatía; nefritis glomerular; y anemia hipoplásica.

Por consiguiente, sin limitarse a lo mismo, las secuencias de aminoácidos y polipéptidos de la invención se pueden utilizar, por ejemplo, para prevenir y/o para tratar todas las enfermedades y los trastornos que actualmente se estén previniendo o tratando con los principios activos que pueden modular la señalización mediada por el DR5, tales como aquéllos mencionados en la presente, y las referencias citadas en la técnica. En una modalidad, los polipéptidos

de la invención se pueden utilizar para prevenir y/o para tratar todas las enfermedades y los trastornos para cuyo tratamiento se estén desarrollando actualmente, se hayan propuesto, o se propongan o se desarrollen en el futuro los principios activos. En una modalidad, se prevé que, debido a sus propiedades favorables como se describen adicionalmente en la presente, los polipéptidos de la presente se pueden utilizar para la prevención y el tratamiento de otras enfermedades y trastornos diferentes de aquéllos para los cuales se estén utilizando o se propongan o se desarrollen estos principios activos conocidos; y/o que los polipéptidos de la presente invención pueden proporcionar nuevos métodos y regímenes para el tratamiento de las enfermedades y los trastornos descritos en la presente.

Otras aplicaciones y usos de las secuencias de aminoácidos y polipéptidos de la invención llegarán a quedar más claros para la persona experta a partir de la divulgación adicional en la presente.

En una modalidad, la invención proporciona agentes farmacológicamente activos, así como composiciones que comprenden los mismos (ya sea que formen o no los polipéptidos como se describen en la presente, y/o fragmentos y/o variantes multiméricas de estos polipéptidos o fragmentos, todos los cuales son referidos ampliamente en la presente como las “composiciones de la invención”), que se pueden utilizar en el diagnóstico, la prevención y/o el tratamiento de las enfermedades y los trastornos asociados con el DR5 y de las enfermedades y los trastornos adicionales mencionados en la presente; y para proporcionar métodos para el diagnóstico, la prevención y/o el tratamiento de estas enfermedades y trastornos que involucran la administración y/o el uso de estos agentes y composiciones.

En una modalidad, la invención proporciona los agentes farmacológicamente activos, composiciones y/o métodos que tienen ciertas ventajas comparándose con los agentes, composiciones y/o métodos que se utilizan actualmente y/o que se conocen en la materia. Estas ventajas llegarán a quedar más claras a partir de la

siguiente descripción adicional.

En una modalidad, la invención proporciona secuencias de aminoácidos que se dirigen contra el DR5, en particular contra el DR5 a partir de un animal de sangre caliente, más particularmente, contra el DR5 a partir de un mamífero, y en especial contra el DR5 humano; y para proporcionar proteínas y polipéptidos, los cuales comprenden o esencialmente consisten en cuando menos una de estas secuencias de aminoácidos.

En una modalidad, la invención proporciona las secuencias de aminoácidos y las proteínas y/o polipéptidos que son adecuados para su uso profiláctico, terapéutico y/o de diagnóstico en un animal de sangre caliente, y en particular en un mamífero, y en especial en un ser humano.

En una modalidad, la invención proporciona las secuencias de aminoácidos y las proteínas y/o polipéptidos que se pueden utilizar para la prevención, el tratamiento, el alivio y/o el diagnóstico de una o más enfermedades, trastornos o condiciones asociadas con el DR5 y/o mediadas por el DR5 (tales como las enfermedades, los trastornos y las condiciones mencionadas en la presente) en un animal de sangre caliente, en particular en un mamífero, y más particularmente, en un ser humano.

En una modalidad, la invención proporciona las composiciones de la invención para utilizarse en la preparación de composiciones farmacéuticas o veterinarias para la prevención y/o el tratamiento de una o más enfermedades, trastornos o condiciones asociadas con, y/o mediadas por, el DR5 (tales como las enfermedades, los trastornos y las condiciones mencionadas en la presente) en un animal de sangre caliente, en particular en un mamífero, y más particularmente, en un ser humano.

En una modalidad, la invención proporciona las composiciones de la invención que se dirigen contra, y/o que se pueden enlazar específicamente al DR5; así como los compuestos y las construcciones, y en particular las proteínas y los polipéptidos, que comprenden cuando menos una de estas secuencias de aminoácidos.

De una manera más específica, la invención proporciona secuencias de aminoácidos que se pueden enlazar específicamente al receptor de superficie celular DR5, como se definen, por ejemplo, con el número de acceso “BAA33723” para encontrarse, por ejemplo, en la base de datos de proteínas NCBI. En particular, la invención proporciona secuencias de aminoácidos que se pueden enlazar específicamente al receptor de superficie celular DR5, como se definen, por ejemplo, con el número de acceso “BAA33723” para encontrarse, por ejemplo, en la base de datos de proteínas NCBI y que no se enlazan a cuando menos otro receptor de TRAIL, tal como TRAIL-R3 y TRAIL-R4. También se conoce una variante de empalme de forma corta del DR5 humano (GenBank entrada NP_671716).

En una modalidad, la invención proporciona secuencias de aminoácidos que se pueden enlazar al DR5 con una afinidad (de una manera adecuada medida y/o expresada como un valor K_D (real o aparente), un valor K_A (real o aparente), un índice $k_{activado}$ y/o un índice $k_{desactivado}$, o de una manera alternativa, como un valor IC_{50}, en el intervalo farmacéuticamente aceptable como se dispone en la presente; así como los compuestos y las construcciones, y en particular las proteínas y los polipéptidos, que comprenden cuando menos una de estas secuencias de aminoácidos.

En una modalidad, las composiciones de la invención son tales que:

a) se enlazan al DR5 con una constante de disociación (K_D) de 10^{-5} a 10^{-12} moles/litro o menos, y de preferencia de 10^{-7} a 10^{-12} moles/litro o menos, y de una manera muy preferible de 10^{-8} a 10^{-12} moles/litro (es decir, con una constante de disociación (K_A) de 10^5 a 10^{12} litros/moles o más, y de preferencia de 10^7 a 10^{12} litros/moles o más, y de una manera muy preferible de 10^8 a 10^{12} litros/moles); y/o

b) se enlazan al DR5 con un índice $k_{activado}$ de entre 10^2 $M^{-1}s^{-1}$ y aproximadamente 10^7 $M^{-1}s^{-1}$, de preferencia de entre 10^3 $M^{-1}s^{-1}$ y $^{1}0^7$ $M^{-1}s^{-1}$, más preferiblemente de entre 10^4 $M^{-1}s^{-1}$ y 10^7 $M^{-1}s^{-1}$, tal como de entre 10^5 $M^{-1}s^{-1}$ y 10^7 $M^{-1}s^{-1}$; y/o

c) se enlazan al DR5 con un índice $k_{desactivado}$ de entre $1s^{-1}$

($t_{1/2}$=0.69 s), y 10^{-6} s^{-1} (proporcionar un complejo casi irreversible con un $t_{1/2}$ de múltiples días), de preferencia de entre 10^{-2} s^{-1} y 10^{-6} s^{-1}, más preferiblemente de entre 10^{-3} s^{-1} y 10^{-6} s^{-1}, tal como de entre 10^{-4} s^{-1} y 10^{-6} s^{-1}.

En una modalidad, una composición de la invención, ya sea monovalente o multivalente, se enlaza al DR5 con una afinidad menor de 100 nM, y/o menor de 10 nM, y/o menor de 1 nM, tal como menor de 500 pM. En una modalidad, la composición de la invención es una composición tetravalente. En una modalidad, la composición de la invención es una composición pentavalente.

En una modalidad, una composición de la invención, ya sea monovalente o multivalente, inducirá específicamente la apoptosis en diferentes tipos de células de cáncer (por ejemplo, cuando menos un tipo) con una IC_{50} menor de 100 nM, de preferencia menor de 10 nM, más preferiblemente menor de 1 nM, tal como menor de 500 pM. En una modalidad, una secuencia de aminoácidos multivalente de la invención es cuando menos 10 veces más potente en una línea celular tumoral que en una línea celular normal (no tumoral), o cuando menos 100 veces más potente que en una línea celular normal (no tumoral), como se mide, por ejemplo, en las líneas celulares no tumorales mencionadas en la parte experimental, por ejemplo, Huvec, IMR-90 y ARPE-19. Véanse los Ejemplos y la Tabla 13.

Para enlazarse al DR5, una composición de la invención usualmente contendrá dentro de su secuencia de aminoácidos, uno o más residuos de aminoácidos, o uno o más estiramientos de residuos de aminoácidos (es decir, comprendiendo cada “estiramiento” dos o más residuos de aminoácidos que están adyacentes unos a otros o en estrecha proximidad unos a otros, es decir, en la estructura primaria (lineal) o terciaria (conformacional) de la secuencia de aminoácidos) mediante los cuales se puede enlazar la secuencia de aminoácidos de la invención al DR5, cuyos residuos de aminoácidos o estiramientos de residuos de aminoácidos, por consiguiente, forman el “sitio” para enlazarse al DR5 (también referido en la

presente como el “sitio de enlace de antígeno" o "epítopo”). En la presente se proporcionan experimentos de mapeo de epítopos, en los Ejemplos.

En una modalidad, las composiciones de la invención proporcionadas en la presente están en una forma esencialmente aislada, o forman parte de una proteína o polipéptido de la invención que puede comprender o que consiste esencialmente en una o más secuencias de aminoácidos dadas a conocer en la presente. En una modalidad, las composiciones de la invención pueden comprender además una o más secuencias de aminoácidos adicionales. En una modalidad, estas secuencias adicionales se enlazan por medio de uno o más enlazadores adicionales. Sin limitación, las composiciones de la invención se pueden utilizar como una unidad de enlace en una proteína o polipéptido. Las composiciones de la invención pueden contener una o más secuencias de aminoácidos adicionales que pueden servir como una unidad de enlace adicional (es decir, contra uno o más objetivos diferentes del DR5), como para proporcionar un polipéptido monovalente, multivalente, o multiespecífico de la invención, respectivamente. Esta proteína o polipéptido también puede estar en una forma esencialmente aislada.

En una modalidad, las composiciones de la invención consisten esencialmente en una sola cadena de aminoácidos que no se enlaza por medio de puentes de disulfuro a cualquier otra secuencia o cadena de aminoácidos (pero que pueden contener o no uno o más puentes de disulfuro intramoleculares) o una composición farmacéuticamente relevante. Como un ejemplo de un puente de disulfuro intramolecular, se sabe que las construcciones V_{HH} de camélido algunas veces pueden contener un puente de disulfuro entre CDR3 y CDR1 o FR2. En una modalidad, las composiciones de la invención pueden estar enlazado unas a otras y/o a otras secuencias de aminoácidos (por ejemplo, por medio de puentes de disulfuro), para proporcionar construcciones peptídicas alternativas (por ejemplo fragmentos Fab’, fragmentos $F(ab')_2$, construcciones ScFv, “diacuerpos” y otras construcciones multivalentes y/o

multiespecíficas. Véase la reseña por Holliger y Hudson, Nat Biotechnol. 2005 Sep; 23(9): 1126-36). Los ejemplos de las composiciones farmacéuticamente relevantes incluyen los fármacos que tratan una enfermedad, o las composiciones que aumentan la vida media, que se dirigen a tejidos específicos, y/o que aniquilan a la célula objetivo.

En una modalidad, las composiciones de la invención consisten esencialmente en una sola cadena de aminoácidos que se enlaza, por medio de cuando menos un puente de disulfuro intermolecular, a cualquier otra secuencia o cadena de aminoácidos (cualquiera de las cuales puede o no contener uno o más puentes de disulfuro intramoleculares), o una composición farmacéuticamente relevante.

En una modalidad, cuando una composición de la invención se pretende para su administración a un sujeto (por ejemplo, para propósitos terapéuticos y/o de diagnóstico, como se describen en la presente), es ya sea una secuencia de aminoácidos que no se presenta naturalmente en ese sujeto; o, cuando sí se presenta naturalmente en ese sujeto, está en una forma esencialmente aislada.

En una modalidad, para uso farmacéutico, las secuencias de aminoácidos que se dan a conocer en la invención (así como los compuestos, las construcciones, y los polipéptidos que las comprenden) se dirigen contra el DR5 humano. En una modalidad, para propósitos veterinarios, las composiciones que se dan a conocer se dirigen contra el DR5 a partir de la especie que se vaya a tratar. En una modalidad, para propósitos veterinarios, las composiciones que se dan a conocer reaccionan cruzadamente con el DR5 a partir de la especie que se vaya a tratar.

En una modalidad, una secuencia de aminoácidos de la invención tiene cuando menos un sitio de enlace para enlazarse contra el DR5, y puede contener uno o más sitios de enlace adicionales para enlazarse contra otros epítopos, antígenos, proteínas u objetivos.

La eficacia de las secuencias de aminoácidos y polipéptidos de

la invención, y de las composiciones que comprenden las mismas, se pueden probar utilizando cualquier ensayo *in vitro* adecuado, ensayo basado en células, ensayo *in vivo* y/o modelo animal conocido por sí mismo, o cualquier combinación de los mismos, dependiendo de la enfermedad o el trastorno específico involucrado. Éstos pueden ser, por ejemplo, ensayos o modelos para medir la influencia de las secuencias de aminoácidos o compuestos descritos en la presente sobre la apoptosis, sobre la proliferación de las células tumorales, y/o sobre el crecimiento de tumores en un modelo animal para dicho tumor. Los ensayos y modelos animales adecuados quedarán claros para la persona experta, y, por ejemplo, incluyen los ensayos y modelos animales utilizados en la parte experimental más adelante y en las referencias citadas en la técnica en la presente. Los ejemplos son ensayos de enlace, tales como ELISA, FACS o la metodología de resonancia de plasmón superficial; ensayos funcionales *in vitro*, tales como ensayo de sobrevivencia celular *in vitro* con un panel de líneas celulares tumorales y normales, ensayo de eficacia *in vitro* con detección de sobrevivencia de células Jurkat; ensayos funcionales in vivo, tales como estudio de una sola dosis in vivo combinado con una lectura de activación de caspasa 3/7, proporcionando diferentes datos de eficacia, farmacocinéticos (PK), y farmacodinámicos (PD).

En una modalidad, de acuerdo con la invención, las secuencias de aminoácidos y polipéptidos que se dirigen contra el DR5 a partir de una primera especie de animal de sangre caliente puede o no mostrar reactividad cruzada con el DR5 a partir de una o más especies diferentes de animal de sangre caliente. Por ejemplo, las secuencias de aminoácidos y polipéptidos dirigidos contra el DR5 humano pueden o no mostrar reactividad cruzada con el DR5 a partir de una o más especies diferentes de primates (tales como, sin limitación, monos a partir del género Macaco (tales como, y en particular, monos cinomolgos (*Macaca fascicularis*, conocido como “cino”) y/o monos Rhesus (*Macaca mulatta*)), y babuino (*Papio ursinus*)) y/o con el DR5 a partir de una o más especies de animales que se utilizan con frecuencia en modelos animales para

enfermedades (por ejemplo ratón, rata, conejo, cerdo o perro), y en particular, en modelos animales para las enfermedades y los trastornos asociados con el DR5 (tales como las especies y los modelos animales mencionados en la presente). En este aspecto, estará claro para la persona experta que la reactividad cruzada, cuando está presente, puede tener ventajas desde el punto de vista del desarrollo el fármaco, debido a que permite que se prueben las secuencias de aminoácidos y polipéptidos contra el DR5 humano en esos modelos de enfermedad. Diferentes construcciones de la invención proporcionadas en la presente muestran una reactividad cruzada específica con el DR5 de cinomolgo.

En una modalidad, las secuencias de aminoácidos y polipéptidos de la invención que reaccionan cruzadamente con el DR5 a partir de múltiples especies de mamíferos, usualmente serán convenientes para utilizarse en aplicaciones veterinarias, debido a que esto permitirá que se utilice la misma secuencia de aminoácidos o polipéptido a través de múltiples especies. Por consiguiente, en una modalidad, las secuencias de aminoácidos y polipéptidos dirigidos contra el DR5 a partir de una especie de animal (tales como las secuencias de aminoácidos y polipéptidos contra el DR5 humano) se pueden utilizar en el tratamiento de otra especie de animal, siempre que el uso de las secuencias de aminoácidos y/o polipéptidos proporcionen los efectos deseados en la especie que se vaya a tratar.

La presente invención, en su sentido más amplio, tampoco está particularmente limitada a, ni es definida por, un determinante antigénico específico, epítopo, parte, dominio, subunidad o confirmación (en donde sea aplicable) de DR5 contra el cual se dirijan las secuencias de aminoácidos y polipéptidos de la invención. Sin embargo, en una modalidad, las secuencias de aminoácidos y polipéptidos de la invención se dirigen contra el dominio extracelular del DR5. En un aspecto no limitante, las secuencias de aminoácidos y polipéptidos de la invención se dirigen contra el dominio de enlace del DR5, y son como se definen adicionalmente en la presente. En

una modalidad, una secuencia de aminoácidos monovalente o multivalente y los polipéptidos de la invención compiten con el ligando natural del DR5 en un ensayo de enlace competitivo, como se describe en la parte experimental. En una modalidad, una secuencia de aminoácidos monovalente o multivalente y los polipéptidos de la invención se enlazan sinérgicamente con el ligando natural del DR5 en un ensayo de enlace competitivo.

En una modalidad de la invención, en donde se aplicable, una secuencia de aminoácidos de la invención puede enlazarse a dos o más determinantes antigénicos, epítopos, partes, dominios, subunidades o confirmaciones del DR5. En este caso, los determinantes antigénicos, epítopos, partes, dominios o subunidades del DR5 a los que se enlazan las secuencias de aminoácidos y/o polipéptidos de la invención, pueden ser esencialmente los mismos (por ejemplo, si el DR5 contiene motivos estructurales repetidos o se presenta en una forma multimérica) o pueden ser diferentes (y en el último caso, las secuencias de aminoácidos y los polipéptidos de la invención se pueden enlazar a los diferentes determinantes antigénicos, epítopos, partes, dominios, subunidades del DR5 con una afinidad y/o especificidad que puede ser igual o diferente). También, por ejemplo, cuando el DR5 existe en una conformación activada y en una conformación inactiva, las secuencias de aminoácidos y los polipéptidos de la invención se pueden enlazar ya sea a una de estas confirmaciones, o bien se pueden enlazar a ambas confirmaciones (es decir, con una afinidad y/o especificidad que puede ser igual o diferente). También, por ejemplo, las secuencias de aminoácidos y los polipéptidos de la invención se pueden enlazar a una conformación del DR5 en donde se enlazan a un ligando pertinente, se pueden enlazar a una conformación del DR5 en donde no se enlazan a un ligando pertinente, o se pueden enlazar a ambas conformaciones (nuevamente con una afinidad y/o especificidad que puede ser igual o diferente).

También se espera que las secuencias de aminoácidos y los polipéptidos de la invención se enlazará en general a todos los

análogos que se presenten naturalmente o sintéticos, variantes, mutantes, alelos, partes y fragmentos del DR5; o cuando menos a los análogos, variantes, mutantes, alelos, partes y fragmentos del DR5 que contengan uno o más determinantes antigénicos o epítopos que sean esencialmente los mismos que los determinantes antigénicos o epítopos a los que se enlacen las secuencias de aminoácidos y los polipéptidos de la invención en el DR5 (por ejemplo, en el DR5 de tipo silvestre). Nuevamente, en este caso, las secuencias de aminoácidos y los polipéptidos de la invención se pueden enlazar a estos análogos, variantes, mutantes, alelos, partes y fragmentos con una afinidad y/o especificidad que es la misma que, o que es diferente de (es decir, más alta que, o más baja que), la afinidad y especificidad con que se enlazan las secuencias de aminoácidos de la invención al DR5 (de tipo silvestre). También se incluye dentro del alcance de la invención, que las secuencias de aminoácidos y los polipéptidos de la invención se enlazan a algunos análogos, variantes, mutantes, alelos, partes y fragmentos del DR5, pero no a otros.

En general, cuando el DR5 existe en una forma monomérica y en uno o más formas multiméricas, está dentro del alcance de la invención que las secuencias de aminoácidos y los polipéptidos de la invención solamente se enlazan al DR5 en una forma monomérica, solamente se enlazan al DR5 en una forma multimérica, o se enlazan tanto a la forma monomérica como a la forma multimérica. Nuevamente, en este caso, las secuencias de aminoácidos y los polipéptidos de la invención se pueden enlazar a la forma monomérica con una afinidad y/o especificidad que es igual que, o que es diferente de (es decir, más alta que, o más baja que), la afinidad y especificidad con que se enlazan las secuencias de aminoácidos de la invención a la forma multimérica.

También, cuando el DR5 puede asociarse con otras proteínas o polipéptidos para formar complejos de proteína (por ejemplo, con múltiples subunidades), está dentro del alcance de la invención que las secuencias de aminoácidos y los polipéptidos de la invención se

enlazan al DR5 en su estado no asociado, se enlazan al DR5 en su estado asociado, o se enlazan a ambos. En todos estos casos, las secuencias de aminoácidos y los polipéptidos de la invención se pueden enlazar a estos multímeros o complejos de proteína asociados con una afinidad y/o especificidad que puede ser la misma que, o diferente de (es decir, más alta que, o más baja que) la afinidad y/o especificidad con que las secuencias de aminoácidos y los polipéptidos de la invención se enlazan al DR5 en su estado monomérico y no asociado.

En una modalidad, como quedará claro para la persona experta, las composiciones de la invención que contienen dos o más secuencias de aminoácidos dirigidas contra el DR5 se pueden enlazar con una avidez más alta al DR5 que las secuencias de aminoácidos monoméricas correspondientes. Por ejemplo, y sin limitación, las proteínas o los polipéptidos que contienen dos, tres, cuatro, cinco, seis, ocho, diez o más unidades monoméricas operativamente enlazadas de secuencias de aminoácidos dirigidas contra los mismos o diferentes epítopos del DR5 se pueden enlazar (y usualmente se enlazarán) con una avidez más alta que cada uno de los diferentes monómeros, y las proteínas o los polipéptidos que contengan dos, tres, cuatro o más secuencias de aminoácidos dirigidas contra el DR5 se pueden enlazar (y usualmente se enlazarán) también con una avidez más alta a un multímero del DR5. En una modalidad, la composición de la invención es una sola cadena de polipéptido hecha de cuatro monómeros dirigidos contra el DR5 conectados por enlazadores de aminoácidos. En una modalidad, la composición de la invención es una sola cadena de polipéptido hecha de cinco monómeros dirigidos contra el DR5 conectados por enlazadores de aminoácidos.

En términos generales, las secuencias de aminoácidos y los polipéptidos de la invención se enlazarán cuando menos a las formas de DR5 (incluyendo las formas monoméricas, multiméricas y asociadas) que sean las más relevantes desde un punto de vista biológico y/o terapéutico, como quedará claro para la persona

experta.

Está dentro del alcance de la invención utilizar composiciones que comprendan partes, fragmentos, análogos, mutantes, variantes, alelos y/o derivados de las secuencias de aminoácidos y los polipéptidos de la invención, y/o utilizar proteínas o polipéptidos, los cuales comprendan o esencialmente consistan en una o más de estas composiciones siempre que éstas sean adecuadas para los usos previstos en la presente. En una modalidad, estas composiciones contendrán (cuando menos parte de) un sitio de enlace de antígeno funcional para enlazarse contra el DR5. En una modalidad, estas composiciones serán capaces de tener un enlace específico al DR5. En una modalidad, estas composiciones serán capaces de enlazarse al DR5 con una afinidad (de una manera adecuada medida y/o expresada como un valor K_D (real o aparente), un valor K_A (real o aparente), un índice $k_{activado}$ y/o un índice $k_{desactivado}$, o de una manera alternativa, como un valor IC_{50}, como se describe adicionalmente en la presente) que es como se dispone en la presente. Algunos ejemplos no limitantes de estas composiciones llegarán a quedar más claros a partir de la descripción adicional en la presente. Los fragmentos o polipéptidos adicionales de la invención también se pueden proporcionar mediante la combinación adecuada (es decir, mediante enlace o fusión genética) de una o más composiciones (más pequeñas) como se describen en la presente.

En un aspecto no limitante de la invención, los análogos, mutantes, variantes, alelos, y/o derivados de los polipéptidos de la invención tienen un aumento de su vida media en suero (como se describe adicionalmente en la presente) comparándose con la secuencia de aminoácidos a partir de la cual se han derivado. Por ejemplo, una secuencia de aminoácidos de la invención puede estar enlazada (químicamente o de otra manera) a uno o más grupos o fracciones que extiendan la vida media (tales como PEG), como para proporcionar un derivado de una secuencia de aminoácidos de la invención con una mayor vida media.

En un aspecto específico, pero no limitante, la secuencia de

aminoácidos de la invención puede ser una secuencia de aminoácidos que comprende un pliegue de inmunoglobulina, o puede ser una secuencia de aminoácidos que, bajo condiciones adecuadas (tales como condiciones fisiológicas) es capaz de formar un pliegue de inmunoglobulina (es decir, mediante plegado). Se hace referencia, entre otras cosas, a la reseña por Halaby y colaboradores, J. (1999) Protein Eng. 12, 563-71. En una modalidad, cuando se pliega apropiadamente como para formar un pliegue de inmunoglobulina, esta secuencia de aminoácidos es capaz de tener un enlace específico al DR5. En una modalidad adicional, esta construcción es capaz de enlazarse al DR5 con una afinidad (de una manera adecuada medida y/o expresada como un valor K_D (real o aparente), un valor K_A (real o aparente), un índice $k_{activado}$ y/o un índice $k_{desactivado}$, o de una manera alternativa, como un valor IC_{50}, como se describe adicionalmente en la presente) que es como se dispone en la presente. En una modalidad, las partes, fragmentos, análogos, mutantes, variantes, alelos y/o derivados de estas secuencias de aminoácidos son tales que comprenden un pliegue de inmunoglobulina o que son capaces de formar, bajo condiciones adecuadas, un pliegue de inmunoglobulina.

En particular, pero sin limitación, las secuencias de aminoácidos de la invención pueden ser secuencias de aminoácidos que consisten esencialmente en cuatro regiones de estructura (FR1, FR2, FR3 y FR4, respectivamente), y tres regiones determinantes de complementariedad intercaladas (CDR1, CDR2 y CDR3, respectivamente); o cualquier fragmento adecuado de esta secuencia de aminoácidos (la cual entonces usualmente contendrá cuando menos algunos de los residuos de aminoácidos que forman cuando menos una de las CDRs, como se describen adicionalmente en la presente). En una modalidad, estas regiones se configuran como se muestra en la fórmula I:

FR1 - CDR1 - FR2 - CDR2 - FR3 - CDR3 - FR4 (Fórmula I)

Las secuencias de aminoácidos de la invención pueden ser en particular una secuencia de inmunoglobulina o un fragmento

adecuado de la misma, y más particularmente, pueden ser una secuencia del dominio variable de inmunoglobulina o un fragmento adecuado de la misma, tal como una secuencia del dominio variable de la cadena ligera (por ejemplo, una secuencia V_L) o un fragmento adecuado de la misma; o una secuencia del dominio variable de la cadena pesada (por ejemplo, una secuencia V_H) o un fragmento adecuado de la misma. Cuando la secuencia de aminoácidos de la invención es una secuencia del dominio variable de la cadena pesada, puede ser una secuencia del dominio variable de la cadena pesada que se derive a partir de un anticuerpo de cuatro cadenas convencional (tal como, sin limitación, una secuencia V_H que se derive a partir de un anticuerpo humano) o puede ser una denominada como secuencia V_{HH} que se derive a partir de un denominado como “anticuerpo de cadena pesada”.

Se debe observar que la invención no está limitada con respecto al origen de la secuencia de aminoácidos de la invención (o de la secuencia de nucleótidos de la invención utilizada para expresarla), ni con respecto a la manera en que la secuencia de aminoácidos o la secuencia de nucleótidos de la invención se genere o se obtenga (o se haya generado u obtenido). Por consiguiente, las secuencias de aminoácidos de la invención pueden contener secuencias de aminoácidos que se presenten naturalmente (a partir de cualquier especie adecuada) o secuencias de aminoácidos sintéticas o semi-sintéticas. En un aspecto específico, pero no limitante, de la invención, la secuencia de aminoácidos es una secuencia de inmunoglobulina que se presenta naturalmente (a partir de cualquier especie adecuada) o una secuencia de inmunoglobulina sintética o semi-sintética, incluyendo, pero no limitándose a, “secuencias de inmunoglobulina "humanizadas" (por ejemplo, tales como secuencias de inmunoglobulina de ratón, conejo o mono, parcial o completamente humanizadas (o secuencias de inmunoglobulina de cualquier otra especie de mamífero contemplada por un experto en este campo), y en particular secuencias V_{HH} de camélido parcial o completamente humanizadas, o fragmentos de las

mismas), secuencias de inmunoglobulina "camelizadas", así como secuencias de inmunoglobulina que se hayan obtenido mediante técnicas tales como maduración de afinidad (por ejemplo, empezando a partir de secuencias de inmunoglobulina sintéticas, aleatorias, o que se presenten naturalmente), injerto de CDR, chapeado, combinación de fragmentos derivados a partir de diferentes secuencias de inmunoglobulina, ensamble mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR) utilizando cebadores traslapados, y técnicas similares para el diseño de secuencias de inmunoglobulina bien conocidas por la persona experta; o cualquier combinación adecuada de cualquiera de los anteriores. Se hace referencia, por ejemplo, a los libros de texto convencionales, así como a la descripción adicional y a las referencias de la técnica mencionadas en la presente.

De una manera similar, las secuencias de nucleótidos de la invención pueden ser secuencias de nucleótidos que se presenten naturalmente o secuencias sintéticas o semi-sintéticas, y, por ejemplo, pueden ser secuencias que se aíslen mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR) a partir de una plantilla que se presente naturalmente adecuada (por ejemplo, ADN o ARN aislado a partir de una célula), secuencias de nucleótidos que se hayan aislado a partir de una biblioteca (y en particular, una biblioteca de expresión), secuencias de nucleótidos que se hayan preparado mediante la introducción de mutaciones en una secuencia de nucleótidos que se presente naturalmente (empleando cualquier técnica adecuada conocida por sí misma, tal como reacción en cadena de la polimerasa (PCR) de mal emparejamiento), secuencias de nucleótidos que se hayan preparado mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR) utilizando cebadores traslapados, o secuencias de nucleótidos que se hayan preparado empleando técnicas para la síntesis de ADN conocidas por sí mismas.

La secuencia de aminoácidos de la invención puede ser en particular un anticuerpo de dominio (o una secuencia de aminoácidos que sea adecuada para utilizarse como un anticuerpo de dominio),

un anticuerpo de un solo dominio (o una secuencia de aminoácidos que sea adecuada para utilizarse como un anticuerpo de un solo dominio), un "dAb" (o una secuencia de aminoácidos que sea adecuada para utilizarse como un dAb), o un anticuerpo de camélido (e incluyendo, pero no limitándose a, una secuencia V_{HH} o las variantes de la misma); otros dominios variables individuales, o cualquier fragmento adecuado de cualquiera de los mismos. Para una descripción general de los anticuerpos de (un solo) dominio, también se hace referencia a las referencias de la técnica citadas anteriormente, así como a la Patente Europea Número EP 0 368 684. Para el término “dAbs”, se hace referencia, por ejemplo, a Ward y colaboradores (Nature, 12 de Octubre de 1989; 341 (6242): 544-6), a Holt y colaboradores, Trends Biotechnol., 2003, 21(11): 484-490; así como a, por ejemplo, la Publicación Internacional Número WO 06/030220, la Publicación Internacional Número WO 06/003388, y otras solicitudes de patente publicadas de Domantis Ltd. En una modalidad de la invención, los anticuerpos de un solo dominio o los dominios variables individuales se pueden derivar a partir de ciertas especies de tiburón (por ejemplo, los denominados como “dominios IgNAR”, véase, por ejemplo, la Publicación Internacional Número WO 05/18629).

En particular, la secuencia de aminoácidos de la invención puede ser una construcción de dominio variable de cadena pesada de camélido (por ejemplo, una V_{HH} o las variables de la misma, incluyendo las variables optimizadas para utilizarse como un producto terapéutico humano, por ejemplo, como se define, por ejemplo, en la Publicación Internacional Número WO 2008/020079) o un fragmento adecuado o una variante del mismo. En una modalidad, la secuencia de aminoácidos es un NANOBODY(R) (Nanocuerpo) o una construcción del mismo. Observe que NANOBODY MR, NANOBODIES MR Y NANOCLONE MR son marcas comerciales registradas de Ablynx N.V. Las construcciones de dominio variable de cadena pesada específicas dirigidas contra el DR5, ya sean o no "humanizadas", o alteradas u optimizadas de otra manera, serán

referidas en la presente como una “secuencia de NB” de la invención.

Como se utiliza en la presente, la frase "secuencia optimizada", o de una manera alternativa, las secuencias que son "alteradas u optimizadas", se definen para referirse al reemplazo de los residuos de un agente NB, en especial en la región de estructura, para reducir la presentación de una respuesta inmunogénica al agente NB por parte del sujeto al cual se administra. En el caso en donde el sujeto es un ser humano, la frase incluye cualquier técnica conocida en la materia para humanizar la secuencia.

En una modalidad, los agentes NB son los denominados como “clase V_H3” (es decir, una construcción de NB con un alto grado de homología de secuencia con las secuencias de la línea germinal humana de la clase V_H3, tales como DP-47, DP-51 o DP-29). En una modalidad, esta clase V_H3 de construcciones de NB comprenden las regiones de estructura de esta invención. Sin embargo, la invención en, su sentido más amplio, en términos generales cubre cualquier tipo de agentes NB dirigidos contra el DR5. Por ejemplo, en una modalidad, la invención también cubre las construcciones de NB pertenecientes a la denominada como “clase V_H4” (es decir, las construcciones de NB con un alto grado de homología de secuencia con las secuencias de la línea germinal humana de la clase V_H4, tales como DP-78). Véase, por ejemplo, la Publicación Internacional Número WO 07/118670.

En una modalidad, las construcciones de NB (en particular las construcciones completamente humanizadas y parcialmente humanizadas) se caracterizan por la presencia de uno o más “residuos Hallmark” en una o más de las secuencias de estructura. En una modalidad, las secuencias de estructura presentes en las construcciones de NB de la invención, pueden ser tales que la secuencia de aminoácidos es una variante de una construcción V_{HH} de camélido. Algunos ejemplos no limitantes (combinaciones adecuadas) de estas secuencias de estructura y los residuos Hallmark alternativos aparecen, por ejemplo, en la Publicación

Internacional Número WO 2008/020079, páginas 65 - 98, cuyas páginas se incorporan como referencia en su totalidad. También se contemplan otros residuos humanizados o parcialmente humanizados conocidos en la materia como abarcados dentro de la invención.

En términos generales, una construcción V_H o V_{HH} se puede definir como una secuencia de aminoácidos con la estructura (general) de la fórmula I, en donde FR1 a FR4 se refieren a las regiones de estructura 1 a 4, respectivamente, y en donde CDR1 a CDR3 se refieren a las regiones determinantes de complementariedad 1 a 3, respectivamente.

En una modalidad, una composición de la invención puede ser una construcción de NB con una secuencia de aminoácidos con la estructura (general) de la fórmula I, en donde uno o más de los residuos de aminoácidos en las posiciones 11, 37, 44, 45, 47, 83, 84, 103, 104 y 108 de acuerdo con la numeración de Kabat, se seleccionan a partir de los residuos Hallmark mencionados en la Tabla A-3 de la Publicación Internacional Número WO 2008/020079 y en donde esta secuencia de aminoácidos tiene cuando menos el 80 por ciento, el 85 por ciento, el 90 por ciento, el 95 por ciento, el 98 por ciento, el 99 por ciento ó el 100 por ciento de identidad de aminoácidos con cuando menos una de las secuencias de estructura de aminoácidos de las SEQ ID NOs: 1 a 22 de la Publicación Internacional Número WO 2008/020079, en donde, para los propósitos de determinar el grado de identidad de aminoácidos, no se consideran los residuos de aminoácidos que forman las secuencias de CDR (indicadas con X en las secuencias).

En los agentes NB de la invención, incluyendo, sin limitación los diferentes formatos o andamiajes, las secuencias de CDR son en términos generales como se proporcionan en las Tablas 1 a 3, y en especial como se designan específicamente mediante la SEQ ID NO en la Tabla 4. En particular, la CDR1 puede ser cualquiera de las SEQ ID NOs: 41 a 44; la CDR2 puede ser cualquiera de las SEQ ID NOs: 51 a 55; y la CDR3 puede ser cualquiera de las SEQ ID NOs: 63 a 68.

Por consiguiente, en una modalidad, la invención se refiere a las construcciones V_H que se pueden enlazar a, y/o se dirigen contra, el DR5, a los fragmentos adecuados de las mismas, así como a los polipéptidos que comprenden o que consisten esencialmente en una o más de estas construcciones V_H y/o fragmentos adecuados.

En general, las SEQ ID NOs: 1 - 22, 26 - 40, 87-88, y 103-104 proporcionan las secuencias de aminoácidos de un número de agentes NB que se han reproducido contra el DR5 (véanse las Tablea 1 a 4). Las SEQ ID NOs: 96-99 proporcionan secuencias de ácidos nucleicos específicas que codifican agentes NB específicos, como se dispone en la presente.

En algunas modalidades, las composiciones de la invención son agentes NB, por ejemplo, como se muestra en las Tablas 1 a 4, que se pueden enlazar a, y/o se dirigen contra, el DR5, y que tienen cuando menos el 90 por ciento de identidad de aminoácidos con cuando menos una de las secuencias de aminoácidos de las SEQ ID NOs: 1 - 22, 26 - 40, 87-88 y 103-104, en donde, para los propósitos de determinar el grado de identidad de aminoácidos, no se consideran los residuos de aminoácidos que forman las secuencias de CDR, y en donde uno o más de los residuos de aminoácidos en las posiciones 11, 37, 44, 45, 47, 83, 84, 103, 104 y 108 de acuerdo con la numeración de Kabat son residuos Hallmark.

En diferentes modalidades, y como se proporcionan en la Tabla 4, las construcciones de NB comprenden las secuencias de estructura 1 de las SEQ ID NOs: 34 a 40), las secuencias de estructura 2 de las SEQ ID NOs: 45 a 50, las secuencias de estructura 3 de las SEQ ID NOs: 56 a 62, y las secuencias de estructura 4 de las SEQ ID NOs: 69 a 72. En una modalidad, no se consideran los residuos de aminoácidos en las posiciones 1 a 4 y 27 a 30 de las secuencias de estructura 1 de las construcciones de NB de las SEQ ID NOs: 1 - 22, 26 - 40, 87-88 y 103-104, para determinar el grado de identidad de aminoácidos.

En una modalidad, los agentes NB de la invención y las composiciones se pueden derivar de cualquier manera adecuada y a

partir de cualquier fuente adecuada, y, por ejemplo, pueden ser secuencias V_{HH} que se presenten naturalmente (es decir, a partir de una especie adecuada de camélido) o secuencias de aminoácidos sintéticas o semi-sintéticas, incluyendo, pero no limitándose a, agentes NB "humanizados", secuencias de inmunoglobulina "camelizadas" (y en particular secuencias de dominio variable de cadena pesada camelizadas), así como agentes NB que se hayan obtenido mediante técnicas tales como maduración de afinidad (por ejemplo, empezando a partir de secuencias de inmunoglobulina sintéticas, aleatorias, o que se presenten naturalmente), injerto de CDR, chapeado, combinación de fragmentos derivados a partir de diferentes secuencias de inmunoglobulina, ensamble mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR) utilizando cebadores traslapados, y técnicas similares para el diseño de secuencias de inmunoglobulina bien conocidas por la persona experta; o cualquier combinación adecuada de cualquiera de los anteriores, como se describen adicionalmente en la presente. También, cuando una composición de la invención comprende una secuencia V_{HH}, esta composición se puede humanizar adecuadamente, como se describe en la presente, como para proporcionar una o más composiciones (parcialmente o completamente) humanizadas adicionales de la invención. En una modalidad, cuando una composición de la invención comprende una secuencia sintética o semi-sintética (tal como una secuencia parcialmente humanizada), esta composición opcionalmente se puede humanizar además adecuadamente, por ejemplo, de nuevo se puede humanizar parcial o completamente.

En una modalidad, las composiciones humanizadas son secuencias de aminoácidos que tienen cuando menos un residuo de aminoácido presente (y en particular, en cuando menos uno de los residuos de estructura) que es y/o que corresponde a una sustitución de humanización. En esta modalidad no limitante, las sustituciones de humanización (y las combinaciones adecuadas de las mismas) estarán claras para la persona experta basándose en la divulgación de la presente. En una modalidad, las sustituciones de humanización

potencialmente útiles se pueden aseverar mediante la comparación de la secuencia de las regiones de estructura de una secuencia V_{HH} que se presente naturalmente, con la secuencia de estructura correspondiente de una o más secuencias V_H humanas estrechamente relacionadas, después de lo cual, una o más de las sustituciones de humanización potencialmente útiles (o combinaciones de las mismas), determinadas de esta manera, se pueden introducir en la secuencia V_{HH} de cualquier manera conocida por sí misma. En una modalidad, las secuencias V_{HH} humanizadas resultantes se prueban para determinar su afinidad por el objetivo, su estabilidad, su facilidad y nivel de expresión, y/otras propiedades deseadas. De esta manera, por medio de un grado limitado de ensayo y error, la persona experta puede determinar otras sustituciones de humanización adecuadas (o combinaciones adecuadas de las mismas), basándose en la divulgación de la presente. También, basándose en lo anterior, (las regiones de estructura de) una composición de la invención puede ser parcialmente humanizada o completamente humanizada.

En una modalidad, las composiciones humanizadas de la presente son variantes humanizadas de las composiciones de las SEQ ID NOs: 1 - 22, 26 - 40, 87-88, y 103-104, y de las SEQ ID NOs: 96-99. En una modalidad, las construcciones de NB humanizadas son como se proporcionan en la Tabla 3.

Por consiguiente, algunas otras composiciones preferidas de la invención son las composiciones que se pueden enlazar a (como se definen adicionalmente en la presente) al DR5 y que: (a) son una variante humanizada de una de las secuencias de aminoácidos de las SEQ ID NOs: 1 - 22, 26 - 40, 87-88, y 103-104; y/o (b) tienen cuando menos el 90 por ciento de identidad de aminoácidos con cuando menos una de las secuencias de aminoácidos de las SEQ ID NOs: 1 - 22, 26 - 40, 87-88, y 103-104. En una modalidad, para los propósitos de determinar el grado de identidad de aminoácidos, no se consideran los residuos de aminoácidos que forman las secuencias de CDR.

En una modalidad, uno o más de los residuos de aminoácidos en las posiciones 11, 37, 44, 45, 47, 83, 84, 103, 104 y 108 de acuerdo con la numeración de Kabat, se seleccionan a partir de los residuos Hallmark mencionados en la Tabla A-3 de la Publicación Internacional Número WO 2008/020079.

En una modalidad, la invención proporciona un número de estiramientos de residuos de aminoácidos (es decir, péptidos pequeños) que son en particular adecuados para enlazarse al DR5. Estos estiramientos de residuos de aminoácidos pueden estar presentes en, y/o se pueden incorporar en, una secuencia de aminoácidos de la invención, en particular de tal manera que formen (parte de) el sitio de enlace de antígeno de una secuencia de aminoácidos de la invención. Debido a que estos estiramientos de residuos de aminoácidos se generan primero como secuencias de CDR de anticuerpos de cadena pesada o secuencias V_{HH} que se reproducen contra el DR5 (o se pueden basar en, y/o derivar a partir de estas secuencias de CDR, como se describen adicionalmente en la presente), también serán referidas en términos generales en la presente como “secuencias de CDR” (es decir, como secuencias de CDR1, secuencias de CDR2, y secuencias de CDR3, respectivamente). Sin embargo, se debe observar que la invención en su sentido más amplio no está limitada a un papel o función estructural específica que estos estiramientos de residuos de aminoácidos pueden tener en una secuencia de aminoácidos de la invención, siempre que estos estiramientos de residuos de aminoácidos permitan que la secuencia de aminoácidos de la invención se enlace al DR5. Por consiguiente, en términos generales, la invención, en su sentido más amplio, comprende cualquier secuencia de aminoácidos que sea capaz de enlazarse al DR5 y que comprenda una o más secuencias de CDR como se describen en la presente, y en particular una combinación adecuada de dos o más de estas secuencias de CDR, que adecuadamente se enlazan unas a otras por medio de una o más secuencias de aminoácidos adicionales, de tal manera que la secuencia de aminoácidos entera

forma un dominio de enlace y/o unidad de enlace que es capaz de enlazarse al DR5. Sin embargo, también se debe observar que la presencia de solamente una secuencia de CDR en una secuencia de aminoácidos de la invención puede por sí misma ser ya suficiente para proporcionar una secuencia de aminoácidos de la invención que sea capaz de enlazarse al DR5; por ejemplo, nuevamente se hace referencia a los denominados como “fragmentos expeditos” descritos en la Publicación Internacional Número WO 03/050531.

En una modalidad, la secuencia de aminoácidos de la invención puede ser una secuencia de aminoácidos que comprenda cuando menos una secuencia de aminoácidos que se selecciona a partir del grupo que consiste en las secuencias de CDR1, las secuencias de CDR2 y las secuencias de CDR3 que se describen en la presente (o cualquier combinación adecuada de las mismas). En particular, una secuencia de aminoácidos de la invención puede ser una secuencia de aminoácidos que comprenda cuando menos un sitio de enlace de antígeno, en donde este sitio de enlace de antígeno comprende cuando menos una secuencia de aminoácidos que se selecciona a partir del grupo que consiste en las secuencias de CDR1, las secuencias de CDR2 y las secuencias de CDR3 que se describen en la presente (o cualquier combinación adecuada de las mismas).

En una modalidad, la secuencia de aminoácidos de la invención puede ser cualquier secuencia de aminoácidos que comprenda cuando menos un estiramiento de los residuos de aminoácidos, en donde este estiramiento de los residuos de aminoácidos tiene una secuencia de aminoácidos que corresponde a la secuencia de cuando menos uno de las secuencias de CDR descritas en la presente. Esta secuencia de aminoácidos puede o no comprender un pliegue de inmunoglobulina. Por ejemplo, y sin limitación, esta secuencia de aminoácidos puede ser un fragmento adecuado de una secuencia de inmunoglobulina que comprenda cuando menos una secuencia de CDR, pero que no sea suficientemente grande para formar un pliegue de inmunoglobulina (completo) (por ejemplo, nuevamente se hace referencia a los “fragmentos expeditos”

descritos en la Publicación Internacional Número WO 03/050531). De una manera alternativa, esta secuencia de aminoácidos puede ser un "andamiaje de proteína" adecuado que comprenda cuando menos un estiramiento de los residuos de aminoácidos que correspondan a esa secuencia de CDR (es decir, como parte de su sitio de enlace de antígeno). Los andamiajes adecuados para presentar las secuencias de aminoácidos quedarán claros para la persona experta, y, por ejemplo, comprenden, sin limitación, los andamiajes de enlace que se basan en, o se derivan a partir de, inmunoglobulinas (es decir, diferentes de la secuencias de inmunoglobulina ya descritas en la presente), los andamiajes de proteína derivados a partir de los dominios de proteína A (por ejemplo, tales como AFFIBODIES^{MR}), tendamistato, fibronectina, incluyendo el dominio de fibronectina tipo III, lipocalina, CTLA-4, receptores de células-T, repeticiones de anquirina diseñados, avímeros y dominios PDZ (Binz y colaboradores, Nat. Biotech 2005, Volumen 23: 1257), y las fracciones de enlace que se basan en ADN o ARN, incluyendo, pero no limitándose a, aptámeros de ADN o ARN (Ulrich y colaboradores, Comb Chem. High Throughput Screen 2006 9(8): 619-32).

En una modalidad, cualquier secuencia de aminoácidos de la presente que comprenda una o más de estas secuencias de CDR, se puede enlazar específicamente al DR5. En una modalidad, puede enlazarse al DR5 con una afinidad (de una manera adecuada medida y/o expresada como un valor K_D (real o aparente), un valor K_A (real o aparente), un índice $k_{activado}$ y/o un índice $k_{desactivado}$, o de una manera alternativa, como un valor IC_{50}) como se dispone en la presente.

En una modalidad, una composición de la invención en la presente, puede ser cualquier secuencia de aminoácidos que comprenda cuando menos un sitio de enlace de antígeno, en donde este sitio de enlace de antígeno comprende cuando menos dos secuencias de aminoácidos que se seleccionan a partir del grupo que consiste en las secuencias de CDR1 descritas en la presente, las secuencias de CDR2 descritas en la presente, y las secuencias de CDR3 descritas en la presente, de tal manera que: (1) cuando la

primera secuencia de aminoácidos se selecciona a partir de las secuencias de CDR1 descritas en la presente, la segunda secuencia de aminoácidos se selecciona a partir de las secuencias de CDR2 descritas en la presente o las secuencias de CDR3 descritas en la presente; (2) cuando la primera secuencia de aminoácidos se selecciona a partir de las secuencias de CDR2 descritas en la presente, la segunda secuencia de aminoácidos se selecciona a partir de las secuencias de CDR1 descritas en la presente o las secuencias de CDR3 descritas en la presente; o (3) cuando la primera secuencia de aminoácidos se selecciona a partir de las secuencias de CDR3 descritas en la presente, la segunda secuencia de aminoácidos se selecciona a partir de las secuencias de CDR1 descritas en la presente o las secuencias de CDR3 descritas en la presente.

En una modalidad, una composición de la invención en la presente, puede ser de secuencias de aminoácidos que comprenden cuando menos un sitio de enlace de antígeno, en donde este sitio de enlace de antígeno comprende cuando menos tres secuencias de aminoácidos que se seleccionan a partir del grupo que consiste en las secuencias de CDR1 descritas en la presente, las secuencias de CDR2 descritas en la presente, y las secuencias de CDR3 descritas en la presente, de tal manera que la primera secuencia de aminoácidos se selecciona a partir de las secuencias de CDR1 descritas en la presente, la segunda secuencia de aminoácidos se selecciona a partir de las secuencias de CDR2 descritas en la presente, y la tercera secuencia de aminoácidos se selecciona a partir de las secuencias de CDR3 descritas en la presente. Las combinaciones preferidas de las secuencias de CDR1, CDR2 y CDR3 llegarán a quedar más claras a partir de la descripción adicional en la presente. Como quedará claro para la persona experta, esta secuencia de aminoácidos es de preferencia una secuencia de inmunoglobulina (como se describe adicionalmente en la presente), pero, por ejemplo, también puede ser cualquier otra secuencia de aminoácidos que comprenda un andamiaje adecuado para presentar

estas secuencias de CDR.

En una modalidad, una composición de la invención en la presente se refiere a una secuencia de aminoácidos dirigida contra el DR5, y en particular contra el DR5 como se proporciona en las bases de datos públicas, tales como, por ejemplo, base de datos de proteínas NCBI Número de Acceso BAA33723, en donde la secuencia de aminoácidos comprende uno o más estiramientos de residuos de aminoácidos seleccionados a partir del grupo que consiste en:

(a) las secuencias de aminoácidos de las SEQ ID NOs: 41 a 44;

(b) las secuencias de aminoácidos que tienen cuando menos el 90 por ciento de identidad de aminoácidos con cuando menos una de las secuencias de aminoácidos de las SEQ ID NOs: 41 a 44;

(c) las secuencias de aminoácidos que tienen 3, 2, o 1 diferencia de aminoácido con cuando menos una de las secuencias de aminoácidos de las SEQ ID NOs: 41 a 44;

(d) las secuencias de aminoácidos de las SEQ ID NOs: 51 a 55;

(e) las secuencias de aminoácidos que tienen cuando menos el 90 por ciento de identidad de aminoácidos con cuando menos una de las secuencias de aminoácidos de las SEQ ID NOs: 51 a 55;

(f) las secuencias de aminoácidos que tienen 3, 2, o 1 diferencia de aminoácido con cuando menos una de las secuencias de aminoácidos de las SEQ ID NOs: 51 a 55;

(g) las secuencias de aminoácidos de las SEQ ID NOs: 63 a 68;

(h) las secuencias de aminoácidos que tienen cuando menos el 90 por ciento de identidad de aminoácidos con cuando menos una de las secuencias de aminoácidos de las SEQ ID NOs: 63 a 68;

(i) las secuencias de aminoácidos que tienen 3, 2, o 1 diferencia de aminoácido con cuando menos una de las secuencias de aminoácidos de las SEQ ID NOs: 63 a 68;

o cualquier combinación adecuada de las mismas.

Cuando una secuencia de aminoácidos de la invención

contiene una o más secuencias de aminoácidos de acuerdo con b) y/o c):

(1) cualquier sustitución de aminoácido en esta secuencia de aminoácidos de acuerdo con b) y/o c) es de preferencia, y comparándose con la secuencia de aminoácidos correspondiente de acuerdo con a), una sustitución de aminoácido conservadora; y/o

(2) la secuencia de aminoácidos de acuerdo con b) y/o c) de preferencia contiene solamente sustituciones de aminoácidos, y no hay supresiones o inserciones de aminoácidos, comparándose con la secuencia de aminoácidos correspondiente de acuerdo con a); y/o

(3) la secuencia de aminoácidos de acuerdo con b) y/o c) puede ser una secuencia de aminoácidos que se derive a partir de una secuencia de aminoácidos de acuerdo con a) por medio de maduración de afinidad, utilizando una o más técnicas de maduración de afinidad conocidas por sí mismas.

De una manera similar, cuando una secuencia de aminoácidos de la invención contiene una o más secuencias de aminoácidos de acuerdo con e) y/o f):

(1) cualquier sustitución de aminoácido en esta secuencia de aminoácidos de acuerdo con e) y/o f) es de preferencia, y comparándose con la secuencia de aminoácidos correspondiente de acuerdo con d), una sustitución de aminoácido conservadora; y/o

(2) la secuencia de aminoácidos de acuerdo con e) y/o f) de preferencia contiene solamente sustituciones de aminoácidos, y no hay supresiones o inserciones de aminoácidos, comparándose con la secuencia de aminoácidos correspondiente de acuerdo con d); y/o

(3) la secuencia de aminoácidos de acuerdo con e) y/o f) puede ser una secuencia de aminoácidos que se derive a partir de una secuencia de aminoácidos de acuerdo con d) por medio de maduración de afinidad, utilizando una o más técnicas de maduración de afinidad conocidas por sí mismas.

También, de una manera similar, cuando una secuencia de aminoácidos de la invención contiene una o más secuencias de aminoácidos de acuerdo con h) y/o i):

(1) cualquier sustitución de aminoácido en esta secuencia de aminoácidos de acuerdo con h) y/o i) es de preferencia, y comparándose con la secuencia de aminoácidos correspondiente de acuerdo con g), una sustitución de aminoácido conservadora; y/o

(2) la secuencia de aminoácidos de acuerdo con h) y/o i) de preferencia contiene solamente sustituciones de aminoácidos, y no hay supresiones o inserciones de aminoácidos, comparándose con la secuencia de aminoácidos correspondiente de acuerdo con g); y/o

(3) la secuencia de aminoácidos de acuerdo con h) y/o i) puede ser una secuencia de aminoácidos que se derive a partir de una secuencia de aminoácidos de acuerdo con g) por medio de maduración de afinidad, utilizando una o más técnicas de maduración de afinidad conocidas por sí mismas.

Se debe entender que los últimos párrafos precedentes también se aplican en general a cualesquiera secuencias de aminoácidos de la invención que comprendan una o más secuencias de aminoácidos de acuerdo con a), b), c), d), e), f), g), h) o i), respectivamente.

En este aspecto específico, la secuencia de aminoácidos de preferencia comprende uno o más estiramientos de residuos de aminoácidos seleccionados a partir del grupo que consiste en:

(i) las secuencias de aminoácidos de las SEQ ID NOs: 41 a 44;

(ii) las secuencias de aminoácidos de las SEQ ID NOs: 51 a 55; y

(iii) las secuencias de aminoácidos de las SEQ ID NOs: 63 a 68;

o cualquier combinación adecuada de las mismas.

También, de preferencia, en esta secuencia de aminoácidos, cuando menos uno de los estiramientos de residuos de aminoácidos forma parte del sitio de enlace de antígeno para enlazarse contra el DR5.

En un aspecto no limitante, la invención se refiere a una secuencia de aminoácidos dirigida contra el DR5, la cual comprende

dos o más estiramientos de residuos de aminoácidos seleccionados a partir del grupo que consiste en:

a) las secuencias de aminoácidos de las SEQ ID NOs: 41 a 44;

b) las secuencias de aminoácidos que tienen cuando menos el 90 por ciento de identidad de aminoácidos con cuando menos una de las secuencias de aminoácidos de las SEQ ID NOs: 41 a 44;

c) las secuencias de aminoácidos que tienen 3, 2, o 1 diferencia de aminoácido con cuando menos una de las secuencias de aminoácidos de las SEQ ID NOs: 41 a 44;

d) las secuencias de aminoácidos de las SEQ ID NOs: 51 a 55;

e) las secuencias de aminoácidos que tienen cuando menos el 90 por ciento de identidad de aminoácidos con cuando menos una de las secuencias de aminoácidos de las SEQ ID NOs: 51 a 55;

f) las secuencias de aminoácidos que tienen 3, 2, o 1 diferencia de aminoácido con cuando menos una de las secuencias de aminoácidos de las SEQ ID NOs: 51 a 55;

g) las secuencias de aminoácidos de las SEQ ID NOs: 63 a 68;

h) las secuencias de aminoácidos que tienen cuando menos el 90 por ciento de identidad de aminoácidos con cuando menos una de las secuencias de aminoácidos de las SEQ ID NOs: 63 a 68;

i) las secuencias de aminoácidos que tienen 3, 2, o 1 diferencia de aminoácido con cuando menos una de las secuencias de aminoácidos de las SEQ ID NOs: 63 a 68;

de tal manera que (1) cuando el primer estiramiento de los residuos de aminoácidos corresponde a una de las secuencias de aminoácidos de acuerdo con a), b) o c), el segundo estiramiento de los residuos de aminoácidos corresponde a una de las secuencias de aminoácidos de acuerdo con d), e), f), g), h) o i); (2) cuando el primer estiramiento de los residuos de aminoácidos corresponde a una de las secuencias de aminoácidos de acuerdo con d), e) o f), el segundo estiramiento de los residuos de aminoácidos corresponde a

una de las secuencias de aminoácidos de acuerdo con a), b), c), g), h) o i); o (3) cuando el primer estiramiento de los residuos de aminoácidos corresponde a una de las secuencias de aminoácidos de acuerdo con g), h) o i), el segundo estiramiento de los residuos de aminoácidos corresponde a una de las secuencias de aminoácidos de acuerdo con a), b), c), d), e) o f).

En este aspecto específico, la secuencia de aminoácidos de preferencia comprende dos o más estiramientos de residuos de aminoácidos seleccionados a partir del grupo que consiste en:

(i) las secuencias de aminoácidos de las SEQ ID NOs: 41 a 44;

(ii) las secuencias de aminoácidos de las SEQ ID NOs: 51 a 55; y

(iii) las secuencias de aminoácidos de las SEQ ID NOs: 63 a 68;

de tal manera que, (1) cuando el primer estiramiento de los residuos de aminoácidos corresponde a una de las secuencias de aminoácidos de las SEQ ID NOs: 41 a 44, el segundo estiramiento de los residuos de aminoácidos corresponde a una de las secuencias de aminoácidos de las SEQ ID NOs: 51 a 55 o de las SEQ ID NOs: 63 a 68; (2) cuando el primer estiramiento de los residuos de aminoácidos corresponde a una de las secuencias de aminoácidos de las SEQ ID NOs: 51 a 55, el segundo estiramiento de los residuos de aminoácidos corresponde a una de las secuencias de aminoácidos de las SEQ ID NOs: 41 a 44 o de las SEQ ID NOs: 63 a 68; o (3) cuando el primer estiramiento de los residuos de aminoácidos corresponde a una de las secuencias de aminoácidos de las SEQ ID NOs: 63 a 68, el segundo estiramiento de los residuos de aminoácidos corresponde a una de las secuencias de aminoácidos de las SEQ ID NOs: 41 a 44 o de las SEQ ID NOs: 51 a 55.

También, en esta secuencia de aminoácidos, los cuando menos dos estiramientos de residuos de aminoácidos nuevamente de preferencia forman parte del sitio de enlace de antígeno para enlazarse contra el DR5.

En una modalidad, en particular en lo que se refiere a los párrafos anteriores, la invención se refiere a una secuencia de aminoácidos que comprende dos o más secuencias de aminoácidos de acuerdo con a), b), c), d), e), f), g), h) o i), respectivamente. En una modalidad, la secuencia de aminoácidos es una variante dimérica de un agente NBe. En una modalidad, los monómeros que comprenden el dímero se enlazan operativamente en un solo marco de lectura. En una modalidad, la secuencia enlazadora que une los monómeros es un multímero de la secuencia GGGGS (SEQ ID NO: 81) o GGGS (SEQ ID NO: 82), o una combinación de ambas, o se selecciona a partir de una secuencia enlazadora proporcionada en la presente como las SEQ ID NOs: 44, 45 ó 46, o como se conoce en la materia.

En una modalidad, en particular en lo que se refiere a los párrafos anteriores, la invención se refiere a una secuencia de aminoácidos, la cual comprende tres o más secuencias de aminoácidos de acuerdo con a), b), c), d), e), f), g), h) o i), respectivamente. En una modalidad, la secuencia de aminoácidos es una variante trimérica de un agente NBe. En una modalidad, los monómeros que comprenden el trímero se enlazan operativamente en un solo marco de lectura. En una modalidad, la secuencia enlazadora que une los monómeros es un multímero de la secuencia GGGGS (SEQ ID NO: 81) o GGGS (SEQ ID NO: 82), o una combinación de ambas, o se selecciona a partir de una secuencia enlazadora proporcionada en la presente como las SEQ ID NOs: 44, 45 ó 46, o como se conoce en la materia.

En una modalidad, en particular en lo que se refiere a los párrafos anteriores, la invención se refiere a una secuencia de aminoácidos, la cual comprende cuatro o más secuencias de aminoácidos de acuerdo con a), b), c), d), e), f), g), h) o i), respectivamente. En una modalidad, la secuencia de aminoácidos es una variante tetramérica de un agente NBe. En una modalidad, los monómeros que comprenden el tetrámero se enlazan operativamente en un solo marco de lectura. En una modalidad, la secuencia

enlazadora que une los monómeros es un multímero de la secuencia GGGGS (SEQ ID NO: 81) o GGGS (SEQ ID NO: 82), o una combinación de ambas, o se selecciona a partir de una secuencia enlazadora proporcionada en la presente como las SEQ ID NOs: 44, 45 ó 46, o como se conoce en la materia.

En una modalidad, en particular en lo que se refiere a los párrafos anteriores, la invención se refiere a una secuencia de aminoácidos, la cual comprende cinco o más secuencias de aminoácidos de acuerdo con a), b), c), d), e), f), g), h) o i), respectivamente. En una modalidad, la secuencia de aminoácidos es una variante pentamérica de un agente NBe. En una modalidad, los monómeros que comprenden el pentámero se enlazan operativamente en un solo marco de lectura. En una modalidad, la secuencia enlazadora que une los monómeros es un multímero de la secuencia GGGGS (SEQ ID NO: 81) o GGGS (SEQ ID NO: 82), o una combinación de ambas, o se selecciona a partir de una secuencia enlazadora proporcionada en la presente como las SEQ ID NOs: 44, 45 ó 46, o como se conoce en la materia.

En una modalidad, en particular en lo que se refiere a los párrafos anteriores, la invención se refiere a una secuencia de aminoácidos, la cual comprende seis o más secuencias de aminoácidos de acuerdo con a), b), c), d), e), f), g), h) o i), respectivamente. En una modalidad, la secuencia de aminoácidos es una variante hexamérica de un agente NBe. En una modalidad, los monómeros que comprenden el hexámero se enlazan operativamente en un solo marco de lectura. En una modalidad, la secuencia enlazadora que une los monómeros es un multímero de la secuencia GGGGS (SEQ ID NO: 81) o GGGS (SEQ ID NO: 82), o una combinación de ambas, o se selecciona a partir de una secuencia enlazadora proporcionada en la presente como las SEQ ID NOs: 44, 45 ó 46, o como se conoce en la materia.

En una modalidad, en particular en lo que se refiere a los párrafos anteriores, la invención se refiere a una secuencia de aminoácidos, la cual comprende dos, tres, cuatro, cinco seis, siete,

ocho, nueve, diez o más secuencias de aminoácidos de acuerdo con a), b), c), d), e), f), g), h) o i), respectivamente. En una modalidad, la secuencia de aminoácidos es una variante multimérica de un agente NBe. En una modalidad, los monómeros que comprenden el multímero se enlazan operativamente en un solo marco de lectura. En una modalidad, la secuencia enlazadora que une los monómeros se selecciona a partir de cuando menos una de las secuencias GGGGS (SEQ ID NO: 81) o GGGS (SEQ ID NO: 82), o una combinación de ambas, o se selecciona a partir de una secuencia enlazadora proporcionada en la presente como las SEQ ID NOs: 44, 45 ó 46, o como es conocido por un experto en este campo.

De preferencia, en estas secuencias de aminoácidos, las secuencias de CDR tienen cuando menos el 70 por ciento de identidad de aminoácidos, de preferencia cuando menos el 90 por ciento de identidad de aminoácidos, más preferiblemente cuando menos el 90 por ciento de identidad de aminoácidos, tal como cuando menos el 95 por ciento de identidad de aminoácidos o más, o incluso esencialmente el 100 por ciento de identidad de aminoácidos con las secuencias de CDR de cuando menos una de las secuencias de aminoácidos de las SEQ ID NOs: 1 - 22, 26 - 40, 87-88, y 103-104. Este grado de identidad de aminoácidos, por ejemplo, se puede determinar mediante la determinación del grado de identidad de aminoácidos (de una manera descrita en la presente) entre esta secuencia de aminoácidos y una o más de las secuencias de las SEQ ID NOs: 1 - 22, 26 - 40, 87-88, y 103-104, en donde no se consideran los residuos de aminoácidos que forman las regiones de estructura. También, tales secuencias de aminoácidos se pueden humanizar o modificar como se describe adicionalmente en la presente.

También, las secuencias de aminoácidos son de preferencia de tal manera que se pueden enlazar específicamente al DR5; y más particularmente, se enlazan al DR5 con una afinidad (de una manera adecuada medida y/o expresada como un valor K_D (real o aparente), un valor K_A (real o aparente), un índice $k_{activado}$ y/o un índice $k_{desactivado}$, o de una manera alternativa, como un valor IC_{50}, como se

describe adicionalmente en la presente) que es como se dispone en la presente.

En un aspecto no limitante, la invención se refiere a una secuencia de aminoácidos que esencialmente consiste en cuatro regiones de estructura (FR1 a FR4, respectivamente), y tres regiones determinantes de complementariedad (CDR1 a CDR3, respectivamente), en donde las secuencias de CDR de esta secuencia de aminoácidos tienen cuando menos el 70 por ciento de identidad de aminoácidos, de preferencia cuando menos el 90 por ciento de identidad de aminoácidos, más preferiblemente cuando menos el 90 por ciento de identidad de aminoácidos, tal como cuando menos el 95 por ciento de identidad de aminoácidos o más, cuando menos el 98 por ciento de identidad de aminoácidos o más, cuando menos el 99 por ciento de identidad de aminoácidos o más, o incluso esencialmente el 100 por ciento de identidad de aminoácidos con las secuencias de CDR de cuando menos una de las secuencias de aminoácidos de las SEQ ID NOs: 1 - 22, 26 - 40, 87-88, y 103-104. Este grado de identidad de aminoácidos, por ejemplo, se puede determinar mediante la determinación del grado de identidad de aminoácidos (de una manera descrita en la presente) entre esta secuencia de aminoácidos y una o más de las secuencias de las SEQ ID NOs: 1 - 22, 26 - 40, 87-88, y 103-104, en donde no se consideran los residuos de aminoácidos que forman las regiones de estructura. Tales secuencias de aminoácidos de la invención se pueden modificar adicionalmente como se describe en la presente.

En esta secuencia de aminoácidos de la invención, las secuencias de estructura puede ser cualesquiera secuencias de estructura adecuadas, y los ejemplos de las secuencias de estructura adecuadas quedarán claras para la persona experta, por ejemplo, con base en los libros de texto convencionales, y en la divulgación adicional y en las referencias de la técnica mencionadas en la presente.

Las secuencias de estructura son de preferencia (una combinación adecuada de) secuencias de estructura de

inmunoglobulina o secuencias de estructura que se hayan derivado a partir de secuencias de estructura de inmunoglobulina (por ejemplo, mediante humanización o camelización). Por ejemplo, las secuencias de estructura pueden ser secuencias de estructura derivadas a partir de un dominio variable de cadena ligera (por ejemplo, una secuencia V_L) y/o a partir de un dominio variable de cadena pesada (por ejemplo, una secuencia V_H). En un aspecto particularmente preferido, las secuencias de estructura son cualquiera de las secuencias de estructura que se hayan derivado a partir de una secuencia V_{HH} (en donde estas secuencias de estructura opcionalmente pueden haber sido parcial o completamente humanizadas) o son secuencias V_H convencionales que se han camelizado.

Las secuencias de estructura son de preferencia de tal manera que la secuencia de aminoácidos de la invención es un anticuerpo de dominio (o una secuencia de aminoácidos que sea adecuada para utilizarse como un anticuerpo de dominio); es un anticuerpo de un solo dominio (o una secuencia de aminoácidos que sea adecuada para utilizarse como un anticuerpo de un solo dominio); es un "dAb" (o una secuencia de aminoácidos que sea adecuada para utilizarse como un dAb); o es un agente NB (incluyendo, pero no limitándose a, las secuencias V_H y/o V_{HH}). Nuevamente, las secuencias de estructura adecuadas quedarán claras para la persona experta, por ejemplo, con base en los libros de texto convencionales, y en la divulgación adicional y en las referencias de la técnica mencionadas en la presente.

En una modalidad, como se describe en términos generales en la presente, para las secuencias de aminoácidos de la invención, es posible utilizar fragmentos adecuados (o combinaciones de fragmentos) de cualquiera de los anteriores, tales como fragmentos que contengan una o más secuencias de CDR, de una manera adecuada flanqueadas por, y/o enlazadas por medio de, una o más secuencias de estructura (por ejemplo, en el mismo orden en que se puedan presentar estas CDRs y secuencias de estructura en la

secuencia de inmunoglobulina de tamaño completo a partir de la cual se derivó el fragmento). Estos fragmentos también pueden ser nuevamente de tal manera que comprendan o puedan formar un pliegue de inmunoglobulina, o de una manera alternativa, pueden ser de tal manera que no comprendan o no puedan formar un pliegue de inmunoglobulina.

En un aspecto, este fragmento comprende una sola secuencia de CDR como se describe en la presente (y en particular una secuencia de CDR3), que está flanqueada en cada lado por (es parte de) una secuencia de estructura (y en particular, parte de las secuencias de estructura que, en la secuencia de inmunoglobulina a partir de la cual se deriva el fragmento, están adyacentes a dicha secuencia de CDR. Por ejemplo, una secuencia de CDR3 puede ser precedida por (parte de) una secuencia de FR3 y seguida por (parte de) una secuencia de FR4). Este fragmento también puede contener un puente de disulfuro, y en particular un puente de disulfuro que enlaza las dos regiones de estructura que preceden y siguen a la secuencia de CDR, respectivamente (para el propósito de formar este puente de disulfuro, se pueden utilizar los residuos de cisteína que se presentan naturalmente en esas regiones de estructura, o de una manera alternativa, los residuos de cisteína se pueden agregar sintéticamente a, o se pueden introducir en, esas regiones de estructura). En una modalidad, esta construcción es un fragmento Expedito. Para una descripción adicional de estos “fragmentos expeditos”, nuevamente se hace referencia a la Publicación Internacional Número WO 03/050531, así como a la Solicitud Provisional de Patente de los Estados Unidos de Norteamérica de Ablynx N.V. titulada como "Peptides able of binding to serum proteins" de Ablynx N.V. (inventores: Revets y colaboradores) presentada el 5 de Diciembre de 2006.

En un aspecto, la invención se refiere a un agente NB, y en particular, a una proteína o polipéptido que comprende o que consiste esencialmente en una o más secuencias de aminoácidos de la invención (o fragmentos adecuados de las mismas), y

opcionalmente comprende además uno o más grupos adicionales, residuos, fracciones o unidades de enlace. Como llegará a quedar más claro para la persona experta a partir de la divulgación adicional en la presente, los grupos adicionales, los residuos, las fracciones, las unidades de enlace, o las secuencias de aminoácidos pueden o no proporcionar una funcionalidad adicional a la secuencia de aminoácidos de la invención (y/o al compuesto o a la construcción en donde esté presente), y puede o no modificar las propiedades de la secuencia de aminoácidos de la invención.

Por ejemplo, los grupos adicionales, los residuos, las fracciones o las unidades de enlace, pueden ser una o más secuencias de aminoácidos adicionales, de tal manera que el compuesto o la construcción es una proteína (de fusión) o un polipéptido (de fusión). En un aspecto preferido pero no limitante, el uno o más grupos adicionales, los residuos, las fracciones, o las unidades de enlace, son secuencias de inmunoglobulina. Todavía más preferiblemente, el uno o más grupos adicionales, los residuos, las fracciones, o las unidades de enlace, se seleccionan a partir del grupo que consiste en los anticuerpos de dominio, las secuencias de aminoácidos que son adecuadas para utilizarse como un anticuerpo de dominio, los anticuerpos de un solo dominio, las secuencias de aminoácidos que son adecuadas para utilizarse como un anticuerpo de un solo dominio, los "dAbs", las secuencias de aminoácidos que son adecuadas para utilizarse como un dAb, o las construcciones V_{HH} de camélido.

En una modalidad, los grupos, los residuos, las fracciones o las unidades de enlace, por ejemplo, pueden ser grupos, residuos, o fracciones químicas, que pueden o no ser por sí mismos biológicamente y/o farmacológicamente activos. Por ejemplo, y sin limitación, estos grupos se pueden enlazar a la una o más secuencias de aminoácidos de la invención, como para proporcionar un "derivado" de una secuencia de aminoácidos o polipéptido de la invención, como se describe adicionalmente en la presente.

También dentro del alcance de la presente invención están

compuestos o construcciones, que comprendan o esencialmente consistan en uno o más derivados como se describe en la presente, y opcionalmente comprendan además uno o más grupos adicionales, residuos, fracciones o unidades de enlace, opcionalmente enlazado por medio de uno o más enlazadores. De preferencia, uno o más grupos adicionales, residuos, fracciones o unidades de enlace son secuencias de aminoácidos.

En los compuestos o construcciones descrito anteriormente, una o más secuencias de aminoácidos de la invención, y uno o más grupos, residuos, fracciones o unidades de enlace puede estar enlazados directamente unos a otros y/o por medio de uno o más enlazadores adicionales o espaciadores. Por ejemplo, cuando uno o más grupos, residuos, fracciones o unidades de enlace son secuencias de aminoácidos, los enlazadores también puede ser secuencias de aminoácidos, de tal manera que el compuesto o construcción resultante es una proteína de fusión o un polipéptido de fusión. Las secuencias de aminoácidos de los enlazadores puede ser como se dispone en la presente, o puede ser una conocida por la persona experta en la materia.

Los compuestos o polipéptidos de la invención se pueden preparar en términos generales mediante un método, el cual comprende cuando menos un paso de una manera adecuada enlazando una o más secuencias de aminoácidos de la invención a uno o más grupos, los residuos, fracciones o unidades de enlace adicionales, opcionalmente por medio de uno o más enlazadores adicionales, como para proporcionar el compuesto o polipéptido de la invención. Los polipéptidos de la invención también se pueden preparar mediante un método, el cual en términos generales comprende cuando menos los pasos de proporcionar un ácido nucleico que codifica un polipéptido de la invención, expresando el ácido nucleico en una manera adecuada, y recuperar el polipéptido expresado de la invención. Los métodos se puede llevar a cabo de una manera conocida por sí misma, la cual quedará clara para la persona experta, por ejemplo, en la base de los métodos y técnicas

descritos además en la presente.

El proceso de diseñar/seleccionar y/o preparar un compuesto o polipéptido de la invención, empezando a partir de una secuencia de aminoácidos de la invención, también se refiere en la presente como "formatear" esta secuencia de aminoácidos de la invención; y un aminoácido de la invención que se hace parte de un compuesto o polipéptido de la invención se dice que se "formatea" o se pone "en el formato de" el compuesto o polipéptido mencionado de la invención. Los ejemplos de las formas en donde una secuencia de aminoácidos de la invención puede ser formateada y los ejemplos de los formatos estarán claros para la persona experta basándose en la divulgación de la presente; y las secuencias formateadas de aminoácidos forman un aspecto adicional de la invención.

De acuerdo con un aspecto preferido, un compuesto de la invención es un polipéptido multivalente que contiene dos o más (de preferencia tres o más, cuatro o más, cinco o más, seis o más, ocho o más, y/o diez o más) secuencias de aminoácidos dirigidas contra el DR5 (por ejemplo, las secuencias de aminoácidos como se dispone en la presente), opcionalmente enlazado por medio de uno o más enlazadores adicionales (los cuales pueden ser como se describe adicionalmente en la presente) o por medio de una técnica de enlace cruzado o enlace covalente creado de una manera conocida para un experto en este campo. En una o más modalidades alternativas, el polipéptido multivalente contiene una subunidad opcional que se enlaza a un objetivo diferente de DR5.

En particular, un compuesto de la invención puede ser un polipéptido multivalente el cual es capaz de inducir, desencadenar, incrementar o mejorar la señalización mediada por el DR5, y más particularmente, de desencadenar o inducir la apoptosis en la célula en la que esté presente el DR5. En una modalidad, el polipéptido multivalente consiste en tres unidades de enlace de DR5 monoméricas que se enlazan operativamente, creando de esta manera un polipéptido trimérico. En una modalidad, el polipéptido multivalente consiste en cuatro unidades de enlace de DR5

monoméricas que se enlazan operativamente, creando de esta manera un polipéptido tetramérico. En una modalidad, el polipéptido multivalente consiste en cinco unidades de enlace de DR5 monoméricas que se enlazan operativamente, creando de esta manera un polipéptido pentamérico. En una modalidad, el polipéptido multivalente consiste en seis unidades de enlace de DR5 monoméricas que se enlazan operativamente, creando de esta manera a polipéptido hexamérico. En una modalidad, el polipéptido multivalente consiste en siete, ocho, nueve, diez o más unidades de enlace de DR5 monoméricas que se enlazan operativamente, creando de esta manera variantes adicionales de una proteína multimérica.

Como ya se mencionó en la presente, los polipéptidos multiméricas además pueden estar de tal manera que puedan enlazarse al sitio de enlace de TRAIL sobre el DR5, y/o de tal manera que puedan competir con TRAIL para enlazarse al DR5.

El polipéptido multivalente también pueden ser tal que no se enlaza al sitio de enlace para TRAIL sobre el DR5, y/o esencialmente no previene o inhibe el enlace de TRAIL al DR5, y/o no compite con TRAIL para enlazarse al DR5, y/o aún ser de tal manera que aumenten o mejoren la señalización que es mediada por TRAIL y el DR5 después de enlazar el TRAIL a su receptor (lo cual puede dar nuevamente como resultado un efecto sinérgico después de la señalización mediada por el DR5). En una modalidad, el polipéptido multivalente se enlaza al DR5 con una afinidad mayor a la de una composición monovalente.

En los polipéptidos multivalentes de la invención, las secuencias de aminoácidos de la invención que forma las unidades de enlace pueden ser cada uno dirigido contra el mismo epítopo sobre el DR5 receptor, por ejemplo, un epítopo del DR5, o contra epítopos diferentes sobre el DR5.

En un aspecto específico de la invención, un compuesto de la invención o un polipéptido de la invención puede tener un aumento de media vida, comparándose con la secuencia de aminoácidos

correspondiente de la invención. Algunos ejemplos no limitantes de estos compuestos y los polipéptidos llegarán a quedar más claros para la persona experta basándose en la divulgación adicional en la presente, y por ejemplo, comprenden secuencias de aminoácidos o polipéptidos de la invención que se han modificado químicamente para aumentar la vida media de las mismas (por ejemplo, por medio de pegilación); secuencias de aminoácidos de la invención que comprenden cuando menos un sitio de enlace adicional para enlazarse a una proteína de suero (tal como albúmina de suero); o polipéptidos de la invención que comprenden cuando menos una secuencia de aminoácidos de la invención que se enlaza a cuando menos un fracción (y en particular cuando menos una secuencia de aminoácidos) que incrementa la vida media de la secuencia de aminoácidos de la invención. Los ejemplos de polipéptidos de la invención que comprenden las fracciones o secuencias de aminoácidos que extienden la vida media llegarán a quedar más claros para la persona experta basándose en la divulgación adicional en la presente; y, por ejemplo, incluyen, sin limitación, polipéptidos en donde la una o más secuencias de aminoácidos de la invención son adecuadas enlazadas a uno o más proteínas de suero o fragmentos de las mismas (tal como (humano) albúmina de suero o fragmentos adecuados de los mismos) o a uno o más unidades de enlace que se pueden enlazar a proteínas de suero (tales como, por ejemplo, anticuerpos de dominio, las secuencias de aminoácidos que son adecuadas para utilizarse como un anticuerpo de dominio, los anticuerpos de un solo dominio, las secuencias de aminoácidos que son adecuadas para utilizarse como un anticuerpo de un solo dominio, (dAbs), las secuencias de aminoácidos que son adecuadas para utilizarse como un dAb, o NANOBODIES^{MR} que se pueden enlazar a proteínas de suero tal como albúmina de suero (tal como human albúmina de suero), inmunoglobulinas de suero tal como IgG, o transferrina; se hace referencia, a la descripción y referencias adicionales mencionadas en la presente); los polipéptidos en donde una secuencia de aminoácidos de la invención se enlaza en la

porción Fc (tal como una Fc humana) o una parte o fragmento adecuado de la misma; o los polipéptidos en donde la una o más secuencias de aminoácidos de la invención son adecuadas enlazado a uno o más proteínas o péptidos pequeños que se pueden enlazar a proteínas de suero (tales como, sin limitación, las proteínas y péptidos descritos en la Publicación Internacional Número WO 91/01743, Publicación Internacional Número WO 01/45746, Publicación Internacional Número WO 02/076489 y la Solicitud Provisional de Estados Unidos de Ablynx N.V. titulada *"Péptidos capaces de enlazarse a proteínas de suero "* de Ablynx N.V. presentada el 5 de diciembre de 2006.

En términos generales, los compuestos o polipéptidos de la invención con una mayor vida media de preferencia tienen una vida media que es cuando menos 1.5 veces, de preferencia cuando menos 2 veces, tal como cuando menos 5 veces, por ejemplo, cuando menos 10 veces o más de 20 veces, mayor que la vida media de la secuencia de aminoácidos correspondiente de la invención por sí misma. Por ejemplo, los compuestos o polipéptidos de la invención con una mayor vida media puede tener una vida media que se incrementa con más de 1 hora, de preferencia más de 2 horas, más preferiblemente más de 6 horas, tal como más de 12 horas, o aún más de 24, 48 ó 72 horas, comparándose con la secuencia de aminoácidos correspondiente de la invención por sí misma.

En un aspecto preferido, pero no limitante de la invención, estos compuestos o polipéptidos de la invención tienen una vida media de suero que se incrementa con más de 1 hora, de preferencia más de 2 horas, más preferiblemente más de 6 horas, tal como más de 12 horas, o aún más de 24, 48 ó 72 horas, comparándose con la secuencia de aminoácidos correspondiente de la invención por sí misma.

En otro aspecto preferido, pero no limitante de la invención, estos compuestos o polipéptidos de la invención exhiben una vida media de suero en humano de cuando menos aproximadamente 12 horas, de preferencia cuando menos 24 horas, más preferiblemente

cuando menos 48 horas, todavía más preferiblemente cuando menos 72 horas o más. Por ejemplo, los compuestos o polipéptidos de la invención puede tener una vida media de cuando menos 5 días (tal como aproximadamente 5 a 10 días), de preferencia cuando menos 9 días (tal como aproximadamente 9 a 14 días), más preferiblemente cuando menos aproximadamente 10 días (tal como aproximadamente 10 a 15 días), o cuando menos aproximadamente 11 días (tal como aproximadamente 11 a 16 días), más preferiblemente cuando menos aproximadamente 12 días (tal como aproximadamente 12 a 18 días o más), o más de 14 días (tal como aproximadamente 14 a 19 días).

En otro aspecto, la invención se refiere a un ácido nucleico que codifica una secuencia de aminoácidos de la invención o un polipéptido de la invención (o un fragmento adecuado de los mismos). También se referirá en la presente el ácido nucleico como un "*ácido nucleico de la invención*" y, por ejemplo, puede ser en forma de un construcción genético, por ejemplo, un fragmento de CDR o en un vector, como se describe adicionalmente en la presente. En una modalidad, las secuencias de ácido nucleico de la invención codifican las construcciones de NB de uno o más polipéptidos que se dan a conocer en una o más de las Tablas 1 a 4. En una modalidad, la secuencia de ácido nucleico de la invención codifica uno o más construcciones proporcionados en las SEQ ID NOs: 1-72, 81-82 y 87-92. En una modalidad, las secuencias de ácido nucleico de la invención son codón optimizado para la expresión en las células huésped u organismos huésped de interés. En una modalidad, la optimización del codón es para la expresión en una célula de mamífero. En una modalidad, la optimización del codón es para la expresión en una célula de levadura. En una modalidad, la optimización del codón es para la expresión en *E. coli*.

En otro aspecto, la invención se refiere a un huésped o célula huésped que expresa (o que bajo las circunstancias adecuadas es capaz de expresar) una secuencia de aminoácidos de la invención y/o un polipéptido de la invención; y/o que contiene un ácido nucleico de la invención. Algunos ejemplos preferidos pero no

limitantes de estos huéspedes o células huésped llegarán a quedar más claros a partir de la descripción adicional en la presente.

La invención se refiere además a un producto o una composición que contiene, o el cual comprende cuando menos una secuencia de aminoácidos de la invención, cuando menos un polipéptido de la invención (o un fragmento adecuado del mismo), cuando menos un compuesto de la invención y/o cuando menos un ácido nucleico de la invención, y opcionalmente uno o más componentes adicionales de estas composiciones conocidos por sí mismos, es decir, dependiendo del uso que se intente de la composición. Un producto o una composición, por ejemplo, pueden ser una composición farmacéutica (como se describe en la presente), una composición veterinaria o un producto o una composición para uso de diagnóstico (como también se describen en la presente). Algunos ejemplos no limitantes de los productos o composiciones se proporcionan en la presente.

En una modalidad, la invención se refiere al uso de un construcción de NB, o de una composición que comprenda el mismo, en los métodos o composiciones para modular DR5, ya sea *in vitro* (por ejemplo, en un ensayo *in vitro* o celular) o *in vivo* (por ejemplo, en una sola célula o en un organismo multicelular, y en particular en un mamífero, y más particularmente, en un ser humano, tal como en un ser humano que está en riesgo que sufre de una enfermedad y los trastornos asociados con el DR5).

La invención también se refiere a métodos para modular el DR5, ya sea *in vitro* (por ejemplo, en un ensayo *in vitro* o celular) o *in vivo* (por ejemplo, en una sola célula, o un organismo multicelular, y en particular en un mamífero, y más particularmente, en un ser humano, tal como en un ser humano que está en riesgo o que sufre de una enfermedades y los trastornos asociados con el DR5), cuyo método comprende cuando menos el paso de poner en contacto el DR5 con cuando menos una secuencia de aminoácidos, el construcción de NB de la invención, o con una composición que comprenda los mismos, en una manera y en una cantidad adecuadas

para modular el DR5, con cuando menos una secuencia de aminoácidos, construcción de NB de la invención.

La invención también se refiere al uso de una secuencia de aminoácido, construcción de NB de la invención en la preparación de una composición (tal como, sin limitación, una composición farmacéutica o preparación como se describe adicionalmente en la presente) para modular al DR5, ya sea *in vitro* (por ejemplo, en un ensayo *in vitro* o celular) o *in vivo* (por ejemplo, en una sola célula o en un organismo multicelular, y en particular en un mamífero, y más particularmente, en un ser humano, tal como en un ser humano que está en riesgo o que sufre de una enfermedades y los trastornos asociados con el DR5).

En el contexto de la presente invención, “modulando" o " modular” en términos generales significa cualquiera reducir o inhibir completamente la actividad de, o de una manera alternativa incrementar la actividad de, DR5, como se mide utilizando un ensayo adecuado *in vitro*, celular o *in vivo* (tal como aquéllos mencionados en la presente). En particular, “modulando" o "modular” puede significar cualquiera de reducir o inhibir completamente la actividad de, o de una manera alternativa la actividad de DR5, como se mide utilizando un ensayo adecuado *in vitro*, celular o *in vivo* (tal como aquéllos mencionados en la presente), por cuando menos el 1 por ciento, de preferencia por cuando menos el 5 por ciento, tal como por cuando menos el 10 por ciento o por cuando menos el 25 por ciento, por ejemplo, por cuando menos el 50 por ciento, por cuando menos el 60 por ciento, por cuando menos el 70 por ciento, por cuando menos el 80 por ciento, o por cuando menos el 90 por ciento o más, comparándose con la actividad del DR5 en los mismos ensayos bajo las mismas condiciones pero sin la presencia de la construcción de NB de la invención. En una modalidad principal, la actividad de DR5, en especial incluyendo la señalización mediada por el DR5, requiere la formación de un trímero del DR5 sobre la superficie celular. En una modalidad, una construcción de NB en la presente actúa para modular la actividad de DR5 mediante la

promoción de la formación del homotrímero de DR5 y por consiguiente incrementa la iniciación mediada por DR5 de la apoptosis, por ejemplo, por medio de la senda de muerte celular extrínseca.

Como quedarán claros para la persona experta, “modulación” también puede involucrar efectuar un cambio (el cual puede ser un aumento o una disminución) en afinidad, avidez, especificidad y/o selectividad del DR5 para uno o más de sus objetivos, ligandos o sustratos; y/o efectuar un cambio (el cual puede ser un aumento o una disminución) en la sensibilidad del DR5 para una o más condiciones en el medio o alrededores en donde el DR5 está presente (tal como pH, fuerza de iones, la presencia de co-factores, etc.), comparándose con las mismas condiciones pero sin la presencia de la secuencia de aminoácidos, construcción de NB de la invención. Como quedará claro para la persona experta, esto se puede volver a determinar de cualquier manera adecuada y/o utilizando cualquier ensayo adecuado conocido por sí mismo, tal como los ensayos descritos en la presente o las referencias citadas en la técnica en la presente.

“Modulación” también puede significar efectuar un cambio (es decir, una actividad como un agonista o como un antagonista, respectivamente) con respecto a uno o más mecanismos biológicos o fisiológicos, efectos, respuestas, funciones, vías, o actividades en donde el DR5 (o en donde su sustrato(s), ligando(s) o vía(s) están involucrados, tal como su vía señalizada o vía metabólica y sus efectos biológicos o fisiológicos asociados) están involucrados. Nuevamente, como quedará claro para la persona experta, una acción como un agonista o un antagonista se puede determinar de cualquier manera adecuada y/o utilizando cualquier ensayo adecuado (*in vitro* y usualmente celular o en ensayo) conocido por sí mismo, tales como los ensayos descritos en la presente o las referencias citadas en la técnica en la presente. En particular, una acción como un agonista o antagonista puede ser tal que se incremente o disminuya una actividad biológica o fisiológica destinada,

respectivamente, por cuando menos el 1 por ciento, de preferencia por cuando menos el 5 por ciento, tal como por cuando menos el 10 por ciento o por cuando menos el 25 por ciento, por ejemplo, por cuando menos el 50 por ciento, por cuando menos el 60 por ciento, por cuando menos el 70 por ciento, por cuando menos el 80 por ciento, o por cuando menos el 90 por ciento o más, comparándose con la actividad biológica o fisiológica en el mismo ensayo bajo las mismas condiciones pero sin la presencia de la construcción de NB de la invención.

Modular, por ejemplo, puede involucrar reducir o inhibir el enlace de DR5 a uno de sus sustratos o ligandos y/o compitiendo con un ligando natural, sustrato para enlazarse al DR5. Modular también puede involucrar activar el DR5 ó el mecanismo o vía en donde esté involucrado. Modular puede ser reversible o irreversible, pero para los propósitos farmacéuticos y farmacológicos normalmente será en una manera reversible.

La invención se refiere además a métodos para la preparación o generación de las secuencias de aminoácidos, polipéptidos, ácidos nucleicos, células huésped, productos y las composiciones descritas en la presente. Algunos ejemplos preferidos, pero no limitantes de los métodos llegarán a quedar más claros a partir de la descripción adicional en la presente.

En términos generales, estos métodos puede comprender los pasos de:

a) proporcionar un conjunto, colección o biblioteca de las, secuencias de aminoácidos;

b) detectar el conjunto colección o biblioteca de las secuencias de aminoácidos para las secuencias de aminoácidos que se pueden enlazar a y/o tienen afinidad para el DR5; y

c) aislar la secuencia de aminoácidos(s) que se enlazan a y/o que tienen afinidad para el DR5.

En este método, el conjunto, colección o biblioteca de las secuencias de aminoácidos puede ser cualquier conjunto, colección o biblioteca adecuada de las secuencias de aminoácidos. Por

ejemplo, el conjunto, colección o biblioteca de las secuencias de aminoácidos puede ser un conjunto, colección o biblioteca de las secuencias de inmunoglobulina (como se describe en la presente), tal como un conjunto, colección o biblioteca limpia de las secuencias de inmunoglobulina; un conjunto, colección o biblioteca sintética o semi-sintética de las secuencias de inmunoglobulina; y/o un conjunto, colección o biblioteca de las secuencias de inmunoglobulina que se han sometido a la maduración de afinidad.

También, en este método, el conjunto, colección o biblioteca de las secuencias de aminoácidos puede ser un conjunto, colección o biblioteca de los dominios variables de cadena pesada (tales como los dominios V_H o los dominios V_{HH}) o de los dominios variables de cadena ligera. Por ejemplo, el conjunto, colección o biblioteca de las secuencias de aminoácidos puede ser un conjunto, colección o biblioteca de los anticuerpos de dominio o los anticuerpos de un solo dominio, o puede ser un conjunto, colección o biblioteca de las secuencias de aminoácidos que son capaces de funcionar como un anticuerpo de dominio o anticuerpo de dominio individual.

En un aspecto preferido de este método, el conjunto, colección o biblioteca de las secuencias de aminoácidos puede ser un conjunto, colección o biblioteca inmune de las secuencias de inmunoglobulina, por ejemplo, derivado a partir de un mamífero que se ha inmunizado de una manera adecuada con el DR5 o con un determinado antigénico adecuado basado en el mismo o un derivado del mismo, tal como una parte, fragmento, región, dominio, lazo, u otro epítopo del mismo antigénico. En un aspecto particular, el determinante antigénico puede ser una parte, región, dominio, lazo extracelular, u otros epítopos extracelulares.

En los métodos anteriores, el conjunto, colección o biblioteca de las secuencias de aminoácidos se puede desplegar en un fago, fagémido, ribosoma, o micro-organismo adecuado (tal como levadura), tal como con el objeto de facilitar la detección. Los métodos, técnicas y organismos huéspedes adecuados para desplegar y detectar (un conjunto, colección o biblioteca de) las

secuencias de aminoácidos será claro para la persona experta en la materia, por ejemplo, con base en la divulgación adicional en la presente. También se hace referencia a la reseña por Hoogenboom en *Nature Biotechnology*, 23(9): 1105-1116 (2005).

En otro aspecto, el método para generar secuencias de aminoácidos comprende cuando menos los pasos de:

a) proporcionar una colección o muestra de las células que expresan secuencias de aminoácidos;

b) detectar la colección o muestras de las células para las células que expresan una secuencia de aminoácidos que se pueda enlazar a, y/o que tenga afinidad para el DR5; y

c) cualquiera de (1) aislar la secuencia de aminoácidos; o (2) aislar a partir de la célula, una secuencia de ácido nucleico que codifique la secuencia de aminoácidos, seguida por expresar la secuencia de aminoácidos.

Por ejemplo, cuando la secuencia de aminoácidos deseada es una secuencia de inmunoglobulina, la colección o muestra de las células, por ejemplo, pueden ser una colección o muestra de células-B. También, en este método, la muestra de las células se pueden derivar a partir de un mamífero que se ha inmunizado de una manera adecuada con el DR5 o con un determinante antigénico adecuado basado en lo mismo o derivado del mismo, tal como una parte, fragmento, región, dominio, lazo antigénico, u otro epítopo de los mismos. En un aspecto particular, el determinante antigénico puede ser una parte, región, domino, lazo extracelular, u otros epítopos extracelulares.

El método anterior se puede llevar a cabo de cualquier manera adecuada, como quedará claro para la persona experta. Se hace referencia, por ejemplo, a la Patente Europea Número EP 0 542 810, y a las Publicaciones Internacionales Números WO 05/19824, WO 04/051268 y WO 04/106377. La detección del paso b) de preferencia se realiza utilizando una técnica de citometría de flujo, tal como FACS. Para esto, se hace referencia, por ejemplo, a Lieby y colaboradores, *Blood*, 97(12), 3820 (2001).

En otro aspecto, el método para generar una secuencia de aminoácidos dirigida contra el DR5 puede comprender cuando menos los pasos de:

a) proporcionar un conjunto, colección o biblioteca de secuencias de ácidos nucleicos que codifique secuencias de aminoácidos;

b) rastrear el conjunto, colección o biblioteca de secuencias de ácidos nucleicos para determinar las secuencias de ácidos nucleicos que codifiquen una secuencia de aminoácidos que se pueda enlazar a, y/o que tenga afinidad por el DR5; y

c) aislar la secuencia de ácido nucleico mencionada, seguido por la expresión de esta secuencia de aminoácidos.

En este método, el conjunto, la colección o la biblioteca de secuencias de ácidos nucleicos que codifican secuencias de aminoácidos, por ejemplo, puede ser un conjunto, colección o biblioteca de secuencias de ácidos nucleicos que codifiquen un conjunto, colección o biblioteca limpia de las secuencias de inmunoglobulina; un conjunto, colección o biblioteca de secuencias de ácidos nucleicos que codifican un conjunto, colección o biblioteca sintética o semi-sintética de las secuencias de inmunoglobulina; y/o un conjunto, colección o biblioteca de secuencias de ácidos nucleicos que codifican un conjunto, colección o biblioteca de las secuencias de inmunoglobulina que se han sometido a maduración de afinidad.

También, en este método, el conjunto, la colección o la biblioteca de las secuencias de ácidos nucleicos puede codificar un conjunto, colección o biblioteca de dominios variables de cadena pesada (tales como los dominios V_H o los dominios V_{HH}) o de dominios variables de cadena ligera. En un ejemplo, el conjunto, la colección o la biblioteca de las secuencias de ácidos nucleicos codifica un conjunto, colección o biblioteca de anticuerpos de dominio o de anticuerpos de un solo dominio, o un conjunto, colección o biblioteca de las secuencias de aminoácidos que son capaces de funcionar como un anticuerpo de dominio o un anticuerpo

de un solo dominio.

En un aspecto de este método, el conjunto, colección o biblioteca de las secuencias de aminoácidos puede ser un conjunto, colección o biblioteca inmunitaria de las secuencias de ácidos nucleicos, por ejemplo, derivadas a partir de un mamífero que se haya inmunizado adecuadamente con el DR5 o con un determinante antigénico adecuado basado en el mismo o derivado del mismo, tal como una parte, fragmento, región, dominio, lazo antigénico u otro epítopo de los mismos. En un aspecto particular, el determinante antigénico puede ser una parte, región, domino, lazo extracelular, u otros epítopos extracelulares.

El conjunto, la colección o la biblioteca de las secuencias de ácidos nucleicos por ejemplo, puede codificar un conjunto, colección o biblioteca inmunitaria de dominios variables de cadena pesada o de dominios variables de cadena ligera. En un aspecto específico, el conjunto, colección o biblioteca de las secuencias de nucleótidos puede codificar un conjunto, colección o biblioteca de secuencias V_{HH}.

En los métodos anteriores, el conjunto, colección o biblioteca de las secuencias de nucleótidos se puede exhibir sobre un fago, fagémido, ribosoma, o microorganismo adecuado (tal como levadura), tal como con el objeto de facilitar el rastreo. Los métodos, técnicas y organismos huésped adecuados para exhibir y rastrear (un conjunto, colección o biblioteca de) secuencias de nucleótidos que codifiquen secuencias de aminoácidos estarán claros para la persona experta en este campo, por ejemplo, con base en la divulgación adicional en la presente. También se hace referencia a la reseña por Hoogenboom en Nature Biotechnology, 23(9): 1105-1116 (2005).

La invención también se refiere a las secuencias de aminoácidos que se obtienen mediante los métodos anteriores, o de una manera alternativa, mediante un método que comprenda uno de los métodos anteriores, y en adición, cuando menos los pasos de determinar la secuencia de nucleótidos o la secuencia de aminoácidos de la secuencia de inmunoglobulina; y de expresar o

sintetizar esta secuencia de aminoácidos de una manera conocida, tal como mediante la expresión en una célula huésped o un organismo huésped adecuado o mediante síntesis química.

También, siguiendo los pasos anteriores, una o más secuencias de aminoácidos de la invención se pueden humanizar adecuadamente (o de una manera alternativa, se pueden camelizar); y/o las secuencias de aminoácidos obtenidas de esta manera se pueden enlazar unas a otras o a una o más secuencias de aminoácidos adecuadas diferentes (opcionalmente por medio de uno o más enlazadores adicionales), como para proporcionar un polipéptido de la invención. También, una secuencia de ácido nucleico que codifique una secuencia de aminoácidos de la invención se puede humanizar adecuadamente (o de una manera alternativa, se puede camelizar), y de una manera adecuada se puede expresar; y/o una o más secuencias de ácidos nucleicos que codifiquen una secuencia de aminoácidos de la invención, se pueden enlazar unas a otras o a una o más secuencias de ácidos nucleicos que codifiquen otras secuencias de aminoácidos adecuadas (opcionalmente por medio de secuencias de nucleótidos que codifiquen uno o más enlazadores adicionales), después de lo cual, la secuencia de nucleótidos obtenida de esta manera se puede expresar adecuadamente como para proporcionar un polipéptido de la invención.

La invención se refiere además a las aplicaciones y usos de las secuencias de aminoácidos, los compuestos, las construcciones, polipéptidos, ácidos nucleicos, células huésped, productos y las composiciones descritas en la presente, así como a los métodos para la prevención y/o el tratamiento de las enfermedades y los trastornos asociados con el DR5. Algunas aplicaciones y usos no limitantes preferidos llegarán a quedar más claros a partir de la descripción adicional en la presente.

En una modalidad, la invención se refiere a las secuencias de aminoácidos, los compuestos, las construcciones, polipéptidos, ácidos nucleicos, células huésped, productos y las composiciones

descritas en la presente, para utilizarse en la terapia de una enfermedad o trastorno.

En una modalidad, la invención se refiere a una o más de las secuencias de aminoácidos, los compuestos, las construcciones, polipéptidos, ácidos nucleicos, células huésped, productos y las composiciones descritas en la presente, para utilizarse en la terapia de un sujeto en riesgo de, o que padezca de, una enfermedad o trastorno que se pueda prevenir o tratar mediante la administración, al sujeto que lo necesite, de una cantidad farmacéuticamente efectiva de una secuencia de aminoácidos, compuesto, construcción o polipéptido, como se describe en la presente como un agente NB o construcción de NB.

En una modalidad, la invención se refiere a las secuencias de aminoácidos, los compuestos, las construcciones, polipéptidos, ácidos nucleicos, células huésped, productos y las composiciones descritas en la presente, para utilizarse en la terapia de las enfermedades y los trastornos asociados con el DR5.

Otros aspectos, modalidades, ventajas y aplicaciones de la invención llegarán a quedar más claros a partir de la descripción adicional en la presente, en donde la invención se describe y se discute con mayor detalle.

En ciertas modalidades, las variantes V_{HH} de los agentes NB de la invención, en términos generales, ofrecen ciertas ventajas (ilustradas en la presente) comparándose con los “dAbs” o anticuerpos de dominio (individuales) similares o secuencias de inmunoglobulina, cuyas ventajas también son proporcionadas por las composiciones de la invención. Sin embargo, estará claro para la persona experta que también se pueden aplicar los aspectos más generales de la enseñanza que se encuentran más adelante (ya sea directamente o de una manera análoga) a otras secuencias de aminoácidos de la invención.

Definiciones

En la presente descripción, ejemplos y reivindicaciones, se aplican en general las siguientes definiciones, a menos que se

indique de otra manera. Como se utiliza más adelante y a través de todo el texto, el uso de un término o frase en el singular significa que incorpora el significado del plural, y *viceversa*, a menos que se observe de otra manera o que sea evidente a través del contexto.

A menos que se indiquen o se definan de otra manera, todos los términos empleados tienen su significado usual en la técnica, los cuales quedarán claros para la persona experta. Se hace referencia, por ejemplo, a los libros de texto convencionales, tales como Sambrook y colaboradores, "Molecular Cloning: A Laboratory Manual" (2ª Edición), Volúmenes 1 a 3, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989); F. Ausubel y colaboradores, Editores, "Current protocols in molecular biology", Green Publishing and Wiley Interscience, Nueva York (1987); Lewin, "Genes II", John Wiley & Sons, Nueva York, N.Y., (1985); Old y colaboradores, "Principles of Gene Manipulation: An Introduction to Genetic Engineering", Segunda Edición, University of California Press, Berkeley, CA (1981); Roitt y colaboradores, "Immunology" (6ª Edición), Mosby/Elsevier, Edimburgo (2001); Roitt y colaboradores, Roitt's Essential Immunology, 10ª Edición, Blackwell Publishing, Reino Unido (2001); y Janeway y colaboradores, "Immunobiology" (6ª Edición), Garland Science Publishing/Churchill Livingstone, Nueva York (2005), así como a la técnica antecedente general citada en la presente. Las referencias adicionales incluyen, por ejemplo, las siguientes reseñas: Presta, Adv. Drug Deliv. Rev. 2006, 58 (5-6): 640-56; Levin y Weiss, Mol. Biosyst. 2006, 2(1): 49-57; Irving y colaboradores, J. Immunol. Methods, 2001, 248(1-2), 31-45; Schmitz y colaboradores, Placenta, 2000, 21 Suplemento A, S106-12, Gonzales y colaboradores, Tumour Biol., 2005, 26(1), 31-43, los cuales describen técnicas para el diseño de proteínas, tales como maduración de afinidad y otras técnicas para mejorar la especificidad y otras propiedades deseadas de las proteínas, tales como las inmunoglobulinas.

A menos que se indique de otra manera, se cree que todos los métodos, pasos, técnicas y manipulaciones que no se describan

específicamente con detalle, se pueden llevar a cabo y se han llevado a cabo de una manera conocida por sí misma, y quedarán claros para la persona experta. Nuevamente se hace referencia, por ejemplo, a los libros de texto convencionales y a la técnica antecedente general mencionada en la presente, y a las referencias adicionales citadas en los mismos. Los residuos de aminoácidos se indicarán de acuerdo con el código estándar de aminoácidos de tres letras o de una letra, como es proporcionado por las Tablas de Códigos de IUPAC.

A menos que se indique de otra manera, el término "secuencia de inmunoglobulina", utilizado en la presente para referirse a un anticuerpo de cadena pesada o a un anticuerpo de cuatro cadenas convencional, se utiliza como un término general para incluir tanto el anticuerpo de tamaño completo, las cadenas individuales del mismo, así como todas las partes, dominios o fragmentos de las mismas (incluyendo, pero no limitándose a, dominios o fragmentos de enlace de antígeno, tales como dominios V_{HH} o dominios V_H/V_L, respectivamente).

El término "secuencia", como se utiliza en la presente (por ejemplo en términos como "secuencia de inmunoglobulina", "secuencia de anticuerpo", "secuencia de dominio variable", “secuencia de sdAb”, "secuencia V_H", "secuencia V_{HH}" o "secuencia de proteína"), se utiliza en general para incluir tanto la secuencia de aminoácidos relevante, así como las secuencias de ácidos nucleicos o secuencias de nucleótidos que codifican las mismas, a menos que el contexto requiera una interpretación más limitada.

A menos que se indique de otra manera, los términos “secuencia de nucleótidos" y "ácido nucleico”, en términos generales, se utilizan de una manera intercambiable para referirse a un polímero de ácidos desoxirribonucleicos (ADN) o de ácidos ribonucleicos (ARN), a menos que el contexto requiera una interpretación más limitada.

Para los propósitos de comparar dos o más secuencias de nucleótidos, el porcentaje de “identidad de secuencia” entre una

primera secuencia de nucleótidos y una segunda secuencia de nucleótidos se puede calcular o determinar, por ejemplo, tomando el número de nucleótidos en la primera secuencia de nucleótidos que sean idénticos a los nucleótidos en las posiciones correspondientes en la segunda secuencia de nucleótidos, dividiendo ese número entre el número total de nucleótidos en la primera secuencia de nucleótidos y entonces multiplicando por el 100 por ciento. Cada supresión, inserción, sustitución o adición de un nucleótido en la segunda secuencia de nucleótidos - cuando se compara con la primera secuencia de nucleótidos - se considera como una diferencia en la posición de un solo nucleótido. Un experto en este campo también puede utilizar un algoritmo o una técnica de computación adecuada, tal como, por ejemplo, NCBI Blast v2.0, utilizando las posiciones convencionales.

Con respecto a la estructura 1 (FR1), debe quedar claro para la persona experta que, para determinar el grado de identidad de aminoácidos, de preferencia no se consideran los residuos de aminoácidos en las posiciones 1 a 4 y 27 a 30.

En una modalidad, en la determinación del grado de identidad de secuencia entre dos secuencias de aminoácidos, la persona experta puede tomar en cuenta las denominadas como sustituciones de aminoácidos “conservadoras”. Las sustituciones conservadoras son conocidas en la técnica, y son las sustituciones en donde un aminoácido es sustituido por otro residuo de aminoácido dentro del mismo grupo, que tienen una propiedad común. Los grupos de aminoácidos conservados y sus propiedades comunes son como siguen: (a) residuos pequeños alifáticos, no polares, o ligeramente polares, incluyendo Ala, Ser, Thr, Pro y Gly; (b) residuos polares negativamente cargados y sus amidas (no cargadas), incluyendo Asp, Asn, Glu y Gln; (c) residuos polares positivamente cargados, incluyendo His, Arg y Lys; (d) residuos no polares grandes alifáticos, incluyendo Met, Leu, He, Val y Cys; y (e) residuos aromáticos, incluyendo Phe, Tyr y Trp.

Las sustituciones conservadoras particularmente preferidas son

como siguen: Ala en Gly o en Ser; Arg en Lys; Asn en Gln o en His; Asp en Glu; Cys en Ser; Gln en Asn; Glu en Asp; Gly en Ala o en Pro; His en Asn o en Gln; Ile en Leu o en Val; Leu en Ile o en Val; Lys en Arg, en Gln o en Glu; Met en Leu, en Tyr o en Ile; Phe en Met, en Leu o en Tyr; Ser en Thr; Thr en Ser; Trp en Tyr; Tyr en Trp; y/o Phe en Val, en Ile o en Leu.

Cualesquiera sustituciones de aminoácidos aplicadas a los polipéptidos descritos en la presente también se pueden basar en el análisis de las frecuencias de variaciones de aminoácidos entre proteínas homólogas de diferentes especies desarrolladas por Schulz y colaboradores, Principles of Protein Structure, Springer-Verlag, 1978, sobre los análisis de potenciales formadores de estructura desarrollados por Chou y Fasman, Biochemistry 13: 211, 1974 y Adv. Enzymol., 47: 45-149, 1978, y sobre el análisis de los patrones de hidrofobicidad en proteínas desarrollado por Eisenberg y colaboradores, Proc. Natl. Acad. Sci. EUA 81: 140-144, 1984; Kyte y Doolittle; J Molec. Biol. 157: 105-132, 198 1, y Goldman y colaboradores, Ann. Rev. Biophys. Chem. 15: 321-353, 1986. La información sobre la estructura primaria, secundaria y terciaria de las construcciones V_{HH} de camélido se da en la técnica antecedente general citada anteriormente, y la estructura del cristal de esta construcción V_{HH} de una llama es dada, por ejemplo, por Desmyter y colaboradores, Nature Structural Biology, Volumen 3, 9, 803 (1996); Spinelli y colaboradores, Natural Structural Biology (1996); 3, 752-757; y Decanniere y colaboradores, Structure, Volumen 7, 4, 361 (1999). Se puede encontrar mayor información acerca de algunos de los residuos de aminoácidos que, en los dominios V_H convencionales, forman la interfase V_H/V_L y las sustituciones de camelización potenciales sobre estas posiciones, en la técnica citada anteriormente.

Se dice que las secuencias de aminoácidos y las secuencias de ácidos nucleicos son "*exactamente iguales*" si tienen el 100 por ciento de identidad de secuencia sobre toda su longitud.

Cuando se comparan dos secuencias de aminoácidos, el

término “*diferencia de aminoácido*” se refiere a una inserción, supresión o sustitución de un solo residuo de aminoácido en una posición de la primera secuencia, comparándose con la segunda secuencia; siendo entendido que dos secuencias de aminoácidos pueden contener una, dos o más de esas diferencias de aminoácidos.

Cuando se dice que una secuencia de nucleótidos o una secuencia de aminoácidos "comprende" otra secuencia de nucleótidos u otra secuencia de aminoácidos, respectivamente, o "consiste esencialmente en otra secuencia de nucleótidos u otra secuencia de aminoácidos, esto significa, en términos generales, que la secuencia de nucleótidos o la secuencia de aminoácidos primeramente mencionada tiene, dentro de su secuencia, un estiramiento de nucleótidos o residuos de aminoácidos, respectivamente, que tiene la misma secuencia de nucleótidos o secuencia de aminoácidos, respectivamente, que esta última secuencia, sin importar la manera en que se haya generado u obtenido realmente la primera secuencia mencionada (la cual, por ejemplo, puede ser mediante cualquier método adecuado descrito en la presente).

El término “en una forma esencialmente aislada” significa que una secuencia de ácido nucleico o de aminoácidos se separa de cuando menos otro componente con el que esté usualmente asociada en una fuente o medio, comparándose con su fuente biológica nativa y/o el medio de reacción o medio de cultivo a partir del cual se haya obtenido. El “cuando menos otro componente” puede ser otro ácido nucleico, otra proteína/polipéptido, otro componente biológico o macromolécula, o cuando menos un contaminante, impureza o componente menor. En una modalidad, una secuencia de ácido nucleico o una secuencia de aminoácidos se considera "esencialmente aislada" cuando se ha purificado cuando menos 2 veces, en particular cuando menos 10 veces, más particularmente, cuando menos 100 veces, y hasta 1000 veces o más. Una secuencia de ácido nucleico o la secuencia de aminoácidos que está "en una

forma esencialmente aislada" es de preferencia esencialmente homogénea, como se determine empleando una técnica adecuada, tal como una técnica cromatográfica adecuada, tal como electroforesis en gel de poliacrilamida.

Los términos “dominio" y "dominio de enlace", como se utiliza en la presente, se refiere en términos generales a una región globular de una cadena de anticuerpo, y en particular a una región globular de un anticuerpo de cadena pesada, o a un polipéptido que esencialmente consiste en esa región globular. Usualmente, este dominio comprenderá lazos peptídicos (por ejemplo 3 ó 4 lazos peptídicos) estabilizados, por ejemplo, como una hoja o mediante enlaces de disulfuro.

Los términos “determinante antigénico" y "epítopo”, los cuales también se pueden utilizar de una manera intercambiable en la presente, se refieren al epítopo sobre el antígeno reconocido por la molécula de enlace de antígeno (tal como una construcción de NB de la invención), y más particularmente, por el sitio de enlace de antígeno de dicha molécula.

Una secuencia de aminoácidos (tal como una construcción de NB de la invención, una construcción V_{HH} o V_H, un anticuerpo, o en términos generales una proteína o polipéptido de enlace de antígeno o un fragmento de los mismos) que se puede enlazar (de una manera específica) a, que tiene afinidad por, y/o que tiene especificidad para, un determinante antigénico, epítopo, antígeno o proteína particular (o por cuando menos una parte, fragmento o epítopo de los mismos), se dice que está “*contra*" o "*dirigido contra*” ese determinante antigénico, epítopo, antígeno o proteína.

El término “*especificidad*”, como se menciona en la presente, se refiere al número de diferentes tipos de antígenos o determinantes antigénicos con los que se puede enlazar una molécula de enlace de antígeno o una proteína de enlace de antígeno particular (tal como una construcción de NB de la invención). La especificidad de una proteína de enlace de antígeno se puede determinar basándose en la afinidad y/o avidez.

Típicamente, las proteínas de enlace de antígeno (tales como la construcción de NB de la invención) se enlazarán a su antígeno con una constante de disociación (K_D) de 10^{-5} a 10^{-12} moles/litro o menos, y de preferencia de 10^{-7} a 10^{-12} moles/litro o menos, y de una manera muy preferible de 10^{-8} a 10^{-12} moles/litro (es decir, con una constante de disociación (K_A) de 10^5 a 10^{12} litros/moles o más, y de preferencia de 10^7 a 10^{12} litros/moles o más, y de una manera muy preferible de 10^8 a 10^{12} litros/moles). Cualquier valor K_D mayor de 10^4 moles/litro (o cualquier valor K_A menor de 10^4 M^{-1}) litros/moles, se considera en general que indica un enlace no específico. De preferencia, una construcción de NB de la invención se enlazará a su antígeno deseado con una afinidad menor de 500 nM, de preferencia menor de 200 nM, más preferiblemente menor de 10 nM, tal como menor de 500 pM. "Un enlace específico" de una proteína de enlace de antígeno a un antígeno o determinante antigénico se puede determinar de cualquier manera adecuada conocida por sí misma, incluyendo, por ejemplo, análisis de Scatchard y/o ensayos de enlace competitivo, tales como radioinmunoensayos (RIA), inmunoensayos enzimáticos (EIA), y ensayos competitivos de emparedado, y las diferentes variantes de los mismos conocidas por sí mismas en la materia; así como las otras técnicas mencionadas en la presente.

"Afinidad", representada por la constante de equilibrio para la disociación de un antígeno con una proteína de enlace de antígeno (K_D), es una medida para la fuerza de enlace entre un determinante antigénico y un sitio de enlace de antígeno sobre la proteína de enlace de antígeno: mientras menor sea el valor de la K_D, mayor será la fuerza de enlace entre un determinante antigénico y la molécula de enlace de antígeno (de una manera alternativa, la afinidad también se puede expresar como la constante de afinidad (K_A), la cual es $1/K_D$). Como quedará claro para la persona experta, la afinidad se puede determinar de una manera conocida por sí misma, dependiendo del antígeno específico de interés.

"Avidez" es la medida de la fuerza de enlace entre una molécula de enlace de antígeno (tal como una construcción de NB de

la invención), y el antígeno pertinente. La avidez está relacionada tanto con la afinidad entre un determinante antigénico y su sitio de enlace de antígeno sobre la molécula de enlace de antígeno, como con el número de sitios de enlace pertinentes presentes sobre la molécula de enlace de antígeno.

La constante de disociación puede ser la constante de disociación real o aparente. Los métodos para determinar la constante de disociación son conocidos en la materia.

La frase “se enlaza específicamente" o "se enlaza selectivamente”, cuando se utilizan en el contexto de describir la interacción entre un antígeno (por ejemplo, una proteína), y una construcción de NB, o un fragmento funcional de la misma, por ejemplo, que tiene las regiones determinantes de complementariedad (CDRs) dadas a conocer en la estructura de un anticuerpo, fragmento de anticuerpo, o agente de enlace derivado de anticuerpo, se refiere a una reacción de enlace que es determinante de la presencia del antígeno en una población homogénea de proteínas y otros productos biológicos, por ejemplo, en una muestra biológica, por ejemplo, una muestra de sangre, suero, plasma o tejido. Por consiguiente, bajo ciertas condiciones de inmunoensayo diseñadas, la construcción de NB, los anticuerpos, o los agentes de enlace con una especificidad de enlace particular, se enlazan a un antígeno particular cuando menos dos veces el fondo y no se enlazan sustancialmente en una cantidad significativa a otros antígenos presentes en la muestra. En una modalidad, bajo las condiciones de inmunoensayo diseñadas, la construcción de NB, el anticuerpo, o los agentes de enlace con una especificidad de enlace particular, se enlazan a un antígeno particular cuando menos diez (10) veces el fondo, y no se enlazan sustancialmente en una cantidad significativa a otros antígenos presentes en la muestra. Un enlace específico para una construcción de NB, un anticuerpo, o un agente de enlace, bajo estas condiciones, puede requerir que la construcción de NB, el anticuerpo, o el agente de enlace se haya seleccionado por su especificidad por una proteína particular. Como se desee o según

sea apropiado, esta selección se puede lograr sustrayendo las construcciones de NB o los anticuerpos que reaccionan cruzadamente con, por ejemplo, las moléculas de DR5 a partir de otras especies (por ejemplo, de ratón o de rata) u otros polipéptidos que son miembros o subtipos de la familia del Receptor de Muerte. De una manera alternativa, en algunas modalidades, se seleccionan construcciones de NB, anticuerpos, o fragmentos de anticuerpos que reaccionan cruzadamente con ciertas moléculas deseadas.

Se pueden utilizar una variedad de formatos de inmunoensayo para seleccionar las construcciones de NB que sean específicamente inmuno-reactivas con una proteína particular. Por ejemplo, los inmunoensayos ELISA en fase sólida se utilizan rutinariamente para seleccionar anticuerpos específicamente inmuno-reactivos con una proteína (véase, por ejemplo, Harlow y Lane, Using Antibodies, A Laboratory Manual (1998), para una descripción de los formatos de inmunoensayo y las condiciones que se pueden utilizar para determinar la inmuno-reactividad específica), y de la misma manera se pueden utilizar para construir análisis de enlace de NB. Típicamente, una reacción de enlace específico o selectivo producirá una señal cuando menos dos veces sobre la señal del fondo, y más típicamente cuando menos de 10 a 100 veces sobre el fondo. En adición a la constante de afinidad (K_A) descrita en la presente, una construcción de NB de enlace de DR5 de la invención típicamente también tiene una constante de índice de disociación (K_D) ($k_{desactivado}/k_{activado}$) menor de 5 x 10^{-2}M, menor de 10^{-2}M, menor de 5x10^{-3}M, menor de 10^{-3}M, menor de 5 x 10^{-4}M, menor de 10^{-4}M, menor de 5 x 10^{-5}M, menor de 10^{-5}M, menor de 5 x 10^{-6}M, menor de 10^{-6}M, menor de 5 x 10^{-7}M, menor de 10^{-7}M, menor de 5 x 10^{-8}M, menor de 10^{-8}M, menor de 5 x 10^{-9}M, menor de 10^{-9}M, menor de 5 x 10^{-10}M, menor de 10^{-10}M, menor de 5 x 10^{-11}M, menor de 10^{-11}M, menor de 5 x 10^{-12}M, menor de 10^{-12}M, menor de 5 x 10^{-13}M, menor de 10^{-13}M, menor de 5 x 10^{-14}M, menor de 10^{-14}M, menor de 5 x 10^{-15}M, o menor de 10^{-15}M o más baja, y se enlaza al DR5 con una afinidad que es cuando menos dos veces mayor que su afinidad para

enlazarse a un antígeno no específico (por ejemplo, albúmina de suero humano “HSA”).

La vida media de una secuencia de aminoácidos, compuesto, o polipéptido de la invención, se refiere en términos generales al tiempo que se necesita para que se reduzca la concentración de la construcción en suero por el 50 por ciento, *in vivo*, por ejemplo, debido a la degradación de la secuencia o del compuesto, y/o a la eliminación o el secuestro de la secuencia o del compuesto mediante mecanismos naturales. La vida media *in vivo* de una secuencia de aminoácidos, compuesto, o polipéptido de la invención, se puede determinar de cualquier manera conocida por sí misma, tal como mediante análisis farmacocinético. Las técnicas adecuadas estarán claras para la persona experta en este campo. La vida media se puede expresar utilizando parámetros tales como el $t_{1/2}$-alfa, $t_{1/2}$-beta y el área debajo de la curva (AUC). Véase la parte experimental más adelante, más los libros de texto convencionales, tales como Kenneth y colaboradores, Chemical Stability of Pharmaceuticals: A Handbook for Pharmacists, y Peters y colaboradores, Pharmacokinetic analysis: A Practical Approach (1996); Gibaldi y Perron, "Pharmacokinetics", publicado por Marcel Dekker, 2ª Revisión. Edición (1982). Los términos “aumentan su vida media" o "mayor vida media” se refieren a un aumento en el $t_{1/2}$-beta, ya sea con o sin un aumento en el $t_{1/2}$-alfa y/o la AUC o ambos.

"Las enfermedades y los trastornos asociados con el DR5" son como se definen anteriormente, y a través de toda la memoria descriptiva, por ejemplo, en los párrafos anteriores. Aunque no está limitado por la teoría, se cree que el mecanismo de acción del DR5 en estas enfermedades y/o trastornos es como se dispone, por ejemplo, en los párrafos anteriores. Los ejemplos no limitantes de las enfermedades y los trastornos asociados con el DR5 contemplados, son como se proporcionan a través de toda la memoria descriptiva, incluyendo, por ejemplo, en los párrafos anteriores, y otros pueden llegar a ser evidentes para un experto en este campo basándose en las enseñanzas proporcionadas en la presente.

En el contexto de la presente invención, “modulando" o "modular”, en términos generales, significa ya sea reducir o inhibir la actividad de, o de una manera alternativa aumentar la actividad de, un objetivo o antígeno, como se mide utilizando un ensayo *in vitro*, celular, o *in vivo* adecuado. En particular, “modulando" o "modular” puede significar ya sea reducir o inhibir la actividad de, o de una manera alternativa aumentar una actividad biológica (relevante o pretendida) de, un objetivo o antígeno, como se mide utilizando un ensayo *in vitro*, celular, o *in vivo* adecuado (el cual usualmente dependerá del objetivo o antígeno involucrado), por cuando menos el 1 por ciento, de preferencia por cuando menos el 5 por ciento, tal como por cuando menos el 10 por ciento, o por cuando menos el 25 por ciento, por ejemplo, por cuando menos el 50 por ciento, por cuando menos el 60 por ciento, por cuando menos el 70 por ciento, por cuando menos el 80 por ciento, o por cuando menos el 90 por ciento o más, comparándose con la actividad del objetivo o antígeno en el mismo ensayo bajo las mismas condiciones pero sin la presencia de la construcción de la invención.

Como quedará claro para la persona experta, la “modulación” también puede involucrar efectuar un cambio (el cual puede ser ya sea un aumento o bien una disminución) en la afinidad, avidez, especificidad y/o selectividad de un objetivo o antígeno para uno o más de sus ligandos, componentes de enlace, componentes para asociación en una forma homo-multimérica o hetero-multimérica, o sustratos; y/o efectuar un cambio (el cual puede ser ya sea un aumento o bien una disminución) en la sensibilidad del objetivo o antígeno para uno o más condiciones en el medio o en los alrededores en donde esté presente el objetivo o el antígeno (tales como pH, concentración iónica, la presencia de co-factores, etc.), comparándose con las mismas condiciones pero sin la presencia de la construcción de la invención. Como quedará claro para la persona experta, esto nuevamente se puede determinar de cualquier manera adecuada y/o utilizando cualquier ensayo adecuado conocido por sí mismo, dependiendo del objetivo o antígeno involucrado.

En una modalidad, “modulación” también puede significar efectuar un cambio (es decir, una actividad como un agente neutralizante, como un agonista, como un antagonista, o como un agonista inverso, respectivamente, dependiendo del objetivo o antígeno y del efecto biológico o fisiológico deseado) con respecto a uno o más mecanismos biológicos o fisiológicos, efectos, respuestas, funciones, sendas o actividades en donde esté involucrado el objetivo o antígeno (o en donde estén involucrados sus sustratos, ligandos o sendas, tales como su senda de señalización o su senda metabólica, y sus efectos biológicos o fisiológicos asociados). Como quedará claro para la persona experta, esta acción como un agente neutralizante, como un agonista o un antagonista se puede determinar de cualquier manera adecuada y/o utilizando cualquier ensayo adecuado (*in vitro* y usualmente celular o en un ensayo) conocido por sí mismo, dependiendo del objetivo o antígeno involucrado. En particular, una acción como un agonista o antagonista puede ser tal que se aumente o se disminuya una actividad biológica o fisiológica pretendida, respectivamente, por cuando menos el 1 por ciento, de preferencia por cuando menos el 5 por ciento, tal como por cuando menos el 10 por ciento, o por cuando menos el 25 por ciento, por ejemplo, por cuando menos el 50 por ciento, por cuando menos el 60 por ciento, por cuando menos el 70 por ciento, por cuando menos el 80 por ciento, o por cuando menos el 90 por ciento o más, comparándose con la actividad biológica o fisiológica en el mismo ensayo bajo las mismas condiciones pero sin la presencia de la construcción de la invención.

La modulación puede involucrar, por ejemplo, la modulación aloestérica del objetivo o antígeno; y/o reducir o inhibir el enlace del objetivo o antígeno a uno de sus sustratos o ligandos, y/o competir con un ligando natural o sustrato por el enlace al objetivo o antígeno. La modulación también puede involucrar activar el objetivo o antígeno o el mecanismo o la senda en donde esté involucrado. La modulación también puede involucrar, por ejemplo, efectuar un cambio con respecto al pliegue o la confirmación del objetivo o

antígeno, o con respecto a la capacidad del objetivo o antígeno para plegarse, para cambiar su confirmación (por ejemplo, después de enlazarse a un ligando), para asociarse con otras (sub)unidades, o para disociarse. La modulación puede involucrar, por ejemplo, efectuar un cambio en la capacidad del objetivo o antígeno para transportar otros compuestos o para servir como un canal para otros compuestos (tales como iones).

La modulación puede ser reversible o irreversible, pero para los propósitos farmacéuticos y farmacológicos, usualmente será de una manera reversible.

Con respecto a un objetivo o antígeno, el término “sitio de interacción” sobre el objetivo o antígeno significa un sitio, epítopo, determinante antigénico, parte, dominio o estiramiento de los residuos de aminoácidos sobre el objetivo o antígeno que es un sitio para enlazarse a un ligando, receptor u otro componente de enlace, un sitio catalítico, un sitio de disociación, un sitio para la interacción aloestérica, un sitio involucrado en la multimerización (tal como homomerización o heteromerización) del objetivo o antígeno; o cualquier otro sitio, epítopo, determinante antigénico, parte, dominio o estiramiento de los residuos de aminoácidos sobre el objetivo o antígeno que esté involucrado en una acción o un mecanismo biológico del objetivo o antígeno. En términos más generales, un “sitio de interacción” puede ser cualquier sitio, epítopo, determinante antigénico, parte, dominio o estiramiento de los residuos de aminoácidos sobre el objetivo o antígeno con el que se puede enlazar una secuencia de aminoácidos o polipéptido de la invención, de tal manera que el se modula el objetivo o antígeno (y/o cualquier senda, interacción, señalización, mecanismo biológico o efecto biológico en donde está involucrado el objetivo o antígeno).

Se dice que una secuencia de aminoácidos o de polipéptido es “específica para” un primer objetivo o antígeno comparándose con un segundo objetivo o antígeno cuando que se enlaza al primer antígeno con una afinidad (como se describe anteriormente, y se expresa de una manera adecuada como un valor K_D, un valor K_A, un

índice $K_{desactivado}$ y/o un índice $K_{activado}$) que es cuando menos 10 veces, tal como cuando menos 100 veces, y de preferencia cuando menos 1,000 veces, y hasta 10,000 veces o más, mejor que la afinidad con que se enlaza la secuencia de aminoácidos o polipéptido al segundo objetivo o polipéptido. Por ejemplo, el primer antígeno se puede enlazar al objetivo o antígeno con un valor K_D que es cuando menos 10 veces menor, por ejemplo, cuando menos 100 veces menor, y de preferencia cuando menos 1,000 veces menor, tal como 10,000 veces menor, o incluso una diferencia de veces mayor que el K_D con que se enlaza la secuencia de aminoácidos o el polipéptido al segundo objetivo o polipéptido. En una modalidad, cuando una secuencia de aminoácidos o polipéptido es “específica para” un primer objetivo o antígeno comparándose con un segundo objetivo o antígeno, se dirige contra el primer objetivo o antígeno, pero no se dirige contra el segundo objetivo o antígeno.

Los términos “*bloquear cruzadamente*”, “*bloqueado cruzadamente*" y "*bloqueando cruzadamente*” se utilizan indistintamente en la presente, para significar la capacidad de una secuencia de aminoácidos u otros agentes de enlace (tal como un polipéptido de la invención) para interferir con el enlace de otras secuencias de aminoácidos o con los agentes de enlace de la invención para un objetivo dado. El grado hasta el cual una secuencia de aminoácidos u otros agentes de enlace de la invención son capaces de interferir con el enlace de otros al DR5, y por consiguiente, si se puede decir que tienen un bloqueo cruzado de acuerdo con la invención, se puede determinar empleando ensayos de enlace competitivo. Un ensayo cuantitativo adecuado en particular utiliza una máquina Biacore que puede medir el grado de interacciones utilizando tecnología de resonancia de plasmón superficial. Otro ensayo de bloqueo cruzado cuantitativo adecuado utiliza una aproximación basada en ELISA para medir la competición entre la secuencia de aminoácidos y otros agentes de enlace en términos de su enlace al objetivo.

Un ensayo adecuado para determinar si una secuencia de

aminoácidos u otro agente de enlace bloquea cruzadamente o es capaz de bloquear cruzadamente de acuerdo con la invención es un ensayo Biacore de ejemplo o un ensayo ELISA de ejemplo.

Se dice que una secuencia de aminoácidos es de "*reacción cruzada*" para dos diferentes antígenos o determinantes antigénicos (tales como albúmina de suero a partir de dos diferentes especies de mamífero, tales como albúmina de suero humano y albúmina de suero de cinomolgo), si es específica para estos diferentes antígenos o determinantes antigénicos.

Un enlace que es "*esencialmente independiente del pH*" significa en general en la presente que la constante de asociación (K_A) de la secuencia de aminoácidos con respecto a la proteína de suero (tal como la albúmina de suero) en valores de pH que se presentan en una célula de un animal o de un cuerpo humano (como se describe adicionalmente en la presente), es cuando menos del 5 por ciento, tal como de cuando menos el 10 por ciento, de preferencia de cuando menos el 25 por ciento, más preferiblemente de cuando menos el 50 por ciento, todavía más preferiblemente de cuando menos el 60 por ciento, tal como todavía más preferiblemente de cuando menos el 70 por ciento, tal como de cuando menos el 80 por ciento, o de cuando menos el 90 por ciento o más (o inclusive más del 100 por ciento, tal como más del 110 por ciento, más del 120 por ciento, o incluso el 130 por ciento o más, o inclusive más del 150 por ciento, o incluso más del 200 por ciento) de la constante de asociación (K_A) de la secuencia de aminoácidos con respecto a la misma proteína de suero en valores de pH que se presentan fuera de esta célula. De una manera alternativa, un enlace que es "*esencialmente independiente del pH*" significa en general en la presente que el índice $k_{desactivado}$ (medido mediante Biacore – véase, por ejemplo, el Experimento 2) de la secuencia de aminoácidos con respecto a la proteína de suero (tal como albúmina de suero) en valores de pH que se presentan en una célula de un animal o de un cuerpo humano (como se describen, por ejemplo, adicionalmente en la presente, por ejemplo, un pH de alrededor de

5.5, por ejemplo, de 5.3 a 5.7), es de cuando menos el 5 por ciento, tal como de cuando menos el 10 por ciento, de preferencia de cuando menos el 25 por ciento, más preferiblemente de cuando menos el 50 por ciento, todavía más preferiblemente de cuando menos el 60 por ciento, tal como todavía más preferiblemente de cuando menos el 70 por ciento, tal como de cuando menos el 80 por ciento, o de cuando menos el 90 por ciento o más (o inclusive más del 100 por ciento, tal como más del 110 por ciento, más del 120 por ciento, o incluso el 130 por ciento o más, o inclusive más del 150 por ciento, o inclusive más del 200 por ciento) del índice $k_{desactivado}$ de la secuencia de aminoácidos con respecto a la misma proteína de suero en valores de pH que se presentan fuera de esta célula, por ejemplo, pH de 7.2 a 7.4. "*Los valores de pH que se presentan en una célula de un animal o de un cuerpo humano*" significan los valores de pH que pueden presentarse dentro de una célula, y en particular dentro de una célula que está involucrada en el reciclaje de la proteína de suero. En particular, "*los valores de pH que se presentan en una célula de un animal o de un cuerpo humano*" significan los valores de pH que se pueden presentar dentro de un compartimiento o vesícula (sub)celular que está involucrada en el reciclaje de la proteína de suero (por ejemplo, como un resultado de la pinocitosis, endocitosis, transcitosis, exocitosis y fagocitosis, o un mecanismo similar de absorción o internalización en esta célula), tal como un endosoma, lisosoma o pinosoma.

Como se describe adicionalmente en la presente, el número total de los residuos de aminoácidos en una construcción de NB puede estar en la región de 110 a 120, es de preferencia 112-115, y es más preferiblemente 113. Sin embargo, se debe observar que las partes, fragmentos, análogos o derivados (como se describen adicionalmente en la presente) de una construcción de NB no están limitados en particular con respecto a su longitud y/o tamaño, siempre que tales partes, fragmentos, análogos o derivados satisfagan los requerimientos adicionales ilustrados en la presente, y sean opcionalmente adecuados para los propósitos de la presente.

Como se menciona en la presente “preferido” (o “más preferido”, “todavía más preferido”, etc.) se aplican a los compuestos de NB específicos o las variantes de los mismos, o a su usos, para una variedad de modalidades descritas en la presente, o para las modalidades particulares si así se describen.

Los residuos de aminoácidos de una construcción de NB se numeran de acuerdo con la numeración general para los dominios V_H, como es dada por Kabat y colaboradores, “Sequence of proteins of immunological interest”, US Public Health Services, NIH Bethesda, MD, Publicación No. 91, como se aplica a los dominios V_{HH} a partir de camélidos en el artículo de Riechmann y Muyldermans, J. Immunol. Methods, 23 de Junio de 2000; 240 (1-2): 185-195 (véase, por ejemplo, la Figura 2 de esta publicación). De conformidad con lo anterior, en general una FR1 de una construcción de NB comprende los residuos de aminoácidos en las posiciones 1 a 30, una CDR1 de una construcción de NB comprende los residuos de aminoácidos en las posiciones 31 a 35, una FR2 de una construcción de NB comprende los aminoácidos en las posiciones 36 a 49, una CDR2 de una construcción de NB comprende los residuos de aminoácidos en las posiciones 50 a 65, una FR3 de una construcción de NB comprende los residuos de aminoácidos en las posiciones 66 a 94, una CDR3 de una construcción de NB comprende los residuos de aminoácidos en las posiciones 95 a 102, y una FR4 de una construcción de NB comprende los residuos de aminoácidos en las posiciones 103 a 113. Sin embargo, es bien conocido en la materia para los dominios V_H y para los dominios V_{HH} que el número total de los residuos de aminoácidos en cada una de las regiones determinantes de complementariedad (CDRs) puede variar y, por consiguiente, puede no corresponder al número total de los residuos de aminoácidos indicados por la numeración de Kabat. A manera de ejemplo, para una construcción de NB de la invención descrita en la presente, los residuos de aminoácidos y su posición en la construcción de NB para sus FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3 y FR4 particulares, son como se proporcionan en la Tabla 4 en la

presente. Se pueden utilizar otros métodos tales como Kabat y Chotia para definir versiones alternativas de las regiones determinantes de complementariedad (CDRs) particulares, y la determinación cristalográfica de los puntos de contacto y los sitios de interacción pueden informar adicionalmente a un experto en este campo con respecto a la extensión de cada región CDR y/o FR particular.

Las Figuras, el Listado de Secuencias, y la Parte Experimental/Ejemplos, se dan para ilustrar adicionalmente la invención, y no deben interpretarse o construirse para limitar el alcance de la invención y/o de las reivindicaciones adjuntas de cualquier manera, excepto si se indica explícitamente de otra manera en la presente.

Para una descripción general de los anticuerpos de cadena pesada y de los dominios variables de los mismos, se hace referencia, entre otras cosas, a las referencias de la técnica citadas en la presente.

De acuerdo con la terminología utilizada en la materia, los dominios variables presentes en los anticuerpos de cadena pesada que se presentan naturalmente, también serán referidos como "*dominios* V_{HH}", con el objeto de distinguirlos de los dominios variables de la cadena pesada que están presentes en los anticuerpos de 4 cadenas convencionales (los cuales serán referidos en la presente como "*dominios* V_H"), y de los dominios variables de la cadena ligera que están presentes en los anticuerpos de 4 cadenas convencionales (los cuales serán referidos en la presente como "*dominios* V_L"). En general, los dominios V_{HH} han sido "diseñados" por naturaleza para enlazarse funcionalmente a un antígeno sin la presencia de, y sin cualquier interacción con, un dominio variable de cadena ligera.

Como se menciona en las referencias citadas en la técnica anteriores, dominios V_{HH} tienen un número de características estructurales y propiedades funcionales únicas. Éstas hacen que los dominios V_{HH} aislados (así como las composiciones de la invención

basadas en los mismos que compartan estas características estructurales y propiedades funcionales con los dominios V_{HH} que se presentan naturalmente), y las proteínas que los contienen sean altamente convenientes para utilizarse como dominios o proteínas de enlace de antígeno funcionales. En particular, y sin limitarse a lo mismo, los dominios V_{HH} y las composiciones de la invención pueden funcionar como una sola unidad, dominio o proteína estructural de enlace de antígeno funcional relativamente pequeña. Esto distingue los dominios V_{HH} de los dominios V_H y V_L de los anticuerpos de 4 cadenas convencionales, los cuales, por sí mismos, en general no son adecuados para la aplicación práctica como proteínas o dominios de enlace de antígeno individuales, sino que se necesitan combinar de alguna forma u otra para proporcionar una unidad de enlace de antígeno funcional (por ejemplo, como en los fragmentos de anticuerpos convencionales, tales como los fragmentos Fab; en los fragmentos ScFv, los cuales consisten en un dominio V_H covalentemente enlazado a un dominio V_L).

Debido a estas propiedades únicas, el uso de los dominios V_{HH}, y de los agentes NB de la invención, y de las composiciones basadas en los mismos, como proteínas de enlace de antígeno o como dominios de enlace de antígeno individuales (es decir, como parte de una proteína o polipéptido más grande), ofrece un número de ventajas significativas sobre el uso de los dominios V_H y V_L convencionales, los ScFvs, o los fragmentos de anticuerpos convencionales (tales como los fragmentos Fab o $F(ab')_2$). Las ventajas de una variante V_{HH} de camélido de una construcción de NB son, por ejemplo, que únicamente se requiere que se enlace un solo dominio a un antígeno con una alta afinidad y con una alta selectividad, de tal manera que no hay necesidad de elaborar o combinar múltiples dominios separados, ni hay necesidad de garantizar que estos dos dominios estén presentes en la conformación y configuración espacial correcta; los dominios V_{HH} se pueden expresar a partir de una sola transcripción, y no requieren de pliegue o modificaciones posteriores a la traducción; los dominios

V_{HH} se pueden diseñar fácilmente en formatos multivalentes y multiespecíficos (como se discute adicionalmente en la presente); los dominios V_{HH} son altamente solubles y no tienen tendencia a aglomerarse; los dominios V_{HH} son altamente estables al calor, el pH, a las proteasas, y a otros agentes o condiciones desnaturalizantes; los dominios V_{HH} son fáciles y relativamente baratos de preparar y escalar para la producción; los dominios V_{HH} son relativamente pequeños (los monómeros son de aproximadamente 15 kDa, ó 10 veces más pequeños que la IgG convencional), comparándose con los anticuerpos de 4 cadenas convencionales y con los fragmentos de enlace de antígeno de los mismos y, por consiguiente, muestran una penetración más alta en los tejidos (incluyendo, pero no limitándose a, tumores sólidos y otros tejidos densos) que los anticuerpos de 4 cadenas convencionales los fragmentos de enlace de antígeno de los mismos; los dominios V_{HH} pueden mostrar las denominadas como propiedades de enlace de cavidades (entre otras cosas, debido a su lazo extendido de CDR3, comparándose con los dominios V_H convencionales) y, por consiguiente, también pueden tener acceso a los objetivos y epítopos no accesibles para los anticuerpos de 4 cadenas convencionales y los fragmentos de enlace de antígeno de los mismos.

Construcciones de NB contra el DR5

En un aspecto específico y preferido, la invención proporciona agentes NB contra el DR5, y en particular agentes NB contra el DR5 a partir de un animal de sangre caliente, y más particularmente, los agentes NB contra el DR5 a partir de un mamífero, y en especial agentes NB contra el DR5 humano, tal como se proporciona en las bases de datos públicas, por ejemplo, en las bases de datos de proteínas NCBI Número de Acceso BAA33723 (SEQ ID NO: 89); así como proteínas y/o polipéptidos, los cuales comprenden cuando menos un agente NB.

En particular, la invención proporciona agentes NB contra el DR5, y proteínas y/o polipéptidos que los comprenden, que tienen mejores propiedades terapéuticas y/o farmacológicas y/u otras

propiedades convenientes (tales como, por ejemplo, mayor facilidad de preparación y/o costos reducidos de los artículos), comparándose con los anticuerpos convencionales contra el DR5, o fragmentos de los mismos, comparándose con las construcciones que se podrían basar en los anticuerpos convencionales o fragmentos de anticuerpos (tales como fragmentos Fab', fragmentos $F(ab')_2$, construcciones ScFv, "diacuerpos" y otras construcciones multiespecíficas (véase, por ejemplo, la reseña por Holliger y Hudson, Nat Biotechnol. Septiembre de 2005; 23(9): 1126-36)), y también comparándose con los denominados como "dAbs" o anticuerpos de dominio (individuales) similares que se pueden derivar a partir de los dominios variables de los anticuerpos convencionales.

En una modalidad, y como se describe en términos generales en la presente para las secuencias de aminoácidos terapéuticamente útiles de la invención, los agentes NB y las variantes de los mismos de la invención, están en una forma esencialmente aislada, o forman parte de una proteína o polipéptido de la invención que puede comprender o consistir esencialmente en uno o más agentes NB de la invención. En una modalidad, la variante del agente NB puede comprender además una o más secuencias de aminoácidos adicionales. En una modalidad, la una o más secuencias de aminoácidos adicionales se enlazan por medio de uno o más enlazadores adicionales. En una modalidad, y sin limitación, la una o más secuencias de aminoácidos de la invención se pueden utilizar como una unidad de enlace en una proteína o polipéptido, que opcionalmente pueden contener una o más secuencias de aminoácidos adicionales que pueden servir como una unidad de enlace (es decir, contra uno o más objetivos diferentes del DR5), como para proporcionar un polipéptido monovalente, multivalente, o multiespecífico de la invención, respectivamente. En una modalidad, esta proteína o polipéptido puede comprender o consistir esencialmente en uno o más agentes NB de la invención y opcionalmente uno o más (otros) dominios de polipéptido o

composiciones de enlace de epítopos (es decir, dirigidos contra objetivos diferentes del DR5), todos opcionalmente enlazados por medio de uno o más enlazadores adicionales, como para proporcionar un agente NB monovalente, multivalente, o multiespecífico, respectivamente.

En una modalidad, el sitio de enlace para el enlace contra el DR5 se forma mediante las secuencias de CDR. En una modalidad, una composición de la invención, en adición al cuando menos un sitio de enlace para enlazarse contra el DR5, puede contener uno o más sitios de enlace adicionales para enlazarse contra otros antígenos, proteínas u objetivos. Para los métodos y las posiciones para introducir estos segundos sitios de enlace, se hace referencia, por ejemplo, a Keck y Huston, Biophysical Journal, 71, Octubre de 1996, 2002-2011; Patente Europea Número EP 0 640 130; Publicación Internacional Número WO 06/07260, y la Solicitud Provisional de Patente de los Estados Unidos de Norteamérica por Ablynx N.V. titulada como “Immunoglobulin domains with multiple binding sites” presentada el 27 de Noviembre de 2006.

En una modalidad, cuando las secuencias de aminoácidos de la invención (o un polipéptido de la invención que comprende las mismas) se pretenden para su administración a un sujeto (por ejemplo, para propósitos terapéuticos y/o de diagnóstico, como se describen en la presente), se dirigen contra el DR5 humano. En una modalidad, para propósitos veterinarios, la composición de la invención se dirige contra el DR5 a partir de la especie que se vaya a tratar. Las composiciones de la invención en la presente pueden o no reaccionar cruzadamente (es decir, pueden ser activas contra el DR5 a partir de dos o más especies de mamífero, tal como contra el DR5 humano y el DR5 a partir de cuando menos una de las especies de mamífero mencionadas en la presente). En una modalidad, una construcción de NB de la invención se puede enlazar específicamente al DR5 pero no se enlaza al DR-4, al TRAIL-R3, o al TRAIL-R4.

En una modalidad, las composiciones de la invención se

dirigen en general contra cualquier determinante antigénico, epítopo, parte, dominio, subunidad o confirmación (en donde sea aplicable) del DR5. En una modalidad, los agentes NB de la invención se dirigen contra la porción del dominio extracelular del DR5.

En una modalidad específica, las composiciones de la invención en la presente compiten con el ligando natural del DR5 en un ensayo de enlace competitivo. En una modalidad, un agente NB de la invención compite con TRAIL para enlazarse al DR5. En una modalidad, una composición de la invención no compite con TRAIL- para enlazarse al DR5. En una modalidad, un agente NB de la invención hace sinergismo con TRAIL para enlazarse al DR5.

En una modalidad no limitante, la secuencia de aminoácidos y la estructura de una composición de la invención están comprendidas de cuatro regiones de estructura o “FRs” (o algunas veces también referidas como “FWs”), las cuales son referidas en la materia y en la presente como “Región de estructura 1" o "FR1”; como “Región de estructura 2" o "FR2”; como “Región de estructura 3" o "FR3”; y como “Región de estructura 4" o "FR4”, respectivamente; cuyas regiones de estructura están interrumpidas por tres regiones determinantes de complementariedad o “CDRs”, las cuales son referidas en la materia como “Región determinante de complementariedad 1” o “CDR1”; como “Región determinante de complementariedad 2" o "CDR2”; y como “Región determinante de complementariedad 3" o "CDR3”, respectivamente. En una modalidad, las secuencias de estructura y las regiones determinantes de complementariedad (CDRs) (y las combinaciones de las mismas) son aquéllas que están presentes en las construcciones de NB de la invención como se describen en la presente, y en especial en la Tabla 4. Otras secuencias de CDR adecuadas se pueden obtener mediante los métodos descritos en la presente.

En una modalidad no limitante, las secuencias de CDR de la invención son tales que:

a) las construcciones de NB pueden enlazarse al DR5 con

una constante de disociación (K_D) de 10^{-5} a 10^{-12} moles/litro o menos, y de preferencia de 10^{-7} a 10^{-12} moles/litro o menos, y de una manera muy preferible de 10^{-8} a 10^{-12} moles/litro (es decir, con una constante de disociación (K_A) de 10^5 a 10^{12} litros/moles o más, y de preferencia de 10^7 a 10^{12} litros/moles o más, y de una manera muy preferible de 10^8 a 10^{12} litros/moles); y/o son tales que:

b) las construcciones de NB pueden enlazarse al DR5 con un índice $k_{activado}$ de entre 10^2 $M^{-1}s^{-1}$ y aproximadamente 10^7 $M^{-1}s^{-1}$, de preferencia de entre 10^3 $M^{-1}s^{-1}$ y 10^7 $M^{-1}s^{-1}$, más preferiblemente de entre 10^4 $M^{-1}s^{-1}$ y $^10^7$ $M^{-1}s^{-1}$, tal como de entre 10^5 $M^{-1}s^{-1}$ y 10^7 $M^{-1}s^{-1}$; y/o son tales que:

c) las construcciones de NB pueden enlazarse al DR5 con un índice $k_{desactivado}$ de entre 1 s^{-1} ($t_{1/2}$=0.69 s) y 10^{-6} s^{-1} (proporcionando un complejo casi irreversible con un $t_{1/2}$ de múltiples días), de preferencia de entre 10^{-2} s^{-1} y 10^{-6} s^{-1}, más preferiblemente de entre 10^{-3} s^{-1} y 10^{-6} s^{-1}, tal como de entre 10^{-4} s^{-1} y 10^{-6} s^{-1}.

En una modalidad, las secuencias de CDR en la presente son tales que: una composición monovalente de la invención (o un polipéptido que contenga solamente una construcción de NB de la invención) se enlazará al DR5 con una afinidad menor de 100 nM, de preferencia menor de 10 nM, más preferiblemente menor de 1 nM, tal como menor de 500 pM.

La afinidad de los agentes NB de la invención contra el DR5 se puede determinar de una manera conocida por sí misma, por ejemplo, utilizando las técnicas generales para medir las K_D, K_A, $k_{desactivado}$ o $k_{activado}$ mencionadas en la presente, así como algunos de los ensayos específicos descritos en la presente.

En un aspecto no limitante, la invención se refiere a un agente NB contra el DR5, el cual consiste en cuatro regiones de estructura (FR1 a FR4, respectivamente), y tres regiones determinantes de complementariedad (CDR1 una CDR3, respectivamente). En una modalidad, el agente NB es una construcción de NB en donde:

la CDR1 se selecciona a partir del grupo que consiste en:

a) las secuencias de aminoácidos de las SEQ ID NOs: 41 a

44;

b) las secuencias de aminoácidos que tienen cuando menos el 90 por ciento de identidad de aminoácidos con cuando menos una de las secuencias de aminoácidos de las SEQ ID NOs: 41 a 44;

c) las secuencias de aminoácidos que tienen 3, 2, o 1 diferencia de aminoácido con cuando menos una de las secuencias de aminoácidos de las SEQ ID NOs: 41 a 44;

y/o

la CDR2 se selecciona a partir del grupo que consiste en:

a) las secuencias de aminoácidos de las SEQ ID NOs: 51 a 55;

b) las secuencias de aminoácidos que tienen cuando menos el 90 por ciento de identidad de aminoácidos con cuando menos una de las secuencias de aminoácidos de las SEQ ID NOs: 51 a 55;

c) las secuencias de aminoácidos que tienen 3, 2, o 1 diferencia de aminoácido con cuando menos una de las secuencias de aminoácidos de las SEQ ID NOs: 51 a 55;

y/o

la CDR3 se selecciona a partir del grupo que consiste en:

a) las secuencias de aminoácidos de las SEQ ID NOs: 63 a 68;

b) las secuencias de aminoácidos que tienen cuando menos el 90 por ciento de identidad de aminoácidos con cuando menos una de las secuencias de aminoácidos de las SEQ ID NOs: 63 a 68

c) las secuencias de aminoácidos que tienen 3, 2, o 1 diferencia de aminoácido con cuando menos una de las secuencias de aminoácidos de las SEQ ID NOs: 63 a 68;

o cualquier fragmento adecuado de esta secuencia de aminoácidos.

De los agentes NB de la invención, se prefieren en particular las construcciones de NB que comprenden una o más de las regiones determinantes de complementariedad (CDRs) explícitamente enlistadas anteriormente; se prefieren más particularmente las construcciones de NB que comprenden dos o más de las regiones

determinantes de complementariedad (CDRs) explícitamente enlistadas anteriormente; y se prefieren de una manera muy particular, las construcciones de NB que comprenden tres de las regiones determinantes de complementariedad (CDRs) explícitamente enlistadas anteriormente.

Algunas combinaciones de secuencias de CDR particularmente preferidas, pero no limitantes, así como las combinaciones preferidas de secuencias de CDR y secuencias de estructura, se mencionan en la Tabla 4 más adelante, la cual enlista las secuencias de CDR y las secuencias de estructura que están presentes en un número de construcciones preferidas (pero no limitantes) de NB de la invención. Como quedará claro para la persona experta, normalmente se preferirá una combinación de las secuencias de CDR1, CDR2 y CDR3 que se presentan en el mismo clon (es decir, CDR1, CDR2 y las secuencias de CDR3 que se mencionan sobre la misma línea en la Tabla 4, y en especial como se proporciona en las SEQ ID NOs: 1-22, 26-40, 87-88, y 103-104) (aunque la invención en su sentido más amplio no está limitada a la misma, y también comprende otras combinaciones adecuadas de las secuencias de CDR mencionadas en la Tabla 4). También, normalmente se preferirá una combinación de secuencias de CDR y las secuencias de estructura que se presentan en el mismo clon (es decir, las secuencias de CDR y las secuencias de estructura que se mencionan sobre la misma línea en la Tabla 4, y en especial como se proporciona en contexto dentro de las SEQ ID NOs: 1 – 22, 26 – 40, 87-88, y 103-104)) (aunque la invención en su sentido más amplio no está limitada a la misma, y también comprende otras combinaciones adecuadas de las secuencias de CDR y las secuencias de estructura mencionadas en la Tabla 4, así como combinaciones de estas secuencias de CDR y otras secuencias de estructura adecuadas.

En una modalidad, en las construcciones de NB que comprenden las combinaciones de CDRs mencionadas en la Tabla 4, cada CDR puede ser reemplazada por una CDR seleccionada a partir del grupo que consiste en las secuencias de aminoácidos que tienen

cuando menos el 80 por ciento, de preferencia cuando menos el 90 por ciento, más preferiblemente cuando menos el 95 por ciento, todavía más preferiblemente cuando menos el 99 por ciento de identidad de secuencia con las regiones determinantes de complementariedad (CDRs) mencionadas.

Por consiguiente, en las construcciones de NB de la invención, cuando menos una de las secuencias de CDR1, CDR2 y CDR3 presentes se selecciona adecuadamente a partir del grupo que consiste en las secuencias de CDR1, CDR2 y CDR3, respectivamente, enlistadas en la Tabla 4; o a partir del grupo de las secuencias de CDR1, CDR2 y CDR3, respectivamente, que tienen cuando menos el 80 por ciento, de preferencia cuando menos el 90 por ciento, más preferiblemente cuando menos el 95 por ciento, todavía más preferiblemente cuando menos el 99 por ciento de "identidad de secuencia" con cuando menos una de las secuencias de CDR1, CDR2 y CDR3, respectivamente, enlistadas en la Tabla 4; y/o a partir del grupo que consiste en las secuencias de CDR1, CDR2 y CDR3, respectivamente, que tienen 3, 2 o solamente 1 "diferencia de aminoácido(s)" con cuando menos una de las secuencias de CDR1, CDR2 y CDR3, respectivamente, enlistadas en la Tabla 4.

En este contexto, "se selecciona adecuadamente" significa que, como sea aplicable, una secuencia de CDR1 se selecciona a partir de las secuencias de CDR1 adecuadas (es decir, como se definen en la presente), una secuencia de CDR2 se selecciona a partir de las secuencias de CDR2 adecuadas (es decir, como se definen en la presente), y una secuencia de CDR3 se selecciona a partir de las secuencias de CDR3 adecuadas (es decir, como se definen en la presente), respectivamente. En una modalidad, las secuencias de CDR se seleccionan de tal manera que las construcciones de NB de la invención se enlazan al DR5 con una afinidad (de una manera adecuada medida y/o expresada como un valor K_D (real o aparente), un valor K_A (real o aparente), un índice $k_{activado}$ y/o un índice $k_{desactivado}$, o de una manera alternativa, como un valor IC_{50}) que es

como se dispone en la presente.

En una modalidad de las construcciones de NB de la invención, cuando menos la secuencia de CDR3 presente se selecciona adecuadamente a partir del grupo que consiste en las secuencias de CDR3 enlistadas en la Tabla 4, o a partir del grupo de las secuencias de CDR3 que tienen cuando menos el 80 por ciento, de preferencia cuando menos el 90 por ciento, más preferiblemente cuando menos el 95 por ciento, todavía más preferiblemente cuando menos el 99 por ciento de identidad de secuencia con cuando menos una de las secuencias de CDR3s enlistadas en la Tabla 4; y/o a partir del grupo que consiste en las secuencias de CDR3 que tienen 3, o tienen 2 o tienen solamente 1 diferencia de aminoácido(s) con cuando menos una de las secuencias de CDR3s enlistadas en la Tabla 4.

En una modalidad de las construcciones de NB de la invención, cuando menos dos de las secuencias de CDR1, CDR2 y CDR3 presentes se seleccionan adecuadamente a partir del grupo que consiste en las secuencias de CDR1, CDR2 y CDR3, respectivamente, enlistadas en la Tabla 4, o a partir del grupo que consiste en las secuencias de CDR1, CDR2 y CDR3, respectivamente, que tienen cuando menos el 80 por ciento, y/o cuando menos el 90 por ciento, y/o cuando menos el 95 por ciento, y/o cuando menos el 99 por ciento de identidad de secuencia con cuando menos una de las secuencias de CDR1, CDR2 y CDR3, respectivamente, enlistadas en la Tabla 4; y/o a partir del grupo que consiste en las secuencias de CDR1, CDR2 y CDR3, respectivamente, que tienen 3, 2 o solamente 1 “diferencia de aminoácido(s)” con cuando menos una de las secuencias de CDR1, CDR2 y CDR3, respectivamente, enlistadas en la Tabla 4.

En una modalidad de las construcciones de NB de la invención, cuando menos la secuencia de CDR3 presente se selecciona adecuadamente a partir del grupo que consiste en las secuencias de CDR3 enlistadas en la Tabla 4, o a partir del grupo de las secuencias de CDR3 que tienen cuando menos el 80 por ciento, y/o cuando menos el 90 por ciento, y/o cuando menos el 95 por ciento, y/o

cuando menos el 99 por ciento de identidad de secuencia con cuando menos una de las secuencias de CDR3s enlistadas en la Tabla 4, respectivamente; y cuando menos una de las secuencias de CDR1 y CDR2 presentes se selecciona adecuadamente a partir del grupo que consiste en las secuencias de CDR1 y CDR2, respectivamente, enlistadas en la Tabla 4, o a partir del grupo de las secuencias de CDR1 y CDR2, respectivamente, que tienen cuando menos el 80 por ciento, y/o cuando menos el 90 por ciento, y/o cuando menos el 95 por ciento, y/o cuando menos el 99 por ciento de identidad de secuencia con cuando menos una de las secuencias de CDR1 y CDR2, respectivamente, enlistadas en la Tabla 4; y/o a partir del grupo que consiste en las secuencias de CDR1 y CDR2, respectivamente, que tienen 3, 2 o solamente 1 diferencia de aminoácido(s) con cuando menos una de las secuencias de CDR1 y CDR2, respectivamente, enlistadas en la Tabla 4.

En una modalidad de las construcciones de NB de la invención, todas las tres secuencias de CDR1, CDR2 y CDR3 presentes se seleccionan adecuadamente a partir del grupo que consiste en las secuencias de CDR1, CDR2 y CDR3, respectivamente, enlistadas en la Tabla 4.

En una modalidad, se prefieren las combinaciones de CDRs enlistadas en la Tabla 4 (es decir, aquéllas mencionadas para las mismas construcciones en la Tabla 4). Por consiguiente, en un aspecto, cuando una CDR en una construcción de NB de la invención es una secuencia de CDR mencionada en la Tabla 4, o se selecciona adecuadamente a partir del grupo de secuencias de CDR que tienen cuando menos el 80 por ciento, de preferencia cuando menos el 90 por ciento, más preferiblemente cuando menos el 95 por ciento, todavía más preferiblemente cuando menos el 99 por ciento de identidad de secuencia con una secuencia de CDR enlistada en la Tabla 4; y/o a partir del grupo que consiste en las secuencias de CDR que tienen 3, 2 o solamente 1 diferencia de aminoácido(s) con una secuencia de CDR enlistada en la Tabla 4, cuando menos una y de preferencia ambas de las otras CDRs se seleccionan

adecuadamente a partir de las secuencias de CDR que pertenezcan a la misma combinación en la Tabla 4 (es decir, mencionada sobre la misma línea en la Tabla 4), o se seleccionan adecuadamente a partir del grupo de secuencias de CDR que tienen cuando menos el 80 por ciento, de preferencia cuando menos el 90 por ciento, más preferiblemente cuando menos el 95 por ciento, todavía más preferiblemente cuando menos el 99 por ciento de identidad de secuencia con las secuencias de CDR pertenecientes a la misma combinación, y/o a partir del grupo que consiste en las secuencias de CDR que tienen 3, 2 o solamente 1 diferencia de aminoácido(s) con las secuencias de CDR pertenecientes a la misma combinación. Las otras preferencias indicadas en los párrafos anteriores también se aplican a las combinaciones de CDRs mencionadas en la Tabla 4.

En una modalidad de una construcción de NB de la invención, las secuencias de CDR1, CDR2 y CDR3 presentes se seleccionan adecuadamente a partir de una de las combinaciones de las secuencias de CDR1, CDR2 y CDR3, respectivamente, enlistadas en la Tabla 4.

De acuerdo con un aspecto no limitante de una construcción de NB de la invención, (a) CDR1 tiene una longitud de entre 1 y 12 residuos de aminoácidos, y usualmente de entre 2 y 9 residuos de aminoácidos, tal como de 5, 6 ó 7 residuos de aminoácidos; y/o (b) CDR2 tiene una longitud de entre 13 y 24 residuos de aminoácidos, y usualmente de entre 15 y 21 residuos de aminoácidos, tal como de entre 16 y 17 residuos de aminoácidos; y/o (c) CDR3 tiene una longitud de entre 2 y 35 residuos de aminoácidos, y usualmente de entre 3 y 30 residuos de aminoácidos, tal como de entre 6 y 23 residuos de aminoácidos.

En un aspecto no limitante, la invención se refiere a una construcción de NB en donde las secuencias de CDR tienen más del 80 por ciento, de preferencia más del 90 por ciento, más preferiblemente más del 95 por ciento, tal como cuando menos el 99 por ciento o más de identidad de secuencia con las secuencias de CDR de cuando menos una de las secuencias de aminoácidos de las

SEQ ID NOs: 1-22, 26-40, 87-88, y 103-104.

En términos generales, los agentes NB con las secuencias de CDR anteriores pueden ser como se describen adicionalmente en la presente. En una modalidad, los agentes NB tienen secuencias de estructura que son también como se describen adicionalmente en la presente. Por consiguiente, por ejemplo, y como se menciona en la presente, los agentes NB pueden ser los anticuerpos de un solo dominio que se presentan naturalmente (a partir de cualquier especie adecuada), las secuencias V_{HH} que se presenten naturalmente (es decir, a partir de una especie adecuada de camélido), o las secuencias de aminoácidos sintéticas o semi-sintéticas o agentes NB, incluyendo, pero no limitándose a, las construcciones de NB parcialmente humanizadas, o las secuencias V_{HH}, las construcciones de NB completamente humanizadas, o las secuencias V_{HH}, las secuencias del dominio variable de la cadena pesada camelizadas, así como los agentes NB que se hayan obtenido mediante las técnicas mencionadas en la presente.

Por consiguiente, en un aspecto no limitante, la invención se refiere a un agente NB humanizado, el cual consiste en cuatro regiones de estructura (FR1 a FR4, respectivamente), y tres regiones determinantes de complementariedad (CDR1 una CDR3, respectivamente), en donde las CDR1 una CDR3 son como se definen en la presente, y en donde el agente NB humanizado comprende cuando menos una sustitución humanizada, y en particular cuando menos una sustitución de humanización en cuando menos una de sus secuencias de estructura.

En otro aspecto preferido, pero no limitante, la invención se refiere a un agente NB en donde las secuencias de CDR tienen cuando menos el 70 por ciento de identidad de aminoácidos, de preferencia cuando menos el 80 por ciento de identidad de aminoácidos, más preferiblemente cuando menos el 90 por ciento de identidad de aminoácidos, tal como el 95 por ciento de identidad de aminoácidos o más, o incluso esencialmente el 100 por ciento de identidad de aminoácidos con las secuencias de CDR de cuando

menos una de las secuencias de aminoácidos de las SEQ ID NOs: 1-22, 26-40, 87-88, y 103-104. Este grado de identidad de aminoácidos, por ejemplo, se puede determinar mediante la determinación del grado de identidad de aminoácidos (de una manera descrita en la presente) entre el agente NB y una o más de las secuencias de las SEQ ID NOs: 1-22, 26-40, 87-88, y 103-104, en donde no se consideran los residuos de aminoácidos que forman las regiones de estructura. Los agentes NB pueden ser como se describen adicionalmente en la presente.

En un aspecto no limitante, la invención se refiere a un agente NB, incluyendo, pero no limitándose a, una construcción de NB, con una secuencia de aminoácidos que se selecciona a partir del grupo que consiste en las SEQ ID NOs: 1-22, 26-40, 87-88, y 103-104, o a partir del grupo que consiste en las secuencias de aminoácidos que tienen más del 80 por ciento, de preferencia más del 90 por ciento, más preferiblemente más del 95 por ciento, tal como cuando menos el 99 por ciento o más de identidad de secuencia con cuando menos una de las secuencias de aminoácidos de las SEQ ID NOs: 1-22, 26-40, 87-88, y 103-104.

Otro aspecto no limitante de la invención se refiere a las variantes humanizadas o adicionalmente humanizadas de las construcciones de NB de las SEQ ID NOs: 1-22, 26-40, 87-88, y 103-104, que comprenden, comparándose con la secuencia nativa correspondiente, cuando menos una sustitución humanizada, y en particular cuando menos una sustitución de humanización en cuando menos una de sus secuencias de estructura.

Polipéptidos de Enlace Monovalentes y Multivalentes

La invención se refiere además a un compuesto que comprende o que consiste esencialmente en uno o más polipéptidos de la invención contra el DR5, y más específicamente contra el DR5 humano, y opcionalmente comprende uno o más grupos, residuos, fracciones o unidades de enlace adicionales, en donde el compuesto mencionado es capaz de mejorar la apoptosis. En una modalidad, algunos agentes NB de la invención son proteínas que comprenden

cuando menos tres, cuatro, cinco o más polipéptidos de enlace monovalente contra el receptor DR5, tales como los agentes NB de la invención dirigidos contra el DR5. Como se menciona en la presente, en estos polipéptidos multivalentes de la invención, cada polipéptido de enlace monovalente, tal como una construcción de NB, se puede dirigir contra el mismo epítopo sobre el DR5, o contra diferentes epítopos sobre el DR5. Algunos ejemplos no limitantes de estos polipéptidos de NB de la invención se dan en las SEQ ID NOs: 1-22, 26-40, 87-88, y 103-104.

En términos generales, las proteínas o los polipéptidos que comprenden o que consisten esencialmente en un solo polipéptido de enlace (tal como una sola subunidad de enlace de DR5 de un agente NB de la invención) serán referidos en la presente como proteínas o polipéptidos “monovalentes” o como “construcciones monovalentes”. Las proteínas y los polipéptidos que comprenden o que consisten esencialmente en dos o más polipéptidos de enlace (tales como cuando menos dos agentes NB unidos de la invención, o cuando menos un agente NB de la invención, y cuando menos otro agente NB o construcción de polipéptido) serán referidos en la presente como proteínas o polipéptidos “multivalentes” o como “construcciones multivalentes”, y éstos pueden proporcionar ciertas ventajas comparándose con los polipéptidos de enlace monovalente correspondientes de la invención. Los ejemplos no limitantes particulares de estas construcciones multivalentes con como se disponen en la presente.

Los ejemplos específicos del agente NB multivalente incluyen un dímero o una construcción divalente que comprende dos subunidades de polipéptido, un trímero, o agente NB trivalente que comprende tres subunidades de polipéptido, un tetrámero o agente NB tetravalente que comprende cuatro subunidades de polipéptido, un pentámero o agente NB pentavalente que comprende cinco subunidades de polipéptido, a hexámero o agente NB hexavalente que comprende seis subunidades de polipéptido, o variantes multiméricas adicionales de los mismos.

En un aspecto no limitante, un agente NB trimérico de la invención comprende o consiste esencialmente en tres subunidades de polipéptido monovalentes de la invención. En una modalidad, el agente NB trimérico comprende tres subunidades de polipéptido monovalentes de enlace de DR5 idénticas de la invención, en cuyo caso, el agente NB es un trímero que es multivalente pero monoespecífico. En una modalidad, un agente NB trimérico comprende o consiste esencialmente en una primera y/o una segunda subunidad de enlace de DR5, y una segunda o tercera subunidad, respectivamente, que es opcionalmente una subunidad que se enlaza específicamente a un epítopo diferente (ya sea sobre DR5 o sobre otro objetivo), por ejemplo, en cuyo caso, el agente NB es un trímero que es multivalente y multiespecífico.

En una modalidad no limitante, un agente NB comprende o consiste esencialmente en cuando menos cuatro subunidades de polipéptido de enlace de DR5 monovalentes de la invención. Este agente NB tetramérico de la invención puede ser monoespecífico o se puede convertir hasta una construcción multiespecífica mediante la unión opcional de subunidades adicionales que se enlacen específicamente al mismo o a un epítopo de DR5 diferente del primero y/o a un objetivo diferente de DR5.

En una modalidad no limitante, un agente NB comprende o consiste esencialmente en cuando menos cinco subunidades de polipéptido de enlace de DR5 monovalentes de la invención. Este agente NB pentamérico de la invención puede ser monoespecífico o se puede convertir hasta una construcción multiespecífica mediante la unión opcional de subunidades adicionales que se enlacen específicamente a un epítopo de DR5 diferente del primero y/o a un objetivo diferente de DR5.

En una modalidad no limitante, un agente NB comprende o consiste esencialmente en seis, ocho o diez subunidades de polipéptido de enlace de DR5 monovalentes de la invención. Este agente NB multimérico de la invención puede ser monoespecífico o se puede convertir hasta una construcción multiespecífica mediante

la unión opcional de subunidades adicionales que se enlacen específicamente a un epítopo de DR5 diferente del primero y/o a un objetivo diferente de DR5.

En una modalidad, los agentes NB multiméricos, ya sea monoespecíficos o multiespecíficos, proporcionan ciertas ventajas comparándose con una proteína o polipéptido que comprenda o que consista esencialmente en un agente NB monomérico de la invención; en una modalidad, las ventajas incluyen, pero no se limitan a, una avidez muy mejorada por DR5, por ejemplo, por el DR5 humano. Algunos ejemplos específicos, pero no limitantes, de agentes NB multiméricos son las construcciones de NB de las SEQ ID NOs: 6 a 22, 27-29, 31-33 y 88.

En un aspecto no limitante, un polipéptido de la invención comprende o consiste esencialmente en cuando menos un agente NB de la invención, opcionalmente uno o más agentes NB adicionales, y cuando menos otra secuencia de aminoácidos (tal como una proteína o polipéptido) que confiere cuando menos una propiedad deseada al agente NB de la invención y/o a la proteína de fusión resultante. Nuevamente, estas proteínas de fusión pueden proporcionar ciertas ventajas comparándose con el agente NB monovalente correspondiente de la invención. Algunos ejemplos no limitantes de estas secuencias de aminoácidos y de las construcciones de fusión llegarán a quedar más claros a partir de la descripción adicional en la presente.

En una modalidad, es posible combinar dos o más de los aspectos anteriores, por ejemplo, para proporcionar una construcción biespecífica trivalente que comprenda dos agentes NB de la invención y otro agente NB, y opcionalmente una o más secuencias de aminoácidos diferentes. Los ejemplos no limitantes adicionales de estas construcciones, así como de algunas construcciones que son particularmente preferidas dentro del contexto de la presente invención, llegarán a quedar más claros a partir de la descripción adicional en la presente.

En las construcciones anteriores, el uno o más polipéptidos de

enlace contra el DR5 y/u otras secuencias de aminoácidos se pueden enlazar operativamente unas a otras y/o se pueden enlazar adecuadamente unas a otras por medio de una o más secuencias enlazadoras. Algunos ejemplos adecuados, pero no limitantes, de estos enlazadores llegarán a quedar más claros a partir de la descripción adicional en la presente.

En un aspecto específico, el compuesto multivalente de la invención comprende cuando menos tres, cuatro, cinco o más polipéptidos de enlace monovalente (es decir, subunidades), y tiene una IC_{50} menor de 100 nM, de preferencia menor de 10 nM, más preferiblemente menor de 1 nM, todavía más preferiblemente menor de 100 pM, por ejemplo, debajo de 10 pM, como se mide, por ejemplo, en el ensayo de sobrevivencia celular de Colo205 o Jurkat. Se pueden utilizar otras líneas de células de cáncer para determinar la IC_{50}, por ejemplo, tales como se mencionan en los Ejemplos. Adicionalmente, las posibles líneas de células de cáncer que se pueden utilizar en los ensayos de sobrevivencia celular incluyen, pero no se limitan a, por ejemplo, Jurkat, Molt4, Colo205, BxPC3, T24, Panc-1, M30, H226, H2122, H2052, y MiaPaCa-2.

En una modalidad, el compuesto multivalente de la invención es cuando menos 10 veces, de preferencia cuando menos 100 veces más potente en una línea de células tumorales que en una línea de células no tumorales y medido en un ensayo de sobrevivencia celular, tal como el ensayo de sobrevivencia celular de Colo205 o Jurkat.

En un aspecto específico de la invención, un agente NB de la invención o un compuesto, construcción o polipéptido de la invención que comprende cuando menos un agente NB de la invención, puede tener una mayor vida media, comparándose con la secuencia de aminoácidos correspondiente de la invención. Algunos ejemplos no limitantes de los agentes, compuestos, y polipéptidos de NB llegarán a quedar más claros para la persona experta basándose en la divulgación adicional en la presente y, por ejemplo, comprenden las secuencias o polipéptidos del agente NB de la invención que se han

modificado químicamente para aumentar la vida media de los mismos (por ejemplo, por medio de pegilación); las secuencias de aminoácidos de la invención que comprenden cuando menos un sitio de enlace adicional para enlazarse a una proteína de suero (tal como albúmina de suero, o los polipéptidos de la invención que comprenden cuando menos un agente NB de la invención que se enlaza a cuando menos una fracción (y en particular cuando menos una secuencia de aminoácidos) que aumenta la vida media del agente NB de la invención. Los ejemplos de los polipéptidos de la invención que comprenden estas fracciones o secuencias de aminoácidos que extienden la vida media, llegarán a quedar más claros para la persona experta basándose en la divulgación adicional en la presente; y, por ejemplo, incluyen, sin limitación, los polipéptidos en donde el uno o más agentes NB de la invención se enlazan adecuadamente a una o más proteínas de suero o fragmentos de las mismas (tales como albúmina de suero o fragmentos adecuados de la misma) o a una o más unidades de enlace que se pueden enlazar a las proteínas de suero (tales como, por ejemplo, los agentes NB, las construcciones V_{HH} de camélido, o los anticuerpos de (un solo) dominio que pueden enlazarse a las proteínas de suero, tales como albúmina de suero, inmunoglobulinas de suero, tales como IgG, o transferrina); los polipéptidos en donde un agente NB de la invención se enlaza a una porción Fc (tal como una Fc humana) o una parte o fragmento adecuado de los mismos; o los polipéptidos en donde el uno o más agentes NB de la invención se enlazan adecuadamente a una o más proteínas o péptidos pequeños que se pueden enlazar a las proteínas de suero (tales como, sin limitación, las proteínas y los péptidos descritos en las Publicaciones Internacionales Números WO 91/01743, WO 01/45746, WO 02/076489 y WO 2006/122787, WO 2008/028977, WO 2008/043821, WO 2008/068280 y WO 2009/127691 presentadas por Ablynx N.V.

Nuevamente, como quedará claro para la persona experta, los agentes NB pueden contener uno o más grupos, residuos, fracciones

o unidades de enlace adicionales, tales como una o más secuencias de aminoácidos adicionales, y en particular uno o más agentes NB adicionales (es decir, no dirigidos contra el DR5), como para proporcionar una construcción de agente NB di-, tri-, o multi-específico más alto.

En términos generales, los agentes NB de la invención (o los compuestos, las construcciones, o los polipéptidos que las comprenden) con una mayor vida media, de preferencia tienen una vida media que es cuando menos 1.5 veces, de preferencia cuando menos 2 veces, tal como cuando menos 5 veces, por ejemplo, cuando menos 10 veces, o más de 20 veces, mayor de la vida media de la secuencia de aminoácidos correspondiente de la invención por sí mismos. Por ejemplo, los agentes NB, los compuestos, las construcciones o polipéptidos de la invención con una mayor vida media, pueden tener una vida media que aumenta con más de 1 hora, de preferencia más de 2 horas, más preferiblemente más de 6 horas, tal como más de 12 horas, o inclusive más de 24, 48 ó 72 horas, comparándose con la secuencia de aminoácidos correspondiente de la invención por sí misma.

En un aspecto preferido, pero no limitante de la invención, los agentes NB, los compuestos, las construcciones, o los polipéptidos de la invención exhiben una vida media en suero en el ser humano, de cuando menos aproximadamente 12 horas, de preferencia de cuando menos 24 horas, más preferiblemente de cuando menos 48 horas, todavía más preferiblemente de cuando menos 72 horas o más. Por ejemplo, los compuestos o los polipéptidos de la invención pueden tener una vida media de cuando menos 5 días (tal como de aproximadamente 5 a 10 días), de preferencia de cuando menos 9 días (tal como de aproximadamente 9 a 14 días), más preferiblemente de cuando menos aproximadamente 10 días (tal como de aproximadamente 10 a 15 días), o de cuando menos aproximadamente 11 días (tal como de aproximadamente 11 a 16 días), más preferiblemente de cuando menos aproximadamente 12 días (tal como de aproximadamente 12 a 18 días o más), o más de

14 días (tal como de aproximadamente 14 a 19 días).

En otro aspecto de la invención, un polipéptido de la invención comprende uno o más (tal como dos o de preferencia uno) agentes NB de la invención enlazados (opcionalmente por medio de una o más secuencias enlazadoras adecuadas) a una o más (tal como dos y de preferencia una) secuencias de aminoácidos que permiten que el polipéptido resultante de la invención cruce la barrera hematoencefálica. En particular, estas una o más secuencias de aminoácidos que permiten que los polipéptidos resultantes de la invención crucen la barrera hematoencefálica, pueden ser uno o más (tal como dos y de preferencia uno) NANOBODIES^{MR} (Nanocuerpos), tales como los NANOBODIES^{MR} descritos en la Publicación Internacional Número WO 02/057445, de los cuales, el FC44 (SEQ ID NO: 189 de la Publicación Internacional Número WO 06/040153), y el FC5 (SEQ ID NO: 190 de la Publicación Internacional Número WO 06/040154) son ejemplos particulares.

En una modalidad, los polipéptidos que comprenden uno o más agentes NB de la invención son tales que:

a) se enlazan al DR5 con una constante de disociación (K_D) de 10^{-5} a 10^{-12} moles/litro o menos, y de preferencia de 10^{-7} a 10^{-12} moles/litro o menos, y de una manera muy preferible de 10^{-8} a 10^{-12} moles/litro (es decir, con una constante de disociación (K_A) de 10^5 a 10^{12} litros/moles o más, y de preferencia de 10^7 a 10^{12} litros/moles o más, y de una manera muy preferible de 10^8 a 10^{12} litros/moles);

y/o de tal manera que:

b) se enlazan al DR5 con un índice $k_{activado}$ de entre 10^2 $M^{-1}s^{-1}$ y aproximadamente 10^7 $M^{-1}s^{-1}$, de preferencia de entre 10^3 $M^{-1}s^{-1}$ y 10^7 $M^{-1}s^{-1}$, más preferiblemente de entre 10^4 $M^{-1}s^{-1}$ y 10^7 $M^{-1}s^{-1}$, tal como de entre 10^5 $M^{-1}s^{-1}$ y 10^7 $M^{-1}s^{-1}$;

y/o de tal manera que:

c) se enlazan al DR5 con un índice $k_{desactivado}$ de entre $1s^{-1}$ ($t_{1/2}$=0.69 s), y 10^{-6} s^{-1} (proporcionando un complejo casi irreversible con un $t_{1/2}$ de múltiples días), de preferencia de entre 10^{-2} s^{-1} y 10^{-6} s^{-1}, más preferiblemente de entre 10^{-3} s^{-1} y 10^{-6} s^{-1}, tal como de entre

10^{-4} s^{-1} y 10^{-6} s^{-1}.

En una modalidad, un polipéptido que contiene solamente una secuencia de aminoácidos de la invención es tal que se enlazará al DR5 con una afinidad menor de 500 nM, de preferencia menor de 200 nM, más preferiblemente menor de 10 nM, tal como menor de 500 pM. En este aspecto, estará claro para la persona experta que un polipéptido que contiene dos o más agentes NB de la invención se pueden enlazar al DR5 con una mayor avidez, comparándose con un polipéptido que contiene solamente una secuencia de aminoácidos de la invención.

Otros polipéptidos de acuerdo con este aspecto preferido de la invención, por ejemplo, se pueden seleccionar a partir del grupo que consiste en las secuencias de aminoácidos que tienen más del 80 por ciento, de preferencia más del 90 por ciento, más preferiblemente más del 95 por ciento, tal como cuando menos el 99 por ciento o más “identidad de secuencia” con una o más de las secuencias de aminoácidos de las SEQ ID NOs: 1-22, 26-40 y 87-88, en donde los agentes NB comprendidos dentro de estas secuencias de aminoácidos son de preferencia como se definen adicionalmente en la presente.

Ácidos nucleicos, células huésped, y método para generar las construcciones de NB de la invención

Otro aspecto de esta invención se refiere a un ácido nucleico que codifica un agente NB de la invención o un polipéptido de la invención que lo comprende. Nuevamente, como se describe en términos generales en la presente, para los ácidos nucleicos de la invención, este ácido nucleico puede estar en la forma de una construcción genética, como se dispone en la presente.

En otro aspecto, la invención se refiere a un huésped o a una célula huésped que expresa o que es capaz de expresar un agente NB de la invención y/o un polipéptido de la invención que lo comprende; y/o que contiene un ácido nucleico de la invención. Algunos ejemplos preferidos, pero no limitantes, de estos huéspedes o células huésped llegarán a quedar más claros a partir de la

descripción adicional en la presente.

Otro aspecto de la invención se refiere a un producto o una composición que contiene o que comprende cuando menos un agente NB de la invención, cuando menos un polipéptido de la invención, y/o cuando menos un ácido nucleico de la invención, y opcionalmente uno o más componentes adicionales de estas composiciones, conocido por sí mismos, es decir, dependiendo del uso pretendido de la composición. Este producto o composición, por ejemplo, puede ser una composición farmacéutica (como se describe en la presente), una composición o un producto veterinario, o una composición para utilizarse en diagnóstico (como se describe también en la presente). Algunos ejemplos preferidos, pero no limitantes, de estos productos o composiciones llegarán a quedar más claros a partir de la descripción adicional en la presente.

La invención se refiere además a métodos para la preparación o la generación de los agentes NB, polipéptidos, ácidos nucleicos, células huésped, productos y las composiciones descritas en la presente. Algunos ejemplos preferidos, pero no limitantes, de los métodos, llegarán a quedar más claros a partir de la descripción adicional en la presente.

La invención se refiere además a aplicaciones y usos de los agentes NB, polipéptidos, ácidos nucleicos, células huésped, productos y las composiciones descritas en la presente, así como a los métodos para la prevención y/o el tratamiento de las enfermedades y los trastornos asociados con el DR5. Las aplicaciones y usos no limitantes particulares llegarán a quedar más claros a partir de la descripción adicional en la presente.

Otros aspectos, modalidades, ventajas y aplicaciones de la invención también llegarán a quedar claros a partir de la descripción adicional más adelante en la presente.

En términos generales, se debe observar que el término “agente NB", como se utiliza en la presente, en su sentido más amplio, no está limitado a una fuente biológica específica o a un método de preparación específico. Por ejemplo, como se discutirá

con mayor detalle más adelante, los agentes NB de la invención se pueden obtener en términos generales mediante cualquiera de las técnicas (1) a (8) mencionadas en páginas 61 y 62 de la Publicación Internacional Número WO 08/020079, o cualquier otra técnica adecuada conocida por sí mismo. Una clase preferida de los agentes NB corresponde a los dominios V_{HH} o V_H de los anticuerpos de cadena pesada que se presentan naturalmente dirigidos contra el DR5. Como se describe adicionalmente en la presente, las secuencias V_{HH} se pueden generar u obtener en términos generales mediante la inmunización adecuada de una especie de Camélido con el DR5 (es decir, como para provocar una respuesta inmunitaria y/o para reproducir anticuerpos de cadena pesada dirigidos contra el DR5), mediante la obtención de una muestra biológica adecuada a partir de dicho Camélido (tal como una muestra de sangre, una muestra de suero, o una muestra de células-B), y mediante la generación de secuencias V_{HH} dirigidas contra el DR5, empezando a partir de esa muestra, utilizando cualquier técnica adecuada conocida por sí misma. Estas técnicas estarán claras para la persona experta y/o se describen adicionalmente en la presente.

De una manera alternativa, los dominios V_{HH} que se presentan naturalmente contra el DR5, se pueden obtener a partir de las bibliotecas puras de secuencias V_{HH} de Camélido, por ejemplo, mediante el rastreo de esta biblioteca utilizando el DR5, o cuando menos una parte, fragmento, determinante antigénico o epítopo del mismo, utilizando uno o más técnicas de rastreo conocidas por sí mismas. Estas bibliotecas y técnicas, por ejemplo, se describen en las Publicaciones Internacionales Números WO 99/37681, WO 01/90190, WO 03/025020 y WO 03/035694. De una manera alternativa, se pueden utilizar bibliotecas sintéticas o semi-sintéticas mejoradas derivadas a partir de las bibliotecas de V_{HH} puras, tales como bibliotecas de V_{HH} obtenidas a partir de las bibliotecas de V_{HH} puras mediante técnicas tales como mutagénesis aleatoria y/o mezcla de CDR, como se describen, por ejemplo, en la Publicación Internacional Número WO 00/43507.

Por consiguiente, en otro aspecto, la invención se refiere a un método para generar agentes NB que se dirigen contra el DR5. En un aspecto, este método cuando menos comprende los pasos de:

a) proporcionar un conjunto, colección o biblioteca de secuencias del agente NB;

b) rastrear este conjunto, colección, o biblioteca de secuencias del agente NB para buscar las secuencias del agente NB que se puedan enlazar a, y/o que tengan afinidad por, DR5;

y

c) aislar las secuencias de aminoácidos que se puedan enlazar a, y/o que tengan afinidad por, el DR5.

En este método, el conjunto, la colección o la biblioteca de secuencias del agente NB puede ser un conjunto, colección, o biblioteca pura de secuencias del agente NB; un conjunto, colección, o biblioteca sintética o semi-sintética de secuencias del agente NB; y/o un conjunto, colección o biblioteca de secuencias del agente NB que se han sometido a maduración de afinidad.

En un aspecto particular de este método, el conjunto, colección o biblioteca de secuencias del agente NB, puede ser un conjunto, colección o biblioteca inmunitaria de secuencias del agente NB, y en particular un conjunto, colección o biblioteca inmunitaria de secuencias V_{HH}, que se hayan derivado a partir de una especie de Camélido que se haya inmunizado adecuadamente con el DR5 o con un determinante antigénico adecuado basado en el mismo o derivado del mismo, tal como una parte, fragmento, región, dominio, lazo antigénico u otro epítopo de los mismos. En un aspecto particular, el determinante antigénico puede ser una parte, región, dominio, lazo extracelular, u otros epítopos extracelulares.

En los métodos anteriores, el conjunto, la colección o la biblioteca de secuencias V_{HH} se puede exhibir sobre un fago, fagémido, ribosoma, o microorganismo adecuado (tal como levadura), tal como con el objeto de facilitar el rastreo. Los métodos, técnicas y organismos huésped adecuados para exhibir y rastrear (un conjunto, colección o biblioteca de) secuencias estarán claros para

la persona experta en este campo, por ejemplo, con base en la divulgación adicional en la presente. También se hace referencia a la Publicación Internacional Número WO 03/054016, y a la reseña por Hoogenboom en Nature Biotechnology, 23, 9, 1105-1116 (2005).

En una modalidad, el método para generar secuencias V_{HH} comprende cuando menos los pasos de:

a) proporcionar una colección o muestra de las células derivadas a partir de una especie de Camélido que expresan secuencias de inmunoglobulina;

b) rastrear la colección o la muestra de las células para determinar: (1) las células que expresen una secuencia de inmunoglobulina que se pueda enlazar a y/o que tenga afinidad por DR5; y (2) las células que expresen los anticuerpos de cadena pesada, en donde los subpasos (1) y (2) se pueden llevar a cabo esencialmente como un solo paso de rastreo o en cualquier orden adecuado como dos pasos de rastreo separados, como para proporcionar cuando menos una célula que exprese un anticuerpo de cadena pesada que se pueda enlazar a, y/o que tenga afinidad por DR5;

y

c) cualquiera de: (1) aislar a partir de la célula mencionada, la secuencia V_{HH} presente en el anticuerpo de cadena pesada; o (2) aislar a partir de la célula mencionada, una secuencia de ácido nucleico que codifique la secuencia V_{HH} presente en el anticuerpo de cadena pesada, seguido por la expresión del dominio V_{HH}.

En el método de acuerdo con este aspecto, la colección o la muestra de las células, por ejemplo, puede ser una colección o muestra de células-B. También, en este método, la muestra de las células se puede derivar a partir de un Camélido que se haya inmunizado adecuadamente con el DR5 ó un determinante antigénico adecuado basado en el mismo o derivado del mismo, tal como una parte, fragmento, región, dominio, lazo antigénico u otro epítopo del mismo. En un aspecto particular, el determinante antigénico puede ser una parte, región, dominio, lazo extracelular, u otros epítopos

extracelulares.

El método anterior se puede llevar a cabo de cualquier manera adecuada, como quedará claro para la persona experta. Se hace referencia, por ejemplo, a la Patente Europea Número EP 0 542 810, y a las Publicaciones Internacionales Números WO 05/19824, WO 04/051268 y WO 04/106377. La detección del paso b) de preferencia se lleva a cabo utilizando una técnica de citometría de flujo, tal como FACS. Para esto, se hace referencia, por ejemplo, a Lieby y colaboradores, *Blood*, Volumen 97, Número 12, 3820. Véase, por ejemplo, la técnica denominada como "Nanoclone^{MR}" descrita en la Solicitud Internacional Número WO 06/079372 por Ablynx N.V.

En otro aspecto, el método para generar una secuencia de aminoácidos dirigida contra el DR5 puede comprender cuando menos los pasos de:

a) proporcionar un conjunto, colección o biblioteca de secuencias de ácidos nucleicos que codifiquen los anticuerpos de cadena pesada o las secuencias V_{HH};

b) rastrear el conjunto, colección o biblioteca de secuencias de ácidos nucleicos para buscar las secuencias de ácidos nucleicos que codifiquen un anticuerpo de cadena pesada o una secuencia V_{HH} que se pueda enlazar a, y/o que tenga afinidad por, DR5; y

c) aislar la secuencia de ácido nucleico mencionada, seguido por la expresión de la secuencia V_{HH} presente en el anticuerpo de cadena pesada o por la expresión de la secuencia de esta construcción de NB, respectivamente.

En este método, el conjunto, la colección o la biblioteca de secuencias de ácidos nucleicos que codifican anticuerpos de cadena pesada o secuencias V_{HH}, por ejemplo, puede ser un conjunto, colección o biblioteca de secuencias de ácidos nucleicos que codifican un conjunto, colección, o biblioteca pura de anticuerpos de cadena pesada o secuencias V_{HH}; un conjunto, colección o biblioteca de secuencias de ácidos nucleicos que codifican un conjunto, colección, o biblioteca sintética o semi-sintética de secuencias V_{HH}; y/o un conjunto, colección o biblioteca de secuencias de ácidos

nucleicos que codifican un conjunto, colección o biblioteca de secuencias V_{HH} que se han sometido a maduración de afinidad.

En una modalidad de este método, el conjunto, colección o biblioteca de las secuencias de aminoácidos puede ser un conjunto, colección o biblioteca inmunitaria de secuencias de ácidos nucleicos que codifican anticuerpos de cadena pesada o secuencias V_{HH} derivadas a partir de un Camélido que se haya inmunizado adecuadamente con el DR5 o con un determinante antigénico adecuado basado en el mismo o derivado del mismo, tal como una parte, fragmento, región, dominio, lazo antigénico u otro epítopo del mismo. En un aspecto, el determinante antigénico puede ser una parte, región, dominio, lazo extracelular, u otros epítopos extracelulares.

En los métodos anteriores, el conjunto, colección o biblioteca de las secuencias de nucleótidos se puede exhibir sobre un fago, fagémido, ribosoma, o microorganismo adecuado (tal como levadura), tal como con el objeto de facilitar el rastreo. Los métodos, técnicas y organismos huésped adecuados para exhibir y rastrear (un conjunto, colección o biblioteca de) secuencias de nucleótidos que codifiquen las secuencias de aminoácidos estarán claros para la persona experta en este campo, por ejemplo, con base en la divulgación adicional en la presente. También se hace referencia a la Publicación Internacional Número WO 03/054016 y a Hoogenboom en Nature Biotechnology, 23, 9, 1105-1116 (2005).

En una modalidad, el paso de detección de los métodos descritos en la presente también se puede llevar a cabo como un paso de selección. De conformidad con lo anterior, el término “rastreo”, como se utiliza en la presente descripción, puede comprender la selección, el rastreo, o cualquier combinación adecuada de técnicas de selección y/o de rastreo. También, cuando se utiliza un conjunto, colección o biblioteca de las secuencias, puede contener cualquier número adecuado de secuencias, tal como 1, 2, 3, o aproximadamente 5, 10, 50, 100, 500, 1000, 5000, 10^4, 10^5, 10^6, 10^7, 10^8 o más secuencias.

En una modalidad, una o más o todas las secuencias en el conjunto, colección o biblioteca anterior de las secuencias de aminoácidos, se pueden obtener o definir mediante planteamientos racionales o semi-empíricos, tales como técnicas de modelación por computadora o técnicas biostáticas o de cavado de datos.

Adicionalmente, este conjunto, colección o biblioteca puede comprender una, dos o más secuencias que son variantes unas de otras (por ejemplo, con mutaciones puntuales diseñadas o con posiciones aleatoriamente seleccionadas), comprometer múltiples secuencias derivadas a partir de un conjunto diverso de secuencias naturalmente diversificadas (por ejemplo, una biblioteca inmunitaria)), o cualquier otra fuente de secuencias diversas (como se describen, por ejemplo, en Hoogenboom y colaboradores, Nat Biotechnol 23: 1105, 2005, y Binz y colaboradores, Nat Biotechnol 2005, 23: 1247). Este conjunto, colección o biblioteca de las secuencias se puede exhibir sobre la superficie de una partícula de fago, un ribosoma, una bacteria, una célula de levadura, una célula de mamífero, y se enlaza a la secuencia de nucleótidos que codifica la secuencia de aminoácidos dentro de estos vehículos. Esto hace que este conjunto, colección, o biblioteca susceptible a los procedimientos de selección para aislar las secuencias de aminoácidos deseadas de la invención. En términos más generales, cuando se exhibe una secuencia en un huésped o en una célula huésped adecuada, también es posible (y acostumbrado) aislar primero, a partir de este huésped o de esta célula huésped, una secuencia de nucleótidos que codifique la secuencia deseada, y entonces, obtener la secuencia deseada mediante la expresión adecuada de esta secuencia de nucleótidos en un organismo huésped adecuado. Nuevamente, esto se puede llevar a cabo de cualquier manera adecuada conocida por sí misma, como quedará claro para la persona experta.

Todavía otra técnica para obtener las secuencias V_{HH}, las secuencias V_H, o alguna otra variante de las secuencias del agente NB dirigidas contra el DR5 involucra inmunizar adecuadamente un

mamífero transgénico que sea capaz de expresar anticuerpos de cadena pesada (es decir, como para provocar una respuesta inmunitaria y/o anticuerpos de cadena pesada dirigidos contra el DR5), obtener una muestra biológica adecuada a partir del mamífero transgénico que contenga (las secuencias de ácidos nucleicos que codifiquen) estas secuencias (tales como una muestra de sangre, una muestra de suero, o una muestra de células-B), y entonces generar la secuencias del agente NB dirigidas contra el DR5, empezando a partir de esa muestra, utilizando cualquier técnica adecuada conocida por sí misma (tal como cualquiera de los métodos descritos en la presente o una técnica de hibridoma). Por ejemplo, para este propósito, se pueden utilizar los ratones que expresan el anticuerpo de cadena pesada y los métodos y técnicas adicionales descritas en las Publicaciones Internacionales Números WO 02/085945, WO 04/049794 y WO 06/008548, y en Janssen y colaboradores, Proc. Natl. Acad. Sci. EUA. 10 de Octubre de 2006; 103(41): 15130-5. Por ejemplo, estos ratones que expresan el anticuerpo de cadena pesada pueden expresar los anticuerpos de cadena pesada con cualquier dominio variable (individual) adecuado, tal como los dominios variables (individuales) a partir de las fuentes naturales (por ejemplo, los dominios variables (individuales) humanos, los dominios variables (individuales) de Camélido, o los dominios variables (individuales) de tiburón), así como, por ejemplo, los dominios variables (individuales) sintéticos o semi-sintéticos.

En una modalidad, la invención se refiere a las secuencias del agente NB que se obtienen mediante los métodos anteriores, o de una manera alternativa, mediante un método que comprende uno de los métodos anteriores, y en adición, cuando menos los pasos de determinar la secuencia de nucleótidos o la secuencia de aminoácidos de la secuencia del agente NB; y de expresar o sintetizar la secuencia del agente NB de una manera conocida por sí misma, tal como mediante la expresión en una célula huésped o en un organismo huésped adecuado, o mediante síntesis química.

En una modalidad, la invención proporciona una clase de los

agentes NB que comprende construcciones V_{HH} de camélido con una secuencia de aminoácidos que corresponde a la secuencia de aminoácidos de un dominio V_{HH} de llama que se presenta naturalmente, pero que se ha “humanizado”, es decir, mediante el reemplazo de uno o más residuos de aminoácidos en la secuencia de aminoácidos de esta secuencia V_{HH} que se presenta naturalmente (y en particular en las secuencias de estructura, pero también opcionalmente en una o más CDR) por uno o más de los residuos de aminoácidos que se presentan en las posiciones correspondientes en un dominio V_H a partir de un anticuerpo de cuatro cadenas convencional de un ser humano, por ejemplo, como se indica anteriormente, y por ejemplo, como se describe adicionalmente en, y utilizando las técnicas mencionadas en, la página 63 de la Publicación Internacional Número WO 08/020079. En una modalidad, la invención proporciona una clase de los agentes NB que comprende una secuencia de aminoácidos que corresponde a la secuencia de aminoácidos de un dominio V_H que se presenta naturalmente, pero que se ha “camelizado”, es decir, mediante el reemplazo de uno o más residuos de aminoácidos en la secuencia de aminoácidos de un dominio V_H que se presenta naturalmente a partir de un anticuerpo de cuatro cadenas convencional por uno o más de los residuos de aminoácidos que se presentan en las posiciones correspondientes en el dominio V_{HH} de un anticuerpo de cadena pesada, por ejemplo, como se describe adicionalmente en, y utilizando las técnicas mencionadas en, la página 63 de la Publicación Internacional Número WO 08/020079.

Otros métodos y técnicas adecuadas para obtener los agentes NB de la invención (incluyendo los polipéptidos y/o los ácidos nucleicos que los codifican), empezando a partir de las secuencias V_H o las secuencias V_{HH} que se presentan naturalmente, quedarán claras para la persona experta y, por ejemplo, pueden incluir las técnicas que se mencionan en la página 64 de la Publicación Internacional Número WO 08/020079.

Como se menciona en la presente, los agentes NB se pueden

caracterizar en particular por la presencia de uno o más "*residuos Hallmark*" (como se describen en la Publicación Internacional Número WO 2008/020079, páginas 65-98) en una o más de las secuencias de estructura.

En una modalidad, los agentes NB, por ejemplo, pueden ser secuencias V_{HH} o puede ser construcciones de NB humanizadas o adicionalmente humanizadas. Cuando las secuencias del agente NB son secuencias V_{HH}, se pueden humanizar adecuadamente. Cuando los agentes NB son construcciones de NB parcialmente humanizadas, opcionalmente se pueden humanizar de manera adicional adecuadamente. En los agentes NB anteriores, uno o más de los residuos Hallmark adicionales son de preferencia como se describen (por ejemplo, cuando son secuencias V_{HH} o construcciones de NB parcial o completamente humanizadas).

Los agentes NB de la presente, por ejemplo, pueden ser secuencias V_{HH} o pueden ser humanizadas o humano-diseñadas (humaneered). Cuando las secuencias de los agentes NB anteriores son secuencias V_{HH}, se pueden humanizar adecuadamente, como se dispone en la presente. Cuando los agentes NB son parcialmente humanizados, opcionalmente se pueden humanizar de manera adicional adecuadamente, como se describe en la presente. Se proporciona un método de humanización no limitante y de ejemplo en los Ejemplos, pero se pueden contemplar otros métodos conocidos en la técnica.

En una modalidad de los agentes NB anteriores, uno o más de los residuos Hallmark (adicionales) son como se describen en la presente (por ejemplo, cuando son secuencias V_{HH} de camélido o construcciones V_{HH} parcial o completamente humanizadas).

En un aspecto no limitante, la invención se refiere a agentes NB como se describen anteriormente, en donde las secuencias de CDR tienen cuando menos el 70 por ciento de identidad de aminoácidos, de preferencia cuando menos el 80 por ciento de identidad de aminoácidos, más preferiblemente cuando menos el 90 por ciento de identidad de aminoácidos, tal como cuando menos el

95 por ciento de identidad de aminoácidos o más, o incluso esencialmente el 100 por ciento de identidad de aminoácidos con las secuencias de CDR de cuando menos una de las secuencias de aminoácidos de las SEQ ID NOs: 1-22, 26-40, 87-88, y 103-104. Este grado de identidad de aminoácidos, por ejemplo, se puede determinar mediante la determinación del grado de identidad de aminoácidos (de una manera descrita en la presente) entre los agentes NB y una o más de las secuencias de las SEQ ID NOs: 1-22, 26-40, 87-88, y 103-104, en donde no se consideran los residuos de aminoácidos que forman las regiones de estructura. Los agentes NB se pueden modificar como se describe adicionalmente en la presente.

Como ya se mencionó en la presente, otro aspecto preferido pero no limitante de la invención se refiere a un agente NB con una secuencia de aminoácidos que se selecciona a partir del grupo que consiste en las SEQ ID NOs: 1-22, 26-40, 87-88, y 103-104, o a partir del grupo que consiste en las secuencias de aminoácidos que tienen más del 80 por ciento, de preferencia más del 90 por ciento, más preferiblemente más del 95 por ciento, tal como cuando menos el 99 por ciento o más de identidad de secuencia con cuando menos una de las secuencias de aminoácidos de las SEQ ID NOs: 1-22, 26-40, 87-88, y 103-104.

En las modalidades particulares de los agentes NB anteriores:

i) cualquier sustitución de aminoácido (cuando no es una sustitución de humanización como se define en la presente) es de preferencia, y comparándose con la secuencia de aminoácidos correspondiente de las SEQ ID NOs: 1-22, 26-40 y 87-88, una sustitución de aminoácido conservadora;

y/o:

ii) su secuencia de aminoácidos de preferencia contiene ya sea solamente sustituciones de aminoácidos, o de otra manera de preferencia no más de 5, de preferencia no más de 3, y de una manera muy preferible solamente 1 ó 2 supresiones o inserciones de aminoácidos, comparándose con la secuencia de aminoácidos

correspondiente de las SEQ ID NOs: 1-22, 26-40 y 87-88;

y/o

iii) las regiones determinantes de complementariedad (CDRs) pueden ser CDRs que se deriven por medio de maduración de afinidad, por ejemplo, empezando a partir de las regiones determinantes de complementariedad (CDRs) de la secuencia de aminoácidos correspondiente de las SEQ ID NOs: 1-22, 26-40 y 87-88.

De preferencia, las secuencias de CDR y las secuencias de FR en los agentes NB de la invención son tales que los agentes NB de la invención (y los polipéptidos que las comprenden):

a) se enlazan al DR5, por ejemplo, al DR5 humano, con una constante de disociación (K_D) de 10^{-5} a 10^{-12} moles/litro o menos, y de preferencia de 10^{-7} a 10^{-12} moles/litro o menos, y de una manera muy preferible de 10^{-8} a 10^{-12} moles/litro (es decir, con una constante de disociación (K_A) de 10^5 a 10^{12} litros/moles o más, y de preferencia de 10^7 a 10^{12} litros/moles o más, y de una manera muy preferible de 10^8 a 10^{12} litros/moles);

y/o de tal manera que:

b) se enlazan al DR5, por ejemplo, el DR5 humano, con un índice $k_{activado}$ de entre 10^2 $M^{-1}s^{-1}$ y aproximadamente 10^7 $M^{-1}s^{-1}$, de preferencia de entre 10^3 $M^{-1}s^{-1}$ y 10^7 $M^{-1}s^{-1}$, más preferiblemente de entre 10^4 $M^{-1}s^{-1}$ y 10^7 $M^{-1}s^{-1}$, tal como de entre 10^5 $M^{-1}s^{-1}$ y 10^7 $M^{-1}s^{-1}$;

y/o de tal manera que:

c) se enlazan al DR5, por ejemplo, el DR5 humano, con un índice $k_{desactivado}$ de entre $1s^{-1}$ ($t_{1/2}$=0.69 s) y 10^{-6} s^{-1} (proporcionando un complejo casi irreversible con un $t_{1/2}$ de múltiples días), de preferencia de entre 10^{-2} s^{-1} y 10^{-6} s^{-1}, más preferiblemente de entre 10^{-3} s^{-1} y 10^{-6} s^{-1}, tal como de entre 10^{-4} s^{-1} y 10^{-6} s^{-1}.

En una modalidad, las secuencias de CDR y las secuencias de FR presentes en los agentes NB de la invención son tales que los agentes NB de la invención se enlazarán al DR5, por ejemplo, al DR5 humano, con una afinidad menor de 500 nM, de preferencia menor de 200 nM, más preferiblemente menor de 10 nM, tal como menor de

500 pM.

En un aspecto no limitante de la invención, un agente NB puede ser como se dispone en la presente, pero con la condición de que tenga cuando menos “una diferencia de aminoácido” en cuando menos una de las regiones de estructura comparándose con la región de estructura correspondiente de un dominio V_H que se presenta naturalmente, y en particular comparándose con la región de estructura correspondiente del DP-47. De una manera más específica, de acuerdo con un aspecto no limitante de la invención, un agente NB puede ser como se dispone en la presente, pero con la condición de que tenga cuando menos “una diferencia de aminoácido” en cuando menos uno de los residuos Hallmark (incluyendo aquéllos en las posiciones 108, 103 y/o 45) comparándose con la región de estructura correspondiente de un dominio V_H que se presenta naturalmente, y en particular comparándose con la región de estructura correspondiente del DP-47. Usualmente, un agente NB tendrá cuando menos una diferencia de aminoácido con un dominio V_H que se presenta naturalmente en cuando menos una de las FR2 y/o FR4, y en particular en cuando menos uno de los residuos Hallmark en las FR2 y/o FR4 (nuevamente, incluyendo aquéllos en las posiciones 108, 103 y/o 45).

En una modalidad, un agente NB humanizado de la invención puede ser como se dispone en la presente, pero con la condición de que tenga cuando menos “una diferencia de aminoácido” en cuando menos una de las regiones de estructura comparándose con la región de estructura correspondiente de un dominio V_{HH} que se presenta naturalmente. De una manera más específica, de acuerdo con un aspecto no limitante de la invención, un agente NB humanizado puede ser como se dispone en la presente, pero con la condición de que tenga cuando menos “una diferencia de aminoácido” en cuando menos uno de los residuos Hallmark (incluyendo aquéllos en las posiciones 108, 103 y/o 45) comparándose con la región de estructura correspondiente de un dominio V_{HH} que se presenta

naturalmente. Usualmente, un agente NB humanizado tendrá cuando menos una diferencia de aminoácido con un dominio V_{HH} que se presenta naturalmente en cuando menos una de las FR2 y/o FR4, y en particular en cuando menos uno de los residuos Hallmark en las FR2 y/o FR4 (nuevamente, incluyendo aquéllos en las posiciones 108, 103 y/o 45).

Como estará claro a partir de la divulgación en la presente, está dentro del alcance de la invención utilizar análogos, mutantes, variantes, alelos, homólogos, y ortólogos naturales o sintéticos (en la presente colectivamente referidos como “análogos”) de los agentes NB de la invención, como se dispone en la presente, y en particular análogos de las construcciones de NB de las SEQ ID NOs: 1-22, 26-40, 87-88, y 103-104, y de las SEQ ID NOs: 96-99. Por consiguiente, de acuerdo con un aspecto de la invención, el término “agentes NB de la invención” y el término “construcciones de NB de la invención” en su sentido más amplio, también cubren estos análogos.

En términos generales, en estos análogos, uno o más residuos de aminoácidos pueden haber sido reemplazados, suprimidos y/o agregados, comparándose con los agentes NB de la invención, como se dispone en la presente. Estas sustituciones, inserciones o supresiones se pueden hacer en una o más de las regiones de estructura y/o en una o más de las regiones determinantes de complementariedad (CDRs). Cuando estas sustituciones, inserciones o supresiones se hacen en una o más de las regiones de estructura, se pueden hacer en uno o más de los residuos Hallmark y/o en una o más de las otras posiciones en los residuos de estructura, aunque las sustituciones, inserciones o supresiones en los residuos Hallmark son en general menos preferidas (a menos que éstas sean sustituciones de humanización adecuadas, como se describen en la presente).

Por medio de los ejemplos no limitantes, una sustitución, por ejemplo, puede ser una sustitución conservadora (como se describe en la presente), y/o un residuo de aminoácido puede ser reemplazado por otro residuo de aminoácido que se presente

naturalmente en la misma posición en otro dominio V_{HH} (véase, por ejemplo, la Publicación Internacional Número WO 2008/020079 para ver los ejemplos no limitantes de estas sustituciones), aunque la invención en general no está limitada a los mismos. Por consiguiente, cualquiera o más sustituciones, supresiones o inserciones, o cualquier combinación de las mismas, ya sea que mejoren las propiedades de los agentes NB de la invención, o bien que cuando menos no detracten demasiado las propiedades deseadas o el balance o la combinación de propiedades deseadas de los agentes NB de la invención (es decir, hasta el grado en que el agente NB ya no sea adecuado para su uso pretendido) se incluyen dentro del alcance de la invención. Una persona experta será capaz de determinar y seleccionar en general las sustituciones, supresiones o inserciones adecuadas, o las combinaciones adecuadas de las mismas, basándose en la divulgación de la presente, y opcionalmente después de un grado limitado de experimentación de rutina, la cual, por ejemplo, puede involucrar la introducción de un número limitado de posibles sustituciones, y determinar su influencia sobre las propiedades de los agentes NB obtenidos de esta manera.

En un aspecto, dependiendo del organismo huésped utilizado para expresar el agente NB (es decir, un polinucleótido o polipéptido de la invención), estas supresiones y/o sustituciones se pueden diseñar de tal manera que se remueven uno o más sitios para la modificación posterior a la traducción (tales como uno o más sitios de glicosilación), como estará dentro de la capacidad de la persona experta en la materia. De una manera alternativa, se pueden diseñar sustituciones o inserciones como para introducir uno o más sitios para la unión de los grupos funcionales (como se describe en la presente), por ejemplo, para permitir la pegilación específica del sitio (nuevamente como se describe en la presente).

Como se proporciona en la Publicación Internacional Número WO 2008/020079 con respecto a las posibles sustituciones de aminoácidos y como se presenta anteriormente, algunos residuos de

aminoácidos en las regiones de estructura están más conservados que otros. En un aspecto, aunque la invención en su sentido más amplio no está limitada a las mismas, cualesquiera sustituciones, supresiones o inserciones de preferencia se hacen en las posiciones que están menos conservadas. En un aspecto no limitante, se prefieren las sustituciones de aminoácidos sobre las supresiones o inserciones de aminoácidos.

En un aspecto no limitante, los análogos son tales que pueden enlazarse al DR5 con una afinidad (de una manera adecuada medida y/o expresada como un valor K_D (real o aparente), un valor K_A (real o aparente), un índice $k_{activado}$ y/o un índice $k_{desactivado}$, o de una manera alternativa, como un valor IC_{50}, como se describe adicionalmente en la presente), que es como se dispone en la presente, para los agentes NB de la invención.

En un aspecto no limitante, los análogos son tales que conservan las propiedades favorables de los agentes NB, como se describe en la presente.

En una modalidad, los análogos tienen un grado de identidad de secuencia de cuando menos el 70 por ciento, de preferencia de cuando menos el 80 por ciento, más preferiblemente de cuando menos el 90 por ciento, tal como de cuando menos el 95 por ciento o el 99 por ciento o más; y/o de preferencia tienen cuando mucho 20, de preferencia cuando mucho 10, todavía más preferiblemente cuando mucho 5, tal como 4, 3, 2 o solamente 1 diferencia de aminoácido, con una de las construcciones de NB de las SEQ ID NOs: 1-22, 26-40, 87-88, y 103-104.

En un aspecto no limitante, las secuencias de estructura y las regiones determinantes de complementariedad (CDRs) de los análogos tendrán: (a) un Q en la posición 108; y/o (b) un aminoácido cargado o un residuo de cisteína en la posición 45 y de preferencia un E en la posición 44, y de una manera muy preferible E en la posición 44 y R en la posición 45; y/o (c) P, R o S en la posición 103.

En un aspecto no limitante, una clase de análogos de los agentes NB de la invención comprenden los agentes NB que se han

humanizado (es decir, comparándose con la secuencia de los agentes NB que se presentan naturalmente de la invención). Como se menciona en la técnica antecedente citada en la presente, la humanización en términos generales involucra reemplazar uno o más residuos de aminoácidos en la secuencia de una V_{HH} que se presenta naturalmente, con los residuos de aminoácidos que se presentan en la misma posición en un dominio V_H humano, tal como un dominio V_H3 humano. Los ejemplos de las posibles sustituciones de humanización o combinaciones de las sustituciones de humanización quedarán claros para la persona experta, por ejemplo, a partir de las Tablas de la presente, a partir de las posibles sustituciones de humanización mencionadas en la técnica antecedente citada en la presente, y/o a partir de una comparación entre la secuencia de un agente NB y la secuencia de un dominio V_H que se presenta naturalmente.

En un aspecto no limitante, las sustituciones de humanización se seleccionan de tal manera que los agentes NB humanizados resultantes todavía conservan las propiedades favorables de los agentes NB como se dispone en la presente, y además de tal manera que son como se describe para los análogos en los párrafos anteriores. Una persona experta será capaz de determinar y seleccionar las sustituciones de humanización generalmente adecuadas o las combinaciones adecuadas de las sustituciones de humanización, basándose en la divulgación de la presente, y opcionalmente después de un grado limitado de experimentación de rutina, la cual, por ejemplo, puede involucrar introducir un número limitado de las posibles sustituciones de humanización, y determinar su influencia sobre las propiedades de los agentes NB obtenidos de esta manera.

En un aspecto no limitante, como un resultado de la humanización, los agentes NB de la invención pueden llegar a ser más “tipo humanos”, mientras que todavía conserven las propiedades favorables de los agentes NB de la invención, como se describe en la presente. Como un resultado, los agentes NB humanizados pueden

tener varias ventajas, tales como una inmunogenicidad reducida, comparándose con los dominios V_{HH} que se presentan naturalmente correspondientes. Nuevamente, basándose en la divulgación de la presente, y opcionalmente después de un grado limitado de experimentación de rutina, la persona experta será capaz de seleccionar las sustituciones de humanización o las combinaciones adecuadas de las sustituciones de humanización que optimizan o logran un equilibrio deseado o adecuado entre las propiedades favorables proporcionadas por las sustituciones de humanización por una parte, y las propiedades favorables de los dominios V_{HH} que se presentan naturalmente, por otra parte.

Los agentes NB de la invención se pueden humanizar adecuadamente en cualesquiera residuos de estructura, tal como en uno o más residuos Hallmark, o en uno o más residuos de estructura diferentes (es decir, residuos que no son Hallmark) o cualquier combinación adecuada de los mismos. Una sustitución de humanización preferida para los agentes NB del “grupo P,R,S-103” o del “grupo KERE” es Q108 en L108. Los agentes NB de la “clase GLEW” también se pueden humanizar mediante una sustitución de Q108 en L108, en el entendido de que cuando menos uno de los otros residuos Hallmark contenga una sustitución de camélido (camelizante). Por ejemplo, como se menciona en la presente, una clase particularmente preferida de los agentes NB humanizados tiene una secuencia GLEW o una secuencia tipo GLEW en las posiciones 44-47; P, R o S (y en particular R) en la posición 103, y un L en la posición 108.

Los análogos humanizados y otros análogos, y las secuencias de ácidos nucleicos que los codifican, se pueden proporcionar de cualquier manera conocida por sí misma, por ejemplo, empleando una o más de las técnicas mencionadas en páginas 103 y 104 de la Publicación Internacional Número WO 08/020079.

En un aspecto no limitante, una clase de análogos de los agentes NB de la invención comprende los agentes NB que se han humanizado (es decir, comparándose con la secuencia de un agente

NB que se presenta naturalmente de la invención). Como se menciona en la técnica antecedente citada en la presente, la humanización en términos generales involucra reemplazar uno o más residuos de aminoácidos en la secuencia de una V_{HH} que se presenta naturalmente, con los residuos de aminoácidos que se presentan en la misma posición en un dominio V_H humano, tal como un dominio V_H3 humano. Los ejemplos de las posibles sustituciones de humanización o de las combinaciones de las sustituciones de humanización, quedarán claros para la persona experta, por ejemplo, a partir de las Tablas de la presente, a partir de las posibles sustituciones de humanización mencionadas en la técnica antecedente citada en la presente, y/o a partir de una comparación entre la secuencia de un agente NB y la secuencia de un dominio V_H que se presente naturalmente.

En un aspecto no limitante, las sustituciones de humanización se seleccionan de tal manera que los agentes NB humanizados resultantes todavía conservan las propiedades favorables de los agentes NB, como se dispone en la presente, y de una manera muy preferible, de tal manera que son como se describe para los análogos en los párrafos anteriores. Una persona experta será capaz de determinar y seleccionar las sustituciones de humanización generalmente adecuadas o las combinaciones adecuadas de las sustituciones de humanización, basándose en la divulgación de la presente, y opcionalmente después de un grado limitado de experimentación de rutina, la cual, por ejemplo, puede involucrar introducir un número limitado de las posibles sustituciones de humanización, y determinar su influencia sobre las propiedades de los agentes NB obtenidos de esta manera.

En términos generales, como un resultado de la humanización, los agentes NB de la invención pueden llegar a ser más "tipo humanos", mientras que todavía conservan las propiedades favorables de los agentes NB de la invención, como se describe en la presente. Como un resultado, los agentes NB humanizados pueden tener varias ventajas, tales como una inmunogenicidad reducida,

comparándose con los dominios V_{HH} que se presentan naturalmente correspondientes. Nuevamente, basándose en la divulgación de la presente, y opcionalmente después de un grado limitado de experimentación de rutina, la persona experta será capaz de seleccionar las sustituciones de humanización o las combinaciones adecuadas de las sustituciones de humanización que optimicen o logren un equilibrio deseado o adecuado entre las propiedades favorables proporcionadas por las sustituciones de humanización por una parte, y las propiedades favorables de los dominios V_{HH} que se presentan naturalmente, por otra parte.

Los agentes NB de la invención se pueden humanizar adecuadamente en cualesquiera residuos de estructura, tal como en uno o más residuos Hallmark (como se definen en la Publicación Internacional Número WO 2008/020079) o en uno o más residuos de estructura diferentes (es decir, residuos que no son Hallmark), o cualquier combinación adecuada de los mismos.

Los análogos humanizados y otros análogos, y las secuencias de ácidos nucleicos que los codifican, se pueden proporcionar de cualquier manera conocida por sí misma. Por ejemplo, los análogos se pueden obtener proporcionando un ácido nucleico que codifique un dominio V_{HH} que se presente naturalmente, cambiar los codones para el uno o más residuos de aminoácidos que van a ser sustituidos en los codones por los residuos de aminoácidos deseados correspondientes (por ejemplo, mediante mutagénesis dirigida al sitio o mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR) utilizando cebadores de malos emparejamientos adecuados), expresar la secuencia de ácido nucleico/de nucleótidos obtenida de esta manera en un huésped o sistema de expresión adecuado; y opcionalmente aislar y/o purificar el análogo obtenido de esta manera, para proporcionar este análogo en una forma esencialmente aislada (por ejemplo, como se describe adicionalmente en la presente).

Esto se puede llevar a cabo en términos generales empleando los métodos y las técnicas conocidas por sí mismas, las cuales quedarán claras para la persona experta, por ejemplo, a partir de los

libros de texto y las referencias citadas en la presente, la técnica antecedente citada en la presente, y/o a partir de la descripción adicional en la presente. De una manera alternativa, un ácido nucleico que codifique el análogo deseado se puede sintetizar de una manera conocida por sí misma (por ejemplo utilizando un aparato automatizado para sintetizar las secuencias de ácidos nucleicos con una secuencia de aminoácidos previamente definida), y entonces se puede expresar como se describe en la presente. Todavía otra técnica puede involucrar la combinación de una o más secuencias de ácidos nucleicos que se presentan naturalmente y/o sintéticas, cada una codificando una parte del análogo deseado, y entonces expresar la secuencia de ácido nucleico combinada, como se describe en la presente. También, los análogos se pueden proporcionar utilizando una síntesis química de la secuencia de aminoácidos pertinente, empleando técnicas para la síntesis de péptidos conocidas por sí mismas, tales como aquéllas mencionadas en la presente.

En este aspecto, también quedará claro para la persona experta, que los agentes NB de la invención (incluyendo sus análogos) se pueden diseñar y/o preparar empezando a partir de las secuencias V_H humanas (es decir, las secuencias de aminoácidos o las secuencias de nucleótidos correspondientes), tales como, por ejemplo, a partir de las secuencias V_H3 humanas, tales como DP-47, DP-51 o DP-29, es decir, mediante la introducción de una o más sustituciones camelizantes (es decir, cambiar uno o más residuos de aminoácidos en la secuencia de aminoácidos del dominio V_H humano en los residuos de aminoácidos que se presentan en la posición correspondiente en un dominio V_{HH}), como para proporcionar la secuencia de un agente NB de la invención y/o como para conferir las propiedades favorables de un agente NB a la secuencia obtenida de esta manera. Nuevamente, esto se puede llevar a cabo en términos generales empleando los diferentes métodos y técnicas referidas en el párrafo anterior, utilizando una secuencia de aminoácidos y/o una secuencia de nucleótidos para un dominio V_H

humano como un punto de partida.

Como se menciona, estará claro para la persona experta que los agentes NB de la invención (incluyendo sus análogos) se pueden diseñar y/o preparar empezando a partir de las secuencias V_H humanas (es decir, las secuencias de aminoácidos o las secuencias de nucleótidos correspondientes), tales como, por ejemplo, a partir de las secuencias V_H3 humanas, tales como DP-47, DP-51 o DP-29, es decir, mediante la introducción de una o más sustituciones camelizantes (es decir, cambiar uno o más residuos de aminoácidos en la secuencia de aminoácidos del dominio V_H humano en los residuos de aminoácidos que se presentan en la posición correspondiente en un dominio V_{HH}), como para proporcionar la secuencia de un agente NB de la invención y/o como para conferir las propiedades favorables de un agente NB a la secuencia obtenida de esta manera. Nuevamente, esto se puede llevar a cabo en términos generales empleando los diferentes métodos y técnicas referidas en el párrafo anterior, utilizando una secuencia de aminoácidos y/o una secuencia de nucleótidos para un dominio V_H humano como un punto de partida.

Algunas sustituciones camelizantes no limitantes se pueden derivar a partir de la Publicación Internacional Número WO 2008/020079. Quedará claro que las sustituciones camelizantes en uno o más de los residuos Hallmark tendrán en general una mayor influencia sobre las propiedades deseadas, que las sustituciones en una o más de las otras posiciones de aminoácidos, aunque se incluyen ambas y cualquier combinación adecuada de las mismas dentro del alcance de la invención. Por ejemplo, es posible introducir una o más sustituciones camelizantes que ya confieran cuando menos algunas propiedades deseadas, y entonces introducir otras sustituciones camelizantes ya sea que mejoren adicionalmente esas propiedades y/o confieran propiedades favorables adicionales. Nuevamente, la persona experta será capaz de determinar y seleccionar las sustituciones camelizantes generalmente adecuadas o las combinaciones adecuadas de las sustituciones camelizantes,

basándose en la divulgación de la presente, y opcionalmente después de un grado limitado de experimentación de rutina, la cual, por ejemplo, puede involucrar introducir un número limitado de posibles sustituciones camelizantes, y determinar si se obtienen o se mejoran las propiedades favorables de los agentes NB (es decir, comparándose con el dominio original V_H original).

En un aspecto no limitante, las sustituciones camelizantes son tales que la secuencia de aminoácidos resultante cuando menos contiene: (a) un Q en la posición 108; y/o (b) un aminoácido cargado o un residuo de cisteína en la posición 45, y de preferencia también un E en la posición 44, y de una manera muy preferible E en la posición 44 y R en la posición 45; y/o (c) P, R o S en la posición 103; y opcionalmente una o más sustituciones camelizantes adicionales. En un aspecto no limitante, las sustituciones camelizantes son tales que dan como resultado un agente NB de la invención y/o un análogo del mismo, tal como un análogo humanizado y/o de preferencia un análogo que es como se proporciona en los párrafos anteriores.

Como también quedará claro a partir de la divulgación en la presente, también está dentro del alcance de la invención utilizar partes o fragmentos, o combinaciones de dos o más partes o fragmentos, de los agentes NB de la invención, como se dispone en la presente, y en particular partes o fragmentos de los agentes NB de las SEQ ID NOs: 1-22, 26-40, 87-88, y 103-104, y de las SEQ ID NOs: 96-99. Por consiguiente, de acuerdo con un aspecto de la invención, el término “agentes NB de la invención”, en su sentido más amplio, también cubre esas partes o fragmentos.

En términos generales, las partes o fragmentos de los agentes NB de la invención (incluyendo los análogos de los mismos) tienen secuencias de aminoácidos en donde, comparándose con la secuencia de aminoácidos del agente NB de longitud completa correspondiente de la invención (o del análogo del mismo), se han suprimido y/o removido uno o más de los residuos de aminoácidos en el extremo N-terminal, uno o más residuos de aminoácidos en el extremo C-terminal, uno o más residuos de aminoácidos internos

contiguos, o cualquier combinación de los mismos.

Las partes o los fragmentos son de preferencia tales que pueden enlazarse a un DR5, por ejemplo, el DR5 humano, con una afinidad (de una manera adecuada medida y/o expresada como un valor K_D (real o aparente), un valor K_A (real o aparente), un índice $k_{activado}$ y/o un índice $k_{desactivado}$, o de una manera alternativa, como un valor IC_{50}, como se describe adicionalmente en la presente) que es como se dispone en la presente, para los agentes NB de la invención.

Cualquier parte o fragmento es de preferencia tal que comprende cuando menos 10 residuos de aminoácidos contiguos, de preferencia cuando menos 20 residuos de aminoácidos contiguos, más preferiblemente cuando menos 30 residuos de aminoácidos contiguos, tal como cuando menos 40 residuos de aminoácidos contiguos, de la secuencia de aminoácidos del agente NB de longitud completa correspondiente de la invención.

También, cualquier parte o fragmento es tal que de preferencia comprende cuando menos una de las CDR1, CDR2 y/o CDR3, o cuando menos parte de las mismas (y en particular cuando menos la CDR3 o cuando menos parte de la misma). Más preferiblemente, cualquier parte o fragmento es tal que comprende cuando menos una de las regiones determinantes de complementariedad (CDRs) (y de preferencia cuando menos la CDR3 o parte de la misma), y cuando menos otra CDR (es decir, CDR1 o CDR2) o cuando menos parte de la misma, de preferencia conectadas por secuencias de estructura adecuadas o cuando menos parte de las mismas. Más preferiblemente, cualquier parte o fragmento es tal que comprende cuando menos una de las regiones determinantes de complementariedad (CDRs) (y de preferencia cuando menos la CDR3 o parte de la misma), y cuando menos parte de las dos CDRs restantes, nuevamente de preferencia conectadas por secuencias de estructura adecuadas o cuando menos parte de las mismas.

De acuerdo con otro aspecto particularmente preferido, pero no limitante, esa parte o fragmento comprende cuando menos la CDR3,

tal como FR3, CDR3 y FR4 del agente NB de longitud completa correspondiente de la invención, es decir, como se describe, por ejemplo, en la Solicitud Internacional Número WO 03/050531 (Lasters y colaboradores).

Como ya se mencionó en la presente, también es posible combinar dos o más de esas partes o fragmentos (es decir, a partir de los mismos o diferentes agentes NB de la invención), es decir, para proporcionar un análogo y/o para proporcionar partes o fragmentos adicionales de un agente NB de la invención. Por ejemplo, también es posible combinar una o más partes o fragmentos de un agente NB de la invención con una o más partes o fragmentos de un dominio V_H humano.

De acuerdo con un aspecto, las partes o los fragmentos tienen un grado de identidad de secuencia de cuando menos el 50 por ciento, de cuando menos el 60 por ciento, de cuando menos el 70 por ciento, de cuando menos el 80 por ciento, y/o de cuando menos el 90 por ciento, el 95 por ciento, o el 99 por ciento o más con uno de los agentes NB de las SEQ ID NOs: 1-22, 26-40, 87-88, y 103-104, y con las SEQ ID NOs: 96-99.

Las partes y fragmentos, y las secuencias de ácidos nucleicos que los codifican, se pueden proporcionar y opcionalmente combinar de cualquier manera conocida por sí misma. Por ejemplo, esas partes o fragmentos se pueden obtener mediante la inserción de un codón de paro en un ácido nucleico que codifique un agente NB de tamaño completo de la invención, y entonces expresar el ácido nucleico obtenido de esta manera de una manera conocida por sí misma (por ejemplo, como se describe en la presente). De una manera alternativa, los ácidos nucleicos que codifican esas partes o fragmentos se pueden obtener mediante la restricción adecuada de un ácido nucleico que codifique un agente NB de tamaño completo de la invención, o mediante la síntesis de este ácido nucleico de una manera conocida por sí misma. También se pueden proporcionar partes o fragmentos empleando las técnicas para la síntesis de péptidos conocidas por sí mismas.

La invención, en su sentido más amplio, también comprende derivados de los agentes NB de la invención. Estos derivados se pueden obtener en términos generales mediante la modificación, y en particular mediante la modificación química y/o biológica (por ejemplo, enzimática), de los agentes NB de la invención y/o de uno o más de los residuos de aminoácidos que forman los agentes NB de la invención.

Los ejemplos de estas modificaciones, así como los ejemplos de los residuos de aminoácidos dentro de la secuencia del agente NB que se pueden modificar de esta manera (es decir, ya sea sobre la estructura base del polipéptido, pero de preferencia sobre una cadena lateral), los métodos y las técnicas que se pueden utilizar para introducir estas modificaciones y los usos potenciales y las ventajas de estas modificaciones quedarán claros para la persona experta.

En un aspecto no limitante, está modificación involucra la introducción (por ejemplo, mediante enlace covalente o de otra manera adecuada) de uno o más grupos funcionales, de residuos o fracciones en o sobre el agente NB de la invención, y en particular de uno o más grupos funcionales, de residuos o fracciones que confieran una o más propiedades o funcionalidades deseadas al agente NB de la invención. Los ejemplos de estos grupos funcionales quedarán claros para la persona experta.

En un aspecto no limitante, esta modificación comprende la introducción (por ejemplo, mediante enlace covalente o de cualquier otra manera adecuada) de uno o más grupos funcionales que aumenten la vida media, la solubilidad y/o la absorción del agente NB de la invención, que reduzcan la inmunogenicidad y/o la toxicidad del agente NB de la invención, que eliminen o atenúen cualesquiera efectos secundarios indeseables del agente NB de la invención, y/o que confieran otras propiedades convenientes a, y/o que reduzcan las propiedades indeseadas de los agentes NB y/o de los polipéptidos de la invención; o cualquier combinación de dos o más de los anteriores. Los ejemplos de estos grupos funcionales y de las

técnicas para introducirlos quedarán claros para la persona experta, y en términos generales pueden comprender a todos los grupos funcionales y las técnicas mencionadas en la técnica antecedente general citada anteriormente en la presente, así como los grupos funcionales y las técnicas conocidas por sí mismas para la modificación de las proteínas farmacéuticas, y en particular para la modificación de los anticuerpos o fragmentos de anticuerpos (incluyendo ScFvs y los anticuerpos de un solo dominio), para lo cual se hace referencia, por ejemplo, a Remington's Pharmaceutical Sciences, 16ª Edición, Mack Publishing Co., Easton, PA (1980). Estos grupos funcionales, por ejemplo, se pueden enlazar directamente (por ejemplo, de una manera covalente) a un agente NB de la invención, u opcionalmente por medio de un enlazador o separador adecuado, como nuevamente quedará claro para la persona experta.

Una de las técnicas más ampliamente empleadas para aumentar la vida media y/o para reducir la inmunogenicidad de las proteínas farmacéuticas, comprende la unión dentro de un polímero farmacológicamente aceptable adecuado, tal como poli-(etilenglicol) (PEG) o derivados del mismo (tales como metoxi-poli-(etilenglicol) o mPEG). En términos generales, se puede utilizar cualquier forma adecuada de pegilación, tal como la pegilación utilizada en la materia para anticuerpos y fragmentos de anticuerpos (incluyendo, pero no limitándose a, los anticuerpos de (un solo) dominio y los ScFvs); véanse, por ejemplo, Chapman, Nat. Biotechnol., 54, 531-545 (2002); Veronese y Harris, Adv. Drug Deliv. Rev. 54, 453-456 (2003), Harris y Chess, Nat. Rev. Drug. Discov., 2, (2003), y la Publicación Internacional Número WO 04/060965. También hay diferentes reactivos para la pegilación de proteínas comercialmente disponibles, por ejemplo, en Nektar Therapeutics, EUA.

En una modalidad, se utiliza la pegilación dirigida al sitio, en particular por medio de un residuo de cisteína (véase, por ejemplo, Yang y colaboradores, Protein Engineering, 16, 10, 761-770 (2003)). En diferentes modalidades, para este propósito, el PEG está unido a

un residuo de cisteína que se presenta naturalmente en un agente NB de la invención. Un agente NB de la invención se puede modificar como para introducir adecuadamente uno o más residuos de cisteína para la unión de PEG, o una secuencia de aminoácidos que comprenda uno o más residuos de cisteína para la unión de PEG, se puede fusionar con el término N y/o C de un agente NB de la invención, todos empleando las técnicas de diseño de proteínas conocida por sí misma para la persona experta.

En una modalidad, para los agentes NB y las proteínas de la invención, se utiliza un PEG con un peso molecular de más de 5,000, tal como de más de 10,000 y menor de 200,000, tal como menor de 100,000; por ejemplo, en el intervalo de 20,000 a 80,000.

En una modalidad, la modificación comprende una glicosilación enlazada por nitrógeno (N) o enlazada por oxígeno (O), usualmente como parte de la modificación junto con la traducción y/o posterior a la traducción, dependiendo de la célula huésped utilizada para expresar el agente NB o el polipéptido de la invención.

En una modalidad, la modificación puede comprender la introducción de una o más marcas detectables u otros grupos o fracciones generadoras de señales, dependiendo del uso pretendido del agente NB marcado. Las marcas y técnicas adecuadas para unirlas, usarlas, y detectarlas, quedarán claras para la persona experta y, por ejemplo, incluyen, pero no se limitan a, marcas fluorescentes, marcas fosforescentes, marcas quimiluminiscentes, marcas bioluminiscentes, radio-isótopos, metales, quelatos de metales, cationes metálicos, cromóforos y enzimas, tales como aquéllos mencionados en la página 109 de la Publicación Internacional Número WO 08/020079. Otras marcas adecuadas quedarán claras para la persona experta y, por ejemplo, incluyen las fracciones que se pueden detectar utilizando espectroscopía de RMN o ESR.

Los agentes NB marcados y los polipéptidos de la invención, por ejemplo, se pueden utilizar para los ensayos *in vitro*, *in vivo* o *in situ* (incluyendo los inmunoensayos conocidos por sí mismos, tales

como ELISA, RIA, EIA y otros “ensayos de emparedado”, etc.), así como para propósitos de diagnóstico y de toma de imágenes *in vivo*, dependiendo de la elección de la marca específica.

En una modalidad, la modificación puede involucrar la introducción de un grupo quelante, por ejemplo, para quelar uno de los metales o cationes metálicos referidos anteriormente. Los grupos quelantes adecuados incluyen, por ejemplo, sin limitación, ácido dietilen-triamina-penta-acético (DTPA) o ácido etilen-diamina-tetra-acético (EDTA).

En una modalidad, la modificación puede comprender la introducción de un grupo funcional que sea una parte de un par de enlace específico, tal como el par de enlace de biotina-(estrept)avidina. Este grupo funcional se puede utilizar para el enlace del agente NB de la invención a otra proteína, polipéptido o compuesto químico que se enlace a la otra mitad del par de enlace, es decir, a través de la formación del par de enlace. Por ejemplo, un agente NB de la invención se puede conjugar con biotina, y se puede enlazar a otra proteína, polipéptido, compuesto o vehículo conjugado con avidina o estreptavidina. Por ejemplo, este agente NB conjugado se puede utilizar como un reportero, por ejemplo, en un sistema de diagnóstico en donde se conjugue un agente productor de una señal detectable con avidina o estreptavidina. Estos pares de enlace, por ejemplo, también se pueden utilizar para enlazar el agente NB de la invención a un vehículo, incluyendo los vehículos adecuados para propósitos farmacéuticos. Un ejemplo no limitante es el de las formulaciones liposomales descritas por Cao y Suresh, Journal of Drug Targeting, 8, 4, 257 (2000). Estos pares de enlace también se pueden utilizar para enlazar un agente terapéuticamente activo con el agente NB de la invención.

Para algunas aplicaciones, en particular para las aplicaciones en donde se pretenda aniquilar una célula que exprese el objetivo contra el cual se dirijan los agentes NB de la invención (por ejemplo, en el tratamiento de cáncer), o reducir o hacer más lento el crecimiento y/o la proliferación de esta célula, los agentes NB de la

invención también se pueden enlazar a una toxina o a un residuo o una fracción (cito)tóxica. Los ejemplos de las fracciones, los compuestos, o los residuos tóxicos que se pueden enlazar a un agente NB de la invención para proporcionar – por ejemplo – un compuesto citotóxico, estarán claros para la persona experta y, por ejemplo, se pueden encontrar en las referencias de la técnica citadas anteriormente y/o en la descripción adicional en la presente. Un ejemplo es la tecnología denominada como ADEPT^{MR} descrita en la Publicación Internacional Número WO 03/055527.

Otras modificaciones químicas y enzimáticas potenciales estarán claras para la persona experta y están dentro del alcance de la invención. Estas modificaciones también se pueden introducir para propósitos de investigación (por ejemplo, para estudiar las relaciones de función-actividad). Se hace referencia, por ejemplo, a Lundblad y Bradshaw, Biotechnol. Appl. Biochem., 26, 143-151 (1997).

En un aspecto no limitante, los derivados son tales que se enlazan al DR5, por ejemplo, al DR5 humano, con una afinidad (de una manera adecuada medida y/o expresada como un valor K_D (real o aparente), un valor K_A (real o aparente), un índice $k_{activado}$ y/o un índice $k_{desactivado}$, o de una manera alternativa, como un valor IC_{50}, como se describe adicionalmente en la presente) que es como se dispone en la presente, para los agentes NB de la invención.

Como se menciona en la presente, la invención también se refiere a proteínas o polipéptidos que consisten esencialmente en, o que comprenden cuando menos un agente NB de la invención. “Consisten esencialmente en” significa que la secuencia de aminoácidos del polipéptido de la invención es ya sea exactamente igual a la secuencia de aminoácidos de un agente NB de la invención, o bien corresponde a la secuencia de aminoácidos de un agente NB de la invención que tiene un número limitado de residuos de aminoácidos, tal como de 1 a 20 residuos de aminoácidos, por ejemplo, de 1 a 10 residuos de aminoácidos, y de preferencia de 1 a 6 residuos de aminoácidos, tal como 1, 2, 3, 4, 5 ó 6 residuos de aminoácidos, agregados en el extremo amino-terminal, en el extremo

carboxi-terminal, o tanto en el extremo amino-terminal como en el extremo carboxi-terminal de la secuencia de aminoácidos del agente NB.

Estos residuos de aminoácidos pueden o no cambiar, alterar, o influenciar de otra manera apreciablemente las propiedades (biológicas) del agente NB, y pueden o no agregar una funcionalidad adicional al agente NB. Por ejemplo, estos residuos de aminoácidos:

a) pueden comprender un residuo Met N-terminal, por ejemplo, como resultado de la expresión en una célula huésped o un organismo huésped heterólogo; o

b) pueden formar una secuencia de señal o secuencia líder que dirija la secreción del agente NB a partir de una célula huésped después de la síntesis. Los péptidos líder secretores adecuados quedarán claros para la persona experta, y pueden ser como se describe adicionalmente en la presente. Usualmente, esta secuencia líder se enlazará al término N del agente NB, aunque la invención en su sentido más amplio no está limitada a lo mismo; o

c) pueden formar una secuencia o señal que permita que el agente NB se dirija hacia y/o penetre o entre en órganos, tejidos, células, o partes o compartimientos específicos de las células, y/o que permita al agente NB penetrar o cruzar una barrera biológica, tal como una membrana celular, una capa celular, tal como una capa de células epiteliales, un tumor, incluyendo tumores sólidos, o la barrera hematoencefálica. Los ejemplos de estas secuencias de aminoácidos estarán claras para la persona experta, e incluyen aquéllas mencionadas en el párrafo c) de la página 112 de la Publicación Internacional Número WO 08/020079; o

d) pueden formar una “marca”, por ejemplo, una secuencia de aminoácidos o un residuo que permita o facilite la purificación del agente NB, por ejemplo, utilizando técnicas de afinidad dirigidas contra esa secuencia o residuo. Posteriormente, dicha secuencia o residuo se puede remover (por ejemplo, mediante disociación química o enzimática), para proporcionar la secuencia del agente NB (para este propósito, la marca se puede enlazar opcionalmente a la

secuencia del agente NB por medio de una secuencia enlazadora disociable o puede contener un motivo disociable). Algunos ejemplos no limitantes de estos residuos son una o más de cada una de una marca cMyc (SEQ ID NO: 91), múltiples residuos de histidina tal como la marca Hisx6 (SEQ ID NO: 92), o una combinación de una marca cMyc y la marca Hisx6 (SEQ ID NO: 93 o SEQ ID NO: 94), la marca del sustrato de pegilación (SEQ ID NO: 95), residuos de glutationa y otra marca myc (véase, por ejemplo, la SEQ ID NO: 31 de la Publicación Internacional Número WO 06/12282); o

e) pueden ser uno o más residuos de aminoácidos que se hayan funcionalizado y/o que puedan servir como un sitio para la unión de los grupos funcionales. Los residuos de aminoácidos y grupos funcionales adecuados estarán claros para la persona experta, e incluyen, pero no se limitan a, los residuos de aminoácidos y grupos funcionales mencionados en la presente para los derivados de los agentes NB de la invención.

De acuerdo con un aspecto, un polipéptido de la invención comprende un agente NB de la invención que se fusiona en su extremo amino-terminal, en su extremo carboxi-terminal, o tanto en su extremo amino-terminal como en su extremo carboxi-terminal, a cuando menos una secuencia de aminoácidos adicional, es decir, como para proporcionar una proteína de fusión que comprenda al agente NB de la invención y la una o más secuencias de aminoácidos adicionales. Esta fusión es referida en la presente como una “fusión del agente NB”.

La una o más secuencias de aminoácidos adicionales pueden ser cualesquiera secuencias de aminoácidos adecuadas y/o deseadas. Las secuencias de aminoácidos adicionales pueden o no cambiar, alterar, o de otra manera influenciar las propiedades (biológicas) del agente NB, y pueden o no agregar una funcionalidad adicional al agente NB o al polipéptido de la invención. De preferencia, la secuencia de aminoácidos adicional es tal que confiere una o más propiedades o funcionalidades deseadas al agente NB o al polipéptido de la invención.

Por ejemplo, la secuencia de aminoácidos adicional también puede proporcionar un segundo sitio de enlace, cuyo sitio de enlace se puede dirigir contra cualquier proteína, polipéptido, antígeno, determinante antigénico o epítopo deseado (incluyendo, pero no limitándose a, la misma proteína, polipéptido, antígeno, determinante antigénico o epítopo contra el cual se dirija el agente NB de la invención, o contra una proteína, polipéptido, antígeno, determinante antigénico o epítopo diferente).

Los ejemplos de tales secuencias de aminoácidos quedarán claros para la persona experta, y en términos generales pueden comprender todas las secuencias de aminoácidos que se utilizan en las fusiones de péptidos, basándose en los anticuerpos convencionales y fragmentos de los mismos (incluyendo, pero no limitándose a, los ScFvs y los anticuerpos de un solo dominio). Se hace referencia, por ejemplo, a la reseña por Holliger y Hudson, Nature Biotechnology, 23, 9, 1126-1136 (2005).

En un aspecto no limitante, esta secuencia de aminoácidos es una secuencia de aminoácidos que aumenta la vida media, la solubilidad, o la absorción, reduce la inmunogenicidad o la toxicidad, elimina o atenúa los efectos secundarios indeseables, y/o confiere otras propiedades convenientes a, y/o reduce las propiedades indeseadas de, los polipéptidos de la invención, comparándose con el agente NB de la invención por sí mismo. Algunos ejemplos no limitantes de estas secuencias de aminoácidos son las proteínas de suero, tales como albúmina de suero humano (véase, por ejemplo, la Publicación Internacional Número WO 00/27435) o las moléculas hapténicas (por ejemplo, los haptenos que son reconocidos por los anticuerpos circulantes, véase, por ejemplo, la Publicación Internacional Número WO 98/22141).

En particular, se ha descrito en la materia que se pueden utilizar fragmentos de enlace de inmunoglobulinas (tales como los dominios V_H) a la albúmina de suero o a los fragmentos de la misma, para aumentar la vida media. Se hace referencia, por ejemplo, a las Publicaciones Internacionales Números WO 00/27435 y WO

01/077137. De acuerdo con la invención, un agente NB de la invención de preferencia se enlaza ya sea directamente a la albúmina de suero (o a un fragmento adecuado de la misma), o bien por medio de un enlazador adecuado, y en particular por medio de un péptido adecuado enlazado de tal manera que el polipéptido de la invención se puede expresar como una fusión genética (proteína). De acuerdo con un aspecto específico, el agente NB de la invención se puede enlazar a un fragmento de albúmina de suero que comprenda cuando menos el dominio III de la albúmina de suero o parte del mismo. Se hace referencia, por ejemplo, a la Publicación Internacional Número WO 07/112940 de Ablynx N.V.

De una manera alternativa, la secuencia de aminoácidos adicional puede proporcionar un segundo sitio de enlace o unidad de enlace que se dirige contra una proteína de suero (tal como, por ejemplo, albúmina de suero humano u otra proteína de suero, tal como IgG), como para proporcionar una mayor vida media en suero. Tales secuencias de aminoácidos, por ejemplo, incluyen el agente NB descrito más adelante, así como los péptidos pequeños y las proteínas de enlace descritas en las Publicaciones Internacionales Números WO 91/01743, WO 01/45746 y WO 02/076489 y los dAbs descritos en las Publicaciones Internacionales Números WO 03/002609 y WO 04/003019. También se hace referencia a Harmsen y colaboradores, Vaccina, 23 (41); 4926-42, 2005, así como a la Patente Europea Número EP 0 368 684, y a las Publicaciones Internacionales Números WO 2006/122787WO 2008/028977, WO 2008/043821, WO 2008/068280 y WO 2009/127691 por Ablynx N.V.

Tales secuencias de aminoácidos se pueden dirigir en particular contra la albúmina de suero (y más particularmente, contra la albúmina de suero humano) y/o contra la IgG (y más particularmente, contra la IgG humana). Por ejemplo, tales secuencias de aminoácidos pueden ser secuencias de aminoácidos que se dirigen contra la albúmina de suero (humano), y las secuencias de aminoácidos que se pueden enlazar a residuos de aminoácidos sobre la albúmina de suero (humano) que no estén

involucradas en el enlace de la albúmina de suero al FcRn (véase, por ejemplo, la Publicación Internacional Número WO 06/0122787) y/o las secuencias de aminoácidos que son capaces de enlazarse a los residuos de aminoácidos sobre la albúmina de suero que no forman parte del dominio III de la albúmina de suero (véase nuevamente, por ejemplo, la Publicación Internacional Número WO 06/0122787); la secuencias de aminoácidos que tienen o pueden proporcionar un aumento de la vida media (véase, por ejemplo, la Publicación Internacional Número WO 08/028977 por Ablynx N.V); las secuencias de aminoácidos contra la albúmina de suero humano que reaccionan cruzadamente con la albúmina de suero a partir de cuando menos una especie de mamífero, y en particular con cuando menos una especie de primate (tales como, sin limitación, monos a partir del género *Macaca* (tales como, y en particular, monos cinomolgos, conocidos como "cino" (*Macaca fascicularis*) y/o monos Rhesus (*Macaca mulatta*)), y babuinos (*Papio ursinus*), nuevamente se hace referencia a la Solicitud Provisional de Patente de los Estados Unidos de Norteamérica Número 60/843,349); las secuencias de aminoácidos que se pueden enlazar a la albúmina de suero de una manera independiente del pH (véase, por ejemplo, la Solicitud Provisional de Patente de los Estados Unidos de Norteamérica Número 60/850,774 por Ablynx N.V. titulada como "*Amino acid sequences that bind to serum proteins in a manner that is essentially independent of the pH, compounds comprising the same, and uses thereof*", presentada el 11 de Octubre de 2006) y/o las secuencias de aminoácidos que son aglutinantes condicionales (véase, por ejemplo, la Solicitud Provisional de Patente de los Estados Unidos de Norteamérica Número 60/850,775 por Ablynx N.V. titulada como "*Amino acid sequences that bind to a desired molecule in a conditional manner*", presentada el 11 de Octubre de 2006), y las Publicaciones Internacionales Números WO 2006/122787, WO 2008/028977, WO 2008/043821, WO 2008/068280 y WO 2009/127691.

De acuerdo con otro aspecto, la una o más secuencias de

aminoácidos adicionales pueden comprender una o más partes, fragmentos o dominios de anticuerpos de cuatro cadenas convencionales (y en particular, anticuerpos humanos) y/o de anticuerpos de cadena pesada. Por ejemplo, aunque usualmente es menos preferido, un agente NB de la invención se puede enlazar a un dominio V_H o V_L convencional (de preferencia, humano), o a un análogo natural o sintético de un dominio V_H o V_L, de nuevo opcionalmente por medio de una secuencia enlazadora (incluyendo, pero no limitándose a, otros anticuerpos de (un solo) dominio, tales como los dAbs descritos por Ward y colaboradores).

El cuando menos un agente NB puede estar enlazado a uno o más dominios C_H1, C_H2 y/o C_H3 (de preferencia humanos), opcionalmente por medio de una secuencia enlazadora. Por ejemplo, un agente NB enlazado a un dominio C_H1 adecuado se podría utilizar - junto con las cadenas ligeras adecuadas - para generar fragmentos de anticuerpos/estructuras análogas a los fragmentos Fab o los fragmentos $F(ab')_2$ convencionales, pero en donde uno o (en el caso de un fragmento $F(ab')_2$) o ambos de los dominios V_H convencionales han sido reemplazados por un agente NB de la invención. También, dos agentes NB se podrían enlazar a un dominio C_H3 (opcionalmente por medio de un enlazador), para proporcionar una construcción con una mayor vida media *in vivo*.

En un aspecto de la invención, uno o más agentes NB de la invención se enlazan a una o más partes, fragmentos o dominios de anticuerpos que confieran una o más funciones efectoras al polipéptido de la invención, y/o que puedan conferir la capacidad para enlazarse a uno o más receptores Fc. Por ejemplo, para este propósito, y sin limitarse a lo mismo, la una o más secuencias de aminoácidos adicionales pueden comprender uno o más dominios C_H2 y/o C_H3 de un anticuerpo, tal como a partir de un anticuerpo de cadena pesada (como se describe en la presente), y de una manera muy preferible, a partir de un anticuerpo de 4 cadenas humano convencional; y/o pueden formar (parte de), la región Fc, por ejemplo, a partir de IgG, a partir de IgE, o a partir de otra Ig humana.

Por ejemplo, la Publicación Internacional Número WO 94/04678 describe anticuerpos de cadena pesada que comprenden un dominio V_{HH} de Camélido o un derivado humanizado del mismo, en donde los dominios C_H2 y/o C_H3 de Camélido han sido reemplazados por los dominios C_H2 y C_H3 humanos, como para proporcionar una inmunoglobulina que consiste en dos cadenas pesadas, cada una de las cuales comprende un dominio V_{HH} y los dominios C_H2 y C_H3 humanos (pero no el dominio C_H1), cuya inmunoglobulina tiene la función efectora proporcionada por los dominios C_H2 y C_H3 y cuya inmunoglobulina puede funcionar sin la presencia de cadenas ligeras. Otras secuencias de aminoácidos que se pueden enlazar de una manera adecuada a los agentes NB de la invención como para proporcionar una función efectora quedarán claras para la persona experta, y se pueden seleccionar con base en las funciones efectoras deseadas. Se hace referencia, por ejemplo, a las Publicaciones Internacionales Números WO 04/058820, WO 99/42077 y WO 05/017148, así como a la reseña por Holliger y Hudson, *supra*. El acoplamiento de un agente NB de la invención a una porción Fc también puede conducir a una mayor vida media, comparándose con el agente NB correspondiente de la invención. Para algunas aplicaciones, el uso de una porción Fc y/o de los dominios constantes (es decir, los dominios C_H2 y/o C_H3) que confieren una mayor vida media sin ninguna función efectora biológicamente significativa, también puede ser adecuado o incluso preferido. Otras construcciones adecuadas que comprenden uno o más agentes NB y uno o más dominios constantes con una mayor vida media *in vivo* quedarán claras para la persona experta, y, por ejemplo, pueden comprender dos agentes NB enlazados a un dominio C_H3, opcionalmente por medio de una secuencia enlazadora. En términos generales, cualquier proteína de fusión o sus derivados con una mayor vida media de preferencia tendrán un peso molecular de más de 50 kD, el valor de corte para la absorción renal.

Las secuencias de aminoácidos adicionales también pueden formar una secuencia de señal o una secuencia líder que dirija la

secreción del agente NB o del polipéptido de la invención a partir de una célula huésped después de la síntesis (por ejemplo, para proporcionar una pre-, pro- o prepro- forma del polipéptido de la invención, dependiendo de la célula huésped utilizada para expresar el polipéptido de la invención).

En un aspecto, una secuencia de aminoácidos adicional forma una secuencia o señal que permite al agente NB o al polipéptido de la invención dirigirse hacia, y/o penetrar o entrar en los órganos, tejidos, células, o partes o compartimientos específicos de las células, y/o que permite al agente NB o al polipéptido de la invención penetrar o cruzar una barrera biológica, tal como una membrana celular, una capa celular, tal como una capa de células epiteliales, un tumor, incluyendo tumores sólidos, o la barrera hematoencefálica. Los ejemplos adecuados de estas secuencias de aminoácidos quedarán claros para la persona experta y, por ejemplo, incluyen, pero no se limitan a, aquéllos mencionados en la página 118 de la Publicación Internacional Número WO 08/020079. Para algunas aplicaciones, en particular para las aplicaciones en donde se pretenda aniquilar una célula que exprese el objetivo contra el cual se dirijan los agentes NB de la invención (por ejemplo, en el tratamiento de cáncer), o reducir o hacer más lento el crecimiento y/o la proliferación de esta célula, los agentes NB de la invención también se pueden enlazar a una proteína o a un polipéptido (cito)tóxico. Los ejemplos de estas proteínas y polipéptidos tóxicos, los cuales se pueden enlazar a un agente NB de la invención para proporcionar – por ejemplo – un polipéptido citotóxico de la invención, estarán claros para la persona experta, y, por ejemplo, se pueden encontrar en las referencias de la técnica citadas anteriormente y/o en la descripción adicional en la presente. Un ejemplo es la tecnología denominada como ADEPT^{MR} descrita en la Publicación Internacional Número WO 03/055527.

En un aspecto no limitante, estas una o más secuencias de aminoácidos adicionales comprenden cuando menos un agente NB adicional, como para proporcionar un polipéptido de la invención que

comprende cuando menos dos, tal como tres, cuatro, cinco o más agentes NB, en donde los agentes NB se pueden enlazar opcionalmente por medio de una o más secuencias enlazadoras. Los polipéptidos de la invención que comprenden una, dos o más construcciones de V_{HH}, por ejemplo, como se describe en las páginas 119 y 120 de la Publicación Internacional Número WO 08/020079, y cuando menos un agente NB de la invención, también serán referidos en la presente como polipéptidos “multivalentes” de la invención, y los agentes NB presentes en estos polipéptidos también serán referidos en la presente como estando en un “formato multivalente”.

Los polipéptidos que contienen cuando menos dos agentes NB, en donde cuando menos un agente NB se dirige contra un primer antígeno (es decir, contra el DR5,), y cuando menos un agente NB se dirige contra un segundo antígeno (es decir, diferente del DR5), también serán referidos como polipéptidos “multiespecíficos” de la invención, y el agente NB presente en estos polipéptidos también será referido en la presente como estando en un “formato multiespecífico”. Por consiguiente, por ejemplo, un polipéptido “biespecífico” de la invención es un polipéptido que comprende cuando menos un agente NB dirigido contra un primer antígeno (es decir, DR5), más preferiblemente tres, cuatro, cinco o más agentes NB dirigidos contra el DR5, y cuando menos un agente NB adicional dirigido contra un segundo antígeno (es decir, diferente del DR5), mientras que un polipéptido “triespecífico” de la invención es un polipéptido que comprende cuando menos un agente NB dirigido contra a primero antígeno (es decir, un epítopo del DR5), cuando menos un agente NB adicional dirigido contra un segundo antígeno (es decir, un epítopo diferente del DR5 o un antígeno diferente del receptor de TRAIIL), y cuando menos un agente NB adicional dirigido contra un tercer antígeno (es decir, diferente de tanto el DR5 como el segundo antígeno); etc.

De conformidad con lo anterior, en su forma más simple, un polipéptido biespecífico de la invención es un polipéptido bivalente de la invención, el cual comprende un primer agente NB dirigido

contra el DR5, y un segundo agente NB dirigido contra un segundo antígeno, en donde los primero y segundo agentes NB se pueden enlazar opcionalmente por medio de una secuencia enlazadora; mientras que un polipéptido triespecífico de la invención en su forma más simple es un polipéptido trivalente de la invención, el cual comprende un primer agente NB dirigido contra el DR5, un segundo agente NB dirigido contra un segundo antígeno, y un tercer agente NB dirigido contra un tercer antígeno, en donde los primero, segundo, y tercer agentes NB se pueden enlazar opcionalmente por medio de una o más, y en particular una y más, en particular dos, secuencias enlazadoras.

Como estará claro para partir de la descripción en la presente, la invención no está limitada a lo anterior, en el sentido de que un polipéptido multiespecífico de la invención puede comprender cuando menos uno o más agentes NB contra el DR5, y cualquier número de agentes NB dirigidos contra uno o más antígenos diferentes del DR5.

Cuando se hace referencia a un polipéptido específico multivalente o multiespecífico de la invención, se debe observar que esto abarca cualquier orden o configuración de los agentes NB relevantes, a menos que se indique explícitamente de otra manera.

Adicionalmente, está dentro del alcance de la invención que los polipéptidos de la invención contienen dos o más agentes NB y una o más secuencias de aminoácidos adicionales (como se menciona en la presente).

Para los polipéptidos multivalentes y multiespecíficos que contienen uno o más dominios V_{HH} y su preparación, también se hace referencia a Conrath y colaboradores, J. Biol. Chem., Volumen 276, 10. 7346-7350, 2001; Muyldermans, Reviews in Molecular Biotechnology 74 (2001), 277-302; así como a, por ejemplo, las Publicaciones Internacionales Números WO 96/34103 y WO 99/23221. Algunos otros ejemplos de algunos polipéptidos específicos, multiespecíficos y/o multivalentes de la invención, se pueden encontrar en las solicitudes por Ablynx N.V. referidas en la presente.

Un ejemplo no limitante de un polipéptido multiespecífico de la invención comprende cuando menos un agente NB de la invención, y cuando menos un agente NB que proporciona una mayor vida media. Los agentes NB, por ejemplo, pueden ser agentes NB que se dirigen contra una proteína de suero, y en particular una proteína de suero humano, tal como albúmina de suero humano, proteína de enlace de tiroxina, transferrina (humana), fibrinógeno, una inmunoglobulina tal como IgG, IgE o IgM, o contra una de las proteínas de suero enlistadas en la Publicación Internacional Número WO 04/003019. De éstas, los agentes NB que se pueden enlazar a la albúmina de suero (y en particular a la albúmina de suero humano) o a la IgG (y en particular la IgG humana, véase, por ejemplo, NANOBODY^{MR} VH-1 descrito en la reseña para Muyldermans, *supra*) son particularmente preferidos (aunque, por ejemplo, para los experimentos en los ratones o primates, se puede utilizar los agentes NB contra, o que reaccionan cruzadamente con, la albúmina de suero de ratón (MSA) o la albúmina de suero a partir de dicho primate, respectivamente. Sin embargo, para uso farmacéutico, normalmente se preferirán los agentes NB contra la albúmina de suero humano o la IgG humana). Los agentes NB que proporcionan una mayor vida media y que se pueden utilizar en los polipéptidos de la invención incluyen los agentes NB dirigidos contra la albúmina de suero que se describen en las Publicaciones Internacionales Números WO 04/041865 y WO 06/122787, y en las solicitudes de patente adicionales por Ablynx N.V., tales como aquéllas mencionadas en la presente.

Por ejemplo, algunos agentes NB preferidos que proporcionan una mayor vida media para utilizarse en la presente invención incluyen los NANOBODIES^{MR} que se pueden enlazar a los residuos de aminoácidos sobre la albúmina de suero (humana) que no están involucrados en el enlace de la albúmina de suero al FcRn (véase, por ejemplo, la Publicación Internacional Número WO 06/0122787); los NANOBODIES^{MR} que son capaces de enlazarse a los residuos de aminoácidos sobre la albúmina de suero que no forman parte del dominio III de la albúmina de suero (véase, por ejemplo, la

Publicación Internacional Número WO 06/0122787); los NANOBODIES[MR] que tienen o pueden proporcionar un aumento de la vida media (véase, por ejemplo, la Solicitud Provisional de Patente de los Estados Unidos de Norteamérica Número 60/843,349 por Ablynx N.V mencionada en la presente); los NANOBODIES[MR] contra la albúmina de suero humano que reaccionan cruzadamente con la albúmina de suero a partir de cuando menos una especie de mamífero, y en particular con cuando menos una especie de primate (tales como, sin limitación, los monos a partir del género *Macaca* (tales como, y en particular, los monos cinomolgos (*Macaca fascicularis*) y/o los monos Rhesus (*Macaca mulatta*)), y los babuinos (*Papio ursinus*)) (véase, por ejemplo, la Solicitud Provisional de Patente de los Estados Unidos de Norteamérica Número 60/843,349 por Ablynx N.V); los NANOBODIES[MR] que se pueden enlazar a la albúmina de suero de una manera independiente del pH (véase, por ejemplo, la Solicitud Provisional de Patente de los Estados Unidos de Norteamérica Número 60/850,774 por Ablynx N.V. mencionada en la presente) y/o los NANOBODIES[MR] que son aglutinantes condicionales (véase, por ejemplo, la Solicitud Provisional de Patente de los Estados Unidos de Norteamérica Número 60/850,775 por Ablynx N.V.).

Algunos NANOBODIES[MR] particularmente preferidos que proporcionan una mayor vida media, y que se pueden utilizar en los polipéptidos de la invención, incluyen los NANOBODIES[MR] ALB-1 a ALB-10 que se dan a conocer en la Publicación Internacional Número WO 06/122787 (véanse las Tablas II y III de la misma) de los cuales, el ALB-8 (SEQ ID NO: 62 en la Publicación Internacional Número WO 06/122787) es particularmente preferido.

De acuerdo con un aspecto específico, pero no limitante de la invención, los polipéptidos de la invención contienen, además del uno o más agentes NB de la invención, cuando menos un agente NB contra la albúmina de suero humano.

En una modalidad, cualesquiera polipéptidos de la invención con una mayor vida media que contienen uno o más agentes NB de

la invención, y cualesquiera derivados de agentes NB de la invención o de los polipéptidos que tienen una mayor vida media, tienen una vida media que es cuando menos 1.5 veces, y/o cuando menos 2 veces, y/o cuando menos 5 veces, por ejemplo, cuando menos 10 veces o más de 20 veces, mayor de la vida media del agente NB correspondiente de la invención por sí mismo. Por ejemplo, el derivado o los polipéptidos con una mayor vida media pueden tener una vida media que aumenta por más de 1 hora, y/o más de 2 horas, y/o más de 6 horas, tal como más de 12 horas, o incluso más de 24, 48 o 72 horas, comparándose con el agente NB correspondiente de la invención por sí mismo.

En un aspecto no limitante de la invención, estos derivados o polipéptidos exhiben una vida media en suero humano de cuando menos aproximadamente 12 horas, y/o de cuando menos 24 horas, y/o cuando de menos 48 horas, y/o de cuando menos 72 horas o más. Por ejemplo, estos derivados o polipéptidos pueden tener una vida media de cuando menos 5 días (tal como de aproximadamente 5 a 10 días), y/o de cuando menos 9 días (tal como de aproximadamente 9 a 14 días), y/o de cuando menos aproximadamente 10 días (tal como de aproximadamente 10 a 15 días), y/o de cuando menos aproximadamente 11 días (tal como de aproximadamente 11 a 16 días), y/o de cuando menos aproximadamente 12 días (tal como de aproximadamente 12 a 18 días o más), y/o de más de 14 días (tal como de aproximadamente 14 a 19 días).

De acuerdo con un aspecto de la invención, estos polipéptidos son capaces de enlazarse a una o más moléculas que pueden aumentar la vida media del polipéptido *in vivo*.

Los polipéptidos de la invención se estabilizan *in vivo* y su vida media aumenta mediante el enlace con moléculas que resistan a la degradación y/o a la eliminación o al secuestro. Típicamente, estas moléculas son proteínas que se presentan naturalmente que por sí mismas tienen una larga vida media *in vivo*.

Otro ejemplo no limitante de un polipéptido multiespecífico de

la invención comprende cuando menos un agente NB de la invención, y cuando menos un agente NB que dirige el polipéptido de la invención hacia, y/o que permite al polipéptido de la invención penetrar o entrar en los órganos, tejidos, células, o partes o compartimientos específicos de las células, y/o que permite al agente NB penetrar o cruzar una barrera biológica, tal como una membrana celular, una capa celular, tal como una capa de células epiteliales, un tumor, incluyendo tumores sólidos, o la barrera hematoencefálica. Los ejemplos de los agentes NB incluyen agentes NB que se dirigen hacia proteínas de superficie celular, marcadores o epítopos específicos del órgano, tejido o célula deseada (por ejemplo, los marcadores de superficie celular asociados con las células tumorales), y los fragmentos de anticuerpos de dirección al cerebro de un solo dominio descritos en las Publicaciones Internacionales Números WO 02/057445 y WO 06/040153, de los cuales, los ejemplos preferidos son FC44 (SEQ ID NO: 189 de la Publicación Internacional Número WO 06/040153), y FC5 (SEQ ID NO: 190 de la Publicación Internacional Número WO 06/040154).

Enlazadores

En los polipéptidos o compuestos de la invención, uno o más polipéptidos de enlace contra el DR5, tal como agentes NB y uno o más polipéptidos se pueden enlazar directamente unos a otros (como, por ejemplo, los descritos en la Publicación Internacional Número WO 99/23221) y/o se pueden enlazar unos a otros por medio de uno o más espaciadores o enlazadores adecuados, o cualquier combinación de los mismos.

Los espaciadores y enlazadores adecuados para utilizarse en los polipéptidos multivalentes y multiespecíficos quedarán claros para la persona experta, y en términos generales puede ser cualquier enlazador o espaciador utilizado en la materia para enlazar secuencias de aminoácidos. De preferencia, el enlazador o espaciador mencionado será adecuado para utilizarse en proteínas o polipéptidos de construcción que se pretendan para uso farmacéutico.

Algunos espaciadores particularmente preferidos incluyen espaciadores y enlazadores que se utilizan en la materia para enlazar fragmentos de anticuerpos o dominios de anticuerpos. Éstos incluyen los enlazadores mencionados en los antecedentes generales de la materia citados anteriormente, así como, por ejemplo, los enlazadores que se utilizan en la materia para la construcción de fragmentos de diacuerpos o ScFv (en este aspecto, sin embargo, se debería observar que, mientras que en los fragmentos de diacuerpos y ScFv, la secuencia enlazadora debería tener una longitud, un grado de flexibilidad y otras propiedades que permitan que los dominios V_H y V_L pertinentes estén juntos para formar el enlace completo del sitio del antígeno, no hay limitación particular en la longitud o flexibilidad del enlazador utilizado en el polipéptido de la invención, debido a que cada agente NB por sí mismo forma un enlace completo del sitio del antígeno).

Por ejemplo, un enlazador puede ser una secuencia de aminoácidos adecuada, y en particular las secuencias de aminoácidos de entre 1 y 50, por ejemplo, de entre 5 y 50, de preferencia de entre 1 y 35, tal como de entre 1 y 10 residuos de aminoácidos. Algunos de los ejemplos preferidos de estas secuencias de aminoácidos incluyen los enlazadores gly-ser, por ejemplo, del tipo $(gly_xser_y)_z$, tales como, por ejemplo $(gly_4ser)_3$ o $(gly_3ser_2)_3$, como se describen en la Publicación Internacional Número WO 99/42077, y los enlazadores GS30, GS15, GS9 y GS7 descritos en las solicitudes por Ablynx mencionadas en la presente (véanse, por ejemplo, las Publicaciones Internacionales Números WO 06/040153 y WO 06/122825), así como las regiones tipo articulación, tales como las regiones de articulación de los anticuerpos de cadena pesada que se presentan naturalmente o en secuencias similares (por ejemplo, tal como se describe en la Publicación Internacional Número WO 94/04678).

Algunos otros enlazadores particularmente preferidos son poli-alanina (tal como AAA), así como los enlazadores GS30 (SEQ ID NO: 85 de la Publicación Internacional Número WO 06/122825), y GS9

(SEQ ID NO: 84 de la Publicación Internacional Número WO 06/122825).

Otros enlazadores adicionales en términos generales comprenden compuestos orgánicos o polímeros, en particular aquéllos adecuados para utilizarse en proteínas para uso farmacéutico. Los ejemplos no limitantes incluyen, por ejemplo, las fracciones de poli-(etilenglicol), por ejemplo, tales como aquéllas utilizadas para enlazar dominios de anticuerpos. Véase, por ejemplo, la Publicación Internacional Número WO 04/081026.

Se abarca dentro del alcance de la invención que la longitud, el grado de flexibilidad, y/u otras propiedades de los enlazadores utilizados (no es crítico, como es usualmente para los enlazadores utilizados en los fragmentos ScFv) pueden tener alguna influencia sobre las propiedades del polipéptido final de la invención, incluyendo, pero no limitándose a, la afinidad, especificidad o avidez para el DR5, o para uno o más de los otros antígenos. Basándose en la divulgación de la presente, la persona experta estará capacitada para determinar los enlazadores óptimos para utilizarse en un polipéptido específico de la invención, opcionalmente después de algunos experimentos de rutina limitados.

En una modalidad, en los polipéptidos multivalentes de la invención que comprenden, por ejemplo, los agentes NB dirigidos contra un antígeno multimérico (tal como un receptor multimérico u otra proteína), la longitud y flexibilidad del enlazador pueden ser tales que permitan que cada agente NB de la presente invención en el polipéptido se enlace al determinante antigénico sobre cada una de las subunidades del multímero. De una manera similar, en un polipéptido multiespecífico de la invención que comprende agentes NB dirigidos contra dos o más determinantes antigénicos diferentes sobre el mismo antígeno (por ejemplo contra epítopos diferentes de un antígeno y/o contra subunidades diferentes de un receptor, canal o proteína multimérica), la longitud y flexibilidad del enlazador pueden ser tales que permitan que cada agente NB se enlace a su determinante antigénico destinado. Nuevamente, basándose en la

divulgación de la presente, la persona experta será capaz de determinar los enlazadores óptimos para utilizarse en un polipéptido específico de la invención, opcionalmente después de algunos experimentos de rutina limitados.

Está dentro del alcance de la invención que el enlazador utilizado confiere una o más propiedades o funcionalidades favorables diferentes a los polipéptidos de la invención, y/o proporcionan uno o más sitios para la formación de derivados y/o para el enlace de los grupos funcionales (por ejemplo, como se describe en la presente para los derivados de los agentes NB de la invención). Por ejemplo, los enlazadores que contienen uno o más residuos de aminoácidos cargados pueden proporcionar propiedades hidrofílicas mejoradas, mientras que los enlazadores que forman o contienen epítopos o etiquetas pequeñas se puede utilizar para los propósitos de detección, identificación y/o purificación. Nuevamente, basándose en la divulgación de la presente, la persona experta será capaz de determinar los enlazadores óptimos para utilizarse en un polipéptido específico de la invención, opcionalmente después de algunos experimentos de rutina limitados.

Finalmente, cuando dos o más enlazadores se utilizan en los polipéptidos de la invención, estos enlazadores pueden ser los mismos o diferentes. Nuevamente, basándose en la divulgación de la presente, la persona experta será capaz de determinar los enlazadores óptimos para utilizarse en un polipéptido específico de la invención, opcionalmente después de algunos experimentos de rutina limitados.

Usualmente, para la facilidad de la expresión y producción, el polipéptido de la invención será un polipéptido lineal. Sin embargo, la invención en su sentido más amplio no está limitada al mismo. Por ejemplo, cuando un polipéptido de la invención comprende tres o más agentes NB, es posible enlazarlos mediante el uso de un enlazador con tres o más “brazos”, siendo cada “brazo” enlazado a un agente NB, como para proporcionar una construcción “en forma de estrella”. También es posible, aunque usualmente menos

preferido, utilizar construcciones circulares.

La invención comprende además derivados de los polipéptidos de la invención, los cuales pueden ser esencialmente análogos a los derivados de los agentes NB de la invención, es decir, como se describen en la presente.

La invención también comprende proteínas o polipéptidos que "esencialmente consisten" en un polipéptido de la invención (en donde el término "esencialmente consiste en" tiene esencialmente el mismo significado que se indica anteriormente en la presente).

De acuerdo con un aspecto de la invención, el polipéptido de la invención está en una forma esencialmente aislada, como se define en la presente.

Método para la elaboración de los agentes NB de la invención

Las secuencias de aminoácidos, los agentes NB, los polipéptidos, los compuestos y ácidos nucleicos de la invención, se pueden preparar de una manera conocida por sí misma, como estará claro para la persona experta a partir de la descripción adicional en la presente. Por ejemplo, los agentes NB y los polipéptidos de la invención se pueden preparar de cualquier manera conocida por sí misma para la preparación de anticuerpos y en particular para la preparación de fragmentos de anticuerpos (incluyendo, pero no limitándose a, los anticuerpos de (un solo) dominio y los fragmentos ScFv). Algunos métodos preferidos, pero no limitantes, para la preparación de las secuencias de aminoácidos, los agentes NB, los polipéptidos y ácidos nucleicos incluyen los métodos y técnicas descritas en la presente.

Como quedará claro para la persona experta, un método particularmente útil para la preparación de una secuencia de aminoácidos, un agente NB y/o un polipéptido de la invención comprende en términos generales los pasos de:

a) la expresión, en una célula huésped o en un organismo huésped adecuado (también referido en la presente como un "huésped de la invención") o en otro sistema de expresión adecuado, de un ácido nucleico que codifica esta secuencia de aminoácidos,

agente NB, o polipéptido de la invención (también referido en la presente como un "*ácido nucleico de la invención*"), opcionalmente seguida por:

b) aislar y/o purificar la secuencia de aminoácidos, el agente NB, o el polipéptido de la invención obtenido de esta manera.

En particular, este método puede comprender los pasos de:

a) cultivar y/o mantener un huésped de la invención bajo condiciones que son tales que el huésped de la invención expresa y/o produce cuando menos una secuencia de aminoácidos, agente NB, y/o polipéptido de la invención;

opcionalmente seguido por:

b) aislar y/o purificar la secuencia de aminoácidos, el agente NB, o el polipéptido de la invención obtenido de esta manera.

Un ácido nucleico de la invención puede estar en la forma de ADN o ARN de una sola cadena o de doble cadena. En una modalidad, un agente NB de polinucleótido está en la forma de ADN de doble cadena. Por ejemplo, las secuencias de nucleótidos de NB de la invención pueden ser ADN genómico, ADNc, o ADN sintético (tal como ADN con un uso de codones que se ha adaptado específicamente para la expresión en la célula huésped o en el organismo huésped pretendido).

De acuerdo con un aspecto de la invención, el ácido nucleico de la invención está en una forma esencialmente aislada, como se define en la presente.

El ácido nucleico de la invención puede estar en la forma de, puede estar presente en, y/o puede ser parte de un vector, tal como, por ejemplo, un plásmido, cósmido o YAC, el cual nuevamente puede estar en una forma esencialmente aislada.

Los ácidos nucleicos de la invención se pueden preparar u obtener de una manera conocida por sí misma, basándose en la información sobre las secuencias de aminoácidos para los polipéptidos de la invención dada en la presente, y/o se puede aislar a partir de una fuente natural adecuada. Para proporcionar análogos, las secuencias de nucleótidos que codifiquen los dominios V_{HH} que

se presentan naturalmente, por ejemplo, se pueden someter a mutagénesis dirigida al sitio, como para proporcionar un ácido nucleico de la invención que codifique dicho análogo. Como quedará claro para la persona experta, para preparar un ácido nucleico de la invención, incluyendo varias secuencias de nucleótidos, por ejemplo, cuando menos una secuencia de nucleótidos que codifique un agente NB y, por ejemplo, los ácidos nucleicos que codifiquen uno o más enlazadores, estas secuencias se pueden enlazar entre sí de una manera adecuada.

Las técnicas para generar los ácidos nucleicos de la invención estarán claras para la persona experta y, por ejemplo pueden incluir, pero no se limitan a, síntesis automatizada de ADN; mutagénesis dirigida al sitio; combinación de dos o más secuencias que se presenten naturalmente y/o sintéticas (o dos o más partes de las mismas), introducción de mutaciones que conduzcan a la expresión de un producto de expresión truncado; introducción de uno o más sitios de restricción (por ejemplo, para crear casetes y/o regiones que se pueden digerir y/o ligar fácilmente utilizando enzimas de restricción adecuadas), y/o la introducción de mutaciones por medio de una reacción en cadena de la polimerasa (PCR) utilizando uno o más cebadores “mal emparejados”, utilizando, por ejemplo, una secuencia de una forma que se presente naturalmente del DR5 como una plantilla. Éstas y otras técnicas quedarán claras para la persona experta, y nuevamente se hace referencia a los libros de texto convencionales, tales como Sambrook y colaboradores, y Ausubel y colaboradores, mencionados en la presente, así como los Ejemplos más adelante.

El ácido nucleico de la invención puede estar en la forma de, puede estar presente en, y/o puede ser parte de una construcción genética, como estará claro para la persona experta en la materia y, por ejemplo, como se describe en las páginas 131-134 de la Publicación Internacional Número WO 08/020079. Estas construcciones genéticas comprenden en términos generales cuando menos un ácido nucleico de la invención que está opcionalmente

enlazado a uno o más elementos de las construcciones genéticas conocidas por sí mismas, tales como, por ejemplo, uno o más elementos reguladores adecuados (tales como promotores, potenciadores, terminadores adecuados, etc.), y los elementos adicionales de las construcciones genéticas referidas en la presente. Estas construcciones genéticas que comprenden cuando menos un ácido nucleico de la invención también serán referidas en la presente como “construcciones genéticas de la invención”.

Las construcciones genéticas de la invención pueden ser ADN o ARN. Las construcciones genéticas de la invención pueden estar en una forma adecuada para la transformación de la célula huésped o el organismo huésped pretendido, en una forma adecuada para la integración en el ADN genómico de la célula huésped pretendida o en una forma adecuada para réplica independiente, mantenimiento y/o herencia en el organismo huésped pretendido. Por ejemplo, las construcciones genéticas de la invención pueden estar en la forma de un vector, tal como, por ejemplo, un plásmido, cósmido, YAC, un vector viral o transposón. En particular, el vector puede ser un vector de expresión, es decir, un vector que puede proporcionar la expresión *in vitro* y/o *in vivo* (por ejemplo, en una célula huésped, un organismo huésped, y/o un sistema de expresión adecuado).

El ácido nucleico de la invención puede estar en la forma de, puede estar presente en, y/o puede ser parte de, una construcción genética. Estas construcciones genéticas comprenden en términos generales cuando menos un ácido nucleico de la invención que está opcionalmente enlazado a uno o más elementos de las construcciones genéticas conocidas por sí mismas, tales como, por ejemplo, uno o más elementos reguladores adecuados (tales como promotores, potenciadores, terminadores adecuados, etc.), y los elementos adicionales de las construcciones genéticas referidas en la presente. Otras construcciones genéticas adecuadas conocidas en la materia se contemplan dentro del alcance de la invención, incluyendo, por ejemplo, aquéllas descritas en las páginas 131-134 de la Publicación Internacional Número WO 08/020079. Estas

construcciones genéticas que comprenden cuando menos un ácido nucleico de la invención también serán referidas en la presente como "construcciones genéticas de la invención".

En una modalidad no limitante, una construcción genética de la invención comprende: a) cuando menos un ácido nucleico de la invención; en donde el agente NB de polinucleótido se conecta operativamente con b) uno o más elementos reguladores, tales como un promotor y opcionalmente un terminador adecuado; y opcionalmente c) uno o más elementos adicionales de las construcciones genéticas conocidas por sí mismas.

En una modalidad, en las construcciones genéticas de la invención, el cuando menos un ácido nucleico de la invención y los elementos reguladores mencionados, y opcionalmente el uno o más elementos adicionales, se "enlazan operativamente" unos a otros, lo cual significa en general que están en una relación funcional unos con otros. Por ejemplo, un promotor se considera "operativamente enlazado" a una secuencia de codificación si este promotor es capaz de iniciar, o de otra manera controlar/regular, la transcripción y/o la expresión de una secuencia de codificación (en donde esta secuencia de codificación se debe entender como estando "bajo el control de dicho promotor). En términos generales, cuando dos secuencias de nucleótidos se enlazan operativamente, estarán en la misma orientación, y usualmente también en el mismo marco de lectura. Usualmente serán esencialmente contiguas, aunque esto puede no ser requerido. Las frases “operativamente conectadas" y "operativamente enlazadas” se utilizan de forma alternativa.

Los términos "elemento regulador", "promotor", "terminador" y "operativamente conectados" tienen su significado usual en la materia. Los "elementos adicionales" presentes en las construcciones genéticas pueden ser, por ejemplo, una secuencia 3'- ó 5'-UTR, secuencias líder, marcadores de selección, marcadores de expresión/genes reporteros, y/o elementos que pueden facilitar o aumentar (la eficiencia de) la transformación o integración. Éstos y otros elementos adecuados para estas construcciones genéticas

quedarán claros para la persona experta, y, por ejemplo, pueden depender del tipo de construcción utilizada, de la célula huésped, o del organismo huésped pretendido; la manera en donde se vayan a expresar las secuencias de nucleótidos de interés de la invención (por ejemplo, por medio de expresión constitutiva, transitoria, o inducible); y/o la técnica de transformación que se vaya a emplear. Por ejemplo, las secuencias reguladoras, promotoras y terminadoras conocidas por sí mismas para la expresión y producción de los anticuerpos y fragmentos de anticuerpos (incluyendo, pero no limitándose a, los anticuerpos de (un solo) dominio y los fragmentos ScFv) se pueden utilizar de una manera esencialmente análoga.

En una modalidad, los elementos reguladores y adicionales de las construcciones genéticas de la invención son tales que son capaces de proporcionar su función biológica pretendida en la célula huésped o en el organismo huésped pretendido.

Por ejemplo, un promotor, potenciador o terminador debe ser "operativo" en la célula huésped o en el organismo huésped pretendido, lo cual significa que (por ejemplo) este promotor debe ser capaz de iniciar o de otra manera controlar/regular la transcripción y/o la expresión de una secuencia de nucleótidos - por ejemplo, una secuencia de codificación - con la que se enlace operativamente (como se define en la presente). Algunos promotores particularmente preferidos incluyen, pero no se limitan a, los promotores conocido por sí mismos para la expresión en las células huésped mencionadas en la presente; y en particular los promotores para la expresión en las células bacterianas.

Los ácidos nucleicos de la invención y/o las construcciones genéticas de la invención se pueden utilizar para transformar una célula huésped o un organismo huésped, es decir, para la expresión y/o producción de la secuencia de aminoácidos, el agente NB, o el polipéptido de la invención. Los huéspedes o células huésped adecuadas quedarán claras para la persona experta y, por ejemplo, puede ser cualquier célula o línea celular fúngica, procariótica, o eucariótica adecuada, o cualquier organismo fúngico, procariótico, o

eucariótico adecuado, por ejemplo, aquéllos descritos en las páginas 134 y 135 de la Publicación Internacional Número WO 08/020079; así como todos los demás huéspedes o células huésped conocidas por sí mismas para la expresión y producción de los anticuerpos y fragmentos de anticuerpos (incluyendo, pero no limitándose a, los anticuerpos de (un solo) dominio y los fragmentos ScFv), las cuales quedarán claras para la persona experta. También se hace referencia a la técnica antecedente general citada anteriormente en la presente, así como, por ejemplo, a las Publicaciones Internacionales Números WO 94/29457; WO 96/34103; WO 99/42077; Frenken y colaboradores (1998), *supra*; Riechmann y Muyldermans, (1999), *supra*; van der Linden, (2000), *supra*; Thomassen y colaboradores (2002), *supra*; Joosten y colaboradores (2003), *supra*; Joosten y colaboradores (2005), *supra*; y las referencias adicionales citadas en la presente.

Las secuencias de aminoácidos y los polipéptidos de NB de la invención se pueden introducir y expresar en una o más células, tejidos u órganos de un organismo multicelular, por ejemplo, para propósitos profilácticos y/o terapéuticos (por ejemplo, como una terapia genética), como se describe adicionalmente en las páginas 135 y 136 de la Publicación Internacional Número WO 08/020079 y en las referencias adicionales citadas en la Publicación Internacional Número WO 08/020079.

Para la expresión de los agentes NB en una célula, se pueden expresar como los denominados “intracuerpos”, como se describen, por ejemplo, en las Publicaciones Internacionales Números WO 94/02610 y WO 95/22618, en la Patente de los Estados Unidos de Norteamérica Número US-A-7004940; en la Publicación Internacional Número WO 03/014960; en Cattaneo, A. y Biocca, S. (1997) Intracellular Antibodies: Development and Applications. Landes y Springer-Verlag; y en Kontermann, Methods 34, (2004), 163-170.

Las secuencias de aminoácidos de NB y los polipéptidos de la invención, por ejemplo, también se pueden producir en la leche de mamíferos transgénicos, por ejemplo, en la leche de conejos, reses,

cabras u ovejas (véanse, por ejemplo, las Patentes de los Estados Unidos de Norteamérica Números US6,741,957, US6,304,489 y US6,849,992 para ver las técnicas generales para introducir transgenes en mamíferos), en plantas o en partes de plantas, incluyendo, pero no limitándose a, sus hojas, flores, frutas, semillas, raíces, o tubérculos (por ejemplo en tabaco, maíz, semilla de soya, o alfalfa) o, por ejemplo, en pupas del gusano de seda *Bombix mori*.

Adicionalmente, las secuencias de aminoácidos de NB y los polipéptidos de la invención se pueden expresar y/o producir en sistemas de expresión sin células, y los ejemplos adecuados de estos sistemas quedarán claros para la persona experta. Algunos ejemplos no limitantes incluyen la expresión en el sistema del germen de trigo; en los lisados de reticulocitos de conejo; o en el sistema de *E. coli* de Zubay.

Como se menciona en la presente, una de las ventajas del uso de los agentes NB expresados a partir de plásmidos o vectores es que los polipéptidos basados en los mismos se pueden preparar a través de la expresión en un sistema bacteriano adecuado, y los sistemas sistemas de expresión, vectores, células huésped, elementos reguladores bacterianos adecuados, etc., quedarán claros para la persona experta, por ejemplo, a partir de las referencias citadas anteriormente. Sin embargo, se debe observar que la invención, en su sentido más amplio, no está limitada a la expresión en los sistemas bacterianos.

En una modalidad, el uso de codones para una secuencia de polinucleótido de la invención es la optimización haciendo referencia a la frecuencia de uso de codones de la célula huésped/el organismo huésped particular. La secuencia de nucleótidos resultante es una secuencia de nucleótidos de NB de “codones optimizados”. Se pueden hacer las secuencias de NB de codones optimizados para la expresión en células huésped/organismos huésped procarióticos o eucarióticos. Los ejemplos particulares incluyen los sistemas de expresión proporcionados en la presente.

En una modalidad de la invención, se utiliza un sistema de

expresión (ya sea *in vivo* o *in vitro*), por ejemplo, tal como un sistema de expresión bacteriano, que proporciona los polipéptidos de la invención en una forma que es adecuada para uso farmacéutico, y estos sistemas de expresión nuevamente quedarán claros para la persona experta. Como también quedará claro para la persona experta, los polipéptidos de la invención adecuados para uso farmacéutico se pueden preparar empleando técnicas para la síntesis de péptidos.

Para la producción a una escala industrial, los huéspedes heterólogos preferidos para la producción (industrial) de los agentes NB o de los productos terapéuticos de proteína que contienen el agente NB incluyen las cepas de *E. coli*, *Pichia pastoris*, *S. cerevisiae* que son adecuados para la expresión / producción / fermentación a gran escala, y en particular, para la expresión / producción / fermentación farmacéutica a gran escala (es decir, de grado GMP). Los ejemplos adecuados de estas cepas quedarán claros para la persona experta. Estas cepas y los sistemas de producción/expresión también los pone a disposición las compañías tales como Biovitrum (Uppsala, Suecia).

De una manera alternativa, se pueden utilizar líneas celulares de mamífero, en particular células de ovario de hámster chino (CHO), para la expresión / producción / fermentación a gran escala, y en particular para la expresión / producción / fermentación farmacéutica a gran escala. Nuevamente, estos sistemas de expresión/producción son también son puestos a disposición por algunas de las compañías mencionadas en la presente.

La elección del sistema de expresión específico dependería en parte del requerimiento de ciertas modificaciones posteriores a la traducción, más específicamente glicosilación. La producción de una proteína recombinante que contenga un agente NB para la cual se desee o se necesite glicosilación, necesitaría del uso de huéspedes de expresión de mamífero que tengan la capacidad para glicosilar la proteína expresada. En este aspecto, estará claro para la persona experta que el patrón de glicosilación obtenido (es decir, la clase, el

número, y la posición de los residuos unidos) dependerá de la célula o de la línea celular que se utilice para la expresión. De preferencia, se utiliza ya sea una célula o línea celular humana (es decir, que conduzca a una proteína que tenga esencialmente un patrón de glicosilación humano) u otra línea celular de mamífero que pueda proporcionar un patrón de glicosilación que sea esencialmente y/o funcionalmente el mismo que el de la glicosilación humana, o que cuando menos imite la glicosilación humana. En términos generales, los huéspedes procarióticos, tales como *E. coli,* no tienen la capacidad para glicosilar proteínas, y el uso de eucariotes inferiores, tales como levadura, usualmente conduce a un patrón de glicosilación que difiere de la glicosilación humana. No obstante, se debe entender que todas las células huésped y sistemas de expresión anteriores se pueden utilizar en la invención, dependiendo de la secuencia de aminoácidos, del agente NB, o del polipéptido que se vaya a obtener deseados.

Por consiguiente, de acuerdo con un aspecto no limitante de la invención, la secuencia de aminoácidos, el agente NB, o el polipéptido de la invención está glicosilado. De acuerdo con otro aspecto no limitante de la invención, la secuencia de aminoácidos, el agente NB, o el polipéptido de la invención, no está glicosilado.

De acuerdo con un aspecto preferido, pero no limitante de la invención, la secuencia de aminoácidos, el agente NB, o el polipéptido de la invención se produce en una célula bacteriana, en particular una célula bacteriana adecuada para la producción farmacéutica a gran escala, tal como las células de las cepas mencionadas en la presente.

De acuerdo con otro aspecto preferido, pero no limitante, de la invención, la secuencia de aminoácidos, el agente NB, o el polipéptido de la invención se produce en una célula de levadura, en particular una célula de levadura adecuada para la producción farmacéutica a gran escala, tal como las células de las especies mencionadas en la presente.

De acuerdo con todavía otro aspecto preferido, pero no

limitante, de la invención, la secuencia de aminoácidos, el agente NB, o el polipéptido de la invención se produce en una célula de mamífero, en particular en una célula humana o en una célula de una línea celular humana, y más particularmente, en una célula humana o en una célula de una línea celular humana que es adecuada para la producción farmacéutica a gran escala, tal como las líneas celulares mencionadas anteriormente en la presente.

Cuando se utiliza la expresión en una célula huésped para producir las secuencias de aminoácidos, los agentes NB y los polipéptidos de la invención, las secuencias de aminoácidos de NB y los polipéptidos de la invención se pueden producir ya sea intracelularmente (por ejemplo, en el citosol, en el periplasma, o en los cuerpos de inclusión), y entonces se aíslan a partir de las células huésped y opcionalmente se purifican adicionalmente; o se pueden producir extracelularmente (por ejemplo, en el medio en donde se cultivan las células huésped), y entonces se aíslan a partir del medio de cultivo, y opcionalmente se purifican adicionalmente. Por consiguiente, de acuerdo con un aspecto no limitante de la invención, la secuencia de aminoácidos, el agente NB, o el polipéptido de la invención es una secuencia de aminoácidos, agente NB, o polipéptido que se ha producido intracelularmente, y que se ha aislado a partir de la célula huésped, y en particular a partir de una célula bacteriana o a partir de un cuerpo de inclusión en una célula bacteriana. De acuerdo con otro aspecto no limitante de la invención, la secuencia de aminoácidos, el agente NB, o el polipéptido de la invención es una secuencia de aminoácidos, agente NB, o polipéptido que se ha producido extracelularmente, y que se ha aislado a partir del medio en donde se cultive la célula huésped.

Se proporciona una discusión más completa de los sistemas de expresión, por ejemplo, en las páginas 138 y 139 de la Publicación Internacional Número WO 08/020079. Se incluye una lista no limitante de promotores para utilizarse con estas células huésped, por ejemplo, incluyendo aquéllos mencionados en las páginas 139 y 140 de la Publicación Internacional Número WO 08/020079. También

se incluye una lista no limitante de secuencias secretoras para utilizarse con estas células huésped, por ejemplo, incluyendo aquéllas mencionadas en la página 140 de la Publicación Internacional Número WO 08/020079.

Las técnicas adecuadas para transformar un huésped o una célula huésped de la invención estarán claras para la persona experta, y pueden depender de la célula huésped/del organismo huésped pretendido, y de la construcción genética utilizada. Nuevamente se hace referencia a los libros de texto y a las solicitudes de patente mencionadas en la presente.

También quedará claro para la persona experta que la secuencia de aminoácidos, el agente NB, o el polipéptido de la invención, se puede generar (primero) en una forma inmadura (como se menciona en la presente), el cual se puede someter entonces a una modificación posterior a la traducción, dependiendo de la célula huésped/del organismo huésped utilizado. También, la secuencia de aminoácidos, el agente NB, o el polipéptido de la invención se puede glicosilar, nuevamente dependiendo de la célula huésped/del organismo huésped utilizado.

La secuencia de aminoácidos, el agente NB, o el polipéptido de la invención entonces se puede aislar a partir de la célula huésped/del organismo huésped y/o a partir del medio en donde se cultive esa célula huésped o ese organismo huésped, empleando técnicas de aislamiento y/o purificación de proteínas conocidas por sí mismas, tales como técnicas de cromatografía (de preparación) y/o electroforesis, técnicas de precipitación diferencial, técnicas de afinidad (por ejemplo, utilizando una secuencia de aminoácidos disociable específica fusionada con la secuencia de aminoácidos, el agente NB, o el polipéptido de la invención) y/o técnicas inmunológicas de preparación (es decir, utilizando anticuerpos contra la secuencia de aminoácidos que se vaya a aislar).

Preparación o composiciones farmacéuticas

En términos generales, para uso farmacéutico, los polipéptidos de la invención se pueden formular como una preparación

farmacéutica o como una composición que comprenda cuando menos un polipéptido de la invención, y cuando menos un vehículo, diluyente o excipiente y/o adyuvante farmacéuticamente aceptable, y opcionalmente uno o más polipéptidos y/o compuestos farmacéuticamente activos adicionales. Por medio de los ejemplos no limitantes, esta formulación puede estar en una forma adecuada para su administración oral, para su administración parenteral (tal como mediante inyección intravenosa, intramuscular o subcutánea o infusión intravenosa), para su administración tópica, para su administración mediante inhalación, mediante un parche para la piel, mediante un implante, mediante un supositorio, etc. Las formas de administración adecuadas - las cuales pueden ser sólidas, semi-sólidas, o líquidas, dependiendo de la forma de administración - así como los métodos y vehículos para utilizarse en la preparación de las mismas, quedarán claras para la persona experta, y se describen adicionalmente en la presente. Esta preparación farmacéutica o una composición será referida en términos generales en la presente como una “composición farmacéutica”. Una preparación o una composición farmacéutica para utilizarse en un organismo no humano, será referida en términos generales en la presente como una “composición veterinaria”.

Por consiguiente, en un aspecto adicional, la invención se refiere a una composición farmacéutica que contiene cuando menos un aminoácido de la invención, cuando menos un agente NB de la invención, o cuando menos un polipéptido de la invención, y cuando menos un vehículo, diluyente o excipiente adecuado (es decir, adecuado para uso farmacéutico), y opcionalmente una o más sustancias activas adicionales.

En términos generales, las secuencias de aminoácidos de NB y los polipéptidos de la invención se pueden formular y administrar de cualquier manera adecuada conocida por sí misma. Se hace referencia, por ejemplo, a la técnica antecedente general citada en lo anterior (y en particular a las Publicaciones Internacionales Números WO 04/041862, WO 04/041863, WO 04/041865, WO 04/041867 y WO

08/020079), así como a los libros de texto convencionales, tales como Remington's Pharmaceutical Sciences, 18ª Edición, Mack Publishing Company, EUA (1990), Remington, The Science and Practice of Pharmacy, 21ª Edición, Lippincott Williams y Wilkins (2005); o el Handbook of Therapeutic Antibodies (S. Dubel, Editor), Wiley, Weinheim, 2007 (véanse, por ejemplo, las páginas 252-255).

Las secuencias de aminoácidos de NB y los polipéptidos de la invención se pueden formular y administrar de cualquier manera conocida por sí misma para los anticuerpos convencionales y fragmentos de anticuerpos (incluyendo ScFvs y diacuerpos), y otras proteínas farmacéuticamente activas. Estas formulaciones y métodos para la preparación las mismas quedará claros para la persona experta y, por ejemplo, incluyen las preparaciones adecuadas para su administración parenteral (por ejemplo, administración intravenosa, intraperitoneal, subcutánea, intramuscular, intraluminal, intra-arterial o intratecal), o para administración tópica (es decir, transdérmica o intradérmica).

Las preparaciones para su administración parenteral, por ejemplo, pueden ser soluciones, suspensiones, dispersiones o emulsiones estériles que sean adecuadas para infusión o inyección. Los vehículos o diluyentes adecuados para estas preparaciones, por ejemplo, incluyen, sin limitación, aquéllos mencionados en la página 143 de la Publicación Internacional Número WO 08/020079. En una modalidad, la preparación es una solución o suspensión acuosa.

Las secuencias de aminoácidos de NB y los polipéptidos de la invención se pueden administrar empleando métodos de suministro de terapia genética. Véase, por ejemplo, la Patente de los Estados Unidos de Norteamérica Número 5,399,346, la cual se incorpora como referencia por sus métodos de suministro de terapia genética. Empleando un método de suministro de terapia genética, las células primarias transfectadas con el gen que codifica una secuencia de aminoácidos, un agente NB, o un polipéptido de la invención, se pueden transfectar adicionalmente con promotores específicos del tejido para dirigirse a órganos, tejidos, injertos, tumores, o células

específicas del objetivo, y adicionalmente se pueden transfectar con secuencias de señales y estabilización para la expresión sub-celularmente localizada.

Por consiguiente, las secuencias de aminoácidos de NB y los polipéptidos de la invención se pueden administrar sistémicamente, por ejemplo, oralmente, en combinación con un vehículo farmacéuticamente aceptable, tal como un diluyente inerte, o un vehículo comestible asimilable. Se pueden encerrar en cápsulas de gelatina de cubierta dura o blanda, se pueden comprimir en tabletas, o se pueden incorporar directamente con el alimento de la dieta del paciente. Para la administración terapéutica oral, las secuencias de aminoácidos de NB y los polipéptidos de la invención se pueden combinar con uno o más excipientes, y se pueden utilizar en la forma de tabletas ingeribles, tabletas bucales, trociscos, cápsulas, elíxires, suspensiones, jarabes, obleas, y similares. Estas composiciones y preparaciones deben contener cuando menos el 0.1 por ciento de la secuencia de aminoácidos, del agente NB, o del polipéptido de la invención. Su porcentaje en las composiciones y preparaciones, desde luego, se puede variar, y de una manera conveniente, puede ser de entre aproximadamente el 2 y aproximadamente el 60 por ciento del peso de una forma de dosificación unitaria dada. La cantidad de la secuencia de aminoácidos, del agente NB, o del polipéptido de la invención en estas composiciones terapéuticamente útiles es tal que se obtendrá un nivel de dosificación efectivo.

Las tabletas, trociscos, píldoras, cápsulas, y similares también pueden contener aglutinantes, excipientes, agentes desintegrantes, lubricantes y agentes edulcorantes o saborizantes, por ejemplo, aquéllos mencionados en las páginas 143-144 de la Publicación Internacional Número WO 08/020079. Cuando la forma de dosificación unitaria es una cápsula, puede contener, en adición a los materiales del tipo anterior, un vehículo líquido, tal como un aceite vegetal o un polietilenglicol. Puede haber otros diferentes materiales presentes como recubrimientos o para modificar de otra manera la forma física de la forma de dosificación unitaria sólida.

Por ejemplo, las tabletas, píldoras, o cápsulas se pueden recubrir con gelatina, cera, shellac o azúcar, y similares. Un jarabe o elíxir puede contener las secuencias de aminoácidos de NB y los polipéptidos de la invención, sacarosa o fructosa como un agente edulcorante, metil- y propil-parabenos como conservadores, un tinte y un saborizante, tal como un saborizante de cereza o de naranja. Desde luego, cualquier material utilizado en la preparación de cualquier forma de dosificación unitaria debe ser farmacéuticamente aceptable y sustancialmente no tóxico en las cantidades empleadas. En adición, las secuencias de aminoácidos de NB y los polipéptidos de la invención se pueden incorporar en preparaciones y dispositivos de liberación sostenida.

Las preparaciones y formulaciones para su administración oral también pueden ser provistas con un recubrimiento entérico que permita que las construcciones de la invención resistan al medio ambiente gástrico y pasen hacia los intestinos. En términos más generales, las preparaciones y formulaciones para su administración oral se pueden formular de una manera adecuada para su suministro en cualquier parte deseada del tracto gastrointestinal. En adición, se pueden utilizar supositorios adecuados para el suministro en el tracto gastrointestinal.

Las secuencias de aminoácidos de NB y los polipéptidos de la invención también se pueden administrar intravenosamente o intraperitonealmente mediante infusión o inyección. Los ejemplos particulares son como se describen adicionalmente en las páginas 144 y 145 de la Publicación Internacional Número WO 08/020079.

Para administración tópica, las secuencias de aminoácidos de NB y los polipéptidos de la invención se pueden aplicar en una forma pura, es decir, cuando son líquidos. Sin embargo, en términos generales, será deseable administrarlos a la piel como composiciones o formulaciones, en combinación con un vehículo dermatológicamente aceptable, el cual puede ser un sólido o un líquido. Los ejemplos particulares son como se describen adicionalmente en la página 145 de la Publicación Internacional

Número WO 08/020079.

En términos generales, la concentración de las secuencias de aminoácidos de NB y los polipéptidos de la invención en una composición líquida, tal como una loción, será de aproximadamente el 0.1 al 25 por ciento en peso, de preferencia de aproximadamente el 0.5 al 10 por ciento en peso. La concentración en una composición semi-sólida o sólida, tal como un gel o un polvo, será de aproximadamente el 0.1 al 5 por ciento en peso, de preferencia de aproximadamente el 0.5 al 2.5 por ciento en peso.

La cantidad de las secuencias de aminoácidos de NB y los polipéptidos de la invención requerida para utilizarse en el tratamiento variará no solamente con la secuencia de aminoácidos, el agente NB, o el polipéptido particular seleccionado, sino también con la vía de administración, la naturaleza de la condición que se esté tratando, y la edad y condición del paciente, y, por último, estará a la discreción del asistente o médico que atienda. También, la dosificación de las secuencias de aminoácidos de NB y de los polipéptidos de la invención varía dependiendo de la célula, tumor, tejido, injerto, u órgano objetivo.

De una manera conveniente, la dosis deseada se puede presentar en una sola dosis o como dosis divididas administradas a intervalos apropiados, por ejemplo, como dos, tres, cuatro o más sub-dosis al día. La sub-dosis misma se puede dividir adicionalmente, por ejemplo, en un número de administraciones discretas cómodamente especiadas; tales como múltiples inhalaciones a partir de un insuflador, o mediante la aplicación de una pluralidad de gotas para los ojos.

Un régimen de administración podría incluir el tratamiento diario de largo plazo. “Largo plazo” significa cuando menos dos semanas y, de preferencia, varias semanas, meses, o años de duración. Las modificaciones necesarias en este intervalo de dosificación pueden ser determinadas por un experto ordinario en este campo utilizando solamente experimentación de rutina, dadas las enseñanzas de la presente. Véase Remington’s Pharmaceutical

Sciences (Martin, E.W., Edición 4), Mack Publishing Co., Easton, PA. La dosificación también puede ser ajustada por el médico individual en el caso de cualquier complicación.

En otro aspecto, la invención se refiere a un método para la prevención y/o el tratamiento de cuando menos las enfermedades y los trastornos asociados con el DR5, comprendiendo este método, administrar a un sujeto que lo necesite, una cantidad farmacéuticamente activa de una secuencia de aminoácidos de la invención, de un agente NB de la invención, de un polipéptido de la invención, y/o de una composición farmacéutica que los comprenda.

En el contexto de la presente invención, el término “prevención y/o tratamiento” no solamente comprende prevenir y/o tratar la enfermedad, pero también en términos generales comprende prevenir el establecimiento de la enfermedad, hacer más lento o revertir el progreso de la enfermedad, prevenir o hacer más lento el establecimiento de uno o más síntomas asociados con la enfermedad, reducir y/o aliviar uno o más síntomas asociados con la enfermedad, reducir la gravedad y/o la duración de la enfermedad y/o de cualquiera de los síntomas asociados con la misma, y/o prevenir un aumento adicional en la gravedad de la enfermedad y/o de cualquiera de los síntomas asociados con la misma, prevenir, reducir o revertir cualquier daño fisiológico causado por la enfermedad, y en términos generales, cualquier acción farmacológica que sea benéfica para el paciente que se esté tratando.

El sujeto que se vaya a tratar puede ser cualquier animal de sangre caliente, pero es en particular un mamífero, y más particularmente, un ser humano. Como quedará claro para la persona experta, el sujeto que se vaya a tratar será en particular una persona que padezca de, o que esté en riesgo de padecer de, las enfermedades y los trastornos mencionados en la presente.

La invención se refiere a un método para la prevención y/o el tratamiento de cuando menos una enfermedad o un trastorno que está asociado con el DR5, con su actividad biológica o farmacológica, y/o con las sendas biológicas o de señalización en

donde esté involucrado el DR5, comprendiendo este método, administrar a un sujeto que lo necesite, una cantidad farmacéuticamente activa de una secuencia de aminoácidos de la invención, de un agente NB de la invención, de un polipéptido de la invención, y/o de una composición farmacéutica que los comprende. En una modalidad, la invención se refiere a un método para la prevención y/o el tratamiento de cuando menos una enfermedad o un trastorno que se puede tratar mediante la modulación del DR5, su actividad biológica o farmacológica, y/o las sendas biológicas o de señalización en donde el DR5 esté involucrado, comprendiendo este método, administrar a un sujeto que lo necesite, una cantidad farmacéuticamente activa de una secuencia de aminoácidos de la invención, de un agente NB de la invención, de un polipéptido de la invención, y/o de una composición farmacéutica que los comprende. En una modalidad, la cantidad farmacéuticamente efectiva puede ser una cantidad que sea suficiente para modular el DR5, su actividad biológica o farmacológica, y/o las sendas biológicas o de señalización en donde esté involucrado el DR5; y/o una cantidad que proporcione un nivel de la secuencia de aminoácidos de la invención, de un agente NB de la invención, de un polipéptido de la invención en la circulación que sea suficiente para modular el DR5, su actividad biológica o farmacológica, y/o las sendas biológicas o de señalización en donde esté involucrado el DR5.

En una modalidad, la invención se refiere a un método para la prevención y/o el tratamiento de cuando menos una enfermedad o un trastorno que pueda ser prevenido y/o tratado mediante la administración de una secuencia de aminoácidos de NB o de un polipéptido de la invención, o de una construcción de nucleótidos de NB de la invención que los codifique, y/o de una composición farmacéutica que los comprenda, a un paciente. En una modalidad, el método comprende administrar una cantidad farmacéuticamente activa de una secuencia de aminoácidos de NB o polipéptido de la invención, o una construcción de nucleótidos de NB de la invención que los codifique, y/o de una composición farmacéutica que los

comprenda, a un sujeto que lo necesite.

En una modalidad, la invención se refiere a un método para la prevención y/o el tratamiento de cuando menos una enfermedad o un trastorno que pueda ser prevenido y/o tratado mediante la mejora de la apoptosis celular en células específicas o en un tejido específico de un sujeto que se vaya a tratar (y en particular, mediante la mejora de la apoptosis celular en las células de cáncer o en un tumor presente en el sujeto que se vaya a tratar), comprendiendo este método, administrar una cantidad farmacéuticamente activa de una secuencia de aminoácidos de NB o polipéptido de la invención, o de una construcción de nucleótidos de NB de la invención que los codifique, y/o de una composición farmacéutica que los comprenda, a un sujeto que lo necesite.

En una modalidad, la invención se refiere a un método para la prevención y/o el tratamiento de cuando menos una enfermedad o un trastorno seleccionado a partir del grupo que consiste en las enfermedades y los trastornos enlistados en la presente, comprendiendo este método, administrar a un sujeto que lo necesite, una secuencia de aminoácidos de NB o polipéptido de la invención, o una construcción de nucleótidos de NB de la invención que los codifique, y/o de una composición farmacéutica que los comprenda.

En una modalidad, la invención se refiere a un método para inmunoterapia, y en particular para inmunoterapia pasiva, cuyo método comprende administrar a un sujeto que padezca de, o que esté en riesgo de padecer, de las enfermedades y los trastornos mencionados en la presente, una cantidad farmacéuticamente activa de una secuencia de aminoácidos de NB o polipéptido de la invención, o una construcción de nucleótidos de NB de la invención que los codifique, y/o de una composición farmacéutica que los comprenda.

En los métodos anteriores, las secuencias de aminoácidos, los agentes NB y/o los polipéptidos de la invención, y/o las composiciones que comprenden los mismos, se puede administrar de cualquier manera adecuada, dependiendo de la formulación o

composición farmacéutica específica que se vaya a utilizar. Por consiguiente, las secuencias de aminoácidos, los agentes NB, y/o los polipéptidos de la invención, y/o las composiciones que comprenden los mismos, por ejemplo, se pueden administrar oralmente, intraperitonealmente (por ejemplo, intravenosamente, sub-cutáneamente, intramuscularmente, o por medio de cualquier otra vía de administración que circunvenga el tracto gastrointestinal), intranasalmente, transdérmicamente, tópicamente, por medio de un supositorio, mediante inhalación, nuevamente dependiendo de la formulación o composición farmacéutica específica que se vaya a utilizar. El médico será capaz de seleccionar una vía de administración adecuada y una formulación o una composición farmacéutica adecuada para utilizarse en esa administración, dependiendo de la enfermedad o del trastorno que se vaya a prevenir o a tratar, y de otros factores bien conocidos por el médico.

Las secuencias de aminoácidos, los agentes NB y/o los polipéptidos de la invención y/o las composiciones que comprenden los mismos, se administran de acuerdo con un régimen de tratamiento que es adecuado para prevenir y/o tratar la enfermedad o el trastorno que se vaya a prevenir o a tratar. El médico en general será capaz de determinar un régimen de tratamiento adecuado, dependiendo de factores tales como la enfermedad o el trastorno que se vaya a prevenir o a tratar, de la gravedad de la enfermedad que se vaya a tratar, y/o de la gravedad de los síntomas de la misma, de la secuencia de aminoácidos específica, del agente NB o polipéptido de la invención que se vaya a utilizar, de la vía de administración específica, y de la formulación o composición farmacéutica que se vaya a utilizar, de la edad, género, peso, dieta, condición general del paciente, y factores similares bien conocidos por el médico.

En términos generales, el régimen de tratamiento comprenderá la administración de una o más secuencias de aminoácidos, los agentes NB y/o polipéptidos de la invención, o de una o más composiciones que comprendan los mismas, en una o más cantidades o dosis farmacéuticamente efectivas. Las cantidades o

dosis específicas que se vayan a administrar pueden ser determinadas por el médico, nuevamente basándose en los factores citados anteriormente.

En términos generales, para la prevención y/o el tratamiento de las enfermedades y los trastornos mencionados en la presente, y dependiendo de la enfermedad o trastorno específico que se vaya a tratar, la potencia de la secuencia de aminoácidos específica, del agente NB y el polipéptido de la invención que se vaya a utilizar, de la vía de administración específica, y de la formulación o composición farmacéutica específica utilizada, las secuencias de aminoácidos de NB y los polipéptidos de la invención se administrarán en términos generales en una cantidad de entre 1 gramo y 0.01 microgramos por kilogramo de peso corporal al día, de preferencia de entre 0.1 gramo y 0.1 microgramos por kilogramo de peso corporal al día, tal como de aproximadamente 1, 10, 100 ó 1000 microgramos por kilogramo de peso corporal al día, ya sea continuamente (por ejemplo, mediante infusión), como una sola dosis diaria, o como múltiples dosis divididas durante el día. El médico será capaz de determinar en términos generales una dosis diaria adecuada, dependiendo de los factores mencionados en la presente. También estará claro que en los casos específicos, el médico puede elegir desviarse de estas cantidades, por ejemplo, con base en los factores citados anteriormente y en su juicio experto. En términos generales, se puede obtener alguna guía sobre las cantidades para administrarse a partir de las cantidades usualmente administradas para los anticuerpos convencionales o fragmentos de anticuerpos comparable contra el mismo objetivo administradas por medio de esencialmente la misma vía, tomando en cuenta, sin embargo, las diferencias en afinidad/avidez, eficacia, biodistribución, vida media, y factores similares bien conocidos por la persona experta.

En una modalidad, se utilizará una sola secuencia de aminoácidos, agente NB o polipéptido de la invención contiguo, ya sea que las secuencias traducidas contengan un solo dominio o bien múltiples dominios monovalentes o multivalentes. En una modalidad,

se proporcionan en combinación dos o más secuencias de aminoácidos, agentes NB y/o polipéptidos de la invención.

Los agentes NB, las secuencias de aminoácidos y los polipéptidos de la invención se pueden utilizar en combinación con uno o más compuestos o principios farmacéuticamente activos adicionales, es decir, como un régimen de tratamiento combinado, el cual puede o no conducir a un efecto sinérgico. Nuevamente, el médico será capaz de seleccionar estos compuestos o principios adicionales, así como un régimen de tratamiento combinado adecuado, basándose en los factores citados anteriormente y en su juicio experto.

En particular, las secuencias de aminoácidos de NB y los polipéptidos de la invención se pueden utilizar en combinación con otros compuestos o principios farmacéuticamente activos que son o se pueden utilizar para la prevención y/o el tratamiento de las enfermedades y los trastornos citados en la presente, como un resultado de lo cual, se puede o no obtener un efecto sinérgico. Los ejemplos de estos compuestos y principios, así como las vías, los métodos, y las formulaciones farmacéuticas o composiciones para administrarlas, estarán claras para el médico, y en términos generales incluyen los principios activos citostáticos usualmente aplicados para el tratamiento del tumor que se vaya a tratar.

Las combinaciones específicas contempladas para utilizarse con los agentes NB de la invención incluyen, pero no se limitan a, por ejemplo, taxol; gemcitabina; cisplatina; inhibidores de cIAP (tales como inhibidores de cIAP1, cIAP2 y/o XIAP); inhibidores de MEK incluyendo, pero no limitándose a, por ejemplo, U0126, PD0325901; inhibidores de bRaf incluyendo, pero no limitándose a, por ejemplo, RAF265; e inhibidores de mTor, incluyendo, pero no limitándose a, por ejemplo, RAD001. Se proporcionan combinaciones específicas en la presente, y en los Ejemplos.

Cuando dos o más sustancias o principios son para utilizarse como parte de un régimen de tratamiento combinado, se pueden administrar por medio de la misma vía de administración o por medio

de diferentes vías de administración, esencialmente al mismo tiempo o en diferentes tiempos (por ejemplo, esencialmente de una manera simultánea, consecutiva, o de acuerdo con un régimen alternado). Cuando las sustancias o principios son para administrarse simultáneamente por medio de la misma vía de administración, se pueden administrar como diferentes formulaciones o composiciones farmacéuticas, o como parte de una formulación o composición farmacéutica combinada, como quedará claro para la persona experta.

También, cuando dos o más sustancias o principios activos son para utilizarse como parte de un régimen de tratamiento combinado, cada una de las sustancias o principios se puede administrar en la misma cantidad y de acuerdo con el mismo régimen, como se utiliza cuando el compuesto o principio se utiliza por sí mismo, y este uso combinado puede o no conducir a un efecto sinérgico. Sin embargo, cuando el uso combinado de las dos o más sustancias o principios activos conduce a un efecto sinérgico, también puede ser posible reducir la cantidad de una, más, o todas las sustancias o principios que se vayan a administrar, mientras que todavía se logre la acción terapéutica deseada. Esto, por ejemplo, puede ser útil para evitar, limitar, o reducir cualesquiera efectos secundarios indeseados que estén asociados con el uso de una o más de las sustancias o principios cuando se utilizan en sus cantidades usuales, mientras que todavía se obtiene el efecto farmacéutico o terapéutico deseado.

La efectividad del régimen de tratamiento empleado de acuerdo con la invención se puede determinar y/o seguir de cualquier manera conocida por sí misma para la enfermedad o el trastorno involucrado, como quedará claro para el médico. El médico también será capaz, donde sea apropiado sobre una base de caso por caso, de cambiar o modificar un régimen de tratamiento particular, como para lograr el efecto terapéutico deseado, para evitar, limitar, o reducir los efectos secundarios indeseados, y/o para lograr un equilibrio apropiado entre el logro del efecto terapéutico deseado por una parte, y evitar, limitar, o reducir los efectos secundarios indeseados por otra parte.

En términos generales, se seguirá el régimen de tratamiento hasta que se logre el efecto terapéutico deseado y/o durante tanto tiempo como se mantenga el efecto terapéutico deseado. Nuevamente, esto puede ser determinado por el médico.

En otro aspecto, la invención se refiere al uso de una secuencia de aminoácidos, un agente NB, o un polipéptido de la invención, en la preparación de una composición farmacéutica para la prevención y/o el tratamiento de cuando menos las enfermedades y los trastornos asociados con el DR5; y/o para utilizarse en uno o más de los métodos para el tratamiento mencionado en la presente.

El sujeto que se vaya a tratar puede ser cualquier animal de sangre caliente, pero es en particular un mamífero, y más particularmente, un ser humano. En las aplicaciones veterinarias, el sujeto que se vaya a tratar incluye cualquier animal reproducido para propósitos comerciales o mantenido como una mascota. Como quedará claro para la persona experta, el sujeto que se vaya a tratar será en particular una persona que padezca de, o que esté en riesgo de padecer de, las enfermedades y los trastornos mencionados en la presente.

La invención se refiere al uso de una secuencia de aminoácidos de NB o polipéptido de la invención, o un nucleótido de NB que los codifique, en la preparación de una composición farmacéutica para la prevención y/o el tratamiento de cuando menos una enfermedad o un trastorno que pueda ser prevenido y/o tratado mediante la administración una secuencia de aminoácidos de NB o polipéptido de la invención, o un nucleótido de NB que los codifique, y/o una composición farmacéutica de los mismos a un paciente.

Más particularmente, la invención se refiere al uso de una secuencia de aminoácidos de NB o polipéptido de la invención, o un nucleótido de NB que los codifique, en la preparación de una composición farmacéutica para la prevención y/o el tratamiento de las enfermedades y los trastornos asociados con el DR5, y en particular para la prevención y el tratamiento de una o más de las enfermedades y los trastornos enlistados en la presente.

Nuevamente, en esta composición farmacéutica, la uno o más secuencias de aminoácidos de NB o polipéptido de la invención, o el nucleótido de NB que los codifica, y/o una composición farmacéutica de los mismos, también se pueden combinar de una manera adecuada con uno o más principios activos diferentes, tales como aquéllos mencionados en la presente.

En una modalidad, aunque se prefiere mucho el uso del los agentes NB de ejemplo de la invención, quedará claro que, con base en la descripción en la presente, la persona experta será capaz de diseñar y/o generar, de una manera análoga, otras secuencias de aminoácidos, y en particular los anticuerpos de (un solo) dominio contra el DR5, así como los polipéptidos que comprenden esos anticuerpos de (un solo) dominio, y/o nucleótidos que los codifican.

Por ejemplo, estará claro para la persona experta que es posible “injertar” una o más de las regiones determinantes de complementariedad (CDRs) mencionadas en la presente, para los agentes NB de la invención, sobre los anticuerpos de (un solo) dominio u otros andamiajes de proteína, incluyendo, pero no limitándose a, andamiajes humanos o andamiajes que no sean de inmunoglobulina. Los andamiajes y técnicas adecuadas para este injerto de CDR estará claro para la persona experta y son bien conocidos en la materia, véanse, por ejemplo, aquéllos mencionados en la Publicación Internacional Número WO 08/020079. Por ejemplo, se pueden emplear de una manera análoga las técnicas conocidas por sí mismas para injertar regiones determinantes de complementariedad (CDRs) de ratón o de rata sobre estructuras y andamiajes humanos, para proporcionar proteínas quiméricas que comprendan una o más de las regiones determinantes de complementariedad (CDRs) de los agentes NB de la invención, y una o más regiones o secuencias de estructura humanas.

También se debe observar que, cuando los agentes NB de la invención contienen una o más secuencias de CDR adicionales que las secuencias de CDR preferidas mencionadas en la presente, y estas secuencias de CDR se pueden obtener de cualquier manera

conocida por sí misma, por ejemplo, empleando una o más de las técnicas descritas en la Publicación Internacional Número WO 08/020079.

Otros usos de las secuencias de aminoácidos, agentes NB, polipéptidos, ácidos nucleicos, construcciones genéticas, y huéspedes y células huésped de la invención, estarán claros para la persona experta basándose en la divulgación de la presente. Por ejemplo, y sin limitación, las secuencias de aminoácidos de la invención se pueden enlazar a un vehículo o soporte sólido adecuado, como para proporcionar un medio que se puede utilizar de una manera conocida por sí misma para purificar el DR5 a partir de las composiciones y preparaciones que los comprenden. Los derivados de las secuencias de aminoácidos de la invención que comprenden una marca detectable adecuada también se pueden utilizar como marcadores para determinar (cualitativamente o cuantitativamente) la presencia del DR5 en una composición o preparación, o como un marcador para detectar selectivamente la presencia del DR5 sobre la superficie de una célula o tejido (por ejemplo, en combinación con técnicas de selección celular adecuadas).

La invención se describirá ahora adicionalmente por medio de la siguiente parte experimental no limitante.

1. Ejemplo I

1.1 Clonación del DR5 humano y de cinomolgo, y preparación de la proteína

1.1.1 Clonación del dominio extracelular (ECD) del DR5 humano de forma larga, y del dominio extracelular del DR5 de cinomolgo de forma larga y corta

El dominio extracelular del DR5 humano de forma larga (aa55-213) se clona mediante RT-PCR. El ARN total se aísla a partir de Células Jurkat y Raji, mediante un mini-kit RNeasy de Qiagen (Número de Catálogo 74104).el ADNc se hace mediante el Sistema de Síntesis de la Primera Cadena SuperScrit II (Invitrogen, Catálogo: 11904-018), entonces se amplifica mediante Polimerasa de ADN Taq

Platino de Alta Fidelidad (Invitrogen, Número de Catálogo 11304-011) utilizando el protocolo estándar: 94°C durante 2 minutos, seguido por 30 ciclos a 95°C/30 segundos, 55°C/30 segundos, 72°C/60 segundos, y una incubación final a 72°C durante 7 minutos. Los cebadores hacia adelante y en reversa utilizados para la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) son: 5'-CTGATCACCC AACAAGACCT AG-3' (SEQ ID NO: 83), y 5'-GCCTGAGAGA GAACAGGGAG A-3' (SEQ ID NO: 84), respectivamente. Entonces el fragmento de 476 pares de bases resultante se liga en el vector de expresión pBAD/Thio-TOPO de *E. coli* (Invitrogen, Número de Catálogo K370-01). Los clones positivos se identifican mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y se confirman mediante la secuencia del ADN.

El gen de DR5 de cinomolgo de longitud total se clona originalmente a partir del ADNc de hígado de cinomolgo (BioChain Institute, Inc. EUA) mediante PR-PCR. Los cebadores hacia adelante (5'-CACCATGGAA CAACGGGGAC AGAACGCC-3') (SEQ ID NO: 85), y en reversa (5'-TTAGGACATG GCAGAGTCTG CATTACCTTC-3') (SEQ ID NO: 86) se diseñan basándose en la secuencia de nucleótido del DR5 humano, incluyendo los codones de inicio (ATG), y de paro (TAA), respectivamente. Se utiliza la Polimerasa de ADN Taq Platino de Alta Fidelidad (Invitrogen, Número de Catálogo 11304-011)para la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y los fragmentos resultantes se ligan en el vector TOPO direccional de pcDNA3.1. Las colonias positivas se identifican mediante secuenciación del ADN. De una manera similar al gen del DR5 humano, se identifican dos alternativas de empalme del gen del DR5 de cinomolgo. Una tiene el ECD de forma larga, y la otra tiene el ECD de forma corta.

Tanto la forma larga de cinomolgo (aminoácidos 55-213), como la forma corta (aminoácidos 55-174) del ECD de DR5 se clonan adicionalmente en el vector pBAD/Thio-TOPO (Invitrogen, Número de Catálogo K370-01). Los clones positivos se identifican mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y se confirman mediante

secuenciación del ADN.

1.1.2 Establecimiento de líneas celulares CHO que expresan el DR5 de cinomolgo de superficie celular

La células de ovario de hámster chino (CHO-K1) se transfectan en el 90 al 95 por ciento de confluencia utilizando FuGENE6 (Roche Applied Sciences), y 1 microgramo del vector de expresión pcDNA3.1-cynoDR5. Las células transfectadas se seleccionan con 500 microgramos/mililitro de Geneticina (G418), y se subclonan mediante selección celular.

1.1.3 Expresión y purificación de la fusión de tio-redoxina-DR5ECD-His6 a partir de E. coli

Para la expresión del ECD de DR5, el vector pBAD/Thio-DR5ECD se transforma en la cepa TOP-10 de *E. coli* (Invitrogen, Número de Catálogo C4040-03). Se utiliza una colonia individual para inocular 100 mililitros de LB que contienen 100 microgramos/ mililitro de ampicilina. Este cultivo se incuba durante la noche a 37°C con agitación a 225 rpm. Se inoculan tres litros de LB/ampicilina con 30 mililitros del cultivo durante la noche, y se agitan a 37°C hasta que el OD_{600} alcanza 0.5. Entonces el cultivo se induce con arabinosa al 0.02 por ciento durante 3 horas a 37°C. El gránulo bacterial se vuelve a suspender en 21 mililitros de regulador de lisis (PBS con NaCl 0.3M, Triton X-100 al 0.4 por ciento, e imidazol 10mM) que contiene inhibidores de proteasa (Roche, Número de Catálogo 1836153). El lisado se sonica dos veces durante 60 segundos, seguido por centrifugación a 20,000 x g durante 20 minutos. El ECD del DR5 marcado con Hisx6 soluble se purifica mediante cromatografía por afinidad de quelato de níquel. El ECD del DR5 marcado con Hisx6 soluble se crea insertando la marca de la secuencia de codificación del polipéptido de la SEQ ID NO: 91 ó 92 en el extremo 3' del marco de lectura de la construcción del DR5, en donde la marca se expresa en el extremo C-terminal del polipéptido. El lisado clarificado se pasa sobre 6 mililitros de Agarosa de Ni-NTA (Qiagen, Número de Catálogo 30210) equilibrada con regulador de lisis. La columna se lava con 20 mililitros de regulador de lisis,

seguido por 15 mililitros de suero regulado con fosfato que contiene imidazol 50 mM y Triton X-100 al 0.1 por ciento. Entonces la proteína ECD de DR5 se eluye con 10 mililitros de suero regulado con fosfato que contiene imidazol 100mM y Triton X-100 al 0.1 por ciento, seguido por el mismo regulador que contiene imidazol 250 mM. Se revisan las fracciones en gel Bis-Tris de NuOAGE del 4 al 12 por ciento (Invitrogen, Número de Catálogo NP0329BOX). Las fracciones positivas que contienen la proteína de ECD de DR5 se reservan, se concentran, y se almacenan a -20°C.

Después de la cromatografía por afinidad de quelato de níquel, la proteína se purifica además mediante cromatografía por exclusión de tamaños hecha en un explorador Amersham AKTA con un programa de software Unicorn. La columna es HiPrep 26/60 Sephacryl S-200 HR con un volumen del lecho de 320 mililitros (Amersham, Número de Catálogo 17-1195-01). Se utilizan los parámetros estándares de acuerdo con las recomendaciones del fabricante. Dicho de una manera breve, el regulador 1xPBS (pH de 7.2) fluye a través de la columna a 0.5 mililitros/minuto, y se recolectan 0.5 mililitros/fracción a 4°C.

El último paso de la purificación es la cromatografía de intercambio de iones. Se utiliza la columna Mono Q 5/50 GL de intercambio de aniones (Amersham, Número de Catálogo 17-5166-01) con una elución en gradiente a una velocidad de flujo de 1 mililitro/minuto, y se recolectan 0.5 mililitros/fracción a 4°C.

1.1.4 Expresión y purificación de la proteína de fusión DR5ECD-Fc a partir de células HEK293

Se clonan tanto el dominio extracelular del DR5 humano como de cinomolgo de forma larga y de forma corta en el vector de expresión pRS5a-IgG que contiene un promotor de CMV y un fragmento del gen de IgG1 Fc humano. Los clones positivos se identifican mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y se confirman mediante la secuencia de ADN. Las células HEK293 se transfectan transitoriamente con Lipofectamina 2000 (Gibco, Número de lote 11317078). El medio que contiene la proteína de fusión

DR5ECD-Fc se recolecta siete días después de la transfección. El sobrenadante concentrado se ajusta a un pH de 7.2, se aclara mediante filtración, y se carga en una columna de Proteína A-Sepharose FF de 5 mililitros a 0.5 mililitros/minuto. Después de que la línea base se lava con suero regulado con fosfato, pH de 7.3, el material enlazado se eluye con Citrato 50 mM/NaCl 140 mM, pH de 2.7, se neutraliza, y se filtra para esterilizarse.

1.2 Inmunizaciones

Se inmunizan tres llamas con antígeno de DR5 humano. Una llama (106) se inmuniza con el DR5 humano recombinante corto (133 residuos) (Peprotech, Rocky Hill NJ, Número de Catálogo 310-19). Otras dos llamas se inmunizan con la fusión de DR5-tio-redoxina humana del ectodominio total. Las llamas reciben siete dosis por semana, se inyectan intramuscularmente con 50 a 100 microgramos de antígeno (con Stimune (Cedi Diagnostics, Lelystad NL) como un adyuvante), seguidas por una dosis de 50 microgramos adicionales dos semanas después. Las muestras de sangre inmune se toman en el día 47 y en el día 88 después de empezar las inmunizaciones, así como los tejidos del ganglio linfático en el día 88.

1.3 Construcciones de Bibliotecas

Se hacen muestras de ADNc a partir de preparaciones de ARN total de la sangre inmune y las muestras de ganglio linfático. Las secuencias de nucleótidos que codifican las construcciones de DR5 NB se amplifican a partir de muestras de ADNc de las tres llamas inmunizadas con el DR5 humano en un paso de reacción de RT-PCR utilizando los cebadores ABL051 (SEQ ID NO: 73), ABL052 (SEQ ID NO: 74), y ABL003 (SEQ ID NO: 75). Las secuencias de los cebadores se muestran en la Tabla 5. Los amplicones de 700 pares de bases amplificados a partir de los ADNcs de IgG2 e IgG3 en la muestra se aíslan a partir del gel y subsiguientemente se utilizan como plantillas en una reacción en cadena de la polimerasa (PCR) anidada utilizando el cebador ABL050-MfeI (SEQ ID NO: 76) que contiene los sitios de restricción *Sfi*I y *Mfe*I, y el cebador ABL003. Los productos de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

subsiguientemente se digieren con *Sfi*I y *BstE*II (FR4 que se presenta naturalmente de los genes V_{HH}), y se ligan en los sitios de restricción correspondientes del vector fagémido pAX50 para obtener una biblioteca después de la eletroporación en *Escherichia coli* TG-1. El pAX50 es un vector de expresión derivado a partir de pUC119, el cual contiene el promotor LacZ, una proteína pIII de colífago, un gen de resistencia a la ampicilina o carbenicilina, un sitio de multi-clonación, y la secuencia líder del gen3. En el marco con la construcción de la secuencia de codificación de NB, el vector codifica para una marca c-myc C-terminal y una marca (His)6. El vector de fagémido permite la producción de partículas de fago, que expresan las construcciones de DR5 NB individuales como una proteína de fusión con el producto del gen3.

Tabla 5

Secuencias de cebador y enlazador, con SEQ ID NO

Nombre	Secuencias (5' a 3')	ID
ABL051	GGCTGAGCTG GGTGGTCCTG G	73
ABL052	GGCTGAGTTT GGTGGTCCTG G	74
ABL003	GGTACGTGCT GTTGAACTGT TCC	75
ABL050-MfeI	CATTTGAGTT GGCCTAGCCG GCCATGGCAG AGGTGCAATT GGTGGAGTCT GGGGG	76
M13Fwd	TGTAAAACGA CGGCCAGT	77
M13Rev	CAGGAAACAG CTATGACC	78
Rev_30GlySer	TCAGTAACCT GGATCCCCCG CCACCGCTGC CTCCACCGCC GCTACCCCCG CCACCGCTGC CTCCACCGCC TGAGGAGACG GTGACCTG	79

Nombre	Secuencias (5' a 3')	ID
For_GlySer35	AGGTTACTGA GGATCCGGCG GTGGAGGCAG CGGAGGTGGG GGCTCTGGTG GCGGGGGTAG CGAGGTGCAG CTGGTGGAGT CTGG	80
DR5 ECD For	CTGATCACCC AACAAGACCT AG	83
DR5 ECD Rev	GCCTGAGAGA GAACAGGGAG A	84
DR5 cyno For	CACCATGGAA CAACGGGGAC AGAACGCC	85
DR5 cyno Rev	TTAGGACATG GCAGAGTCTG CATTACCTTC	86

1.4 Selecciones

Las diferentes concentraciones de entre 0 y 1 microgramo/ mililitro de proteína de fusión de DR5-Fc humano corto (182 aminoácidos) (R&D Systems, Minneapolis MN, Número de Catálogo 631-T2/CF), proteína de fusión de DR5-Fc humano de ectodominio total ((aminoácidos de DR5 humano 56 a 213 fusionados con Fc de la IgG1 humana), y DR5 humano recombinante corto biotinilado (133 residuos) (Peprotech, Rocky Hill NJ, Número de Catálogo 310-19) se inmovilizan en placas y en placas recubiertas de estreptavidina, respectivamente. El bloqueo se hace utilizando suero regulado con fosfato complementado con caseína al 1 por ciento. Se agregan los fagos preparados a partir de las tres bibliotecas de pAX50 anteriormente mencionadas, y se incuban durante 30 minutos (en suero regulado con fosfato complementado con caseína al 0.1 por ciento y Tween20 al 0.1 por ciento). Los fagos no enlazados se lavan (con suero regulado con fosfato complementado con Tween 20 al 0.05 por ciento); los fagos enlazados se eluyen mediante la adición de tripsina (1 miligramo/mililitro en suero regulado con fosfato), y 30 minutos de incubación a 37˚C. Se permite que los fagos eluidos infecten las células TG-1 de crecimiento exponencial, que entonces se ponen sobre placas de agar LB que contiene

ampicilina. Los fagos preparados a partir de las salidas seleccionadas se utilizan como entradas en una segunda ronda de selección sobre proteína de fusión de DR5-Fc humana de longitud completa (aminoácidos de DR5 humano 56 a 213 fusionados con Fc de la IgG1 humana), y DR5 humano recombinante corto biotinilado (133 residuos) (Peprotech, Rocky Hill NJ, Número de Catálogo 310-19) como se describe anteriormente.

Se prepara el ADN del plásmido de las salidas de las rondas de selección 1 y 2, se digiere con *Sfi*I y *Bst*EII, y los fragmentos de ADN que codifican las construcciones anti-DR5 NB se ligan en el vector pAX51 y se transforman en células competentes TG-1. El pAX50 es un vector de expresión derivado a partir de pUC119, el cual contiene al promotor LacZ, un gen de resistencia a la ampicilina o a la carbenicilina, un sitio de multiclonación, y la secuencia líder del gen3. En un marco con la construcción de la secuencia de codificación de NB, el vector codifica para una marca c-myc C-terminal, y una marca (His)6. Los clones resistentes a carbenicilina se analizan para determinar la presencia del inserto, y se verifican las secuencias de los clones positivos. Las células TG-1 que contienen las construcciones de interés de DR5 NB crecen en un medio TB complementado con carbenicilina, y se inducen mediante la adición de IPTG para la expresión. La expresión se deja continuar durante 4 horas a 37°C. Después de la centrifugación, los gránulos celulares se congelan durante la noche, entonces se vuelven a suspender durante 1 hora a 4°C en suero regulado con fosfato (1/10 de volumen de cultivo), otra vez seguido por centrifugación. Los sobrenadantes resultantes se utilizan como extracto periplásmico.

1.5 Rastreo

Los extractos periplásmicos (como se describen anteriormente) se analizan para determinar el enlace de DR5 mediante ELISA. Se agregan diluciones a 10 veces de los extractos periplásmicos a las placas recubiertas con DR5 humano recombinante corto (133 residuos) (Peprotech, Rocky Hill NJ, Número de Catálogo 310-19) o proteína de fusión DR5-Fc de

cinomolgo (DR5 de cinomolgo, aminoácidos 56 a 213 fusionados con la IgG1 humana Fc), los aminoácidos 56 a 213, IgG1 NVTS, y se incuban durante 2 horas (en suero regulado con fosfato complementado con caseína al 0.1 por ciento y Tween20 al 0.1 por ciento). Los extractos periplásmicos no enlazados se lavan (PBS complementado con Tween 20 al 0.05 por ciento), y se detectan las construcciones de NB enlazadas, utilizando anti-myc de ratón (Roche, Basilea CH, Número de Catálogo 11667149001), seguido por fosfatasa alcalina de conejo anti-ratón (Sigma, St. Louis MO, Número de Catálogo A-1902).

En otro conjunto de experimentos, las líneas celulares expresan el DR5 humano (Colo205) o el DR5 de cinomolgo (células CHO-K1 transfectadas con un vector de expresión que lleva la longitud total del gen del DR5 de cinomolgo corriente abajo de un promotor de CMV) se exponen a los extractos periplásmicos (se vuelven a suspender en suero regulado con fosfato complementado con suero fetal de becerro al 10 por ciento). Se detecta el enlace de las construcciones de NB al DR5 enlazado a células utilizando anti-myc de ratón (anticuerpo monoclonal, clon 9E10 ATCC (Teddington, Reino Unido) número CRL-1729, producido en los ratones como ascitas y purificado en la empresa utilizando cromatografía por afinidad estándar), seguido por IgG-fitoeritrina anti-ratón (Jackson ImmunoResearch Laboratories, West Grove, PA, Número de Catálogo 115-115-164). Las células muertas se contra-tiñen con TO-PRO-3 (Molecular Probes, Carlsbad CA, Número de Catálogo T3605). Los resultados se muestran en la Tabla 6.

Tabla 6

Enlace de las construcciones monoméricas de NB al DR5 mediante ELISA (ABS_{405nm})

Construcciones de NB	Humano	Cinomolgo

Construcciones de NB	Humano	Cinomolgo
10F1	0.754	0.124
11D1	0.540	0.213
11H6	0.552	0.133
4E6	0.838	0.313
7A12	0.812	0.341

Se evalúa el enlace de las construcciones de NB al DR5 mediante resonancia de plasmón superficial en un instrumento Biacore 3000. Se analiza la especificidad de enlace permitiendo que las diluciones de los extractos periplásmicos pasen sobre un chip sensor CM5 recubierto con el DR5 humano recombinante corto 270 RU (133 residuos) (Peprotech, Rocky Hill NJ, Número de Catálogo 310-19). Se analizan las fases de disociación y se dan los valores fuera de índice correspondientes ($k_{desactivado}$) en la Tabla 7 y en la Tabla 8. La Tabla 7 muestra los resultados para el enlace de las construcciones monoméricas de NB al DR5 enlazado a células mediante FACS (conteo promedio de fluorescencia). La Tabla 8 muestra los resultados para los valores fuera de índice como se determina mediante Resonancia de Plasmón Superficial. Las secuencias se proporcionan en las Tablas 1 a 4.

Tabla 7

Enlace de las construcciones monoméricas de NB al DR5 enlazado a células mediante FACS

Construcciones de NB	Humano	Cinomolgo
10F1	125	1626

Construcciones de NB	Humano	Cinomolgo
11D1	919	417
11H6	723	292
4E6	972	2868
7A12	1097	24516

Tabla 8

Valores fuera de índice (1/s) como se determinan mediante Resonancia de Plasmón Superficial

Construcciones de NB	$k_{desactivado}$ (1/s)
10F1	2.34×10^{-03}
11D1	4.44×10^{-04}
11H6	2.12×10^{-03}
4E6	9.54×10^{-05}
7A12	1.90×10^{-04}

Ejemplo II

2.1 Trimerización

Los fragmentos de ADN que codifican las construcciones de NB anti-DR5, se digieren con *Mfe*I y *Bst*EII y se clonan en los vectores pAX73, pAX74 y pAX75 dentro del marco con las secuencias enlazadoras. Éstos se transforman en células competentes TG-1, y se analizan los clones resistentes a canamicina para determinar la presencia del inserto y verificar la secuencia. Las construcciones resultantes se digieren con *Sfi*I, *Bpu*AI y *Not*I, y

entonces se clona la construcción de NB que contiene fragmentos a través de una ligación de cuatro puntos en el vector pAX51 digerido por *Sfi*I–*Not*I. Se verifica nuevamente la secuencia de los clones resistentes a la carbenicilina positivos, es decir, aquéllos que codifican las construcciones de NB marcadas con CMYC-HIS6 trivalentes (cada bloque de la construcción de NB se fusiona al siguiente mediante una secuencia enlazadora). Los pAX73, pAX74, pAX75 y pAX83 son vectores de clonación derivados de pUC que contienen un gen de resistencia para canamicina o neomicina, sitios de clonación múltiple, y están dentro del marco con la secuencia de codificación de la construcción de NB, y estos vectores codifican las secuencias enlazadoras de GlySer.

2.2 Tetramerización

Los fragmentos de ADN que codifican las construcciones de NB anti-DR5 se amplifican por medio de PCR utilizando M13Rev (SEQ ID NO: 78), y Rev_30GlySer (SEQ ID NO: 79) o For_GlySer35 (SEQ ID NO: 80), y M13Fwd (SEQ ID NO: 77), respectivamente. Tanto Rev_30GlySer como For_GlySer35 codifican las secuencias enlazadoras (secuencias cebadoras en la Tabla 5). Los productos de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) se digieren con *Mfe*I, *Bam*HI y *Bst*EII, y ambos fragmentos se clonan conjuntamente a través de un ligamiento de tres puntos en pAX75 y en pAX83, dentro del marco con las secuencias enlazadoras codificadas por el vector. Éstos se transforman en células competentes TG-1, y los clones resistentes a la canamicina se analizan para determinar la presencia de construcciones bivalentes del inserto de NB, y se verifica la secuencia. Entonces los clones bivalentes positivos se digieren con *Sfi*I, *Bpu*AI y *Not*I, y entonces se clona la construcción de NB que contiene los fragmentos en el vector pAX51 digerido por *Sfi*I–*Not*I. Nuevamente se verifica la secuencia de los clones resistentes a la carbenicilina positivos, que codifican las construcciones de NB tetravalentes, estando cada bloque de construcción de NB fusionado al siguiente mediante una secuencia enlazadora.

2.3 Pentamerización

Los genes sintéticos que codifican la cuarta secuencia del enlazador de GlySer y el quinto bloque de construcción de NB se ordenan de acuerdo con GeneArt AG (Regensburg, Alemania). Entonces, estos fragmentos se digieren con HgaI y NotI, y se ligan en las construcciones de NB tetravalentes digeridas por BstEII-NotI.

2.4 Expresión a pequeña escala

Las células TG-1 que contienen las construcciones de NB anti-DR5 multivalentes de interés se cultivan en matraces de agitación con pantallas que contienen el medio TB más 100 microgramos/mililitro de carbenicilina, y se inducen mediante la adición de IPTG 1 mM para la expresión. Se deja continuar la expresión durante 4 horas a 37°C. Después de recolectar las células, se preparan los extractos periplásmicos y las construcciones de NB marcadas con HIS6 se purifican mediante cromatografía por afinidad de metales inmovilizados (HisTrap FF Crude, GE Healthcare), seguida por cromatografía de filtración de gel (Superdex 75 HR16/10, GE Healthcare) en PBS.

3. Ejemplo III

3.1 Enlace sobre Biacore

Los chips sensores Biacore CM5 se recubren con la proteína de fusión del DR5 humano-Fc corta (182 aminoácidos) (R&D Systems, Minneapolis MN, catálogo # 631-T2/CF) o la proteína de fusión del DR5 de cinomolgo-Fc (aminoácidos 56 a 213, IgG1 NVTS). Entonces se flotan diferentes concentraciones (de 1 a 100 nM) de las construcciones de NB anti-DR5 monovalentes y multivalentes sobre los chips para un análisis cinético de la interacción de enlace. Todas las construcciones de NB anti-DR5 multivalentes se enlazan al DR5 humano y de cinomolgo (Tabla 9).

Tabla 9

Afinidades (M) de las construcciones de NB anti-DR5 como se determinan mediante resonancia de plasmón superficial

Clon	DR5 Humano	DR5 de Cinomolgo

	Mono	Tri	Tetra	Mono	Tri	Tetra
11D1	1.0 x 10^{-9}	<3.0 x 10^{-11}	ND	2.2 x 10^{-7}	<2.0 x 10^{-10}	ND
7A12	7.3 x 10^{-9}	<3.0 x 10^{-12}	ND	7.1 x 10^{-9}	<3.0 x 10^{-11}	ND
10F1	4.2 x 10^{-9}	<5.0 x 10^{-11}	3.9 x 10^{-12}	1.4 x 10^{-7}	<6.0 x 10^{-10}	2.2 x 10^{-11}
11H6	6.7 x 10^{-9}	<2.0 x 10^{-10}	ND	9.2 x 10^{-6}	<3.0 x 10^{-10}	ND
4E6	1.7 x 10^{-10}	<5.0 x 10^{-11}	ND	1.6 x 10^{-8}	<9.0 x 10^{-11}	ND

ND: No determinado; BDL: debajo del límite de detección

3.2 Enlace sobre FACS

En otro conjunto de experimentos, las líneas celulares que expresan el DR5 humano (Colo205) o de cinomolgo (células CHO-K1 de cinomolgo transfectadas con un vector de expresión que lleva el gen cynoDR5 de longitud completa corriente abajo de un promotor de CMV) se exponen a 1 nM de las construcciones de NB anti-DR5 multivalentes (resuspendidas en suero regulado con fosfato complementado con suero fetal de becerro al 10 por ciento). El enlace de las construcciones de NB al DR5 enlazado a las células se detecta utilizando anti-myc de ratón (anticuerpo monoclonal, clon 9E10 ATCC (Teddington, Reino Unido) número CRL-1729, producido en los ratones como ascitas y purificado en la empresa utilizando cromatografía por afinidad convencional), seguido por IgG-fitoeritrina anti-ratón (Jackson ImmunoResearch Laboratories, West Grove, PA, catálogo # 115-115-164). Las células muertas se contra-tiñen con TO-PRO-3 (Molecular Probes, Carlsbad CA, catálogo # T3605). Todas las construcciones de NB multivalentes se enlazan

específicamente al DR5 humano y de cinomolgo enlazado a células. El enlace de los agentes NB a cada una de la forma corta y la forma larga del DR5 es aproximadamente equivalente para cada una, sugiriendo que todos los epítopos se mantienen en común entre las dos formas.

En otro experimento, se estiman las constantes de enlace evidente a partir de los experimentos de enlace de saturación sobre FACS (como se describe anteriormente) de 10 a 0.005 nM de las construcciones de NB anti-DR5 tetravalentes al DR5 humano y de cinomolgo enlazado a células. Las constantes de enlace evidente se calculan utilizando GraphPad Prism 5 (GrafPad Software, San Diego, CA).

3.3 Especificidad de DR5

Un grupo de miembros de la súper-familia de receptores del factor de necrosis tumoral (TNF) se seleccionan para probar la especificidad de DR5 (Tabla 10). El dominio extracelular de los miembros de la súper-familia de receptores del factor de necrosis tumoral (TNF) se clona en pBadThioTopo, y se transforma en *E. coli* cepa TOP10 (Invitrogen #C4040-03). La proteína se expresa de acuerdo con el protocolo del fabricante. Los lisados celulares se recolectan para el rastreo mediante ELISA. se agregan 25 microlitros de albúmina de suero bovino (BSA) al 20 por ciento por 10 mililitros del lisado. Las placas de captura de His (Sigma #S-5688) se recubren con 100 microlitros del lisado, y se incuban durante 1 hora a temperatura ambiente. La solución restante se aspira y los pozos se lavan tres veces con suero regulado con fosfato + Tween al 0.05 por ciento (PBST). Los anticuerpos primarios se diluyen como sigue en regulador de bloqueo (suero regulado con fosfato (PBS) que contiene suero bovino fetal al 10 por ciento); el LBY135 (control positivo, anticuerpo anti-DR5, Novartis AG) se diluye hasta 0.24 miligramos/mililitro, y el anti-V5 de conejo (Abcam #Ab9116-100) se diluye a 1:5000. Se agregan 100 microlitros del anticuerpo primario diluido por pozo. Las placas de ensayo se incuban a temperatura

ambiente durante una hora, y luego se lavan tres veces con PBST. Los anticuerpos secundarios (IgG-HRP de cabra anti-conejo) (Jackson Immunoresearch Laboratories #111-035-046) para los pozos incubados con V5, e IgG-HRP de cabra anti-humano (Jackson Immunoresearch Laboratories #109-035-098) para los pozos incubados con LBY135) se diluyen a 1:5000 en suero regulado con fosfato que contiene suero bovino fetal (FBS) al 5 por ciento y Tween al 0.025 por ciento. Se agregan 100 microlitros del anticuerpo secundario a los pozos apropiados. Después de la incubación a temperatura ambiente durante 1 hora, las placas se lavan tres veces con PBST. Se agregan 100 microlitros de Sure Blue (KPL #52-00-03), y una vez que se ha revelado el color, las placas se leen a una absorbencia de 650 nanómetros.

Tabla 10

Miembros de la súper-familia de receptores del factor de necrosis tumoral (TNF)

Número TNFR	Nombre TNFR	Número de Acceso	ECD
TNFRSF1A	TNFR1	NM001065	Leu34-Thr211
TNFRSF1B	TNFR2	M32315	Thr27-Leu241
TNFRSF3	TNFR3	L04270	Pro30-Thr224
TNFRSF4	OX40	X75962	Gly33-Gly212
TNFRSF5	CD40	X60592	Val18-Leu192
TNFRSF6	FAS	M67454	Ser20-Gly175
TNFRSF6B	DcR3	AF104419	Val27-Ala176
TNFRSF7	CD27	M63928	Thr21-Ser187
TNFRSF9	CD137	L12964	Glu19-Ile188
TNFRSF10C	DcR1	AF012536	Thr27-Leu241

Número TNFR	Nombre TNFR	Número de Acceso	ECD
TNFRSF10D	DcR2	AF029761	Thr57-Thr198
TNFRSF11B	OPG	U94332	Lys17-Ile197
TNFRSF13	BCMA	NM001192	Met1-Thr56
TNFRSF13B	TACI	NM012452	Met2-Val161
TNFRSF13C	BAFFR	NM052945	Met1-Gly64
TNFRSF16	NGFR	M14764	Lys29-Ile233

Todas las construcciones de NB específicamente se enlazan al DR5, pero no a otros miembros de TRAIL y TNF. Véase, por ejemplo, Figura 1.

3.4 Mapeo de Epítopos Biacore

El rastreo fuera de índice Biacore (Tabla 8) sobre el DR5 humano recombinante (133 residuos) (Peprotech, Rocky Hill NJ, catálogo # 310-19) reveló que todas las construcciones de NB anti-DR5 se enlazan al dominio extracelular de DR5 pero no al residuo 29 de una región alternativamente empalmada (residuos de aminoácidos 185 a 231).

En otro experimento, los chips sensores Biacore CM5 se recubren con las construcciones de NB anti-DR5 monovalentes (230 a 520 RU). Entonces, se flotan 500 nM del DR5 humano recombinante corto (133 residuos) (Peprotech, Rocky Hill NJ, catálogo # 310-19) sobre los chips hasta que se alcanza la saturación. En este punto, se flotan 50 nM de TRAIL humano (R&D Systems, Minneapolis MN, catálogo # 375-TEC/CF) sobre los chips y se utiliza el aumento en la señal de enlace para categorizar las construcciones de NB en diferentes clases de epítopos comparándose con el epítopo de TRAIL (Tabla 11).

Tabla 11

Mapeo de epítopos de las construcciones de NB anti-DR5 comparándose con TRAIL

Construcción de NB	Resultado
11D1	Sin bloqueo de TRAIL
4E6	Bloqueo parcial de TRAIL
10F1	Bloqueo de TRAIL
11H6	Sin bloqueo de TRAIL
7A12	Bloqueo de TRAIL

3.5 Sobrevivencia Celular *In vitro*

Las células se mantienen en fase de crecimiento logarítmico antes de los experimentos. En el día del ensayo, las células se transfieren aplacas de 96 pozos (Corning Inc., Lowell, MA, Cat#3917) a 5,000 - 20,000 células por pozo, entonces se agregan las construcciones de NB anti-DR5 diluidas en serie a 50 microlitros/pozo. Después de la incubación durante 24 a 72 horas, se cuantifica el número relativo de células sobrevivientes utilizando un Kit de cuantificación de ATP basada en luciferasa (Cell Titer Glo, Promega, Madison, WI Cat # G7571), y se lee en un lector de placas de luminiscencia (Fluoroskan Ascent FL, Thermo Electron, Waltham, MA).

Un panel de construcciones trivalentes de NB anti-DR5 se rastrea en un ensayo de sobrevivencia celular con las células Colo205. Todas las construcciones trivalentes indujeron la apoptosis en Colo205 (véase la Tabla 12) en contraste con sus contra-partes monovalentes (no se muestran los datos) que no son biológicamente activas en este ensayo. Una construcción tetravalente de una construcción de NB irrelevante (que no se enlaza al DR5) no indujo la apoptosis.

Tabla 12

Potencia *in vitro* (IC_{50} (M)) de las construcciones trivalentes de NB anti-DR5 en Colo205

Construcción de NB	IC_{50} (M)
10F1 tri	4.07×10^{-11}
11D1 tri	1.11×10^{-10}
11H6 tri	4.58×10^{-11}
4E6 tri	3.79×10^{-11}
7A12 tri	1.20×10^{-10}

En otro experimento (Tabla 13), las construcciones de NB anti-DR5 trivalentes seleccionadas se rastrean en los ensayos de sobrevivencia celular contra un panel de líneas celulares tumorales y normales.

Tabla 13

Potencia *in vitro* (IC_{50} (M)) de las construcciones de NB anti-DR5 trivalentes

	4E6 tri	11D1 tri	10F1 tri	7A12 tri	11H6 tri
Jurkat	20	20	20	20	20
Molt4	20	20	20	20	20
A549	20	20	20	20	20
H226	2.0×10^{-11}	3.0×10^{-11}	2.0×10^{-11}	3.0×10^{-11}	20
H2052	6.0×10^{-12}	1.5×10^{-11}	1.3×10^{-11}	6.4×10^{-11}	3.6×10^{-10}
H2122	2.0×10^{-12}	4.0×10^{-12}	3.0×10^{-12}	8.0×10^{-12}	1.2×10^{-11}
M30	20	20	20	20	20
Panc-1	20	20	20	20	20
MiaPaCa	2.3×10^{-11}	20	20	20	20

	4E6 tri	11D1 tri	10F1 tri	7A12 tri	11H6 tri
-2					
ARPE-19	20	20	20	20	20
IMR-90	20	20	20	20	20
Huvec	20	20	20	20	20

20: IC_{50} 20 nM

En otro experimento (Tabla 14), las construcciones de NB anti-DR5 tetravalentes seleccionadas se rastrean en los ensayos de sobrevivencia celular contra un panel de líneas celulares tumorales y normales.

Tabla 14

Potencia *in vitro* (IC_{50} (M)) de las construcciones de NB anti-DR5 tetravalentes

	4E6 tetra	11D1 tetra	10F1 tetra	7A12 tetra	11H6 tetra
Colo205	$8.0x10^{-13}$	$8.1x10^{-12}$	$2.0x10^{-12}$	$6.6x10^{-12}$	$3.7x10^{-12}$
Jurkat	$6.0x10^{-13}$	$3.5x10^{-11}$	$3.0x10^{-12}$	$3.7x10^{-11}$	$9.1x10^{-12}$
Molt4	$<1.0x10^{-13}$	$1.5x10^{-11}$	$2.0x10^{-12}$	20	$8.0x10^{-13}$
A549	$3.3x10^{-10}$	20	20	20	20
H2122	$8.0x10^{-13}$	$8.0x10^{-12}$	$1.0x10^{-12}$	$3.6x10^{-12}$	$2.8x10^{-12}$
H226	$1.0x10^{-11}$	$8.9x10^{-11}$	$2.4x10^{-11}$	20	$1.1x10^{-10}$
H2052	$8.0x10^{-13}$	$2.5x10^{-11}$	$4.0x10^{-12}$	$3.3x10^{-11}$	$1.5x10^{-11}$
M30	20	20	20	20	20
Panc-1	$3.0x10^{-12}$	20	$9.0x10^{-12}$	20	$2.2x10^{-10}$

	4E6 tetra	11D1 tetra	10F1 tetra	7A12 tetra	11H6 tetra
MiaPaCa-2	$1.8x10^{-12}$	$1.9x10^{-11}$	$2.8x10^{-11}$	$4.1x10^{-11}$	$1.1x10^{-11}$
BxPC-3	$1.9x10^{-12}$	$4.1x10^{-11}$	$3.0x10^{-12}$	$2.3x10^{-11}$	$2.7x10^{-11}$
Malme-3	20	20	20	20	20
WI-38	20	20	20	20	20
ARPE-19	20	20	20	20	20
184A1	20	20	20	20	20
Huvec	20	20	20	20	20
HAAE-1	20	20	20	20	20

20: IC_{50} 20 nM

Las representaciones gráficas que muestran que el aumento de la jerarquía de los multímeros da como resultado una mayor eficacia y potencia, se muestran en las Figuras 6A, 6B y 6C, en donde las construcciones de NB de 11H6 y 4E6 triméricas, tetraméricas y pentaméricas tienen una mayor potencia, respectivamente, contra las células tumorales Colo205 y H226 tratadas *in vitro*.

Las construcciones de NB anti-DR5 multivalentes exhiben una actividad inductora de apoptosis en las líneas celulares tumorales pero no en las líneas celulares normales (sanas). La tendencia general es que se ve un aumento de la actividad inductora de apoptosis con un aumento en el número de subunidades en una composición de NB multimérica. El aumento desde las formas tetraméricas hasta pentaméricas del NB, proporciona evidencia del mayor incremento en la potencia en los ensayos de muerte celular, como se ejemplifica por la disminución de la IC_{50} o el aumento de la

muerte celular máxima lograda dependiendo de la línea celular.

3.6 Reticulación

En otro experimento, las construcciones de NB multivalentes (10 microgramos) que contienen una marca cMYC se reticulan a través de su marca CMYC con 1.5 microgramos a 150 microgramos de anti-myc de ratón (anticuerpo monoclonal, clon 9E10 ATCC (Teddington, Reino Unido) número CRL-1729, producido en los ratones como ascitas y purificado en la empresa utilizando cromatografía por afinidad convencional) durante una incubación de 30 minutos a temperatura ambiente. Las construcciones de NB reticuladas se evalúan entonces en los ensayos de sobrevivencia celular *in vitro*. El aumento de la reticulación se correlacionó con la mayor potencia y eficacia (véanse las Tablas 15 y 16). La Tabla 15 proporciona la potencia *in vitro* (IC_{50} (M)) de las construcciones de NB anti-DR5 reticuladas trivalentes con diferentes cantidades de anticuerpo en células Jurkat. La Tabla 16 proporciona la eficacia *in vitro* (porcentaje de células muertas) de las construcciones de NB anti-DR5 tetravalentes reticuladas con diferentes cantidades de anticuerpo en células Jurkat. La tendencia general es que se aniquilan más células con las mayores cantidades de reticulación de los multímeros de NB marcados.

Tabla 15

Potencia *in vitro* (IC_{50} (M)) de las construcciones de NB anti-DR5 trivalentes reticuladas

Células Jurkat	**Proporción en peso (µg/µg)**	**IC_{50} (M)**
11D1 tri	0	No se observa apoptosis
11D1 tri	0.15	1.1×10^{-8}
11D1 tri	15.0	7.3×10^{-10}

Proporción: Proporción en peso de anticuerpo reticulante / construcciones de NB anti-DR5 tetravalentes.

Tabla 16

Eficacia *in vitro* (porcentaje de células muertas) de las construcciones de NB anti-DR5 tetravalentes reticuladas

Células Jurkat	Proporción en Peso (µg/µg)	Eficacia (% de células muertas)
11D1 tetra	0	48
11D1 tetra	0.15	48
11D1 tetra	0.75	60
11D1 tetra	1.5	63
11D1 tetra	7.5	88
11D1 tetra	15.0	93

Proporción: Proporción en peso de anticuerpo reticulante / construcciones de NB anti-DR5 tetravalentes.

3.7 Estabilidad en Suero

3.7.1 Construcciones de NB y enlace de DR5 en ELISA

Las construcciones de NB se incuban previamente con suero humano fresco al 100 por ciento a 37°C durante 24 horas. Las placas ELISA de 96 pozos de fondo plano (Costar, Cambridge, MA, Catálogo No.3590) se recubren durante la noche a 4°C con 50 microlitros de proteína de fusión DR5-Fc (DR5, aminoácidos 56 a 213) a 1 microgramo/mililitro en suero regulado con fosfato. Las placas entonces se bloquean con 300 microlitros de albúmina de suero bovino al 2 por ciento (Gibco, Grand Island, NY, Cat # 11018-025) en suero regulado con fosfato (PBS) durante una hora, y se lavan tres veces. Las muestras de construcciones de NB se diluyen en serie en el regulador de suero regulado con fosfato (PBS) que

contiene suero humano al 10 por ciento, entonces se agregan a placas ELISA, y se incuban durante una hora a temperatura ambiente. Después del lavado, se agregan a las placas 1:5000 de anticuerpo policlonal anti-myc conjugado con HRP (Invitrogen: 460709) o 1:7000 de anticuerpo anti-V_{HH} de conejo, seguido por 1:15000 de IgG anti-conejo conjugado con HRP (Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc. West Grove, PA, Cat # 115-035-072). Después de un conjunto final de lavados, se agregan 100 microlitros/pozo de sustrato de peroxidasa TMB Microwell (BioFX, Owings Mills, MD, Catálogo No. TBNP-1000-01), y se incuban a temperatura ambiente durante 10 minutos. La reacción se detiene con 100 microlitros de reactivo de Paro (BioFX, Owings Mills, MD, Cat # LSTP-0100-01). Se hace la detección colorimétrica del producto a 450 nanómetros en un lector de placas SpectraMax M5 (Molecular Devices, Sunnyvale, CA). Los datos se analizan con el software SoftMax Pro (Molecular Devices, Sunnyvale, CA) de acuerdo con el manual del usuario.

El suero humano muestra poca interferencia con la construcción de los trímeros o tetrámeros de NB que se enlazan al DR5, detectado mediante el anticuerpo anti-Myc o bien anti-construcción de NB.

3.7.2 Función de la construcción de NB en el ensayo de sobrevivencia celular

Los ensayos de sobrevivencia celular también se llevan a cabo en la presencia y en ausencia de albúmina de suero humano de aproximadamente el 10 al 15 por ciento. Las construcciones de NB anti-DR5 tetravalentes mantienen su potencia *in vitro* comparándose con los ensayos de control en la presencia de suero fetal de becerro al 10 por ciento.

4. Ejemplo IV

4.1 Construcciones de NB anti-DR5 trivalentes de una sola dosis *in vivo*

Los ratones hembras (nu/nu) atímicos exógamos (Harlan Sprague Dawley, Indianápolis, IN) se anestesian y se implantan

subcutáneamente en la región axilar (lateral) derecha de cada animal con 1 x 10^6 células Colo205. Los tumores se dejan crecer hasta el tamaño de 200 mm^3 antes de iniciar la dosificación. La construcción de NB se formula como una solución en suero regulado con fosfato y se administra una sola dosis a 200 microgramos/ratón mediante una inyección intravenosa de bolo. Se recolectan muestras de los tumores a partir de los grupos de animales (un grupo por punto del tiempo, 3 animales por grupo) a las 1 hora, 2 horas, 4 horas, y 8 horas.

Parte de las muestras de tejido se utilizan para el teñido inmunohistoquímico (IHC) de la Caspasa3. Los tejidos se ponen inmediatamente en formalina regulada neutra al 10 por ciento (NBF, Fisher Scientific, Pittsburgh, PA, Catálogo No. SF100-20), se procesan y se empotran en bloques de parafina. Se cortan secciones de 4.0 micras sobre los portaobjetos SuperFrost más cargados (Fisher Scientific, Catálogo No. 12-550-15). Las secciones se desparafinizan en xileno (5 minutos, 2 veces), y se hidratan en una serie graduada de alcoholes (100 por ciento de alcohol durante 5 minutos, 95 por ciento de alcohol durante 2 minutos, 70 por ciento de alcohol durante 2 minutos, y agua desionizada durante 5 minutos). Las secciones hidratadas se sometieron a recuperación del antígeno, la cual se conduce mediante paso por microondas de los portaobjetos en regulador de ácido cítrico (0.01 M, pH de 6.0, BioGenex, San Ramón, CA, Catálogo No.HK080-9K) durante 10 minutos. Los portaobjetos se colocan sobre las rejillas de teñido del auto-teñidor (Dako Cytomation) después de lavarse con agua desionizada durante 5 minutos. Los siguientes pasos se hacen con el sistema automatizado Dako a temperatura ambiente. Entre cada paso, los portaobjetos se enjuagan con el regulador de enjuague (Regulador de Lavado OptiMax, Biogenex, Catálogo No. HK583-5K) tres veces. La peroxidasa endógena se bloquea mediante la incubación de los portaobjetos con peróxido de hidrógeno (Dako, Catálogo No. S2001) durante 10 minutos. La reacción del antígeno

no específico se bloquea mediante el suero de bloqueo (Dako, Catálogo No. X0909) durante 10 minutos. Los portaobjetos se incuban con el anticuerpo policlonal de conejo con Caspasa3 disociada (Cell Signaling Technology, Beverly, MA, Catálogo No. 9661) durante 60 minutos, entonces se enjuagan y se exponen al anticuerpo conjugado con peroxidasa (sistema DAKO Envision, Catálogo No. K4003) durante 30 minutos. Para la detección, se aplica solución de DAB (3,3'-diamino-bencidina) (Dako Cytomation, Catálogo No. K3468) durante 2 minutos. Los portaobjetos inmunoteñidos se contra-tiñen ligeramente con Hematoxilina de Harris (SurgiPath, Catálogo No. 01560), se deshidratan a través de una serie de concentraciones crecientes de alcohol (70 por ciento, 95 por ciento, y 100 por ciento de alcohol, cada una durante 1 minuto), y xileno (5 minutos, 2 veces), y se montan con un cubreobjetos (Leica).

Los portaobjetos se exploran en la base de datos de portaobjetos digitalizada utilizando el sistema Aperio (Aperio Technologies, Inc. Vista, CA), y se hace el análisis de imágenes utilizando el Algoritmo de Conteo de Pixeles Positivos de Aperio. Se utilizan las secciones enteras excluyendo las áreas necróticas y la porción de tejido del huésped "marcada como fuera", utilizando las herramientas proporcionadas por el sistema de toma de imágenes, para el análisis de las imágenes. Todas las construcciones de NB anti-DR5 multivalentes inducen la activación de Caspasa3.

Parte de las muestras de tejido se mezclan con el regulador T-per (Pierce, Rockford, IL, Catálogo No. 78510), entonces inmediatamente se homogeneízan en el lisador de tejido (Qiagen, Catálogo No. 85210). El sobrenadante del lisado de tejido se recolecta, y se determina su concentración de proteína utilizando un ensayo BCA convencional (Pierce, Catálogo No. 1856210). Los lisados de tejido se utilizan en los siguientes ensayos para verificar la concentración de la construcción de NB y anticuerpo más la actividad de Caspasa3 en el tumor.

La concentración de la construcción de NB se determina

en un ELISA. Las placas ELISA (Nunc, Rochester NY, Catálogo No. 439454) se recubren durante la noche a 4°C con 100 microlitros de la proteína de fusión de DR5 humano-Fc (DR5, aminoácidos 56 a 213) a 1 microgramo/mililitro en suero regulado con fosfato, entonces se bloquean con albúmina de suero bovino (BSA) al 1 por ciento (Gibco, Catálogo No. 11018-025) en suero regulado con fosfato durante 1 hora a temperatura ambiente, y luego se lavan tres veces. Las muestras de suero o de lisado de tejido diluidas en serie se transfieren a las placas ELISA y se incuban durante 1.5 horas a temperatura ambiente. En seguida de tres lavados, se agrega anti-V_{HH} diluido a 1/22500 a las placas ELISA, y se incuban durante una hora a temperatura ambiente. Las placas se lavan tres veces más, y entonces se incuban durante una hora con 100 microlitros/pozo de HRP-cabra-anti-conejo diluido a 1/20000 (Pierce, Catálogo No. 31462). Después de un conjunto final de lavados, se agregan 100 microlitros/pozo de sustrato de peroxidasa TMB Microwell (BioFX, Owings Mills, MD, Catálogo No. TMBW-0100-01), durante 10 minutos, y la reacción entonces se detiene con 100 microlitros de solución de paro (BioFX, Catálogo No. LSTP-1000-01). La detección colorimétrica del producto se hace a 450 nanómetros en lector de microplacas SpectraMax M5 (Molecular Devices, Sunnyvale, CA). Los datos se analizan en el modelo de 4 parámetros con el software SoftMax Pro (Molecular Devices, Sunnyvale, CA) de acuerdo con su manual del usuario. Todas las construcciones de NB muestran una rápida liberación en suero y en el tejido tumoral, y una rápida penetración.

La actividad de Caspasa 3/7 en el lisado de tejido tumoral se evalúa mediante el ensayo Caspasa glo (Promega Catálogo No. G8092) de acuerdo con su manual del usuario. La luminiscencia se lee utilizando el lector de microplacas SpectraMax M5 (Molecular Devices, Sunnyvale, CA). De una manera consistente con los resultados de IHC, todas las construcciones de NB activan la Caspasa 3 dentro de 8 horas.

4.2 Una sola dosis *in vivo* de las construcciones de NB anti-

DR5 tetravalentes

Los ratones hembras (nu/nu) atímicos exógamos (Harlan Sprague Dawley, Indianápolis, IN) se anestesian y se implantan subcutáneamente en la región axilar (lateral) derecha de cada animal con 1 x 10^6 células Colo205. Los tumores se dejan crecer hasta el tamaño de 200 mm^3 antes de iniciar la dosificación. La construcción de NB se formula como una solución en suero regulado con fosfato (PBS), y se administra una sola dosis a 200 microgramos/ratón mediante una inyección intravenosa de bolo. El suero y el tejido tumoral se recolectan a partir de los grupos de animales (un grupo por punto del tiempo, 3 animales por grupo) en los siguientes puntos del tiempo: 0.25 horas, 0.5 horas, 1 horas, 2 horas, 4 horas, 8 horas, 24 horas, y 48 horas. La muestra del tejido tumoral se mezcla con regulador T-per (Pierce, Rockford, IL, Catálogo No. 78510), entonces inmediatamente se homogeneiza en el lisador de tejido (Qiagen, Catálogo No. 85210). El sobrenadante del lisado de tejido se recolecta, y se determina su concentración de proteína utilizando un ensayo BCA convencional (Pierce, Catálogo No. 1856210).

La concentración de la construcción de NB en suero y del lisado de tejido se determina en un ELISA, como se describe anteriormente. Los perfiles promedio de concentración en suero-tiempo se someten a un análisis farmacocinético de dos compartimientos utilizando el modelo 7 en el Software WinNonlin Professional Versión 5.1 (Pharsight Corporation, Mountain View California, EUA). Para cada construcción de NB, se ajusta el perfil de concentración-tiempo utilizando reponderación iterativa **1**/**y.y**, en donde **y** es la concentración predicha. El tiempo de residencia promedio (MRT, Tabla 17) de las diferentes construcciones de NB estuvo en el intervalo de 2.6 a 13.5 horas. El volumen de distribución (Vss) de las diferentes construcciones de NB es de 2 a 35 veces mayor que el volumen de plasma de un ratón de 20 gramos (aproximadamente 1.5 mililitros), indicando una extensa distribución fuera del espacio vascular. El índice de liberación global de las diferentes construcciones de NB es cuando menos 5 veces menor

que el índice de filtración glomerular de murino (aproximadamente 15 mililitros/hora), y por consiguiente, todas las construcciones tetravalentes son altamente efectivas para reducir de una manera significativa la filtración urinaria y la subsiguiente excreción al nivel del riñón.

Tabla 17

Parámetros farmacocinéticos de las construcciones de NB anti-DR5 tetravalentes

Parámetro	**10F1 tetra**	**11D1 tetra**	**11H6 tetra**	**4E6 tetra**	**7A12 tetra**
$C_{(0)}$ (microgramos/ mililitro)	114	336	163	25.2	71.7
V_{ss} (mL)	12.5	5.63	2.83	56.8	12.2
V_1 (mL)	1.76	0.595	1.22	7.95	2.79
V_2 (mL)	10.7	5.04	1.61	48.8	9.43
CL (mL/hr)	2.85	2.11	0.211	4.2	1.42
CL_d (mL/hr)	1.29	0.453	0.387	2.89	1.59
$t_{½\alpha}$ (hr)	0.3	0.161	1.04	0.756	0.589
$t_{½\beta}$ (hr)	8.49	9.41	11.1	20.3	9.46
MRT (hr)	4.38	2.68	13.4	13.5	8.57
AUC_{inf} (µg *hr/ml)	70.2	95	947	47.6	140

La actividad de Caspasa 3/7 en el lisado del tejido

tumoral se evalúa mediante el ensayo Caspasa glo (Promega Catálogo No. G8092) de acuerdo con su manual del usuario, y se describe como anteriormente. Todos los tetrámeros tienen un perfil farmacodinámico similar (Figura 2).

Se desarrolla un modelo de respuesta indirecta para describir la potencia (EC_{50}), la eficacia (E_{max}), y el transcurso del tiempo del efecto farmacológico de las diferentes construcciones de NB. El modelo describe un cambio en el nivel de caspasa celular que resulta de un mayor índice de producción en seguida del enlace del receptor de DR5 (es decir, estimulación de la acumulación de la caspasa celular). El índice de caspasa celular (Respuesta, R) se describe mediante la siguiente ecuación.

$$\frac{dR}{dt} = k_{entrada} \bullet \left[1 + \frac{E_{\max} \bullet C^{n}}{EC_{50}{}^{n} + C^{n}} \right] - k_{salida} \bullet R \qquad \text{(Ecuación 1)}$$

en donde $k_{entrada}$ es el índice de síntesis de cero orden, R es el nivel de caspasa, E_{max} es la máxima estimulación, C es la concentración de la construcción de NB en el tumor, n es el factor de forma de respuesta, y k_{salida} es la constante de índice de eliminación de primer orden de caspasa.

Los perfiles de concentración de tumor-tiempo se ajustan primero a la función farmacocinética que es mínimamente necesaria para proporcionar una caracterización razonable de los datos de concentración-tiempo (modelo 3 o modelo 11 de dos compartimientos en el Software WinNonlin Versión 5.1). Entonces se utiliza la función farmacocinética obtenida para cada construcción de NB como la función de entrada para la ecuación 1. Los parámetros farmacodinámicos obtenidos se enlistan en la Tabla 18.

Tabla 18

Parámetros farmacocinéticos/farmacodinámicos (PK/PD) de una sola dosis de las construcciones de NB anti-DR5 tetravalentes

Parámetro[1]	10F1 tetra	7A12 tetra	4E6 tetra	11D1 tetra	11H6 tetra

Parámetro[1]	10F1 tetra	7A12 tetra	4E6 tetra	11D1 tetra	11H6 tetra
k_{salida} (1/hr)	0.319	0.301	0.412	0.416	0.356
EC_{50} (ng/mg de tejido)	0.365	1.41	1.36	12.2	8.37
E_{max}	15.8	15.3	4.74	12.2	17.5
N	2.14	3.85	10.1	0.18	4.62

4.3 Prueba *In vivo* utilizando un modelo de xeno-injerto

Los ratones hembras (nu/nu) atímicos exógamos (Harlan Sprague Dawley, Indianápolis, IN) se implantan subcutáneamente en la región axilar (lateral) derecha con aproximadamente 1-2 x 10^6 células tumorales Colo205 suspendidas en solución de sal balanceada de Hanks al 100 por ciento (HBSS) en un volumen total de 100 mililitros. Los tumores se dejan crecer hasta 200 mm^3 antes de iniciar la dosificación. Las construcciones de NB se formulan como una solución en suero regulado con fosfato, y se dosifican ya sea una vez por semana o bien tres veces por semana en lunes, miércoles y viernes. Ambos tratamientos se administran intravenosamente durante cuatro semanas. Los tumores se miden, y se registran los pesos corporales de los animales individuales una o dos veces por semana. Los experimentos se concluyen después de siete semanas desde la dosificación inicial. La actividad anti-tumoral se expresa como %T/C (comparando el cambio en el volumen del tumor para el grupo de tratamiento contra el grupo de control con vehículo). La regresión se calcula utilizando la fórmula: (1-T/T0) x 100%, en donde T es el volumen tumoral promedio para el grupo de tratamiento al final del experimento, y T0 es el volumen tumoral promedio al principio del experimento. El significado estadístico de los resultados se evalúa uniformemente utilizando la prueba ANOVA de una vía post-hoc análisis de Tukey. Como se muestra en la Figura 3, las construcciones de NB inducen la estasis o regresión del tumor

en el modelo de tumor Colo205. Las formas pentaméricas de las construcciones de NB tienden hacia una eficacia más potente que las formas tetraméricas.

5. Ejemplo V

5.1 Humanización de 4E6

5.1.1. Caracterización de variante de humanización 4E6

La secuencia de proteína del 4E6 progenitor se alinea con las líneas germinales humanas VH3-23 (DP-47) y JH5 (Tabla 19). La diferencia de aminoácidos en relación con la secuencia de la línea germinal humana está representada mediante letras, y los aminoácidos idénticos mediante puntos. La diferencia de aminoácidos en las regiones de estructura que están subrayadas se seleccionan para la conversión en la contra-parte humana, mientras que los otros se dejan sin tocar.

Tabla 19

Alineación de 4E6 progenitor y variantes con eliminación genética de N-glicosilación humanizadas

```
Kabat #:     1         10        20        30        40        50        60
             |--------|---------|---------|---------|---------|--a-------|
VH3-23/JH5: EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSAISGSGGSTYYA
4E6        : ....v.....s..a.d.........r..g.irvg.f..t...er.f.a..nrnd.t....
4E6-hu     : .........................r..g.irvg.f.......r.f....nrnd.t....

Kabat #:    60        70        80            90        100                 110
             |---------|---------|--abc-------|---------|abcdefghi---------|---
VH3-23/JH5:  DSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAK-----------------WGQGTLVTVSS
4E6        :  .............a...v.m..a..kp.........aglqy***nrs***adrvpvgavy.....g.....
4E6-Hu     :  .................v........p.........aglqynr**A**adrvpvgavy...........
```

VH3-23/JH5 = SEQ ID NO: 90

4E6 = SEQ ID NO: 1

4E6-Hu = SEQ ID NO: 26

El material monovalente purificado se produce a partir de 4E6, 4E6-Hu y de la variante 4E6hx (en donde 4E6hx tiene las regiones FR humanizadas idénticas a 4E6-Hu, pero tiene la CDR3 de 4E6). Estas construcciones se caracterizan entonces en un

número de ensayos para enlazarse sobre DR5 humano y de cinomolgo, es decir, enlace de saturación FACS (K_d aparente), y cinética SPR (véase la Tabla 20). En adición, las variantes se analizan en el ensayo de cambio térmico también (Tabla 20). 5 microlitros de cada construcción de NB anti-DR5 monovalente purificada (80 microgramos/mililitro) se incuban con 5 microlitros de la sonda fluorescente Sypro Orange (Invitrogen, Carlsbad, CA, catálogo # S6551) (concentración final 10x) en 10 microlitros de regulador (fosfato 100 mM, borato 100 mM, citrato 100 mM, NaCl 115 mM, regulados a diferentes pHs en el intervalo desde 3.5 hasta 9). Las muestras entonces se calientan en una máquina LightCiclor 480II (Roche, Basilea, Suiza), desde 37°C hasta 90°C a 4.4°C/segundo, después de lo cual, se enfrían hasta 37°C a 2.2°C/segundo. Después del despliegue inducido por calor, se exponen los parches hidrofóbicos de las proteínas, a los que se enlaza el Sypro Orange, dando como resultado un aumento en la intensidad de fluorescencia. El punto de inflexión del primer derivado de la curva de intensidad de fluorescencia sirve como una medida de la temperatura de fusión (Tm). Para mayores detalles, por favor véase Ericsson y colaboradores, 2006 (Annals of Biochemistry, 357: 289-298). Globalmente, la variante 4E6-hx exhibe afinidades similares al 4E6 progenitor. En adición, esta variante tiene un aumento del 7 por ciento en la Tm comparándose con el 4E6 progenitor.

Tabla 20A

Variantes monovalentes de humanización de 4E6 y eliminación genética de N-glicosilación

	DR5 Humano				
	Biacore			**FACS**	**Tm @ pH de 7 (°C)**
	k_a (1/Ms)	**k_d (1/s)**	**KD (M)**	**KD Aparente (M)**	

	DR5 Humano				
	Biacore			FACS	Tm @ pH de 7 (°C)
	k_a (1/Ms)	k_d (1/s)	KD (M)	KD Aparente (M)	
4E6	$4.4 \times 10^{+06}$	1.0×10^{-04}	2.3×10^{-11}	4.2×10^{-10}	73.4
4E6-hx	$6.0 \times 10^{+06}$	1.4×10^{-04}	2.3×10^{-11}	3.4×10^{-10}	79.1
4E6-Hu	$1.1 \times 10^{+07}$	1.1×10^{-04}	9.5×10^{-12}	4.4×10^{-10}	ND

Tabla 20B

Variantes monovalentes de humanización de 4E6 y eliminación genética de N-glicosilación

	DR5 de Cinomolgo				
	Biacore			FACS	Tm @ pH de 7(°C)
	k_a (1/Ms)	k_d (1/s)	KD (M)	KD Aparente (M)	
4E6	$2.1 \times 10^{+06}$	1.1×10^{-02}	5.5×10^{-09}	7.3×10^{-09}	73.4
4E6-hx	$6.1 \times 10^{+06}$	2.1×10^{-02}	3.4×10^{-09}	7.1×10^{-09}	79.1
4E6-Hu	$7.0 \times 10^{+06}$	1.1×10^{-02}	1.6×10^{-09}	8.8×10^{-09}	ND

5.1.2. Variante de eliminación genética de N-glicosilación del 4E6 humanizado

La expresión de 4E6-hx en *P. pastoris,* seguida por SDS-PAGE y Western anti-V_{HH} (policlonal anti-Nanobody®), revela la presencia de dos productos (16kDa y 21kDa) comparándose con solamente un producto de 16kDa cuando *E. coli* es el huésped de expresión. El tratamiento con PNGasaF y el teñido con

concanavalina revelan que el producto de 21kDa es la forma N-glicosilada del producto de 16kDa. La disociación de las fracciones de N-glicosilación a partir de las proteínas utilizando PNGasaF se hace de acuerdo con las recomendaciones del fabricante (New England Biolabs, Ipswich, MA, catálogo # P0704S). La PNGasaF es una amidasa que se disocia entre los residuos más internos de GlcNAc y asparagina de los oligosacáridos superiores de manosa, híbridos, y complejos a partir de las glicoproteínas N-enlazadas. La detección de la N-glicosilación de proteína se hace en un ensayo Western con Concanavalina A, una lectina que reconoce las glicoproteínas que contienen α-D-manosa, α-D-glucosa. Las proteínas transferidas se bloquean durante 2 horas con regulador de bloqueo (suero regulado con fosfato (PBS), Tween-20 al 0.05 por ciento, $CaCl_2$ 1 mM, $MnCl_2$ 1 mM), seguido por incubación durante la noche con 5 microgramos/mililitro de conjugado de Concanavalina A / biotina (Sigma, St. Louis MO, catálogo # C2272) a 4°C en regulador de bloqueo. La detección se hace utilizando una dilución de 1/2000 de conjugado de estravidina-HRP en regulador de bloqueo y DAB como sustrato (Sigma, St. Louis MO, catálogo # E2886 y D6815). La banda de 36 kDa visible en el gel teñido con Coomassie es la enzima PNGasaF. El análisis fuera de índice sobre el DR5 humano reveló un aumento >8 veces para el material producido por *P. pastoris* contra el material producido por *E. coli*, sugiriendo que la N-glicosilación interfiere con el enlace de 4E6-hu al DR5.

Está presente un motivo de N-glicosilación potencial en el CDR3 de 4E6 y 4E6-hx (aminoácidos “nrs”- mostrados en negrillas e itálicas en la Tabla 19). La variante 4E6-Hu (CDR3 con un residuo “A” reemplazado mostrado en letra mayúscula con negrillas – Tabla 19) se genera y se produce en *E. coli*, se purifica y se ensaya para enlazarse al DR5 humano y de cinomolgo utilizando el ensayo de enlace de saturación FACS y la cinética SPR (Tabla 20). El 4E6-Hu tiene características de enlace iguales al DR5 tanto humano como de cinomolgo, comparándose con el 4E6-hx. Después de la expresión en *P. pastoris*, la variante 4E6-Hu proporciona

solamente el producto de 16 kDa. Esto confirma la eliminación genética funcional del motivo de glicosilación.

5.1.3 Caracterización in vitro de 4E6-Hu

El material tetravalente purificado se produce a partir de 4E6 de tipo silvestre y su variante humanizada 4E6-Hu. Entonces éstos se ensayan en los ensayos de sobrevivencia celular en Colo205 y Jurkat (Tabla 21). La potencia y eficacia de la variante humanizada es relativamente igual a la de la construcción progenitora 4E6.

Tabla 21

Potencia y eficacia *in vitro* de 4E6 de tipo silvestre y 4E6-Hu tetravalentes

	Colo205		Jurkat	
	IC_{50} (M)	**Eficacia (% células muertas)**	**IC_{50} (M)**	**Eficacia (% células muertas)**
4E6 tetra	$1.9x10^{-11}$	94	$8.7x10^{-12}$	79
4E6-Hu tetra	$1.2x10^{-11}$	94	$2.6x10^{-12}$	95

5.2 Humanización de 11H6

5.2.1.Caracterización de variante de humanización de 11H6

La secuencia de proteína de 11H6 de tipo silvestre se alinea al a las líneas germinales VH3-23 humana (DP-47) y JH5 (Tabla 22). La diferencia de aminoácidos en relación con la secuencia de la línea germinal humana están representadas mediante letras, y los aminoácidos idénticos mediante puntos. La diferencia de aminoácidos en las regiones de estructura que están subrayadas se seleccionan para la conversión en la contra-parte humana, mientras que los otros se dejan sin tocar.

Tabla 22

Alineación del 11H6 progenitor y variante de humanización

```
Kabat #     : 1         10        20        30        40        50         60
              |--------|---------|---------|---------|---------|--a-------|
VH3-23/JH5  : EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSAISGSGGSTYYA
11H6        : ....v.....................tfdkinn.g.y......qrdl.aq.t-p..i.d..
11H6-hu     : ..........................tfdkinn.g.y......qrdl.aq.t-p..i.d..


Kabat #     : 60        70        80            90        100              110
              |---------|---------|--abc-------|---------|abcdef---------|---
VH3-23/JH5  :   DSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAK--------------WGQGTLVTVSS
11H6        :   .............a.d.m.......kp......f.naeilkrayidvyvny.....g.....
11H6-hu     :   ..........................p........naeilkrayidvyvny...........
```

VH3-23/JH5 = SEQ ID NO: 90

11H6 = SEQ ID NO: 5

11H6-hu = SEQ ID NO: 30

Se produce el material monovalente purificado para 11H6 y 11H6-Hu, el cual entonces se caracteriza en un número de ensayos para enlazarse sobre el DR5 humano y de cinomolgo, es decir, enlace de saturación FACS (Kd aparente), y cinética SPR (Tabla 23). En adición, las variantes se analizan en el ensayo de cambio térmico (Tabla 23). La variante 11H6-hu retiene las características de enlace del 11H6 progenitor. También tiene un aumento del 8 por ciento en la temperatura de fusión, comparándose con el 11H6 progenitor. La Tm se determina a un pH de 7.

Tabla 23

Caracterización de 11H6 progenitor monovalente y variantes de humanización

	Kd Aparente (M)	**Kd (M)**	**Tm (°C)**

	DR5 Humano	DR5 de Cinomolgo	DR5 Humano	DR5 de Cinomolgo	
11H6	4.6×10^{-09}	ND	4.9×10^{-09}	3.2×10^{-07}	68.5
11H6-hu	4.4×10^{-09}	ND	2.3×10^{-09}	1.7×10^{-07}	74.0

5.2.2 Caracterización in vitro de 11H6-Hu

El material tetravalente purificado se produce a partir del clon progenitor 11H6 y su variante humanizada 11H6-Hu. Éstos entonces se ensayan en los ensayos de sobrevivencia celular contra Colo205 y Jurkat (Tabla 24). La potencia y la eficacia de la variante humanizada es igual a la del progenitor. La eficacia representa el porcentaje de las células muertas vistas.

Tabla 24

Potencia y eficacia *in vitro* de 11H6 de tipo silvestre y 11H6-humano tetravalentes

	Colo205		Jurkat	
	IC_{50} (M)	**Eficacia**	**IC_{50} (M)**	**Eficacia**
11H6 tetra	1.4×10^{-11}	92	1.5×10^{-11}	34
11H6-hu tetra	2.0×10^{-11}	94	1.6×10^{-11}	54

5.3 Caracterización *in vitro* de tetrámeros y pentámeros de 11H6-Hu y 4E6-Hu

Las células se aplican a una placa de 96 pozos (Costar # 3903 de fondo blanco transparente) con la intención de alcanzar una confluencia de aproximadamente el 75 por ciento. Las células se aplican en un intervalo de 7500 a 15000 células/pozo (dependiendo de la línea celular) en 100 microlitros del medio el día anterior al ensayo. El día del ensayo, se remueve el medio, y se agrega medio

fresco. Entonces se agrega el agente NB diluido en serie (las concentraciones iniciales pueden variar dependiendo de la línea celular), usualmente en una concentración inicial de entre 1 y 20 nM, el cual entonces se diluye de 3 a 4 veces en 10 diluciones en general para un volumen final de 150 microlitros. Las células se incuban entonces durante 24 a 72 horas a 37°C en la incubadora suministrada con CO_2. Después de la incubación, las células aplicadas y los reactivos Cell Titer Glo (Promega #G7571) se llevan hasta la temperatura ambiente (en aproximadamente 30 minutos). Entonces se agregan a cada pozo 50 microlitros del reactivo Cell Titer Glo reconstituido. La placa se agita durante 2 a 3 minutos, y entonces se deja equilibrar en la oscuridad durante 10 minutos antes de leer la luminiscencia en el Spectromax.

Los ejemplos específicos se proporcionan en la Tabla 25.

Tabla 25

Caracterización *in vitro* de tetrámeros y pentámeros de 11H6-hu y 4E6-hu

IC_{50} (nM)	**11H6-Hu**			**4E6-Hu**		
	tetra	**penta**	**veces de mejora**	**tetra**	**penta**	**veces de mejora**
Jurkat (72)	0.0007	0.0017	4	0.0172	0.0036	5
A549	>10	>10	1	>10	>10	1
Colo205	0.0036	0.0012	3	0.0034	0.0007	5
BxPC-3	0.0154	0.0046	3	0.0292	0.005	6
T24	0.0222	0.0031	7	0.0447	0.0043	10
Panc-1	0.2317	0.0067	35	0.2291	0.0105	22

IC_{50} (nM)	11H6-Hu			4E6-Hu		
	tetra	**penta**	**veces de mejora**	**tetra**	**penta**	**veces de mejora**
M30	>10	>10	1	>10	>10	1
H226	0.1718	0.0124	14	0.1293	0.0272	5
H2122	0.0041	0.0017	2	0.0051	0.0008	7
MiaPaCa-2	0.0117	0.0031	4	0.0185	0.0038	5

6. Ejemplo VI

6.1 Ensayo *ex-vivo* para pacientes con leucemia

Se proporciona un ensayo *ex-vivo* para los pacientes con leucemia, como un método para predecir cuáles pacientes responderán al tratamiento con una construcción de NB. Se obtiene una muestra de sangre a partir de un paciente antes del tratamiento, y se utiliza para ensayar la respuesta potencial al tratamiento. Se utilizan el grado y la dirección de respuesta como criterios para el tratamiento.

Se cree que la leucemia de células-T (T-ALL) es en general sensible a la estimulación del DR5. Las muestras de T-ALL se tratan con las construcciones de NB de la invención, y se evalúan para determinar si el número de células de leucemia disminuye (o sufren apoptosis) con el tratamiento. El intervalo del fármaco del ensayo es de aproximadamente 20 nM a aproximadamente 0.0001 nM para los tratamientos *ex-vivo* con las construcciones de NB de la invención.

También se pueden obtener muestras de células a partir de los pacientes diagnosticados con otras indicaciones, y se prueban de una manera similar.

6.2. Ensayo general de sensibilidad *ex-vivo*:

Las muestras de tumores se prueban afuera de un paciente en un establecimiento de laboratorio, como un método para ayudar a predecir cuáles pacientes pueden responder a uno o más agentes NB.

El material tumoral del paciente primario a partir de la sangre o del tejido, se trata de una manera similar a los ensayos anteriores, dependiendo del tipo de tumor. El tumor se remueve por medio de recolección de sangre total o de biopsia de tejido, y se aplica en una placa de cultivo de tejido apropiada durante 0 a 24 horas. La muestra del tumor se trata entonces con concentraciones variables de agentes NB sobre una serie de dilución (por ejemplo, la concentración inicial podría ser de 20 nM diluido de 3 a 4 veces en 10 diluciones). La placa de cultivo de tejido se trata entonces con los agentes NB durante 24 a 72 horas o durante varias horas (de 1 a 24) a 37°C en la incubadora suministrada con CO_2. Después de la incubación, la muestra emplacada se analiza empleando un método para detectar la respuesta de la muestra al tratamiento. Tal como en los ejemplos anteriores, se proporcionan: Cell Titer Glo (Promega #G7571) para la viabilidad celular, o activación de Caspasa 3/7, o teñido con AnexinaV, o conteo de células, o análisis FACS, u otro método para determinar el crecimiento, muerte, o respuesta al tratamiento con el agente NB.

Ya sea una línea celular sensible al agente NB (por ejemplo, Jurkat) o bien línea celular insensible al agente NB (BE13), o PBMC (células mononucleares de sangre periférica, por ejemplo, frescas a partir de la sangre de un voluntario sano), o la combinación del cultivo celular (línea celular) salpicada en las células mononucleares de sangre periférica (PBMC), se tratan con diferentes concentraciones de agentes NB durante 3.5 horas a 37°C en la incubadora suministrada con CO_2, después de lo cual, se evalúa la activación de Caspasa 3/7 (Promega #G7790) siguiendo las instrucciones proporcionadas por el fabricante.

7. Ejemplo VII

7.1 Análisis de la senda de RAF-MEK-ERK y la actividad del DR5

El Receptor de Muerte 5 (DR5) es de particular interés en el descubrimiento de fármacos para cáncer, debido a que su activación selectiva induce la apoptosis en las células de cáncer mientras que pasa por alto muchas de las células normales. La construcción agonista especifica del DR5 puede evitar las limitaciones del ligando, es decir, el enlace a Receptores de Señuelo tales como DcR1, DcR2 y OPG. Un obstáculo mayor para los desarrollos clínicos de anticuerpos agonistas de DR5 ha sido la dificultad para identificar los biomarcadores predictivos de eficacia en los subgrupos de pacientes. El análisis de datos a partir de 200 líneas celulares de cáncer, indica que las mutaciones genéticas no obvias, incluyendo aquéllas en RAS y RAF, son correlativas a la sensibilidad a LBY135, el anticuerpo agonista de DR5 (Novartis AG).

Se utiliza una estrategia para rastrear los shARNs reservados basándose en la sensibilización/rescate del DR5 para identificar genes o sendas que modifiquen la apoptosis mediada por el DR5 después de la perturbación genética. Los rastreos se conducen en siete líneas celulares de cáncer a través de varios linajes, y se utiliza secuenciación a profundidad basada en Solexa de las horquillas integradas para desconvolucionar las composiciones de shARN.

Se identifica un conjunto de sensibilizantes y rescatadores como los componentes de la senda conocidos, de tal manera que los shARNs que se dirigen a caspasa 8, caspasa 3 y DR5 por sí mismos, son los rescatadores superiores, y aquéllos que se dirigen a BCLxI son los sensibilizantes superiores, indicando la robustez de los rastreos. Es interesante que, en adición a estos conjuntos de genes comunes, la inhibición de BRAF-MEK-ERK exhibe la oposición de fenotipos dependientes del contexto celular sobre la apoptosis mediada por DR5. De una manera específica, la inhibición de la senda de BRAF-MEK-ERK sensibiliza las células

Miapaca2 a la apoptosis mediada por DR5, pero rescata las células Colo205 de la misma.

Estos fenotipos opuestos se correlacionan bien con las cinética diferente de la actividad de caspasa 8 y caspasa 9, pero parecen ser independientes del nivel de expresión de DR5. La disección de la senda revela que cFLIP y cIAP1, dos de los inhibidores de apoptosis endógenos, median la interferencia entre la apoptosis mediada por DR5 y la senda de BRAF-MEK-ERK. En las células Miapaca2, la combinación de U0126 (inhibidor de MEK), y el anticuerpo de DR5, acelera la degradación de las proteínas cFLIP y cIAP1, mientras que, en colo205, se sobre-regulan los mARNs tanto de cFLIP como de cIAP1. Consistentemente, la inhibición de cFLIP o cIAP1 mediante los shARNs o la inhibición química, eliminan el fenotipo de rescate en las células Colo205, y además sensibiliza a Miapaca2 a la apoptosis mediada por DR5.

El análisis de microarreglo de las células Miapaca2 y Colo205 tratadas con inhibidor de MEK revela genes que se sub-regulan en ambas líneas celulares, incluyendo DUSP6, ETV5 y ERG1, las cuales son los objetivos canónicos corriente abajo de ERK.

7.2 <u>Bcl-xL, cIAP1 Y BRAF-MEK-ERK como reguladores dependientes del contexto celular de la apoptosis mediada por DR5</u>

Muchas proteínas funcionan como reguladores dependientes del contexto celular, si se define ampliamente. Por ejemplo, ABT737, un inhibidor de Bcl-xL, mostró un intervalo de fenotipos sobre la apoptosis inducida por LBY135. Entre 35 líneas celulares a examinar, sensibilizó fuertemente el efecto de LBY135 sobre 7 líneas celulares, sensibilizó levemente 9 líneas celulares, pero no tuvo efecto alguno sobre las otras 19 líneas celulares. Una de las razones plausibles es que están presentes sendas paralelas en algunas líneas celulares que compensan la inhibición de Bcl-xL. Por ejemplo, el análisis de nuestros rastreos revela que los shARNs contra Bcl-xL sensibilizan a todas las líneas celulares, excepto por

las células Miapaca2, las cuales son realmente sensibilizadas por los shARNs que se dirigen a MCL1. Esta clase de reguladores no impediría el desarrollo de la terapia de combinación. En este aspecto, un inhibidor para cIAP1 es un regulador similar que sensibiliza al anticuerpo agonista de DR5 en un gran número de líneas celulares (Tabla 26, más no se muestran los datos). Es interesante que cIAP1, y no x-IAP, está específicamente involucrado en la interferencia entre DR5 y la senda de BRAF-MEK-ERK.

La senda de BRAF-MEK-ERK cae en una categoría para los reguladores dependientes del contexto celular. Sus efectos dependientes del contexto celular está en el intervalo desde como sensibilizante hasta como antagonista. Estas diferencias dramáticas proporcionan una oportunidad para obtener una visualización de las redes de señalización que regulan la apoptosis mediada por DR5. Sin embargo, se debería identificar el biomarcador, o esa combinación será difícil de desarrollar, inclusive cuando los efectos sensibilizantes sean fuertes y deseables. Realmente, para las líneas celulares resistentes a DR5, tales como ES2 y A375, los inhibidores de BRAF/MEK son los únicos componentes de la siguiente tabla que muestran fuertes efectos sensibilizantes, mientras que los inhibidores para Bcl-xL no lo hacen. La sub-regulación de cIAP1 está asociada con los efectos sensibilizantes en múltiples líneas celulares, sugiriéndolo como un biomarcador de PD en esta estrategia de combinación. Nuestros resultados sugieren que una solución podría ser una combinación triple del anticuerpo agonista de DR5 con los inhibidores para c1 y BRAF-MEK.

La Tabla 26 muestra el efecto sinérgico entre el anticuerpo agonista de DR5 y los inhibidores para cIAP1 o Bcl-xL. Treinta y cinco líneas celulares se tratan con LBY135 (anticuerpo agonista de DR5, Novartis AG) solo o en combinación con LBW242 (inhibidor de cIAP1) o ABT737 (inhibidor de Bcl-xL). Las células se marcan como insensibles cuando la viabilidad es mayor del 70 por ciento a 5 nM de LBY135. Para los efectos de la combinación, está etiquetado como '+++' cuando la combinación reduce la viabilidad celular por

más del 30 por ciento; y está etiquetado como '++' cuando la combinación reduce la viabilidad celular por entre el 10 y el 30 por ciento. Está etiquetado como "ninguno" cuando no se observa sinergismo con el tratamiento de combinación.

Tabla 26

Efecto sinérgico entre el agonista de DR5 y los inhibidores de cIAP1 o Bcl-xL.

Línea celular	Tipo de tumor	Sensibilidad a LBY135 (5nM)	Sensibilizado por LBW242	Sensibilizado por ABT737
A172	CNS	sensible	++	++
Bxpc3	Pancreático	insensible	++	++
Caov3	ovario	sensible	++	++
H596	NSCLC	insensible	++	++
panc10.05	Pancreático	insensible	++	+++
A375	Melanoma	insensible	++	ninguno
DU145	Próstata	insensible	++	ninguno
SK-Mel5	Melanoma	insensible	++	ninguno
colo741	Colon	insensible	+++	++
HCT116	Colon	sensible	+++	++
HT29	Colon	insensible	+++	++
colo205	Colon	sensible	+++	+++
EBC1	Pulmón	sensible	+++	+++
colo201	Colon	sensible	+++	ninguno

Línea celular	Tipo de tumor	Sensibilidad a LBY135 (5nM)	Sensibilizado por LBW242	Sensibilizado por ABT737
ES2	ovario	insensible	+++	ninguno
sw626	Colon	insensible	ninguno	++
H2452	Mesotelioma	sensible	ninguno	+++
HPAC	Pancreático	sensible	ninguno	+++
LNcap	Próstata	insensible	ninguno	+++
T24	Vejiga	insensible	ninguno	+++
A549	NSCLC	insensible	ninguno	ninguno
Calu6	Pulmón	sensible	ninguno	ninguno
H146	SCLC	insensible	ninguno	ninguno
H358	NSCLC	sensible	ninguno	ninguno
H520	NSCLC	insensible	ninguno	ninguno
MDAMB 361	Mama	insensible	ninguno	ninguno
MDA-MB-453	Mama	sensible	ninguno	ninguno
OPM2	Mieloma múltiple	sensible	ninguno	ninguno
panc2.03	Pancreático	insensible	ninguno	ninguno
Panc3.27	Pancreático	sensible	ninguno	ninguno

Línea celular	Tipo de tumor	Sensibilidad a LBY135 (5nM)	Sensibilizado por LBW242	Sensibilizado por ABT737
RKO	Colon	insensible	ninguno	ninguno
RT4	Vejiga	insensible	ninguno	ninguno
SKOV3	Ovario	insensible	ninguno	ninguno
SW480	Colon	sensible	ninguno	ninguno
U266B1	Mieloma múltiple	insensible	ninguno	ninguno

++: sensibilización; +++: fuerte sensibilización;

En adición, también se identifican 180 genes como diferencialmente regulados por la inhibición de MEK entre las dos líneas celulares. Se predice un conjunto de factores de transcripción que podrían ser responsables de la regulación de estos genes, mediante el análisis de enriquecimiento de conjunto de genes (GSEA), seguido por el examen individual utilizando el shARN para confirmar su involucramiento. Entre muchos factores de transcripción, se encuentra que solamente FOXO3 y SP1 están directamente involucrados en el cruce entre las dos sendas, como se muestra por su función en la regulación de cFLIP o cIAP1 al nivel del ARNm en las células Colo205. Sin embargo, en las células Miapcaca2, cFLIP o cIAP1 son regulados al nivel de la proteína en el proteasoma y de maneras dependientes de la caspasa 8. Finalmente, los niveles reducidos de proteína cIAP1 están asociados con los efectos sensibilizantes en las líneas celulares adicionales. Estos resultados identifican múltiples estrategias de combinación potentes para el anticuerpo LBY135 agonista del DR5, y revelan una regulación dependiente del contexto celular de la apoptosis mediada por el DR5 mediante la senda de BRAF-MEK-ERK.

Con el fin de validar los resultados del shARN, se utilizan inhibidores químicos específicos para BRAF y MEK con el objeto de

alterar la senda de BRAF-MEK-ERK. Es decir, RAF265 y U0126 son inhibidores de BRAF y MEK, respectivamente. La inhibición de la senda de BRAF-MEK-ERK con cualquier compuesto, sensibilizó a las células Miapaca2 al tratamiento con LBY135, pero rescató a las células Colo205 del mismo. Otros inhibidores específicos de BRAF y MEK dieron fenotipos similares.

Las células Miapaca2 tienen una mutación de KRAS activadora (G12C), mientras que las células Colo205 tienen una mutación de BRAF activa (V600E). De modo que es posible que estas mutaciones sean responsables de los diferentes fenotipos. Sin embargo, H2122, que tiene la misma mutación de KRAS que las células Miapaca2, no mostró ningún efecto sensibilizante como en Miapaca2. Adicionalmente, después del rastreo de siete líneas celulares adicionales, todas con las mutaciones de BRAF, encontramos que los inhibidores de MEK no mostraron efecto alguno en algunas líneas celulares, mientras que las otras se sensibilizaron como las células Miapaca2. Tomados juntos, nuestros resultados indican que las mutaciones de BRAF o de KRAS no explican las funciones dependientes del contexto celular de la senda de BRAF-MEK-ERK sobre la apoptosis mediada por DR5.

Globalmente, la inhibición de BRAF-MEK-ERK es una espada de dos filos - puede conducir a ya sea un efecto sensibilizante o bien antagonizante cuando se utiliza en combinación con el agonista de DR5. Los inhibidores de cIAP1 o XIAP, de Bcl-xL o de cFLIP en combinación con al agonista de DR5, son suficientes para la sensibilización. Sin embargo, la combinación de un inhibidor de BRAF y cualquiera de un inhibidor de MEK o ERK, parece antagonizar el efecto del tratamiento previo con LBY135. Aunque esto provoca preocupaciones para la terapia de combinación que se dirija hacia ambas sendas en la clínica, los datos sugieren que una triple combinación con inhibidores de cIAP podría ser una solución para el antagonismo. Es decir, una triple combinación del agonista de DR5, un inhibidor de cIAP (ya sea para cIAP1 o para XIAP), y la elección de un inhibidor de MEK o de un inhibidor de BRAF, también

debería dar como resultado la inducción sinérgica de la muerte celular.

7.3 Protocolos Experimentales

Para el rastreo de la biblioteca de shARN, las células objetivo se infectan con una biblioteca de shARN reservada que se dirige al shARN de quinoma y apotoma, seleccionada con purimicina, y entonces se trata con LBY135 reticulado o con un control de suero regulado con fosfato (PBS). Las muestras recolectadas en el Día 0, 7 y 14 se someten a extracción del ADN, amplificación mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR) de los shARNs integrados, y purificación, seguida por secuenciación Solexa. Las comparaciones entre los tratamientos en los mismos puntos del tiempo revelan los shARNs que modulan la apoptosis mediada por DR5. Las comparaciones entre los puntos del tiempo en los controles de suero regulado con fosfato (PBS) revelan efectos de los shARNs sobre el crecimiento celular. Entonces estos impactos se someten a validación individual.

Para analizar la eliminación genética de las células Miapaca2 y Colo205 sensibilizadas a LIMK2 a la apoptosis inducida por LBY135, las células se infectan con shARNs contra LIMK2 o contra las horquillas de control, se seleccionan con puromicina durante 5 días, entonces se siembran en placas de 96 pozos para los tratamientos con diluciones en serie de LBY135 reticulado al día siguiente durante 36 horas. Las viabilidades celulares se miden mediante el reactivo Cell-Titer-Glo, y se normalizan con las muestras no tratadas con LBY135. El índice de sobrevivencia celular se grafica como una función de las concentraciones para generar una curva de respuesta a la dosis. Los datos incluyen el promedio ± SD de los triplicados de un experimento representativo de cuando menos dos experimentos independientes.

Se utilizan inhibidores químicos de MEK y BRAF para validar el fenotipo de los shARNs en el rastreo. Las células Miapaca2 y Colo205 se incuban previamente con sulfóxido de dimetilo, inhibidor de MEK, U0126 (10 μM) o inhibidor de BRAF, RAF265 (1

μM) durante la noche, entonces se tratan con diluciones en serie de LBY135 reticulado durante 36 horas. Las viabilidades celulares se miden mediante el reactivo Cell-Titer-Glo, y se normalizan con las muestras no tratadas con LBY135. El índice de sobrevivencia celular se grafica como una función de las concentraciones para generar una curva de respuesta a la dosis. Los datos son el promedio ± SD de los triplicados de un experimento representativo de cuando menos dos experimentos independientes.

Con el objeto de mostrar que la activación de ERK mediante DR5 sigue intacta en ambas líneas celulares, las células Miapaca2 y Colo205 se incuban previamente con sulfóxido de dimetilo, o con U0126 (10 μM) durante la noche, se tratan con LBY135 reticulado (0.25 nM), y se recolectan a las 0 horas, 1 hora, 3 horas, y 6 horas para el análisis Western Blot para ERK y p-ERK. La inhibición de MEK disminuye las actividades de caspasa-8, caspasa-9 y caspasa-3/7 inducidas por DR5 en las células Colo205, mientras que las aumenta en las células Miapaca2. Las células Colo205 y Miapaca2 se tratan con LBY-135 reticulado a 0 nM, 0.25 nM o 1 nM durante 7 horas. Las células se lisan para el análisis de las actividades de caspasa8, caspasa9 y caspasa3/7. Las actividades de Caspasa se grafican como una función de las concentraciones de LBY135. Los datos son del experimento representativo de cuando menos dos experimentos independientes.

Se utiliza el análisis de microarreglo para revelar los genes con una correlación significativa entre las células Colo205 y Miapaca2 entre los genes regulados por MEK. Las células Colo205 y Miapaca2 se incuban previamente con sulfóxido de dimetilo o con U0126 durante la noche en cinco experimentos independientes. Se extrae el ARN para el análisis del microarreglo. Se grafica el nivel de expresión relativa para cada gen en las células tratadas con U0126 contra las células tratadas con sulfóxido de dimetilo, como una función de las células Colo205 sobre el eje-Y y de las células Miapaca2 sobre el eje-X.

7.4 <u>Modelo de procesamiento para el cruce entre DR5 y RAF-</u>

MEK-ERK

Un modelo de procesamiento propone que el tratamiento con el agonista de DR5 activa tanto la caspasa-8 como la ERK. Los cruces entre estas dos sendas son mediados por cFLIP y cIAP1, los cuales regulan negativamente la activación de caspasa-8 y caspasa-9, que a su vez controlan la apoptosis inducida por el agonista de DR5. cFLIP y cIAP1 se regulan en diferentes niveles, de una manera que es dependiente del contexto celular. En las células Colo205, se regulan en sus niveles de ARN a través de los factores de transcripción FOXO3 y SP1, que ellos mismos son regulados por la senda de BRAF-MEK-ERK. En las células Miapaca2, cFLIP y cIAP1 son regulados por la senda de BRAF-MEK-ERK al nivel de la proteína en el proteasoma y de una manera dependiente de la caspasa 8.

8. Ejemplo VIII

8.1 Ensayo Biacore de Ejemplo

Un ensayo adecuado para determinar si una secuencia de aminoácidos u otro agente de enlace bloquea cruzadamente o es capaz de bloquear cruzadamente, es un ensayo Biacore. Se apreciará que el ensayo se puede utilizar con cualquiera de las secuencias de aminoácidos (u otros agentes de enlace, tales como los polipéptidos de la invención) descritos en la presente.

La máquina Biacore (por ejemplo la Biacore 3000) se opera en línea con las recomendaciones del fabricante. En un ensayo de bloqueo cruzado de ejemplo, la proteína objetivo se acopla a un chip CM5 Biacore utilizando la química convencional de acoplamiento de amina para generar una superficie que se recubre con el objetivo. Típicamente se acoplarían de 200 a 800 unidades de resonancia del objetivo al chip (es decir, una cantidad que da niveles fácilmente mensurables de enlace, pero que es puede ser fácilmente saturada por las concentraciones del reactivo de prueba que se esté utilizando).

Dos secuencias de aminoácidos de prueba (denominadas como A* y B*) que se van a evaluar con el fin de determinar su

capacidad para tener bloqueo cruzado, se mezclan una con la otra a una proporción molar de los sitios de enlace en un regulador adecuado para crear la mezcla de prueba.. Cuando se calculan las concentraciones sobre una base del sitio de enlace, se asume que el peso molecular de una secuencia de aminoácidos es el peso molecular total de la secuencia de aminoácidos dividido entre el número de sitios de enlace objetivo sobre esa secuencia de aminoácidos. La concentración de cada secuencia de aminoácidos en la mezcla de prueba debe ser suficientemente alta para saturar fácilmente los sitios de enlace para esa secuencia de aminoácidos sobre las moléculas objetivo capturadas en el chip Biacore. Las secuencias de aminoácidos en la mezcla están en la misma concentración molar (sobre una base de enlace), y esa concentración típicamente sería de entre 1.00 y 1.5 micromolar (sobre una base del sitio de enlace). También se preparan soluciones separadas que contienen A* sola y B* sola. A* y B* en estas soluciones están en el mismo regulador y a la misma concentración que la mezcla de prueba.

La mezcla de prueba se pasa sobre el chip Biacore recubierto con el objetivo, y se registra la cantidad total de enlace. El chip se trata entonces de tal manera que se remueven las secuencias de aminoácidos enlazadas sin dañar el objetivo enlazado al chip. Típicamente, esto se hace mediante el tratamiento del chip con HCl 30 mM durante 60 segundos. La solución de A* sola se pasa entonces sobre la superficie recubierta con el objetivo, y se registra la cantidad de enlace. El chip se trata nuevamente para remover todas las secuencias de aminoácidos enlazadas sin dañar el objetivo enlazado al chip. La solución de B* sola se pasa entonces sobre la superficie recubierta con el objetivo, y se registra la cantidad de enlace.

En seguida se calcula el máximo enlace teórico de la mezcla de A* y B*, y es la suma del enlace de cada secuencia de aminoácidos cuando se pasa sobre la superficie objetivo sola. Si el enlace registrado real de la mezcla es menor que este máximo

teórico, entonces las dos secuencias de aminoácidos se bloquean cruzadamente una a la otra. Por consiguiente, en general, una secuencia de aminoácidos u otro agente de enlace de bloqueo cruzado de acuerdo con la invención, es uno que se enlazará al objetivo en el ensayo de bloqueo cruzado Biacore anterior, de tal manera que, durante el ensayo y en la presencia de una segunda secuencia de aminoácidos o de otro agente de enlace de la invención, el enlace registrado es de entre el 80 por ciento y el 0.1 por ciento (por ejemplo, del 80 por ciento al 4 por ciento) del máximo enlace teórico, específicamente de entre el 75 por ciento y el 0.1 por ciento (por ejemplo, del 75 por ciento al 4 por ciento) del máximo enlace teórico, y más específicamente de entre el 70 por ciento y el 0.1 por ciento (por ejemplo, del 70 por ciento al 4 por ciento) del máximo enlace teórico (como se definió justo en lo anterior) de las dos secuencias de aminoácidos o los agentes de enlace en combinación.

El ensayo Biacore descrito anteriormente es un ensayo primario utilizado para determinar si las secuencias de aminoácidos u otros agentes de enlace se bloquean cruzadamente unos a otros de acuerdo con la invención. En raras ocasiones, algunas secuencias de aminoácidos particulares u otros agentes de enlace pueden no enlazarse al objetivo acoplado por medio de la química de amina a un chip CM5 Biacore (esto ocurre usualmente cuando el sitio de enlace relevante sobre el objetivo es enmascarado o destruido por el acoplamiento al chip). En tales casos, el bloqueo cruzado se puede determinar utilizando una versión marcada del objetivo, por ejemplo, un sistema marcado con His N-terminal (R & D Systems, Minneapolis, MN, EUA; 2005 cat # 1406-ST-025). En este formato particular, se podría acoplar una secuencia de aminoácidos anti-His al chip Biacore, y entonces el objetivo marcado con His se pasaría sobre la superficie del chip, y sería capturado por la secuencia de aminoácidos anti-His. El análisis de bloqueo cruzado se llevaría a cabo esencialmente como se describe anteriormente, excepto que después de cada ciclo de regeneración del chip, se cargaría un

nuevo objetivo marcado con His de regreso sobre la superficie recubierta con la secuencia de aminoácidos anti-His. En adición al ejemplo dado utilizando el DR5 marcado con His N-terminal, se podría utilizar de una manera alternativa el objetivo marcado con His C-terminal. Adicionalmente, se podrían utilizar otras diferentes marcas y combinaciones de enlace de marcas que se conocen en la técnica, para este análisis de bloqueo cruzado (por ejemplo, marca HA con anticuerpos anti-HA; marca FLAG con anticuerpos anti-FLAG; marca de biotina con estreptavidina).

9. Ejemplo IX

9.2 Ensayo ELISA de ejemplo

Lo siguiente describe en términos generales un ensayo ELISA para determinar si una secuencia de aminoácidos o otro agente de enlace dirigido contra un objetivo bloquea cruzadamente o es capaz de bloquear cruzadamente como se define en la presente. Este ensayo se puede utilizar con cualquiera de las secuencias de aminoácidos (u otros agentes de enlace, tales como los polipéptidos de la invención) de la presente.

El principio general del ensayo es tener una secuencia de aminoácidos o agente de enlace que se dirija contra el objetivo recubierto sobre los pozos de una placa ELISA. Se agrega una cantidad excesiva de una segunda secuencia de aminoácidos contra el objetivo, que se potencialmente de bloqueo cruzado, en solución (es decir, no enlazada a la placa ELISA). Entonces se agrega a los pozos una cantidad limitada del objetivo. La secuencia de aminoácidos recubierta y la secuencia de aminoácidos en solución compiten para enlazarse al número limitado de moléculas objetivo. La placa se lava para remover el exceso de objetivo que no se haya enlazado con la secuencia de aminoácidos recubierta, y también para remover la segunda secuencia de aminoácidos en fase de solución, así como cualesquiera complejos formados entre la segunda secuencia de aminoácidos en fase de solución y el objetivo. Entonces se mide la cantidad de objetivo enlazado utilizando un reactivo que sea apropiado para detectar el objetivo. Una secuencia

de aminoácidos en solución que sea capaz de bloquear cruzadamente la secuencia de aminoácidos recubierta, será capaz de provocar una disminución en el número de moléculas objetivo con las que se puede enlazar la secuencia de aminoácidos recubierta, en relación con el número de moléculas objetivo con las que se puede enlazar la secuencia de aminoácidos recubierta en ausencia de la segunda secuencia de aminoácidos en fase de solución.

En el caso en donde la primera secuencia de aminoácidos, por ejemplo, una Ab-X, se seleccione como la secuencia de aminoácidos inmovilizada, se recubre sobre los pozos de la placa ELISA, después de lo cual, las placas se bloquean con una solución de bloqueo adecuada, para minimizar un enlace no específico de los reactivos que se agreguen subsiguientemente. Entonces se agrega una cantidad excesiva de la segunda secuencia de aminoácidos, es decir, Ab-Y, a la placa ELISA, de tal manera que los moles de sitios de enlace de Ab-Y [objetivo] por pozo sean cuando menos 10 veces más altos que los moles de sitios de enlace de Ab-X [objetivo] que se utilicen, por pozo, para el recubrimiento de la placa ELISA. Entonces se agrega el [objetivo] de tal manera que los moles de [objetivo] agregados por pozo sean cuando menos 25 veces menores que los moles de sitios de enlace de Ab-X [objetivo] que se utilicen para el recubrimiento de cada pozo. En seguida de un período de incubación adecuado, se lava la placa ELISA, y se agrega un reactivo para detectar el objetivo, con el fin de medir la cantidad de objetivo específicamente enlazado por la secuencia de aminoácidos anti-[objetivo] recubierta (en este caso Ab-X).

La señal del fondo para el ensayo se define como la señal obtenida en los pozos con la secuencia de aminoácidos recubierta (en este caso Ab-X), la segunda secuencia de aminoácidos en fase de solución (en este caso Ab-Y), el regulador [objetivo] solamente (es decir, sin objetivo), y los reactivos de detección de objetivo. La señal de control positivo para el ensayo se define como la señal obtenida en los pozos con la secuencia de aminoácidos recubierta (en este caso Ab-X), el regulador de la

segunda secuencia de aminoácidos en fase de solución solamente (es decir, sin la segunda secuencia de aminoácidos en fase de solución), el objetivo, y los reactivos de detección de objetivo. El ensayo ELISA se puede ejecutar de una manera tal como para hacer que la señal de control positivo sea cuando menos seis veces la señal del fondo.

Para evitar cualesquiera artificios (por ejemplo, afinidades significativamente diferentes entre Ab-X y Ab-Y para el [objetivo]) resultantes de la elección de cuál secuencia de aminoácidos utilizar como la secuencia de aminoácidos de recubrimiento y cuál utilizar como la segunda secuencia de aminoácidos (competidora), el ensayo de bloqueo cruzado se puede ejecutar en dos formatos: (1) el formato 1 es en donde Ab-X es la secuencia de aminoácidos que se recubre sobre la placa ELISA, y Ab-Y es la secuencia de aminoácidos competidora que está en solución, y (2) el formato 2 es en donde Ab-Y es la secuencia de aminoácidos que se recubre sobre la placa ELISA, y Ab-X es la secuencia de aminoácidos competidora que está en solución. Ab-X y Ab-Y se definen como de bloqueo cruzado si, ya sea en el formato 1 o en el formato 2, la secuencia de aminoácidos anti-objetivo en fase de solución es capaz de provocar una reducción de entre el 60 por ciento y el 100 por ciento, específicamente de entre el 70 por ciento y el 100 por ciento, y más específicamente de entre el 80 por ciento y el 100 por ciento, de la señal de detección de objetivo {es decir, la cantidad de objetivo enlazado por la secuencia de aminoácidos recubierta), comparándose con la señal de detección de objetivo obtenida en ausencia de la secuencia de aminoácidos anti-objetivo en fase de solución (es decir, los pozos de control positivo).

10. Ejemplo X

10.1 Experimento de agotamiento de macrófagos

Todos los anticuerpos anti-DR5 en desarrollo clínico hasta la fecha requieren de reticulación para lograr una potencia óptima *in vitro* e *in vivo*. Se cree que esta reticulación *in vivo* es mediada por medio del enlace de la porción Fc del anticuerpo anti-

DR5 con las células inmunes que expresan el receptor de Fc. Con el fin de investigar los efectos de la reticulación *in vivo* del anticuerpo anti-DR5 LCR211, comparándose con una construcción de NB, que se espera que no requiera de esta reticulación, se compara la actividad del IgG1 anticuerpo anti-DR5 de ratón LCR211 con el 11H6 tetra bajo condiciones de agotamiento de macrófagos asociados con el tumor (TAM) en el modelo de xeno-injerto de MiaPaCa-2 en los ratones hembras NOD/LtSz-*scid IL2R* gamma^{nada} (ratón NSG). Los ratones NSG (NOD-SCID gamma) son deficientes en células-T, en células-B, y tienen poca o ninguna actividad de citotoxicidad de células NK causada por la señalización alterada de la citoquina, como un resultado de la supresión de la cadena gamma de IL-2R (Shultz, J. of Immunology 2005). El agotamiento de los macrófagos asociados con el tumor (TAMs) se lleva a cabo utilizando una molécula pequeña que inhibe la señalización a través del receptor de CSF-1. Tres dosis a 200 miligramos/kilogramo una vez al día, agotan hasta el 80 por ciento de los macrófagos, como se muestra anteriormente. La dosificación diaria se continúa a través de todo el estudio.

Las células MiaPaCa se cosechan en el crecimiento exponencial. Cinco millones de células mezcladas a 50:50 con Matrigel se implantan subcutáneamente en el flanco derecho superior de los ratones sin pelo. Para el implante de las células, los ratones se anestesian con un flujo continuo del 2 al 4 por ciento de una mezcla de isoflurano/oxígeno, utilizando el centro de anestesia de múltiples cámaras integrado (IMCAC) y la cámara de inducción (Vetequip. Inc., Pleasanton, CA). La velocidad de absorción del tumor es >90 por ciento, y los tumores alcanzan de aproximadamente 150 a 350 mm^3 alrededor de 14 días después de la implantación de las células. Los animales se seleccionan aleatoriamente de acuerdo con el volumen del tumor, de tal manera que el volumen tumoral promedio y el intervalo son estadísticamente similares entre los grupos de tratamiento (como se determina mediante una prueba-t de Student). Los tumores se miden con calibres digitales dos veces por

semana al principio de la dosificación. Los volúmenes tumorales se calculan utilizando la fórmula elipsoidal: (longitud x anchura^2)/2. LCR211 se dosifica a 10 miligramos/kilogramo 3 veces por semana (3qw) intravenosamente, y 11H6 tetra se dosifica a 10 miligramos/kilogramo y a 40 miligramos/kilogramo por semana (qw) intravenosamente, con o sin el inhibidor de CSF1-R (CSF-1Ri) a 250 miligramos/kilogramo al día (qd) oralmente.

Los valores del porcentaje de tratamiento/control (T/C) se calculan utilizando la siguiente fórmula:

$$\% \text{ T/C} = 100 \times \Delta T/\Delta C \text{ si } \Delta T > 0$$

$$\% \text{ Regresión} = 100 \times \Delta T/T_{inicial} \text{ si } \Delta T < 0$$

en donde:

T = volumen tumoral promedio del grupo tratado con fármaco en el día final del estudio;

ΔT = volumen tumoral promedio del grupo tratado con fármaco en el día final del estudio – volumen tumoral promedio del grupo tratado con fármaco en el día inicial de la dosificación;

$T_{inicial}$ = volumen tumoral promedio del grupo tratado con fármaco en el día inicial de la dosificación;

C = volumen tumoral promedio del grupo de control en el día final del estudio; y

ΔC = volumen tumoral promedio del grupo de control en el día final del estudio – volumen tumoral promedio del grupo de control en el día inicial de la dosificación.

% T/C se hacen cálculos al final del estudio.

Como se ve en la Tabla 27 y en las Figuras 4A y 4B, 11H6 tetra mantiene una potente actividad de un solo agente en el xeno-injerto de MiaPaCa-2 bajo condiciones de agotamiento de TAM en el fondo del ratón NSG, mientras que, bajo las mismas condiciones, el anticuerpo de murino anti-DR5, LCR211 pierde eficacia.

Tabla 27

Sumario de la eficacia de 11H6 bajo condiciones de agotamiento

de TAM

Molécula	%T/C sin agotamiento de TAM	%T/C con agotamiento de TAM
LCR211 10 mg/kg 3qw	22 %	95 %
11H6 tetra 10 mg/kg qw	- 23.64 %	- 5.73 %
11H6 tetra 40 mg/kg qw	- 67.77 %	-9.11 %

10.2 Actividad anti-tumoral del agente DR5 en el modelo de tumor derivado del paciente insensible a LCR211

TPAN1-IFA, un tumor pancreático derivado del paciente (Xentech), se implanta subcutáneamente (sc) en (80) ratones sin pelo hembras (Harlan, aproximadamente 8 semanas de edad en el implante). Los animales se seleccionan aleatoriamente al principio del tratamiento en grupos de nueve. El volumen tumoral inicial es de 99 mm^3 (intervalo de 63 a 196 mm^3). Los grupos de tratamiento son: (1) Vehículo, una vez a la semana (qw), intravenosamente (i.v.), (2) LCR211, 10 miligramos/kilogramo, tres veces por semana (3qw), intravenosamente (i.v.), (3) 11H6 tetrámero, 10 miligramos/ kilogramo una vez a la semana (qw), intravenosamente (i.v.), (4) 11H6, 40 miligramos/kilogramo, una vez a la semana (qw), intravenosamente (i.v.), 5. Gemcitabina, 60 miligramos/kilogramo, dos veces por semana (2qw), intravenosamente (i.v.). El volumen de la dosificación intravenosa es de 5 mililitros/kilogramo. Los ratones se pesan dos veces por semana. Los tumores se miden con calibres dos veces por semana, y se calcula el volumen tumoral (TV) utilizando la fórmula: TV (mm^3) = [longitud (mm) x anchura (mm)2] / 2, en donde la longitud y la anchura son los diámetros de prueba más largo y más corto de cada tumor, respectivamente.

Como se muestra en la Figura 5, después de 4 semanas de la dosificación, LCR211 no muestra actividad de un solo agente, con el cambio promedio en el volumen tumoral del grupo de tratamiento sobre el control (T/C) = 109 por ciento. En contraste, 11H6 dosificado a 10 miligramos/kilogramo semanalmente, y a 40 miligramos/kilogramo semanalmente, da como resultado el 1 por ciento y el 86 por ciento de regresión, respectivamente ($p<0.05$ contra el vehículo). El tratamiento con gemcitabina da como resultado un T/C del 25 por ciento ($p<0.05$ contra el vehículo). El tratamiento con LCR211 y 11H6 es bien tolerado, sin pérdida de peso corporal significativa observada. Por consiguiente, en un cáncer derivado del paciente que es insensible a la dirección convencional del anticuerpo al DR5, las construcciones de NB muestran una potente regresión del tumor. En este ejemplo, la construcción de NB tiene el potencial para tratar una mayor clase de pacientes que podrían ser refractarios a los planteamientos de dirección convencionales para esta senda.

11. Ejemplo XI

11.1 Determinación de la estructura cristalográfica de rayos X de los complejos de DR5 humano/construcción de NB

Se determinan las estructuras de cristal de un fragmento de ECD de DR5 humano enlazado a construcciones monoméricas de 11H6 (SEQ ID NO: 103) y 4E6 (SEQ ID NO: 104). Como se detalla más adelante, los fragmentos de proteína de DR5 individuales se expresan, se purifican y se mezclan para formar complejos. Se emplea cristalografía de proteínas para generar los datos de resolución atómica para el enlace de proteína de DR5 a los dos ejemplos.

Se producen dos variantes de proteína de DR5 para la cristalografía, es decir, DR5_54 y DR5_61. Siguiendo la numeración de la secuencia del DR5 humano, Número de Acceso GenBank BAA33723.1 (SEQ ID NO: 89), las secuencias del DR5 corresponden a los residuos 54 a 183, y 61 a 183, respectivamente. Como se muestra en la Tabla 28, las secuencias en letras minúsculas se

remueven durante la producción. Para DR5_54 (SEQ ID NO: 100), y DR5_61 (SEQ ID NO: 101), se subraya la secuencia del DR5 humano. En la Tabla 28, “ID” representa la SEQ ID NO.

Tabla 28

Proteínas utilizadas para la determinación de la estructura del cristal

Construcción	**Secuencia de aminoácidos en código de una letra.**	**ID**
HuDR5 GenBank: BAA33723.1	meqrgqnapaasgarkrhgpgpreargarpglrvpktlvlvvaav lllvsaesalitqqdlapqqrvapqqkrsspseglcppghhisedgr dcisckygqdysthwndllfclrctrcdsgevelspctttrntvcqce egtfreedspemcrkcrtgcprgmvkvgdctpwsdiecvhkesg tkhsgeapaveetvtsspgtpaspcslsgiiigvtvaavvlivavfv cksllwkkvlpylkgicsggggdpervdrssqrpgaednvlneivsi lqptqvpeqemevqepaeptgvnmlspgesehllepaeaersq rrrllvpanegdptetlrqcfddfadlvpfdsweplmrklglmdneik vakaeaaghrdtlytmlikwvnktgrdasvhtlldaletlgerlakqk iedhllssgkfmylegnadsams	89
DR5_54 gp67DR5a54-s183-PH	mvsaivlyvllaaaahsafaadlgslevlfqALITQQDLAPQQ RAAPQQKRSSPSEGLCPPGHHISEDGRDCISCKY GQDYSTHWNDLLFCLRCTRCDSGEVELSPCTTTR NTVCQCEEGTFREEDSPEMCRKCRTGCPRGMVK VGDCTPWSDIECVHKESAAALEVLFQgpssgklghh hhhhhhhh	100
DR5_61 gp67DR5l61-s183-PH	mvsaivlyvllaaaahsafaadlgslevlfqGPSMALAPQQR AAPQQKRSSPSEGLCPPGHHISEDGRDCISCKYG QDYSTHWNDLLFCLRCTRCDSGEVELSPCTTTRN TVCQCEEGTFREEDSPEMCRKCRTGCPRGMVKV GDCTPWSDIECVHKESAAALEVLFQgpssgklghhhh hhhhhh	101

Construcción	Secuencia de aminoácidos en código de una letra.	ID
11H6 hu pAX100-11H6	mkktaiaiavalaglatvaqaEVQLLESGGGLVQPGGSL RLSCAASGTFDKINNMGWYRQAPGKQRDLVAQIT PGGITDYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLR PEDTAVYYCNAEILKRAYIDVYVNYWGQGTLVTV SSAAAEQKLISEEDLNGAAHHHHHH	102
4E6 hu pAX111-4E6	mkktaiaiavalaglatvaqaEVQLLESGGGLVQPGGSL RLSCAASGRTFGSIRVGWFRQAPGKGREFVSAIN RNDGTTYYADSVKGRFTISRDNSKNTVYLQMNSL RPEDTAVYYCAAGLQYNRAADRVPVGAVYWGQG TLVTVSSHHHHHH	103

Las proteínas anteriores se expresan en células SF9 utilizando un sistema de expresión de baculovirus, con el vector de expresión que contiene el péptido de señal GP67. La proteína de DR5 se purifica a partir del medio de crecimiento celular, seguido por una infección de 2.5 días. Se aclara el medio con la adición de $CaCl_2$ 5 mM, $NiCl_2$ 1 mM, Tris 50 mM, pH de 8.0, y PMSF 1 µM. La proteína se captura en resina de Ni-NTA (Qiagen) equilibrada en Tris 50 mM, pH de 8.0, NaCl 300 mM, utilizando una columna de flujo por gravedad. La columna se lava con Tris 50 mM, pH 8.0, NaCl 300 mM, imidazol 30 mM, seguido por elución con Tris 50 mN, pH de 8.0, NaCl 300 mM, imidazol 300 mM. Se disocia el DR5 eluido a partir de la columna de Ni con proteasa PreScission (GE Healthcare), seguido por cromatografía de filtración de gel utilizando una columna Superdex 75 (GE Healthcare) equilibrada en HEPES 50 mM, pH de 7.6, NaCl 150 mM. Además se purifica el DR5 mediante intercambio de iones utilizando una columna MonoQ (GE Healthcare) a un pH de 7.5 con un gradiente de volumen en la columna 20 de NaCl 0.03-1M. Se analizan las fracciones pico mediante SDS-PAGE y LCMS antes

de reservarse.

11.2 Cristalización de 4E6 y 11H6 con el DR5.

Ambos 4E6 (pAX111-4E6, SEQ ID NO:103), y 11H6 (pAX100-11H6, SEQ ID NO:102), se clonan como las construcciones monoméricas de NB para la expresión de *E. coli* en células BL21(DE3)pLysS y células BL21(DE3)Star, respectivamente, y ambas contienen secuencias de señal para la localización periplásmica, como se proporciona en la Tabla 28 anterior. Siguiendo a una inducción de 3 horas con IPTG a 37°C, se cosechan y se lisan las células. Se captura la proteína sobre una columna de Ni-NTA previamente equilibrada en Tris 50 mM, pH de 8.0, NaCl 300 mM. La columna se lava con Tris 50 mM, pH de 8.0, NaCl 300 mM, imidazol 50 mM, seguido por elución con Tris 50 mN, pH de 8.0, NaCl 300 mM, imidazol 300 mM. Además se purifica el eluido de Ni por medio de cromatografía de filtración de gel utilizando una columna Superdex 75 (GE Healthcare). Mientras que éste es el paso de purificación final para el 11H6, el 4E6 se sometió a un paso de purificación adicional mediante una columna de intercambio de cationes MonoS (GE Healthcare).

Se prepara un complejo del DR5_61/4E6 mediante la mezcla de DR5_61 y 4E6 en una proporción molar de 1:1 (concentración medida por medio de LCUV), incubando sobre hielo durante 1 hora, y purificando el complejo sobre una columna Superdex75 (GE Healthcare) equilibrada en HEPES 20 mM, pH de 7.5, NaCl 150 mM. Se analizan las fracciones pico mediante SDS-PAGE y LMCS. Las fracciones que contienen DR5_61/4E6 se concentran hasta aproximadamente 10 miligramos/mililitro para la cristalización.

Se prepara un complejo de DR5_54/11H6 mediante la mezcla de DR5_54 y 11H6 en una proporción molar de 1:1.3 (se estima la concentración mediante LCUV), incubando sobre hielo durante 1 hora, y purificando el complejo en una columna Superdex75 (GE Healthcare) equilibrada en HEPES 25 mM, pH de 7.5, NaCl 150 mM. Las fracciones pico que contienen el dímero

DR5_54/11H6 se reservan y se concentran hasta aproximadamente 12.7 miligramos/mililitro. Entonces el dímero se trata con Tripsina como sigue: se utilizan 200 microlitros de dímero (aproximadamente 2.5 miligramos) para volver a suspender 20 microgramos de tripsina liofilizada, la cual entonces se incuba a temperatura ambiente durante 15 minutos. La mezcla de DR5_54/11H6/tripsina se centrifuga antes de establecerse los rastreos de cristalización.

Los cristales crecen mediante la difusión de vapor por goteo asentado a partir de gotas que contienen volúmenes iguales de proteína y solución de depósito. Para el complejo DR5_61/4E6 se produce una solución de depósito de PEG 3350 al 22 por ciento, acetato de calcio 150 mM, Hepes 100 mM, pH de 7.5, se producen cristales sobre la incubación a 20°C. El complejo de DR5_54/11G6 tratado con tripsina, una solución de depósito de sulfato de amonio 0.2M. Tris 0.1M, pH de 8.5, PEG 3350 al 25 por ciento, produce cristales después de la incubación a 20°C.

Los cristales de DR5_61/4E6 se transfieren a una solución criogénica que contiene PEG 3350 al 25 por ciento, HEPES 50 mM, pH de 7.5, acetato de calcio 150 mM, glicerol al 15 por ciento, etilenglicol al 10 por ciento, y se enfría por evaporación en nitrógeno líquido. Los cristales de DR5_a54/11H6 se transfieren a una solución de depósito que contiene glicerol al 22 por ciento adicional y se enfría por evaporación en nitrógeno líquido.

Para el complejo DR5_61/4E6, se recolectan los datos de difracción en la estación PXI-X06SA en la Swiss Light Source (Paul Scherrer Institut, Villigen, Suiza). Se procesan y se escalan los datos a 1.9Å utilizando autoPROC (Global Phasing, LTD) en el grupo de espacio C121 con dimensiones celulares de a = 98.50Å, b = 84.65Å, c = 64.91Å, alfa = 90°, beta = 99.38°, gama = 90°. La estructura de DR5_61/4E6 se disuelve mediante reemplazo molecular utilizando Phaser (McCoy y colaboradores (2007) J. Appl. Cryst. 40: 658-674) con la estructura del DR5, 2H9G, y la estructura 1OL0 de VH humana camelizada, como modelos de búsqueda. El modelo final que contiene 2 moléculas del complejo DR5_61/4E6 por unidad

asimétrica, se construye en COOT (Emsley y Cowtan (2004) Acta Cryst. 60: 2126-2132), y se refina hasta valores R y R_{libre} del 22.2 por ciento y del 24.1 por ciento, respectivamente, con un rmsd de 0.003Å y 0.69° para las longitudes de enlace y los ángulos de enlace, respectivamente, utilizando FENIX (Adams y colaboradores, Acta Cryst. D66, 213-221 (2010)).

Para el complejo DR5_54/11H6, se recolectan los datos de difracción en la línea del haz 17-ID en la Advanced Photon Sourse (Argonne National Laboratory, EUA). Los datos se procesan y se escalan a 2.2Å utilizando autoPROC (Global Phasing, LTD) en un grupo de espacio $P6_5$ con dimensiones celulares de a = 99.61Å, b = 99.61 Å, c = 107.73Å, alfa = 90°, beta = 90°, gamma = 120°. Se disuelve la estructura DR5_54/11H6 mediante reemplazo molecular utilizando Phaser (McCoy y colaboradores (2007) J. Appl. Cryst. 40: 658-674) con la estructura de DR5, 2H9G y la construcción 4E6 de NB como modelos de búsqueda. El modelo final, que contiene 2 moléculas del complejo DR5_54/11H6 por unidad asimétrica, se construye en COOT (Emsley y Cowtan (2004) Acta Cryst. 60: 2126-2132), y se definen los valores R y R_{libre} del 19.5 por ciento y del 22.0 por ciento, respectivamente, con un rmsd de 0.002 Å y 0.64° para las longitudes de enlace y los ángulos de enlace, respectivamente, utilizando FENIX (Adams y colaboradores, Acta Cryst. D66, 213-221 (2010)).

11.3 4E6 y 11H6 reconocen los epítopos únicos en DR5

La estructura de cristal del complejo 4E6/DR5_61 se ha utilizado para identificar el epítopo de DR5 para la construcción de 4E6. La superficie de interacción sobre el DR5 se forma mediante tres secuencias discontinuas (es decir, no contiguas) secuencias: es decir, los residuos 77 a 80, los residuos 87 a 91, y los residuos 105 a 114, como se detalla en la Tabla 29A. Estos residuos forman la superficie tridimensional que se reconoce mediante la construcción de NB. Las interacciones incluyen interacciones de la estructura base, interacciones mediadas por solventes, e interacciones de

cadena lateral directas. Los aminoácidos cuyas cadenas laterales contribuyen directamente a las interacciones anotadas en la Tabla 29A. La contribución de la superficie de interacción a partir de la construcción 4E6 de NB se forma mediante su residuo 2 N-terminal, y tres regiones de lazos: los residuos 28 a 33, los residuos 53 a 59, y los residuos 99 a 115. Los residuos de contacto se enlistan en la Tabla 29B.

En la Tabla 29A, se enlistan los residuos de DR5 que contienen átomos en contacto con la construcción de NB, 4E6. El contacto se define para estar dentro de 5 Angstroms de la construcción de NB para contabilizar las interacción mediadas por agua potenciales. Los aminoácidos cuyas cadenas laterales contribuyen directamente a la superficie de interacción se anotan con un “+”.

Tabla 29A

Epítopo conformacional de DR5 para 4E6

Proteína	Aminoácido	Posición en la Secuencia	Interacción de Cadena Lateral
DR5	S	77	
DR5	E	78	+
DR5	G	79	
DR5	L	80	+
DR5	I	87	+
DR5	S	88	
DR5	E	89	
DR5	D	90	
DR5	G	91	+
DR5	T	105	

Proteína	Aminoácido	Posición en la Secuencia	Interacción de Cadena Lateral
DR5	H	106	+
DR5	W	107	+
DR5	N	108	
DR5	D	109	+
DR5	L	110	+
DR5	L	111	+
DR5	F	112	+
DR5	L	114	+

En la Tabla 29B, se enlistan los residuos en la construcción de NB 4E6 que están en contacto con el DR5. El contacto se define dentro de 5 Angstroms de la construcción de NB para contabilizar las interacciones mediadas por agua potenciales. Los aminoácidos cuyas cadenas laterales contribuyen directamente a la superficie de interacción se anotan con “+”.

Tabla 29B

Aminoácidos 4E6 en contacto con el DR5

Proteína	Aminoácido	Posición en la Secuencia	Interacción de Cadena Lateral
4E6	V	2	+
4E6	T	28	+
4E6	G	30	+
4E6	S	31	+

Proteína	Aminoácido	Posición en la Secuencia	Interacción de Cadena Lateral
4E6	I	32	+
4E6	R	33	+
4E6	R	53	
4E6	N	54	+
4E6	Y	59	
4E6	G	99	+
4E6	L	100	
4E6	Q	101	+
4E6	Y	102	+
4E6	N	103	
4E6	R	104	
4E6	A	105	+
4E6	A	106	+
4E6	V	111	+
4E6	V	114	+
4E6	Y	115	+

La estructura de cristal del complejo 11H6/DR5_54 se utiliza para identificar el epítopo de DR5 para la construcción del 11H6. La superficie de interacción sobre el DR5 se forma mediante dos secuencias discontinuas, los residuos 86 a 102 y los residuos 111 a 118, y dos residuos adicionales 74 y 125 como se detalla en la Tabla 30A. Estos residuos forman la superficie tridimensional que se reconoce mediante la construcción de NB. Las interacciones incluyen

interacciones de la estructura base, interacciones mediadas por solvente, e interacciones de cadena lateral directas. Los aminoácidos cuyas cadenas laterales contribuyen directamente a las interacciones se anotan en la Tabla 30A. La contribución a la superficie de interacción a partir de la construcción 11H6 se extiende más allá de las regiones de lazo observadas para la construcción 4E6. Los residuos 30 a 37, los residuos 44 a 61, y los residuos 96 a 112 contribuyen a la superficie de enlace de la construcción del 11H6 como se detalla en la Tabla 30B. El lazo de la construcción 11H6 a partir de los residuos 98 a 110 está en una conformación muy diferente del lazo correspondiente a partir de la construcción 4E6. Esta posición de lazo alternativa proporciona una superficie de interacción única para el enlace de DR5.

En la Tabla 30A, se enlistan los residuos de DR5 que contienen átomos en contacto con la construcción del 11H6. El contacto se define para estar dentro de 5 Angstroms del 11H6, para contabilizar las interacciones mediadas por agua potenciales. Los aminoácidos cuyas cadenas laterales contribuyen directamente a la superficie de interacción se anotan con un “+”. El área superficial enterrada se determina como un porcentaje.

Tabla 30A

Epítopo Conformacional del DR5 para 11H6

Proteína	Aminoácido	Posición en la Secuencia	Área Superficial Enterrada (%)
DR5	S	74	
DR5	H	86	+
DR5	I	87	
DR5	S	88	+
DR5	E	89	+

Proteína	Aminoácido	Posición en la Secuencia	Área Superficial Enterrada (%)
DR5	D	90	+
DR5	R	92	
DR5	D	93	+
DR5	I	95	+
DR5	S	96	
DR5	K	98	+
DR5	G	100	
DR5	Q	101	+
DR5	D	102	+
DR5	L	111	+
DR5	F	112	+
DR5	C	113	
DR5	R	115	+
DR5	R	118	+
DR5	E	125	

En la Tabla 30B, se enlistan los residuos en 11H6 que están en contacto con el DR5. El contacto se define para estar dentro de 5 Angstroms de la construcción del 11H6 para contabilizar las interacciones mediadas por agua potenciales. Los aminoácidos cuya cadena lateral contribuye directamente a la superficie de interacción se anotan con un “+”.

Tabla 30B

Aminoácidos de 11H6 en contacto con el DR5

Proteína	Aminoácido	Posición en la Secuencia	Interacción de Cadena Lateral
11H6	K	30	+
11H6	N	32	+
11H6	N	33	+
11H6	Y	37	+
11H6	Q	44	+
11H6	R	45	
11H6	D	46	+
11H6	L	47	+
11H6	Q	50	+
11H6	I	51	
11H6	T	52	+
11H6	P	53	
11H6	G	54	
11H6	G	55	
11H6	I	56	+
11H6	T	57	
11H6	D	58	+
11H6	A	60	+
11H6	D	61	

Proteína	Aminoácido	Posición en la Secuencia	Interacción de Cadena Lateral
11H6	N	96	+
11H6	E	98	+
11H6	L	100	+
11H6	Y	104	
11H6	D	106	
11H6	V	107	+
11H6	Y	108	+
11H6	N	110	+
11H6	W	112	+

EQUIVALENTES

1. Una modalidad proporciona un polipéptido aislado, el cual comprende cuando menos un monómero de un solo dominio variable de un agente NB que se enlaza específicamente al DR5 humano.

2. Una modalidad proporciona el polipéptido del párrafo 1, en donde el único dominio variable mencionado se selecciona a partir del grupo que consiste en: a) los dominios variables individuales, los cuales comprenden una o más secuencias de la región determinante de complementariedad 3 (CDR3) seleccionadas a partir de cualquiera o más de las SEQ ID NOs: 63-68; b) los dominios variables individuales que comprenden una o más secuencias de la región determinante de complementariedad 3 (CDR3) con el 90 por ciento de identidad con cuando menos una CDR3 seleccionada a partir de cualquiera o más de las SEQ ID NOs: 63-68; y c) los dominios variables individuales que comprenden una o más secuencias de la región determinante de complementariedad 3

(CDR3) con cuando menos el 95 por ciento de identidad con cuando menos una CDR3 seleccionada a partir de cualquiera o más de las SEQ ID NOs: 63-68.

3. Una modalidad proporciona el polipéptido del párrafo 1, en donde el único dominio variable mencionado se selecciona a partir del grupo que consiste en: a) los dominios variables individuales, los cuales comprenden una o más secuencias de la región determinante de complementariedad 3 (CDR3) seleccionadas a partir de cualquiera o más de las SEQ ID NOs: 41-44, 51-55, y 63-68; b) los dominios variables individuales que comprenden una o más secuencias de la región determinante de complementariedad 3 (CDR3) con cuando menos el 90 por ciento de identidad con cuando menos una CDR3 seleccionada a partir de cualquiera o más de las SEQ ID NOs: 41-44, 51-55 y 63-68; y c) los dominios variables individuales que comprenden una o más secuencias de la región determinante de complementariedad 3 (CDR3) con cuando menos el 95 por ciento de identidad con cuando menos una CDR3 seleccionada a partir de cualquiera o más de las SEQ ID NOs: 41-44, 51-55 y 63-68 con cuando menos el 90 por ciento de identidad.

4. Una modalidad proporciona el polipéptido del párrafo 1, en donde el único dominio variable mencionado se selecciona a partir del grupo que consiste en: a) los dominios variables individuales con las SEQ ID NOs: 1-5, 26, 30 y 87; y b) los dominios variables individuales con cuando menos el 95 por ciento de identidad con cuando menos un solo dominio variable de las SEQ ID NOs: 1-5, 26, 30 y 87.

5. Una modalidad proporciona un polipéptido aislado, el cual comprende cuando menos tres monómeros de un solo dominio variable que se enlaza específicamente al DR5 humano.

6. Una modalidad proporciona el polipéptido del párrafo 5, en donde el polipéptido mencionado comprende tres monómeros idénticos del único dominio variable, y en donde el único dominio variable mencionado se selecciona a partir del grupo que consiste en: a) un solo dominio variable, el cual comprende una o más

secuencias de la región determinante de complementariedad 3 (CDR3) seleccionadas a partir de cualquiera o más de las SEQ ID NOs: 63-68; b) los dominios variables individuales que comprenden una o más secuencias de la región determinante de complementariedad 3 (CDR3) con cuando menos el 90 por ciento de identidad con cuando menos una CDR3 seleccionada a partir de cualquiera o más de las SEQ ID NOs: 63-68; y c) los dominios variables individuales que comprenden una o más secuencias de la región determinante de complementariedad 3 (CDR3) con cuando menos el 95 por ciento de identidad con cuando menos una CDR3 seleccionada a partir de cualquiera o más de las SEQ ID NOs: 63-68 con cuando menos el 90 por ciento de identidad.

7. Una modalidad proporciona el polipéptido del párrafo 5, en donde el polipéptido mencionado comprende tres monómeros idénticos del único dominio variable, y en donde el único dominio variable mencionado se selecciona a partir del grupo que consiste en: a) los dominios variables individuales, los cuales comprenden una o más secuencias de la región determinante de complementariedad 3 (CDR3) seleccionadas a partir de cualquiera o más de las SEQ ID NOs: 41-44, 51-55 y 63-68; b) los dominios variables individuales que comprenden una o más secuencias de la región determinante de complementariedad 3 (CDR3) con cuando menos el 90 por ciento de identidad con cuando menos una CDR3 seleccionada a partir de cualquiera o más de las SEQ ID NOs: 41-44, 51-55 y 63-68; y c) los dominios variables individuales que comprenden una o más secuencias de la región determinante de complementariedad 3 (CDR3) con cuando menos el 95 por ciento de identidad con cuando menos una CDR3 seleccionada a partir de cualquiera o más de las SEQ ID NOs: 41-44, 51-55 y 63-68 con cuando menos el 90 por ciento de identidad.

8. Una modalidad proporciona el polipéptido del párrafo 5, en donde el polipéptido mencionado comprende tres monómeros idénticos del único dominio variable, y en donde el único dominio variable mencionado se selecciona a partir del grupo que consiste

en: a) los dominios variables individuales con las SEQ ID NOs: 1-5, 26, 30 y 87; b) los dominios variables individuales con cuando menos el 90 por ciento de identidad con cuando menos un solo dominio variable de las SEQ ID NOs: 1-5, 26, 30 y 87, y c) los dominios variables individuales con cuando menos el 95 por ciento de identidad con cuando menos un solo dominio variable de las SEQ ID NOs: 1-5, 26, 30 y 87.

9. Una modalidad proporciona el polipéptido del párrafo 5, el cual comprende una secuencia de aminoácidos que se selecciona a partir del grupo que consiste en: a) las secuencias de aminoácidos de las SEQ ID NOs: 6, 9, 12-14, 17, 20, 27 y 31; y b) las secuencias de aminoácidos con cuando menos el 90 por ciento de identidad con la secuencia de aminoácidos de las SEQ ID NOs: 6, 9, 12-14, 17, 20, 27 y 31.

10. Una modalidad proporciona el polipéptido del párrafo 5, el cual comprende una secuencia de aminoácidos que se selecciona a partir del grupo que consiste en: a) las secuencias de aminoácidos de las SEQ ID NOs: 6, 9, 12-14, 17, 20, 27 y 31; y b) las secuencias de aminoácidos con cuando menos el 90 por ciento de identidad con la secuencia de aminoácidos de las SEQ ID NOs: 6, 9, 12-14, 17, 20, 27 y 31.

11. El polipéptido del párrafo 5, el cual comprende una secuencia de aminoácidos que se selecciona a partir del grupo que consiste en: a) las secuencias de aminoácidos de las SEQ ID NOs: 6, 9, 12-14, 17, 20, 27 y 31; y b) las secuencias de aminoácidos con cuando menos el 95 por ciento de identidad con la secuencia de aminoácidos de las SEQ ID NOs: 6, 9, 12-14, 17, 20, 27 y 31.

12. Una modalidad proporciona un polipéptido aislado, el cual comprende cuando menos cuatro monómeros de un solo dominio variable que se enlaza específicamente al DR5 humano.

13. Una modalidad proporciona el polipéptido del párrafo 12, en donde el polipéptido mencionado comprende cuatro dominios variables individuales, y en donde el único dominio variable mencionado se selecciona a partir de uno, dos, tres o cuatro

monómeros a partir del grupo que consiste en: a) los dominios variables individuales con las SEQ ID NOs: 1-5, 26, 30 y 87; b) los dominios variables individuales con cuando menos el 90 por ciento de identidad con el único dominio variable mencionado de las SEQ ID NOs: 1-5, 26, 30 y 87; y c) los dominios variables individuales con el 95 por ciento de identidad con el único dominio variable mencionado de las SEQ ID NOs: 1-5, 26, 30 y 87.

14. Una modalidad proporciona el polipéptido del párrafo 12, en donde el polipéptido mencionado comprende cuatro dominios variables individuales idénticos, y en donde el único dominio variable mencionado se selecciona a partir del grupo que consiste en: a) los dominios variables individuales con las SEQ ID NOs: 1-5, 26, 30 y 87; b) los dominios variables individuales con cuando menos el 90 por ciento de identidad con el único dominio variable mencionado de las SEQ ID NOs: 1-5, 26, 30 y 87; y c) los dominios variables individuales con el 95 por ciento de identidad con el único dominio variable mencionado de las SEQ ID NOs: 1-5, 26, 30 y 87.

15. Una modalidad proporciona el polipéptido del párrafo 12, en donde el polipéptido mencionado comprende cuatro dominios variables individuales idénticos, y en donde el único dominio variable mencionado se selecciona a partir del grupo que consiste en: a) los dominios variables individuales con las SEQ ID NOs: 1-5, 26, 30 y 87; y b) los dominios variables individuales con cuando menos el 95 por ciento de identidad con cuando menos un solo dominio variable de las SEQ ID NOs: 1-5, 26, 30 y 87.

16. Una modalidad proporciona el polipéptido del párrafo 12, el cual comprende una secuencia de aminoácidos que se selecciona a partir del grupo que consiste en: a) una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 88; b) las secuencias de aminoácidos con cuando menos el 90 por ciento de identidad con esta secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 88; y c) las secuencias de aminoácidos con el 95 por ciento de identidad con esta secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 88.

17. Una modalidad proporciona el polipéptido del párrafo 12,

el cual comprende una secuencia de aminoácidos que se selecciona a partir del grupo que consiste en: a) las secuencias de aminoácidos con las SEQ ID NOs: 7, 10, 15, 18, 21, 28 y 32; b) las secuencias de aminoácidos con cuando menos el 90 por ciento de identidad con esta secuencia de aminoácidos de las SEQ ID NOs: 7, 10, 15, 18, 21, 28 y 32; y c) las secuencias de aminoácidos con el 95 por ciento de identidad con esta secuencia de aminoácidos de las SEQ ID NOs: 7, 10, 15, 18, 21, 28 y 32.

18. El polipéptido del párrafo 12, el cual comprende una secuencia de aminoácidos humanizada que se selecciona a partir del grupo que consiste en: a) las secuencias de aminoácidos con la SEQ ID NO: 28; b) las secuencias de aminoácidos con la SEQ ID NO: 32; y b) las secuencias de aminoácidos con cuando menos el 95 por ciento de identidad con esta secuencia de aminoácidos de las SEQ ID NOs: 28 y 32.

19. Una modalidad proporciona un polipéptido aislado, el cual comprende cuando menos cinco monómeros de un solo dominio variable que se enlaza específicamente al DR5 humano.

20. Una modalidad proporciona el polipéptido del párrafo 19, en donde el polipéptido mencionado comprende cinco dominios variables individuales, y en donde el único dominio variable mencionado se selecciona a partir de uno, dos, tres, cuatro o cinco monómeros del grupo que consiste en: a) los dominios variables individuales con las SEQ ID NOs: 1-5, 26, 30 y 87; b) los dominios variables individuales con cuando menos el 90 por ciento de identidad con el único dominio variable mencionado de las SEQ ID NOs: 1-5, 26, 30 y 87; y c) los dominios variables individuales con cuando menos el 95 por ciento de identidad con el único dominio variable mencionado de las SEQ ID NOs: 1-5, 26, 30 y 87 con cuando menos el 90 por ciento de identidad.

21. Una modalidad proporciona el polipéptido del párrafo 19, en donde el polipéptido mencionado comprende cinco dominios variables individuales idénticos, y en donde el único dominio variable mencionado se selecciona a partir del grupo que consiste en: a) los

dominios variables individuales con las SEQ ID NOs: 1-5, 26, 30 y 87; b) los dominios variables individuales con cuando menos el 90 por ciento de identidad con el único dominio variable mencionado de las SEQ ID NOs: 1-5, 26, 30 y 87; y b) los dominios variables individuales con el 95 por ciento de identidad con el único dominio variable mencionado de las SEQ ID NOs: 1-5, 26, 30 y 87.

22. Una modalidad proporciona el polipéptido del párrafo 19, en donde el polipéptido mencionado comprende cinco dominios variables individuales, y en donde el único dominio variable mencionado está humanizado, y este dominio humanizado se selecciona a partir del grupo que consiste en: a) los dominios variables individuales con las SEQ ID NOs: 26 y 30; b) los dominios variables individuales con cuando menos el 90 por ciento de identidad con cuando menos un solo dominio variable de las SEQ ID NOs: 26 y 30; y b) los dominios variables individuales con cuando menos el 95 por ciento de identidad con cuando menos un solo dominio variable de las SEQ ID NOs: 26 y 30.

23. Una modalidad proporciona el polipéptido del párrafo 19, el cual comprende una secuencia de aminoácidos que se selecciona a partir del grupo que consiste en: a) las secuencias de aminoácidos con las SEQ ID NOs: 8, 11, 16, 19, 22, 29 y 33; b) las secuencias de aminoácidos con cuando menos el 90 por ciento de identidad con esta secuencia de aminoácidos de las SEQ ID NOs: 8, 11, 16, 19, 22, 29 y 33; y c) las secuencias de aminoácidos con el 95 por ciento de identidad con esta secuencia de aminoácidos de las SEQ ID NOs: 8, 11, 16, 19, 22, 29 y 33.

24. Una modalidad proporciona el polipéptido del párrafo 19, el cual comprende una secuencia de aminoácidos que se selecciona a partir del grupo que consiste en: a) la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 29; b) las secuencias de aminoácidos con cuando menos el 90 por ciento de identidad con esta secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 29; y b) las secuencias de aminoácidos con el 95 por ciento de identidad con esta secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 29.

25. Una modalidad proporciona el polipéptido del párrafo 19, el cual comprende una secuencia de aminoácidos que se selecciona a partir del grupo que consiste en: a) las secuencias de aminoácidos con la SEQ ID NO: 33; b) las secuencias de aminoácidos con cuando menos el 90 por ciento de identidad con esta secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 33; y b) las secuencias de aminoácidos con cuando menos el 95 por ciento de identidad con esta secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 33.

26. Una modalidad proporciona un polipéptido aislado, el cual comprende tres o cuatro o cinco monómeros de un solo dominio variable que se enlaza específicamente al DR5 humano, y en donde el polipéptido mencionado tiene una potencia *in vitro* (IC_{50}) contra un panel de cuando menos 2 líneas celulares tumorales seleccionadas a partir del grupo que consiste en Colo205, Jurkat, Molt4, H2122, H226, y H2052, que es igual o menor de 100nM.

27. Una modalidad proporciona el polipéptido del párrafo 26, en donde el polipéptido mencionado tiene una potencia *in vitro* que es igual o menor de 10 nM.

28. Una modalidad proporciona el polipéptido del párrafo 26, en donde el polipéptido mencionado tiene una potencia *in vitro* que es igual o menor de 1 nM.

29. Una modalidad proporciona el polipéptido del párrafo 26, en donde el polipéptido mencionado tiene una potencia *in vitro* que es igual o menor de 100 pM.

30. Una modalidad proporciona el polipéptido de los párrafos 26 a 29, en donde el polipéptido mencionado tiene una potencia *in vitro* (IC_{50}) contra un panel de cuando menos 3 líneas celulares no tumorales seleccionadas a partir del grupo que consiste en Malme-3, WI-38, ARPE-19, 184A1, Huvec, HAAE-1 que es igual o mayor de 20nM.

31. Una modalidad proporciona el polipéptido de los párrafos 26 a 29, en donde el polipéptido mencionado tiene una potencia *in vitro* (IC_{50}) contra un panel de cuando menos 3 líneas celulares no tumorales seleccionadas a partir del grupo que consiste en Malme-3,

WI-38, ARPE-19, 184A1, Huvec, HAAE-1 que es igual o mayor de 100 nM.

32. Una modalidad proporciona el polipéptido de los párrafos 26 a 31, en donde el polipéptido mencionado comprende tres o cuatro o cinco monómeros de un solo dominio variable, y en donde el único dominio variable mencionado se selecciona a partir del grupo que consiste en: a) los dominios variables individuales con las SEQ ID NOs: 1-5, 26, 30 y 87; y b) los dominios variables individuales con cuando menos el 90 por ciento de identidad con el único dominio variable mencionado de las SEQ ID NOs: 1-5, 26, 30 y 87.

33. El polipéptido de los párrafos 26 a 31, en donde el polipéptido mencionado comprende tres o cuatro o cinco monómeros de un solo dominio variable, y en donde el único dominio variable mencionado está humanizado y se selecciona a partir del grupo que consiste en: a) los dominios variables individuales con las SEQ ID NOs: 26 y 30; b) los dominios variables individuales con cuando menos el 90 por ciento de identidad con el único dominio variable mencionado de las SEQ ID NOs: 26 y 30; y b) los dominios variables individuales con cuando menos el 95 por ciento de identidad con el único dominio variable mencionado de las SEQ ID NOs: 26 y 30.

34. Una modalidad proporciona el polipéptido de los párrafos 26 a 31, en donde el polipéptido mencionado se selecciona a partir del grupo que consiste en: a) el polipéptido seleccionado a partir de cualquiera o más de las SEQ ID NOs: 27, 28 y 29; b) un polipéptido con cuando menos el 95 por ciento de identidad con cuando menos un polipéptido seleccionado a partir de cualquiera o más de las SEQ ID NOs: 27, 28 y 29; c) el polipéptido seleccionado a partir de cualquiera o más de las SEQ ID NOs: 31, 32 y 33; y d) un polipéptido con cuando menos el 95 por ciento de identidad con cuando menos un polipéptido seleccionado a partir de cualquiera o más de las SEQ ID NOs: 31, 32 y 33.

35. Una modalidad proporciona un polipéptido aislado, el cual comprende una secuencia de aminoácidos que se selecciona a partir del grupo que consiste en una o más secuencias de aminoácidos de

las SEQ ID NOs: 1 a 22, 26 a 33, 87 y 88.

36. Una modalidad proporciona el polipéptido aislado de acuerdo con cualquiera de los párrafos anteriores 1 al presente, en donde el polipéptido mencionado no compite total o parcialmente con el ligando natural del DR5 en un ensayo de enlace competitivo.

37. Una modalidad proporciona el polipéptido aislado de acuerdo con cualquiera de los párrafos anteriores 1 al presente, en donde el polipéptido mencionado sí compite total o parcialmente con el ligando natural del DR5 en un ensayo de enlace competitivo.

38. Una modalidad proporciona el polipéptido aislado de acuerdo con los párrafos 1, 5, 12, 19, 26, ó 37, el cual comprende cuando menos una región determinante de complementariedad (CDR) que tiene cuando menos el 60, 70, 80, 90, 95 ó 100 por ciento de identidad de secuencia con cuando menos una de las regiones CDR ilustradas en cualquiera de las SEQ ID NOs: 41 a 44 (CDR1); SEQ ID NOs: 51 a 55 (CDR2); SEQ ID NOs: 63 a 68 (CDR3), más preferiblemente SEQ ID NOs: 51 a 55 y SEQ ID NOs: 63 a 68.

39. Una modalidad proporciona el polipéptido aislado de acuerdo con los párrafos 1, 5, 12, 19, 26, ó 37, el cual comprende las regiones CDR1 a CDR3 que tienen cuando menos el 90, 95 ó 100 por ciento de identidad de secuencia, respectivamente, con las regiones CDR ilustradas en cualquiera de las SEQ ID NOs: 41 a 44 (CDR1); SEQ ID NOs: 51 a 55 (CDR2); SEQ ID NOs: 63 a 68 (CDR3).

40. Una modalidad proporciona el polipéptido aislado de acuerdo con cualquiera de los párrafos 1, 5, 12, 19, 26, ó 37, el cual comprende o esencialmente consiste en una secuencia de aminoácidos que tiene cuando menos el 90, 95 ó 100 por ciento de identidad de secuencia con cualquiera de secuencias como se ilustran en las SEQ ID NOs: 26 a 33.

41. Una modalidad proporciona el polipéptido aislado de acuerdo con cualquiera de los párrafos 1, 5, 12, 19, 26, ó 37, el cual comprende una región CDR3 de acuerdo con la SEQ ID NO: 64 o con la SEQ ID NO: 66.

42. Una modalidad proporciona el polipéptido aislado de

acuerdo con cualquiera de los párrafos 1, 5, 12, 19, 26, ó 37, una región CDR1, CDR2 y CDR3 idéntica respectivamente a las regiones CDR ilustradas en las SEQ ID NOs: 41 a 44 (CDR1); SEQ ID NOs: 51 a 55 (CDR2); SEQ ID NOs: 63 a 68 (CDR3) o las regiones CDR variantes con 1, 2, 3, 4 ó 5 aminoácidos sustituidos, suprimidos, o insertados cuando se comparan con las regiones CDR originales como se ilustran en la presente.

43. Una modalidad proporciona el polipéptido aislado de acuerdo con cualquiera de los párrafos anteriores 1 al presente, que es una inmunoglobulina o un fragmento de la misma.

44. Una modalidad proporciona el polipéptido aislado de acuerdo con cualquiera de los párrafos anteriores 1 al presente, que es una inmunoglobulina humanizada, una inmunoglobulina camelizada, o una inmunoglobulina que se puede obtener mediante la técnica de optimización de afinidad, o un fragmento de la misma.

45. Una modalidad proporciona el polipéptido aislado de acuerdo con cualquiera de los párrafos anteriores 1 al presente, que esencialmente consiste en una secuencia del dominio variable de la cadena ligera, por ejemplo, una secuencia V_L; o en una secuencia del dominio variable de la cadena pesada, por ejemplo, una secuencia V_H.

46. Una modalidad proporciona el polipéptido aislado de acuerdo con cualquiera de los párrafos anteriores 1 al presente, que esencialmente consiste en una secuencia del dominio variable de la cadena pesada que se deriva a partir de un anticuerpo de cuatro cadenas convencional o que esencialmente consiste en una secuencia del dominio variable de la cadena pesada que se deriva a partir de un anticuerpo de cadena pesada.

47. Una modalidad proporciona el polipéptido aislado de acuerdo con cualquiera de los párrafos anteriores 1 al presente, que esencialmente consiste en un anticuerpo de dominio, un anticuerpo de un solo dominio, un dAb y un anticuerpo de camélido o fragmento, incluyendo, pero no limitándose a, una secuencia V_{HH}.

48. Una modalidad proporciona el polipéptido aislado de

acuerdo con cualquiera de los párrafos anteriores 1 al presente, que esencialmente consiste en una secuencia V_{HH}.

49. Una modalidad proporciona el polipéptido aislado de acuerdo con cualquiera de los párrafos anteriores 1 al presente, que esencialmente consiste en una secuencia V_{HH} que:

a) tiene cuando menos el 90 por ciento de identidad de aminoácidos con cuando menos una de las secuencias de aminoácidos de las SEQ ID NOs: 1-22, 26-40, 87-88, y 103-104, en donde, para los propósitos de determinar el grado de identidad de aminoácidos, no se consideran los residuos de aminoácidos que forman las secuencias de CDR; y en donde:

b) opcionalmente una o más de las posiciones de aminoácidos 11, 37, 44, 45, 47, 83, 84, 103, 104 y 108 de acuerdo con la numeración de Kabat están humano-diseñadas (humaneered).

50. Una modalidad proporciona el polipéptido aislado de acuerdo con cualquiera o más de los párrafos anteriores 1 al presente, que esencialmente consiste en una secuencia V_{HH} que:

a) tiene cuando menos el 90 por ciento de identidad de aminoácidos con cuando menos una de las secuencias de aminoácidos de las SEQ ID NOs: 1-22, 26-40, 87-88, y 103-104, en donde, para los propósitos de determinar el grado de identidad de aminoácidos, no se consideran los residuos de aminoácidos que forman las secuencias de CDR; y en donde:

b) opcionalmente los contactos entre DR5 y la secuencia V_{HH} se seleccionan a partir de:

i) el epítopo conformacional del DR5, el cual comprende los residuos de la Tabla 29A;

ii) el epítopo conformacional del DR5, el cual comprende los residuos de la Tabla 30A;

iii) la superficie de interacción de los aminoácidos V_{HH} como se enlistan en la Tabla 29B; y

iv) la superficie de interacción de los aminoácidos V_{HH} como se enlistan en la Tabla 30B.

51. Una modalidad proporciona el polipéptido aislado de

acuerdo con cualquiera de los párrafos anteriores 1 al presente, que esencialmente consiste en una secuencia V_{HH} humanizada.

52. Una modalidad proporciona el compuesto que comprende o que consiste esencialmente en uno o más polipéptidos de acuerdo con cualquiera de cualquiera de los párrafos anteriores 1 al presente, y opcionalmente comprende además uno o más grupos, residuos, fracciones o unidades de enlace adicionales, en donde el compuesto mencionado es capaz de mejorar la apoptosis celular.

53. Una modalidad proporciona el compuesto del párrafo 52, el cual tiene una IC_{50} menor de 100 nM, de preferencia menor de 10 nM, más preferiblemente menor de 1 nM, todavía más preferiblemente menor de 100 pM, por ejemplo, debajo de 10 pM como se mide, por ejemplo, en el ensayo de sobrevivencia celular de Colo205.

54. Una modalidad proporciona el compuesto de los párrafos 52 ó 53, en donde el polipéptido de enlace monovalente correspondiente no es tan potente como el polipéptido multivalente, como se mide, por ejemplo, en el ensayo de sobrevivencia basado en células Colo205.

55. Una modalidad proporciona el compuesto de cualquiera de los párrafos 52 ó 54, en donde los cuando menos tres, cuatro, cinco o más polipéptidos de enlace monovalentes mencionados, pueden enlazarse cada uno al DR5 humano en un formato monovalente.

56. Una modalidad proporciona el compuesto de cualquiera de los párrafos 52 ó 54, en donde los cuando menos tres, cuatro, cinco o más polipéptidos de enlace monovalentes mencionados, pueden enlazarse cada uno al DR5 humano en un formato monovalente pero no se enlazan a los receptores TRAIL-R3 y/o TRAIL-R4.

57. Una modalidad proporciona el compuesto de cualquiera de los párrafos 52 ó 54, en donde los cuando menos tres, cuatro, cinco o más polipéptidos de enlace monovalentes se pueden enlazar cada uno al DR5 en un formato monovalente, y compiten en un

ensayo de enlace con el ligando TRAIL natural.

58. Una modalidad proporciona el compuesto de cualquiera de los párrafos 52 ó 54, en donde los cuando menos tres, cuatro, cinco o más polipéptidos de enlace monovalentes mencionados, se dirigen todos contra la misma región de enlace del DR5 humano.

59. Una modalidad proporciona el compuesto de cualquiera de los párrafos 52 ó 53, en donde el cuando menos un polipéptido de enlace monovalente mencionado se dirige contra una región de enlace del DR5, y cuando menos otro polipéptido de enlace monovalente se dirige contra otra región de enlace distinta del DR5 o contra una región de enlace de otro DR5.

60. Una modalidad proporciona el compuesto de cualquiera de los párrafos 52 ó 53, en donde los cuando menos tres, cuatro, cinco o más polipéptidos de enlace monovalentes mencionados tienen secuencias de aminoácidos sustancialmente idénticas.

61. Una modalidad proporciona el compuesto de cualquiera de los párrafos 52 ó 53, el cual consiste esencialmente en un polipéptido de una sola cadena, y en donde los cuando menos tres, cuatro, cinco o más dominios variables individuales de enlace monovalente se enlazan entre sí por medio de un enlazador peptídico.

62. Una modalidad proporciona el compuesto del párrafo 61, en donde el enlazador mencionado consiste esencialmente en un péptido, el cual comprende entre 5 y 50 residuos de aminoácidos.

63. Una modalidad proporciona el compuesto de cualquiera de los párrafos 52 ó 54, en donde el uno o más grupos, residuos, fracciones o unidades de enlace adicionales son polipéptidos, opcionalmente enlazados por medio de uno o más enlazadores.

64. Una modalidad proporciona el compuesto de cualquiera de los párrafos 1 a 63, en donde el uno o más enlazadores son enlazadores peptídicos o polipeptídicos.

65. Una modalidad proporciona el compuesto del párrafo 64, en donde el uno o más grupos, residuos, fracciones o unidades de enlace adicionales se seleccionan a partir del grupo que consiste en

un anticuerpo de dominio, un anticuerpo de un solo dominio, un dAb y un anticuerpo de camélido, o un fragmento de los mismos, incluyendo, pero no limitándose a, una secuencia V_{HH}.

66. Una modalidad proporciona el compuesto de cualquiera de los párrafos 52 a 66, en donde el uno o más grupos, residuos, fracciones o unidades de enlace adicionales proporcionan el compuesto con un aumento de la vida media cuando se administran en un organismo de mamífero, comparándose con el mismo compuesto sin el uno o más grupos, residuos, fracciones o unidades de enlace adicionales.

67. Una modalidad proporciona un ácido nucleico aislado que codifica cualquiera de: (1) un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos del polipéptido, como se define en cualquiera de los párrafos 1 a 51, o (2) un compuesto de acuerdo con cualquiera de los párrafos 52 a 66.

68. Una modalidad proporciona una célula huésped que expresa, o que, bajo circunstancias adecuadas, es capaz de expresar el ácido nucleico del párrafo 67.

69. Una modalidad proporciona un método para producir el polipéptido de enlace de DR5 de cualquiera de los párrafos 1 a 51, o el compuesto de cualquiera de los párrafos 52 a 66, el cual comprende:

a) expresar, en una célula huésped adecuada o en un organismo huésped no humano, el ácido nucleico del párrafo 67; y

b) aislar y/o purificar el polipéptido de enlace de DR5 o el compuesto mencionados.

70. Una modalidad proporciona el polipéptido de acuerdo con cualquiera de los párrafos 1 a 51 o el compuesto de acuerdo con cualquiera de los párrafos 52 a 66, para utilizarse como un fármaco.

71. Una modalidad proporciona el polipéptido del párrafo 70, para utilizarse como un producto terapéutico contra el cáncer.

72. Una modalidad proporciona una composición que comprende cuando menos un polipéptido de cualquiera de los párrafos 1 a 51, o un compuesto de cualquiera de los párrafos 52 a

66, y cuando menos un vehículo, diluyente o excipiente y/o adyuvante farmacéuticamente aceptable.

73. Una modalidad proporciona un método para la prevención y/o el tratamiento de un trastorno que se pueda tratar mediante la mejora de la apoptosis celular, comprendiendo este método, administrar a un sujeto que lo necesite, una cantidad farmacéuticamente efectiva de cuando menos un polipéptido de acuerdo con cualquiera de los párrafos 1 a 51, o de cuando menos un compuesto de acuerdo con cualquiera de los párrafos 52 a 66.

74. Una modalidad proporciona el método del párrafo 73, en donde el trastorno mencionado es una enfermedad proliferativa.

75. Una modalidad proporciona el método del párrafo 74, en donde la enfermedad proliferativa mencionada se selecciona a partir de:

a) uno o más cánceres sólidos seleccionados a partir de cánceres primarios y metastásicos, tales como carcinoma de células renales, y cánceres del pulmón (por ejemplo, cáncer pulmonar microcelular “SCLC” y cáncer pulmonar no microcelular “NSCLC”), páncreas, malignidad hematopoiética, glioma, astrocitoma, mesotelioma, cánceres colo-rectales, cáncer de próstata, osteosarcoma, melanoma, linfoma (incluyendo, pero no limitándose a, linfoma de Burkitt), cáncer de mama, cáncer endometrial, cáncer de hígado, cáncer gástrico, cáncer de piel, cáncer de ovario, y cánceres de células escamosas de cualquier origen (incluyendo, pero no limitándose a, cánceres de células escamosas del pulmón, cabeza y cuello, mama, tiroides, cérvix, piel, y/o esofágico); y

b) uno o más cánceres líquidos seleccionado a partir de leucemias, incluyendo en especial una leucemia de células-T, tal como leucemia de células-T aguda (T-ALL), leucemia de células-B aguda (B-ALL), leucemia mielógena crónica (CML), leucemia mielógena aguda (AML), mieloma de células de plasma, y mieloma múltiple (MM).

76. Una modalidad proporciona el método del párrafo 74, en

donde la enfermedad proliferativa mencionada es una o más indicaciones que no son de cáncer, comprendiendo estas indicaciones una o más de las enfermedades inflamatorias y autoinmunes, tales como lupus eritematoso sistémico, enfermedad de Hashimoto, artritis reumatoide, enfermedad del injerto contra el huésped, síndrome de Sjogren, anemia perniciosa, enfermedad de Addison, esclerodermia, síndrome de Goodpasture, enfermedad de Crohn, anemia hemolítica autoinmune, esterilidad, miastenia grave, esclerosis múltiple, enfermedad de Basedow, trombocitopenia trombótica, trombocitopenia purpúrea, diabetes mellitus dependiente de insulina, alergia; asma, enfermedad atópica; arterioesclerosis; miocarditis; cardiomiopatía; nefritis glomerular; y anemia hipoplásica.

77. Una modalidad proporciona el método del párrafo 75, en donde la enfermedad proliferativa es cáncer pancreático.

78. Una modalidad proporciona el método del párrafo 75, en donde la enfermedad proliferativa es T-ALL.

79. Una modalidad proporciona el método del párrafo 75, en donde la enfermedad proliferativa es mesotelioma.

80. Una modalidad proporciona el método del párrafo 75, en donde la enfermedad proliferativa es carcinoma de células escamosas de cualquier origen de tejido.

81. Una modalidad proporciona el método del párrafo 75, en donde la enfermedad proliferativa es AML.

82. Una modalidad proporciona el método del párrafo 75, en donde la enfermedad proliferativa es melanoma.

83. Una modalidad proporciona el método del párrafo 75, en donde la enfermedad proliferativa es mieloma.

84. Una modalidad proporciona una composición que comprende el polipéptido de acuerdo con cualquiera de los párrafos 1 a 51 o cuando menos un compuesto de acuerdo con cualquiera de los párrafos 52 a 66, estando esta composición en combinación con cuando menos un inhibidor de cualquiera o más genes seleccionados a partir de cIAP1, cIAP2, XIAP, cFLIP y Bcl-xL.

85. Una modalidad proporciona la composición del párrafo

84, en donde el inhibidor es un inhibidor de cIAP1.

86. Una modalidad proporciona la composición del párrafo 85, que además comprende un inhibidor de MEK.

87. Una modalidad proporciona la composición del párrafo 85, que además comprende un inhibidor de BRAF,

88. Una modalidad proporciona la composición del párrafo 84, en donde el inhibidor es un inhibidor de XIAP.

89. Una modalidad proporciona la composición del párrafo 84, en donde el inhibidor es un inhibidor de cFLIP.

90. Una modalidad proporciona la composición del párrafo 84, en donde el inhibidor es un compuesto de bajo peso molecular seleccionado a partir de LCL161 y ABT263.

91. Una modalidad proporciona la composición del párrafo 84, en donde el inhibidor es un shARN.

92. Una modalidad proporciona un método para utilizar cualquiera o más de las composiciones del párrafo 72, comprendiendo el método administrar a un sujeto que lo necesite, una cantidad farmacéuticamente efectiva de esta composición o de una combinación de la misma, para el tratamiento de una enfermedad asociada con el DR5.

93. Una modalidad proporciona el método del párrafo 92, en donde la enfermedad asociada con el DR5 se selecciona a partir de una o más de las siguientes:

a) una o más enfermedades proliferativas seleccionadas a partir de cánceres sólidos y líquidos,

(i) en donde los tumores sólidos incluyen cánceres primarios y metastásicos, tales como carcinoma de células renales, y cánceres del pulmón (por ejemplo, cáncer pulmonar microcelular “SCLC” y cáncer pulmonar no microcelular “NSCLC”), páncreas, malignidad hematopoiética, glioma, astrocitoma, mesotelioma, cánceres colo-rectales, cáncer de próstata, osteosarcoma, melanoma, linfoma (incluyendo, pero no limitándose a, linfoma de Burkitt), cáncer de mama, cáncer endometrial, cáncer de hígado, cáncer gástrico, cáncer de piel, cáncer de ovario, y

cánceres de células escamosas de cualquier origen (incluyendo, pero no limitándose a, cánceres de células escamosas del pulmón, cabeza y cuello, mama, tiroides, cérvix, piel, y/o esofágico); y

(ii) en donde los cánceres líquidos comprenden leucemias, incluyendo en especial una leucemia de células-T, tal como leucemia de células-T aguda (T-ALL), leucemia de células-B aguda (B-ALL), leucemia mielógena crónica (CML), leucemia mielógena aguda (AML), mieloma de células de plasma, y mieloma múltiple (MM); y

b) indicaciones que no son de cáncer, las cuales comprenden una o más de las enfermedades inflamatorias y autoinmunes, tales como lupus eritematoso sistémico, enfermedad de Hashimoto, artritis reumatoide, enfermedad del injerto contra el huésped, síndrome de Sjogren, anemia perniciosa, enfermedad de Addison, esclerodermia, síndrome de Goodpasture, enfermedad de Crohn, anemia hemolítica autoinmune; esterilidad, miastenia grave, esclerosis múltiple, enfermedad de Basedow, trombocitopenia trombótica, trombocitopenia purpúrea, diabetes mellitus dependiente de insulina, alergia; asma, enfermedad atópica; arterioesclerosis; miocarditis; cardiomiopatía; nefritis glomerular; y anemia hipoplásica.

94. Una modalidad proporciona los polipéptidos aislados de acuerdo con cualquiera o más de los párrafos anteriores 1 al presente, en donde las CDRs se calculan de acuerdo con las reglas ya sea de Kabat y/o de Chotia.

95. Una modalidad proporciona los polipéptidos aislados de acuerdo con cualquiera o más de los párrafos anteriores 1 al presente, en donde el polipéptido se enlaza a uno o más epítopos como se proporcionan en las Tablas 29A y/o 30A, y/o comprende los residuos superficiales interactivos como se proporcionan en las Tablas 29B y/o 30B.

Las siguientes reivindicaciones de la invención no son limitantes. Se pueden contemplar ciertas variaciones de la invención que están dentro de las capacidades de un experto en este campo, incluyendo, pero no limitándose a, cambios en las formulaciones,

suministro, humanización, sistemas de expresión, y similares. Estas variaciones se consideran dentro del alcance de la invención.

REIVINDICACIONES

1. Un polipéptido aislado, el cual comprende cuando menos un monómero de un solo dominio variable de un agente NB que se enlaza específicamente al DR5 humano.

2. El polipéptido de la reivindicación 1, en donde el único dominio variable mencionado se selecciona a partir del grupo que consiste en: a) dominios variables individuales, los cuales comprenden una o más secuencias de la región determinante de complementariedad 3 (CDR3) seleccionadas a partir de cualquiera o más de las SEQ ID NOs: 63-68; b) los dominios variables individuales que comprenden una o más secuencias de la región determinante de complementariedad 3 (CDR3) con el 90 por ciento de identidad con cuando menos una CDR3 seleccionada a partir de cualquiera o más de las SEQ ID NOs: 63-68; y c) los dominios variables individuales que comprenden una o más secuencias de la región determinante de complementariedad 3 (CDR3) con cuando menos el 95 por ciento de identidad con cuando menos una CDR3 seleccionada a partir de cualquiera o más de las SEQ ID NOs: 63-68.

3. El polipéptido de la reivindicación 1, en donde el único dominio variable mencionado se selecciona a partir del grupo que consiste en: a) los dominios variables individuales con las SEQ ID NOs: 1 - 5, 26, 30 y 87; y b) los dominios variables individuales con cuando menos el 95 por ciento de identidad con cuando menos un solo dominio variable con las SEQ ID NOs: 1 - 5, 26, 30 y 87.

4. Un polipéptido aislado, el cual comprende cuando menos tres, cuando menos cuatro, o cuando menos cinco subunidades monoméricas de un solo dominio variable que se enlaza específicamente al DR5 humano, en donde estas subunidades se enlazan opcionalmente mediante un enlazador de polipéptido.

5. El polipéptido de la reivindicación 4, en donde el polipéptido mencionado comprende monómeros idénticos del único dominio variable, y en donde el único dominio variable mencionado se selecciona a partir del grupo que consiste en: a) los dominios

variables individuales con las SEQ ID NOs: 1 - 5, 26, 30 y 87; b) los dominios variables individuales con cuando menos el 90 por ciento de identidad con cuando menos un solo dominio variable con las SEQ ID NOs: 1 - 5, 26, 30 y 87, y c) los dominios variables individuales con cuando menos el 95 por ciento de identidad con cuando menos un solo dominio variable con las SEQ ID NOs: 1 - 5, 26, 30 y 87.

6. El polipéptido de la reivindicación 4, el cual comprende una secuencia de aminoácidos que se selecciona a partir de una o más subunidades del grupo que consiste en: a) las secuencias de aminoácidos con las SEQ ID NOs: 6, 9, 12-14, 17, 20, 27 y 31; y b) las secuencias de aminoácidos con cuando menos el 90 por ciento de identidad con la secuencia de aminoácidos con las SEQ ID NOs: 6, 9, 12-14, 17, 20, 27 y 31.

7. El polipéptido de la reivindicación 4, el cual se enlaza específicamente al DR5 humano, y en donde el polipéptido mencionado tiene una potencia *in vitro* (IC_{50}) contra un panel de cuando menos 2 líneas celulares tumorales seleccionadas a partir del grupo que consiste en Colo205, Jurkat, Molt4, H2122, H226, y H2052, que es igual o menor de 100nM.

8. El polipéptido de la reivindicación 7, en donde el polipéptido mencionado tiene una potencia *in vitro* que es igual o menor de 10 nM, que es igual o menor de 1 nM, o que es igual o menor de 100 pM.

9. Un polipéptido aislado, el cual comprende una secuencia de aminoácidos que se selecciona a partir del grupo que consiste en una o más secuencias de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1 a 22, 26 a 33, 87 y 88.

10. El polipéptido aislado de acuerdo con la reivindicación 1, el cual comprende cuando menos una región determinante de complementariedad (CDR) que tiene cuando menos el 60, 70, 80, 90, 95 ó 100 por ciento de identidad de secuencia con cuando menos una de las regiones CDR ilustradas en cualquiera de las SEQ ID NO: 41 a 44 (CDR1); SEQ ID NO: 51 a 55 (CDR2); SEQ ID NO: 63 a 68

(CDR3), más preferiblemente SEQ ID NO: 51 a 55 y SEQ ID NO: 63 a 68.

11. El polipéptido aislado de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, el cual es una inmunoglobulina humanizada, una inmunoglobulina camelizada o una inmunoglobulina que se puede obtener mediante la técnica de optimización de afinidad, o un fragmento de la misma.

12. El polipéptido aislado de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, el cual consiste esencialmente en una secuencia de dominio variable de cadena ligera, por ejemplo, una secuencia V_L; o en una secuencia del dominio variable de la cadena pesada, por ejemplo, una secuencia V_H, o es un anticuerpo de dominio, un anticuerpo de un solo dominio, un dAb y un anticuerpo de camélido o fragmento, incluyendo, pero no limitándose a, una secuencia V_{HH}.

13. El polipéptido aislado de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, el cual consiste esencialmente en una secuencia V_{HH} que:

(a) tiene cuando menos el 90 por ciento de identidad de aminoácidos con cuando menos una de las secuencias de aminoácidos de las SEQ ID NOs: 1-22, 26-40, 87-88, y 103-104, o de las secuencias de aminoácidos codificadas por cuando menos una de las SEQ ID NOs: 96-99, en donde, para los propósitos de determinar el grado de identidad de aminoácidos, no se consideran los residuos de aminoácidos que forman las secuencias de CDR;

y en donde:

(b) opcionalmente una o más de las posiciones de aminoácidos 11, 37, 44, 45, 47, 83, 84, 103, 104 y 108 de acuerdo con la numeración de Kabat están humano-diseñadas (humaneered).

14. El compuesto que comprende o que consiste esencialmente en uno o más polipéptidos de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, y opcionalmente comprende además uno o más grupos adicionales, residuos, fracciones o unidades de enlace, en donde el compuesto mencionado es capaz de

mejorar la apoptosis celular.

15. El compuesto de la reivindicación 14, en donde los cuando menos tres, cuatro, cinco o más polipéptidos de enlace monovalentes mencionados se dirigen todos contra la misma región de enlace del DR5 humano.

16. El compuesto de la reivindicación 14, en donde el cuando menos un polipéptido de enlace monovalente mencionado se dirige contra una región de enlace del DR5, y cuando menos otro polipéptido de enlace monovalente se dirige contra otra región de enlace distinta del DR5 o una región de enlace de otro DR5.

17. El polipéptido de acuerdo con la reivindicación 1, para utilizarse como un fármaco.

18. El polipéptido de la reivindicación 17, para utilizarse como un producto terapéutico contra el cáncer.

19. Un polipéptido de la reivindicación 18 y cuando menos un vehículo, diluyente o excipiente y/o adyuvante farmacéuticamente aceptable.

20. Un método para la prevención y/o el tratamiento de un trastorno que se pueda tratar mediante la mejora de la apoptosis celular, comprendiendo este método, administrar, a un sujeto que lo necesite, una cantidad farmacéuticamente efectiva de cuando menos un polipéptido de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores.

21. El método de la reivindicación 20, en donde el trastorno mencionado es una enfermedad proliferativa que responde al agonismo de la actividad del DR5.

22. El método de la reivindicación 21, en donde la enfermedad proliferativa mencionada se selecciona a partir de:

a) uno o más cánceres sólidos seleccionados a partir de cánceres primarios y metastásicos, tales como carcinoma de células renales, y cánceres del pulmón (por ejemplo, cáncer pulmonar microcelular “SCLC” y cáncer pulmonar no microcelular “NSCLC”), páncreas, malignidad hematopoiética, glioma, astrocitoma, mesotelioma, cánceres colo-rectales, cáncer de

próstata, osteosarcoma, melanoma, linfoma (incluyendo, pero no limitándose a, linfoma de Burkitt), cáncer de mama, cáncer endometrial, cáncer de hígado, cáncer gástrico, cáncer de piel, cáncer de ovario, y cánceres de células escamosas de cualquier origen (incluyendo, pero no limitándose a, cánceres de células escamosas del pulmón, cabeza y cuello, mama, tiroides, cérvix, piel, y/o esofágico);

b) uno o más cánceres líquidos seleccionado a partir de leucemias, incluyendo en especial una leucemia de células-T, tal como leucemia de células-T aguda (T-ALL), leucemia de células-B aguda (B-ALL), leucemia mielógena crónica (CML), leucemia mielógena aguda (AML), mieloma de células de plasma, y mieloma múltiple (MM); y

c) una o más indicaciones que no son de cáncer, comprendiendo estas indicaciones una o más de enfermedades inflamatorias y autoinmunes, tales como lupus eritematoso sistémico, enfermedad de Hashimoto, artritis reumatoide, enfermedad del injerto contra el huésped, síndrome de Sjogren, anemia perniciosa, enfermedad de Addison, esclerodermia, síndrome de Goodpasture, enfermedad de Crohn, anemia hemolítica autoinmune, esterilidad, miastenia grave, esclerosis múltiple, enfermedad de Basedow, trombocitopenia trombótica, trombocitopenia purpúrea, diabetes mellitus dependiente de insulina, alergia; asma, enfermedad atópica; arterioesclerosis; miocarditis; cardiomiopatía; nefritis glomerular; y anemia hipoplásica.

23. El método de la reivindicación 22, en donde la enfermedad proliferativa es cáncer pancreático.

24. El método de la reivindicación 22, en donde la enfermedad proliferativa es T-ALL.

25. El método de la reivindicación 22, en donde la enfermedad proliferativa es mesotelioma.

26. El método de la reivindicación 22, en donde la enfermedad proliferativa es carcinoma de células escamosas de cualquier origen de tejido.

27. El método de la reivindicación 22, en donde la enfermedad proliferativa es AML.

28. El método de la reivindicación 22, en donde la enfermedad proliferativa es melanoma.

29. El método de la reivindicación 22, en donde la enfermedad proliferativa es mieloma.

30. Los polipéptidos aislados de acuerdo con cualquiera o más de las reivindicaciones anteriores, en donde las CDRs se calculan de acuerdo con las reglas ya sea de Kabat y/o de Chotia.

31. La construcción de NB de acuerdo con cualquiera o más de las reivindicaciones anteriores, la cual se enlaza al epítopo del DR5 como se proporciona en la Tabla 29A, o la cual se enlaza al epítopo del DR5 como se proporciona en la Tabla 30A.

RESUMEN

La presente invención se refiere a las secuencias de aminoácidos que se dirigen contra el receptor de superficie celular 2 de TRAIL (en la presente también “DR5”), así como a los compuestos o construcciones de las mismas, y en particular a las proteínas y los polipéptidos y los nucleótidos que las codifican (referidos en la presente en su totalidad como “agentes NB”), y a los fragmentos de las mismas, y a las variantes farmacéuticamente efectivas de las mismas, y a su uso en el diagnóstico y el tratamiento de las enfermedades y los trastornos asociados con el DR5.

* * * * *

eolf-seql

SEQUENCE LISTING

<110> Novartis AG
CROMIE, Karen
DOMBRECHT, Bruno
ETTENBERG, Seth
KOLKMAN, Joost
LI, Jing
MEERSCHAERT, Kris
STOVER, David
ZHANG, Jingxin

<120> Biologic Compounds

<130> PAT054056A

<160> 103

<170> PatentIn version 3.3

<210> 1
<211> 126
<212> PRT
<213> artificial

<220>
<223> Recombinant construct

<400> 1

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Ser Val Gln Ala Gly Asp
1 5 10 15

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

Arg Val Gly Trp Phe Arg Gln Thr Pro Gly Lys Glu Arg Glu Phe Val
35 40 45

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

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

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

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

Ala Val Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser
115 120 125

<210> 2

<211> 124
<212> PRT
<213> artificial

<220>
<223> Recombinant construct

<400> 2

```
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Ala Gly Gly
1               5                   10                  15

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

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

Ala Ala Leu Asn Trp Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Val Asp Ser Val
    50                  55                  60

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

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

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

Tyr Trp Gly Lys Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
        115                 120
```

<210> 3
<211> 126
<212> PRT
<213> artificial

<220>
<223> Recombinant construct

<400> 3

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

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

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

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

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

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

Ala Lys Ala Glu Gly Pro Pro Thr Phe Ser Leu Ile Arg Thr Met Thr
100 105 110

Val Asp Pro Gly Ala Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser
115 120 125

<210> 4
<211> 122
<212> PRT
<213> artificial

<220>
<223> Recombinant construct

<400> 4

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Ser Ile Asp Ser Ile Asn
20 25 30

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

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

Ser Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Arg Thr Val Asn Leu
65 70 75 80

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

Ala Glu Val Arg Glu Arg Gly Thr Ser Trp Tyr Arg Pro Asp Tyr Trp
100 105 110

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

<210> 5

<211> 122
<212> PRT
<213> artificial

<220>
<223> Recombinant construct

<400> 5

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


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


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


Ala Gln Ile Thr Pro Gly Gly Ile Thr Asp Tyr Ala Asp Ser Val Lys
    50                  55                  60


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


Gln Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Phe Cys Asn
                85                  90                  95


Ala Glu Ile Leu Lys Arg Ala Tyr Ile Asp Val Tyr Val Asn Tyr Trp
            100                 105                 110


Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser
        115                 120
```

<210> 6
<211> 448
<212> PRT
<213> artificial

<220>
<223> Recombinant construct

<400> 6

```
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Ser Val Gln Ala Gly Asp
1               5                   10                  15


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


Arg Val Gly Trp Phe Arg Gln Thr Pro Gly Lys Glu Arg Glu Phe Val
        35                  40                  45
```

```
Ala Ala Ile Asn Arg Asn Asp Gly Thr Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
    50                  55                  60

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

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

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

Ala Val Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser Gly Gly
        115                 120                 125

Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly
    130                 135                 140

Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly
145                 150                 155                 160

Ser Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Ser Val Gln Ala Gly
                165                 170                 175

Asp Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Arg Thr Phe Gly Ser
            180                 185                 190

Ile Arg Val Gly Trp Phe Arg Gln Thr Pro Gly Lys Glu Arg Glu Phe
        195                 200                 205

Val Ala Ala Ile Asn Arg Asn Asp Gly Thr Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser
    210                 215                 220

Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Val
225                 230                 235                 240

Tyr Met Gln Met Ala Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr
                245                 250                 255

Cys Ala Ala Gly Leu Gln Tyr Asn Arg Ser Ala Asp Arg Val Pro Val
            260                 265                 270

Gly Ala Val Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser Gly
        275                 280                 285

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly
    290                 295                 300
```

```
Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly
305                 310                 315                 320

Gly Ser Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Ser Val Gln Ala
                325                 330                 335

Gly Asp Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Arg Thr Phe Gly
            340                 345                 350

Ser Ile Arg Val Gly Trp Phe Arg Gln Thr Pro Gly Lys Glu Arg Glu
        355                 360                 365

Phe Val Ala Ala Ile Asn Arg Asn Asp Gly Thr Thr Tyr Tyr Ala Asp
    370                 375                 380

Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr
385                 390                 395                 400

Val Tyr Met Gln Met Ala Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr
                405                 410                 415

Tyr Cys Ala Ala Gly Leu Gln Tyr Asn Arg Ser Ala Asp Arg Val Pro
            420                 425                 430

Val Gly Ala Val Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser
        435                 440                 445
```

<210> 7
<211> 609
<212> PRT
<213> artificial

<220>
<223> Recombinant construct

<400> 7

```
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Ser Val Gln Ala Gly Asp
1               5                   10                  15

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

Arg Val Gly Trp Phe Arg Gln Thr Pro Gly Lys Glu Arg Glu Phe Val
        35                  40                  45

Ala Ala Ile Asn Arg Asn Asp Gly Thr Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
    50                  55                  60
```

```
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Val Tyr
65                  70                  75                  80

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

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

Ala Val Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser Gly Gly
        115                 120                 125

Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly
    130                 135                 140

Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly
145                 150                 155                 160

Ser Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Ser Val Gln Ala Gly
                165                 170                 175

Asp Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Arg Thr Phe Gly Ser
            180                 185                 190

Ile Arg Val Gly Trp Phe Arg Gln Thr Pro Gly Lys Glu Arg Glu Phe
        195                 200                 205

Val Ala Ala Ile Asn Arg Asn Asp Gly Thr Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser
    210                 215                 220

Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Val
225                 230                 235                 240

Tyr Met Gln Met Ala Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr
                245                 250                 255

Cys Ala Ala Gly Leu Gln Tyr Asn Arg Ser Ala Asp Arg Val Pro Val
            260                 265                 270

Gly Ala Val Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser Gly
        275                 280                 285

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly
    290                 295                 300

Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly
305                 310                 315                 320
```

```
Gly Ser Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Ser Val Gln Ala
                325                 330                 335

Gly Asp Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Arg Thr Phe Gly
            340                 345                 350

Ser Ile Arg Val Gly Trp Phe Arg Gln Thr Pro Gly Lys Glu Arg Glu
        355                 360                 365

Phe Val Ala Ala Ile Asn Arg Asn Asp Gly Thr Thr Tyr Tyr Ala Asp
    370                 375                 380

Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr
385                 390                 395                 400

Val Tyr Met Gln Met Ala Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr
                405                 410                 415

Tyr Cys Ala Ala Gly Leu Gln Tyr Asn Arg Ser Ala Asp Arg Val Pro
            420                 425                 430

Val Gly Ala Val Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser
        435                 440                 445

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
    450                 455                 460

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly
465                 470                 475                 480

Gly Gly Ser Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Ser Val Gln
                485                 490                 495

Ala Gly Asp Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Arg Thr Phe
            500                 505                 510

Gly Ser Ile Arg Val Gly Trp Phe Arg Gln Thr Pro Gly Lys Glu Arg
        515                 520                 525

Glu Phe Val Ala Ala Ile Asn Arg Asn Asp Gly Thr Thr Tyr Tyr Ala
    530                 535                 540

Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn
545                 550                 555                 560

Thr Val Tyr Met Gln Met Ala Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Val
                565                 570                 575
```

Tyr Tyr Cys Ala Ala Gly Leu Gln Tyr Asn Arg Ser Ala Asp Arg Val
580 585 590

Pro Val Gly Ala Val Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser
595 600 605

Ser

<210> 8
<211> 770
<212> PRT
<213> artificial

<220>
<223> Recombinant construct

<400> 8

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Ser Val Gln Ala Gly Asp
1 5 10 15

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

Arg Val Gly Trp Phe Arg Gln Thr Pro Gly Lys Glu Arg Glu Phe Val
35 40 45

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

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

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

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

Ala Val Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser Gly Gly
115 120 125

Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly
130 135 140

Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly
145 150 155 160

```
Ser Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Ser Val Gln Ala Gly
                165                 170                 175

Asp Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Arg Thr Phe Gly Ser
            180                 185                 190

Ile Arg Val Gly Trp Phe Arg Gln Thr Pro Gly Lys Glu Arg Glu Phe
        195                 200                 205

Val Ala Ala Ile Asn Arg Asn Asp Gly Thr Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser
    210                 215                 220

Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Val
225                 230                 235                 240

Tyr Met Gln Met Ala Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr
                245                 250                 255

Cys Ala Ala Gly Leu Gln Tyr Asn Arg Ser Ala Asp Arg Val Pro Val
            260                 265                 270

Gly Ala Val Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser Gly
        275                 280                 285

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly
    290                 295                 300

Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly
305                 310                 315                 320

Gly Ser Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Ser Val Gln Ala
                325                 330                 335

Gly Asp Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Arg Thr Phe Gly
            340                 345                 350

Ser Ile Arg Val Gly Trp Phe Arg Gln Thr Pro Gly Lys Glu Arg Glu
        355                 360                 365

Phe Val Ala Ala Ile Asn Arg Asn Asp Gly Thr Thr Tyr Tyr Ala Asp
    370                 375                 380

Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr
385                 390                 395                 400

Val Tyr Met Gln Met Ala Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr
                405                 410                 415
```

```
Tyr Cys Ala Ala Gly Leu Gln Tyr Asn Arg Ser Ala Asp Arg Val Pro
            420                 425                 430

Val Gly Ala Val Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser
        435                 440                 445

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
    450                 455                 460

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly
465                 470                 475                 480

Gly Gly Ser Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Ser Val Gln
                485                 490                 495

Ala Gly Asp Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Arg Thr Phe
            500                 505                 510

Gly Ser Ile Arg Val Gly Trp Phe Arg Gln Thr Pro Gly Lys Glu Arg
        515                 520                 525

Glu Phe Val Ala Ala Ile Asn Arg Asn Asp Gly Thr Thr Tyr Tyr Ala
    530                 535                 540

Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn
545                 550                 555                 560

Thr Val Tyr Met Gln Met Ala Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Val
                565                 570                 575

Tyr Tyr Cys Ala Ala Gly Leu Gln Tyr Asn Arg Ser Ala Asp Arg Val
            580                 585                 590

Pro Val Gly Ala Val Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser
        595                 600                 605

Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
    610                 615                 620

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
625                 630                 635                 640

Gly Gly Gly Ser Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Ser Val
                645                 650                 655

Gln Ala Gly Asp Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Arg Thr
```

eolf-seql

660 665 670

Phe Gly Ser Ile Arg Val Gly Trp Phe Arg Gln Thr Pro Gly Lys Glu
675 680 685

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

Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys
705 710 715 720

Asn Thr Val Tyr Met Gln Met Ala Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala
725 730 735

Val Tyr Tyr Cys Ala Ala Gly Leu Gln Tyr Asn Arg Ser Ala Asp Arg
740 745 750

Val Pro Val Gly Ala Val Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val
755 760 765

Ser Ser
770

<210> 9
<211> 442
<212> PRT
<213> artificial

<220>
<223> Recombinant construct

<400> 9

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

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

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

Ala Ala Leu Asn Trp Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Val Asp Ser Val
50 55 60

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

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

```
Ala Ala Ala Gly Ser Phe Ser Leu Gly Gly Arg Pro Tyr Gly Asp Asp
            100                 105                 110

Tyr Trp Gly Lys Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly
        115                 120                 125

Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
    130                 135                 140

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Glu
145                 150                 155                 160

Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Ala Gly Gly Ser
                165                 170                 175

Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Arg Thr Phe Ser Asn Tyr Ala
            180                 185                 190

Met Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg Glu Phe Val Ala
        195                 200                 205

Ala Leu Asn Trp Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Val Asp Ser Val Lys
    210                 215                 220

Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Val Tyr Leu
225                 230                 235                 240

Gln Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
                245                 250                 255

Ala Ala Gly Ser Phe Ser Leu Gly Gly Arg Pro Tyr Gly Asp Asp Tyr
            260                 265                 270

Trp Gly Lys Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser
        275                 280                 285

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
    290                 295                 300

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Glu Val
305                 310                 315                 320

Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Ala Gly Gly Ser Leu
                325                 330                 335

Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Arg Thr Phe Ser Asn Tyr Ala Met
```

eolf-seql

340 345 350

Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg Glu Phe Val Ala Ala
355 360 365

Leu Asn Trp Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Val Asp Ser Val Lys Gly
370 375 380

Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Val Tyr Leu Gln
385 390 395 400

Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Ala
405 410 415

Ala Gly Ser Phe Ser Leu Gly Gly Arg Pro Tyr Gly Asp Asp Tyr Trp
420 425 430

Gly Lys Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
435 440

<210> 10
<211> 601
<212> PRT
<213> artificial

<220>
<223> Recombinant construct

<400> 10

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

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

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

Ala Ala Leu Asn Trp Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Val Asp Ser Val
50 55 60

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

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

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

```
Tyr Trp Gly Lys Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly
        115                 120                 125

Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
    130                 135                 140

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Glu
145                 150                 155                 160

Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Ala Gly Gly Ser
                165                 170                 175

Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Arg Thr Phe Ser Asn Tyr Ala
            180                 185                 190

Met Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg Glu Phe Val Ala
        195                 200                 205

Ala Leu Asn Trp Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Val Asp Ser Val Lys
    210                 215                 220

Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Val Tyr Leu
225                 230                 235                 240

Gln Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
                245                 250                 255

Ala Ala Gly Ser Phe Ser Leu Gly Gly Arg Pro Tyr Gly Asp Asp Tyr
            260                 265                 270

Trp Gly Lys Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser
        275                 280                 285

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
    290                 295                 300

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Glu Val
305                 310                 315                 320

Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Ala Gly Gly Ser Leu
                325                 330                 335

Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Arg Thr Phe Ser Asn Tyr Ala Met
            340                 345                 350

Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg Glu Phe Val Ala Ala
```

```
        355                 360                 365

Leu Asn Trp Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Val Asp Ser Val Lys Gly
    370                 375                 380

Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Val Tyr Leu Gln
385                 390                 395                 400

Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Ala
                405                 410                 415

Ala Gly Ser Phe Ser Leu Gly Gly Arg Pro Tyr Gly Asp Asp Tyr Trp
            420                 425                 430

Gly Lys Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
        435                 440                 445

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly
    450                 455                 460

Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Glu Val Gln
465                 470                 475                 480

Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Ala Gly Gly Ser Leu Arg
                485                 490                 495

Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Arg Thr Phe Ser Asn Tyr Ala Met Gly
            500                 505                 510

Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg Glu Phe Val Ala Ala Leu
        515                 520                 525

Asn Trp Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Val Asp Ser Val Lys Gly Arg
    530                 535                 540

Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Val Tyr Leu Gln Met
545                 550                 555                 560

Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Ala Ala
                565                 570                 575

Gly Ser Phe Ser Leu Gly Gly Arg Pro Tyr Gly Asp Asp Tyr Trp Gly
            580                 585                 590

Lys Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
        595                 600
```

<210> 11
<211> 760
<212> PRT
<213> artificial

<220>
<223> Recombinant construct

<400> 11

```
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Ala Gly Gly
1               5                   10                  15

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

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

Ala Ala Leu Asn Trp Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Val Asp Ser Val
    50                  55                  60

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

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

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

Tyr Trp Gly Lys Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly
        115                 120                 125

Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
    130                 135                 140

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Glu
145                 150                 155                 160

Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Ala Gly Gly Ser
                165                 170                 175

Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Arg Thr Phe Ser Asn Tyr Ala
            180                 185                 190

Met Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg Glu Phe Val Ala
        195                 200                 205

Ala Leu Asn Trp Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Val Asp Ser Val Lys
```

```
    210                 215                 220

Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Val Tyr Leu
225                 230                 235                 240

Gln Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
                245                 250                 255

Ala Ala Gly Ser Phe Ser Leu Gly Gly Arg Pro Tyr Gly Asp Asp Tyr
            260                 265                 270

Trp Gly Lys Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser
        275                 280                 285

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
    290                 295                 300

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Glu Val
305                 310                 315                 320

Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Ala Gly Gly Ser Leu
                325                 330                 335

Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Arg Thr Phe Ser Asn Tyr Ala Met
            340                 345                 350

Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg Glu Phe Val Ala Ala
        355                 360                 365

Leu Asn Trp Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Val Asp Ser Val Lys Gly
    370                 375                 380

Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Val Tyr Leu Gln
385                 390                 395                 400

Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Ala
                405                 410                 415

Ala Gly Ser Phe Ser Leu Gly Gly Arg Pro Tyr Gly Asp Asp Tyr Trp
            420                 425                 430

Gly Lys Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
        435                 440                 445

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly
    450                 455                 460
```

```
Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Glu Val Gln
465                 470                 475                 480

Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Ala Gly Gly Ser Leu Arg
                485                 490                 495

Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Arg Thr Phe Ser Asn Tyr Ala Met Gly
            500                 505                 510

Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg Glu Phe Val Ala Ala Leu
        515                 520                 525

Asn Trp Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Val Asp Ser Val Lys Gly Arg
    530                 535                 540

Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Val Tyr Leu Gln Met
545                 550                 555                 560

Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Ala Ala
                565                 570                 575

Gly Ser Phe Ser Leu Gly Gly Arg Pro Tyr Gly Asp Asp Tyr Trp Gly
            580                 585                 590

Lys Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly
        595                 600                 605

Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly
    610                 615                 620

Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Glu Val Gln Leu
625                 630                 635                 640

Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Ala Gly Gly Ser Leu Arg Leu
                645                 650                 655

Ser Cys Ala Ala Ser Gly Arg Thr Phe Ser Asn Tyr Ala Met Gly Trp
            660                 665                 670

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

Trp Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Val Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe
    690                 695                 700

Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Val Tyr Leu Gln Met Asn
705                 710                 715                 720
```

Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Ala Ala Gly
725 730 735

Ser Phe Ser Leu Gly Gly Arg Pro Tyr Gly Asp Asp Tyr Trp Gly Lys
740 745 750

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
755 760

<210> 12
<211> 396
<212> PRT
<213> artificial

<220>
<223> Recombinant construct

<400> 12

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

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

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

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

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

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

Ala Lys Ala Glu Gly Pro Pro Thr Phe Ser Leu Ile Arg Thr Met Thr
100 105 110

Val Asp Pro Gly Ala Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser Gly Gly
115 120 125

Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly
130 135 140

Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser
145 150 155 160

```
Gly Phe Thr Phe Ser Arg Tyr Trp Met Tyr Trp Val Arg Gln Ala Pro
               165                 170                 175

Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ser Ala Ile Asn Ser Gly Gly Gly Asp
            180                 185                 190

Thr Tyr Tyr Arg Asp Ser Val Arg Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp
        195                 200                 205

Asn Phe Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Ser Glu
    210                 215                 220

Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Lys Ala Glu Gly Pro Pro Thr Phe
225                 230                 235                 240

Ser Leu Ile Arg Thr Met Thr Val Asp Pro Gly Ala Gln Gly Thr Gln
                245                 250                 255

Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Glu Val
            260                 265                 270

Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu
        275                 280                 285

Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Arg Tyr Trp Met
    290                 295                 300

Tyr Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ser Ala
305                 310                 315                 320

Ile Asn Ser Gly Gly Gly Asp Thr Tyr Tyr Arg Asp Ser Val Arg Gly
                325                 330                 335

Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Phe Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln
            340                 345                 350

Met Asn Ser Leu Lys Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Lys
        355                 360                 365

Ala Glu Gly Pro Pro Thr Phe Ser Leu Ile Arg Thr Met Thr Val Asp
    370                 375                 380

Pro Gly Ala Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser
385                 390                 395
```

<210> 13
<211> 418
<212> PRT

<213> artificial

<220>
<223> Recombinant construct

<400> 13

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

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

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

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

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

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

Ala Lys Ala Glu Gly Pro Pro Thr Phe Ser Leu Ile Arg Thr Met Thr
            100                 105                 110

Val Asp Pro Gly Ala Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser Gly Gly
        115                 120                 125

Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly
    130                 135                 140

Gly Ser Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro
145                 150                 155                 160

Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser
                165                 170                 175

Arg Tyr Trp Met Tyr Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu
            180                 185                 190

Trp Val Ser Ala Ile Asn Ser Gly Gly Gly Asp Thr Tyr Tyr Arg Asp
        195                 200                 205

Ser Val Arg Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Phe Lys Asn Thr
    210                 215                 220
```

```
Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr
225                 230                 235                 240

Tyr Cys Ala Lys Ala Glu Gly Pro Pro Thr Phe Ser Leu Ile Arg Thr
                245                 250                 255

Met Thr Val Asp Pro Gly Ala Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser
            260                 265                 270

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
        275                 280                 285

Gly Gly Gly Ser Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val
    290                 295                 300

Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr
305                 310                 315                 320

Phe Ser Arg Tyr Trp Met Tyr Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly
                325                 330                 335

Leu Glu Trp Val Ser Ala Ile Asn Ser Gly Gly Gly Asp Thr Tyr Tyr
            340                 345                 350

Arg Asp Ser Val Arg Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Phe Lys
        355                 360                 365

Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Ser Glu Asp Thr Ala
    370                 375                 380

Val Tyr Tyr Cys Ala Lys Ala Glu Gly Pro Pro Thr Phe Ser Leu Ile
385                 390                 395                 400

Arg Thr Met Thr Val Asp Pro Gly Ala Gln Gly Thr Gln Val Thr Val
                405                 410                 415

Ser Ser
```

<210> 14
<211> 448
<212> PRT
<213> artificial

<220>
<223> Recombinant construct

<400> 14

```
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
```

```
1               5                   10                  15

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

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

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

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

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

Ala Lys Ala Glu Gly Pro Pro Thr Phe Ser Leu Ile Arg Thr Met Thr
            100                 105                 110

Val Asp Pro Gly Ala Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser Gly Gly
        115                 120                 125

Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly
    130                 135                 140

Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly
145                 150                 155                 160

Ser Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly
                165                 170                 175

Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Arg
            180                 185                 190

Tyr Trp Met Tyr Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp
        195                 200                 205

Val Ser Ala Ile Asn Ser Gly Gly Gly Asp Thr Tyr Tyr Arg Asp Ser
    210                 215                 220

Val Arg Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Phe Lys Asn Thr Leu
225                 230                 235                 240

Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr
                245                 250                 255
```

```
Cys Ala Lys Ala Glu Gly Pro Pro Thr Phe Ser Leu Ile Arg Thr Met
            260                 265                 270

Thr Val Asp Pro Gly Ala Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser Gly
        275                 280                 285

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly
    290                 295                 300

Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly
305                 310                 315                 320

Gly Ser Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro
                325                 330                 335

Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser
            340                 345                 350

Arg Tyr Trp Met Tyr Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu
        355                 360                 365

Trp Val Ser Ala Ile Asn Ser Gly Gly Gly Asp Thr Tyr Tyr Arg Asp
    370                 375                 380

Ser Val Arg Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Phe Lys Asn Thr
385                 390                 395                 400

Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr
                405                 410                 415

Tyr Cys Ala Lys Ala Glu Gly Pro Pro Thr Phe Ser Leu Ile Arg Thr
            420                 425                 430

Met Thr Val Asp Pro Gly Ala Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser
        435                 440                 445


<210>  15
<211>  609
<212>  PRT
<213>  artificial

<220>
<223>  Recombinant construct

<400>  15

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Arg Tyr
```

```
            20                  25                  30

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

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

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

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

Ala Lys Ala Glu Gly Pro Pro Thr Phe Ser Leu Ile Arg Thr Met Thr
            100                 105                 110

Val Asp Pro Gly Ala Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser Gly Gly
        115                 120                 125

Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly
    130                 135                 140

Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly
145                 150                 155                 160

Ser Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly
                165                 170                 175

Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Arg
            180                 185                 190

Tyr Trp Met Tyr Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp
        195                 200                 205

Val Ser Ala Ile Asn Ser Gly Gly Gly Asp Thr Tyr Tyr Arg Asp Ser
    210                 215                 220

Val Arg Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Phe Lys Asn Thr Leu
225                 230                 235                 240

Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr
                245                 250                 255

Cys Ala Lys Ala Glu Gly Pro Pro Thr Phe Ser Leu Ile Arg Thr Met
            260                 265                 270
```

```
Thr Val Asp Pro Gly Ala Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser Gly
        275                 280                 285

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly
    290                 295                 300

Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly
305                 310                 315                 320

Gly Ser Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro
                325                 330                 335

Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser
            340                 345                 350

Arg Tyr Trp Met Tyr Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu
        355                 360                 365

Trp Val Ser Ala Ile Asn Ser Gly Gly Gly Asp Thr Tyr Tyr Arg Asp
    370                 375                 380

Ser Val Arg Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Phe Lys Asn Thr
385                 390                 395                 400

Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr
                405                 410                 415

Tyr Cys Ala Lys Ala Glu Gly Pro Pro Thr Phe Ser Leu Ile Arg Thr
            420                 425                 430

Met Thr Val Asp Pro Gly Ala Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser
        435                 440                 445

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
    450                 455                 460

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly
465                 470                 475                 480

Gly Gly Ser Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln
                485                 490                 495

Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe
            500                 505                 510

Ser Arg Tyr Trp Met Tyr Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu
        515                 520                 525
```

Glu Trp Val Ser Ala Ile Asn Ser Gly Gly Gly Asp Thr Tyr Tyr Arg
530 535 540

Asp Ser Val Arg Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Phe Lys Asn
545 550 555 560

Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Ser Glu Asp Thr Ala Val
565 570 575

Tyr Tyr Cys Ala Lys Ala Glu Gly Pro Pro Thr Phe Ser Leu Ile Arg
580 585 590

Thr Met Thr Val Asp Pro Gly Ala Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser
595 600 605

Ser

<210> 16
<211> 770
<212> PRT
<213> artificial

<220>
<223> Recombinant construct

<400> 16

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

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

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

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

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

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

Ala Lys Ala Glu Gly Pro Pro Thr Phe Ser Leu Ile Arg Thr Met Thr
100 105 110

```
Val Asp Pro Gly Ala Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser Gly Gly
        115                 120                 125

Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly
    130                 135                 140

Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly
145                 150                 155                 160

Ser Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly
                165                 170                 175

Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Arg
            180                 185                 190

Tyr Trp Met Tyr Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp
        195                 200                 205

Val Ser Ala Ile Asn Ser Gly Gly Gly Asp Thr Tyr Tyr Arg Asp Ser
    210                 215                 220

Val Arg Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Phe Lys Asn Thr Leu
225                 230                 235                 240

Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr
                245                 250                 255

Cys Ala Lys Ala Glu Gly Pro Pro Thr Phe Ser Leu Ile Arg Thr Met
            260                 265                 270

Thr Val Asp Pro Gly Ala Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser Gly
        275                 280                 285

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly
    290                 295                 300

Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly
305                 310                 315                 320

Gly Ser Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro
                325                 330                 335

Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser
            340                 345                 350

Arg Tyr Trp Met Tyr Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu
        355                 360                 365
```

```
Trp Val Ser Ala Ile Asn Ser Gly Gly Gly Asp Thr Tyr Tyr Arg Asp
    370                 375                 380

Ser Val Arg Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Phe Lys Asn Thr
385                 390                 395                 400

Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr
                405                 410                 415

Tyr Cys Ala Lys Ala Glu Gly Pro Pro Thr Phe Ser Leu Ile Arg Thr
            420                 425                 430

Met Thr Val Asp Pro Gly Ala Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser
        435                 440                 445

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
    450                 455                 460

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly
465                 470                 475                 480

Gly Gly Ser Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln
                485                 490                 495

Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe
            500                 505                 510

Ser Arg Tyr Trp Met Tyr Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu
        515                 520                 525

Glu Trp Val Ser Ala Ile Asn Ser Gly Gly Gly Asp Thr Tyr Tyr Arg
    530                 535                 540

Asp Ser Val Arg Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Phe Lys Asn
545                 550                 555                 560

Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Ser Glu Asp Thr Ala Val
                565                 570                 575

Tyr Tyr Cys Ala Lys Ala Glu Gly Pro Pro Thr Phe Ser Leu Ile Arg
            580                 585                 590

Thr Met Thr Val Asp Pro Gly Ala Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser
        595                 600                 605

Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
    610                 615                 620
```

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
625 630 635 640

Gly Gly Gly Ser Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val
645 650 655

Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr
660 665 670

Phe Ser Arg Tyr Trp Met Tyr Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly
675 680 685

Leu Glu Trp Val Ser Ala Ile Asn Ser Gly Gly Gly Asp Thr Tyr Tyr
690 695 700

Arg Asp Ser Val Arg Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Phe Lys
705 710 715 720

Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Ser Glu Asp Thr Ala
725 730 735

Val Tyr Tyr Cys Ala Lys Ala Glu Gly Pro Pro Thr Phe Ser Leu Ile
740 745 750

Arg Thr Met Thr Val Asp Pro Gly Ala Gln Gly Thr Gln Val Thr Val
755 760 765

Ser Ser
770

<210> 17
<211> 436
<212> PRT
<213> artificial

<220>
<223> Recombinant construct

<400> 17

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Ser Ile Asp Ser Ile Asn
20 25 30

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

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

Ser Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Arg Thr Val Asn Leu
65                  70                  75                  80

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

Ala Glu Val Arg Glu Arg Gly Thr Ser Trp Tyr Arg Pro Asp Tyr Trp
            100                 105                 110

Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
        115                 120                 125

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly
    130                 135                 140

Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Glu Val Gln
145                 150                 155                 160

Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg
                165                 170                 175

Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Ser Ile Asp Ser Ile Asn Asn Met Gly
            180                 185                 190

Trp Tyr Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gln Arg Glu Leu Val Ala Glu Ile
        195                 200                 205

Thr Pro Arg Gly Arg Thr Asn Tyr Ala Asp Ser Glu Lys Ser Arg Phe
    210                 215                 220

Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Arg Thr Val Asn Leu Gln Met Asn
225                 230                 235                 240

Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Asn Ala Glu Val
                245                 250                 255

Arg Glu Arg Gly Thr Ser Trp Tyr Arg Pro Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
            260                 265                 270

Thr Gln Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly
        275                 280                 285

Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
    290                 295                 300
```

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Glu Val Gln Leu Val Glu
305 310 315 320

Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys
325 330 335

Ala Ala Ser Gly Ser Ile Asp Ser Ile Asn Asn Met Gly Trp Tyr Arg
340 345 350

Gln Ala Pro Gly Lys Gln Arg Glu Leu Val Ala Glu Ile Thr Pro Arg
355 360 365

Gly Arg Thr Asn Tyr Ala Asp Ser Glu Lys Ser Arg Phe Thr Ile Ser
370 375 380

Arg Asp Asn Ala Lys Arg Thr Val Asn Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys
385 390 395 400

Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Asn Ala Glu Val Arg Glu Arg
405 410 415

Gly Thr Ser Trp Tyr Arg Pro Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val
420 425 430

Thr Val Ser Ser
435

<210> 18
<211> 593
<212> PRT
<213> artificial

<220>
<223> Recombinant construct

<400> 18

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Ser Ile Asp Ser Ile Asn
20 25 30

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

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

```
Ser Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Arg Thr Val Asn Leu
65                  70                  75                  80

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

Ala Glu Val Arg Glu Arg Gly Thr Ser Trp Tyr Arg Pro Asp Tyr Trp
            100                 105                 110

Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
        115                 120                 125

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly
    130                 135                 140

Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Glu Val Gln
145                 150                 155                 160

Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg
                165                 170                 175

Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Ser Ile Asp Ser Ile Asn Asn Met Gly
            180                 185                 190

Trp Tyr Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gln Arg Glu Leu Val Ala Glu Ile
        195                 200                 205

Thr Pro Arg Gly Arg Thr Asn Tyr Ala Asp Ser Glu Lys Ser Arg Phe
    210                 215                 220

Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Arg Thr Val Asn Leu Gln Met Asn
225                 230                 235                 240

Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Asn Ala Glu Val
                245                 250                 255

Arg Glu Arg Gly Thr Ser Trp Tyr Arg Pro Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
            260                 265                 270

Thr Gln Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly
        275                 280                 285

Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
    290                 295                 300

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Glu Val Gln Leu Val Glu
305                 310                 315                 320
```

```
Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys
                325                 330                 335

Ala Ala Ser Gly Ser Ile Asp Ser Ile Asn Asn Met Gly Trp Tyr Arg
            340                 345                 350

Gln Ala Pro Gly Lys Gln Arg Glu Leu Val Ala Glu Ile Thr Pro Arg
        355                 360                 365

Gly Arg Thr Asn Tyr Ala Asp Ser Glu Lys Ser Arg Phe Thr Ile Ser
    370                 375                 380

Arg Asp Asn Ala Lys Arg Thr Val Asn Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys
385                 390                 395                 400

Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Asn Ala Glu Val Arg Glu Arg
                405                 410                 415

Gly Thr Ser Trp Tyr Arg Pro Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val
            420                 425                 430

Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly
        435                 440                 445

Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly
    450                 455                 460

Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly
465                 470                 475                 480

Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser
                485                 490                 495

Gly Ser Ile Asp Ser Ile Asn Asn Met Gly Trp Tyr Arg Gln Ala Pro
            500                 505                 510

Gly Lys Gln Arg Glu Leu Val Ala Glu Ile Thr Pro Arg Gly Arg Thr
        515                 520                 525

Asn Tyr Ala Asp Ser Glu Lys Ser Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn
    530                 535                 540

Ala Lys Arg Thr Val Asn Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp
545                 550                 555                 560

Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Asn Ala Glu Val Arg Glu Arg Gly Thr Ser
```

565 570 575

Trp Tyr Arg Pro Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser
580 585 590

Ser

<210> 19
<211> 750
<212> PRT
<213> artificial

<220>
<223> Recombinant construct

<400> 19

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Ser Ile Asp Ser Ile Asn
20 25 30

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

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

Ser Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Arg Thr Val Asn Leu
65 70 75 80

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

Ala Glu Val Arg Glu Arg Gly Thr Ser Trp Tyr Arg Pro Asp Tyr Trp
100 105 110

Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
115 120 125

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly
130 135 140

Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Glu Val Gln
145 150 155 160

Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg
165 170 175

```
Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Ser Ile Asp Ser Ile Asn Asn Met Gly
            180                 185                 190

Trp Tyr Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gln Arg Glu Leu Val Ala Glu Ile
        195                 200                 205

Thr Pro Arg Gly Arg Thr Asn Tyr Ala Asp Ser Glu Lys Ser Arg Phe
    210                 215                 220

Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Arg Thr Val Asn Leu Gln Met Asn
225                 230                 235                 240

Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Asn Ala Glu Val
                245                 250                 255

Arg Glu Arg Gly Thr Ser Trp Tyr Arg Pro Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
            260                 265                 270

Thr Gln Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly
        275                 280                 285

Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
    290                 295                 300

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Glu Val Gln Leu Val Glu
305                 310                 315                 320

Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys
                325                 330                 335

Ala Ala Ser Gly Ser Ile Asp Ser Ile Asn Asn Met Gly Trp Tyr Arg
            340                 345                 350

Gln Ala Pro Gly Lys Gln Arg Glu Leu Val Ala Glu Ile Thr Pro Arg
        355                 360                 365

Gly Arg Thr Asn Tyr Ala Asp Ser Glu Lys Ser Arg Phe Thr Ile Ser
    370                 375                 380

Arg Asp Asn Ala Lys Arg Thr Val Asn Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys
385                 390                 395                 400

Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Asn Ala Glu Val Arg Glu Arg
                405                 410                 415

Gly Thr Ser Trp Tyr Arg Pro Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val
```

```
            420                 425                 430

Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly
        435                 440                 445

Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly
    450                 455                 460

Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly
465                 470                 475                 480

Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser
                485                 490                 495

Gly Ser Ile Asp Ser Ile Asn Asn Met Gly Trp Tyr Arg Gln Ala Pro
            500                 505                 510

Gly Lys Gln Arg Glu Leu Val Ala Glu Ile Thr Pro Arg Gly Arg Thr
        515                 520                 525

Asn Tyr Ala Asp Ser Glu Lys Ser Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn
    530                 535                 540

Ala Lys Arg Thr Val Asn Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp
545                 550                 555                 560

Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Asn Ala Glu Val Arg Glu Arg Gly Thr Ser
                565                 570                 575

Trp Tyr Arg Pro Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser
            580                 585                 590

Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
        595                 600                 605

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
    610                 615                 620

Gly Gly Gly Ser Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val
625                 630                 635                 640

Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Ser Ile
                645                 650                 655

Asp Ser Ile Asn Asn Met Gly Trp Tyr Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gln
            660                 665                 670
```

```
Arg Glu Leu Val Ala Glu Ile Thr Pro Arg Gly Arg Thr Asn Tyr Ala
        675                 680                 685

Asp Ser Glu Lys Ser Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Arg
    690                 695                 700

Thr Val Asn Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Val
705                 710                 715                 720

Tyr Tyr Cys Asn Ala Glu Val Arg Glu Arg Gly Thr Ser Trp Tyr Arg
                725                 730                 735

Pro Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser
            740                 745                 750
```

<210> 20
<211> 436
<212> PRT
<213> artificial

<220>
<223> Recombinant construct

<400> 20

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

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

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

Ala Gln Ile Thr Pro Gly Gly Ile Thr Asp Tyr Ala Asp Ser Val Lys
    50                  55                  60

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

Gln Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Phe Cys Asn
                85                  90                  95

Ala Glu Ile Leu Lys Arg Ala Tyr Ile Asp Val Tyr Val Asn Tyr Trp
            100                 105                 110

Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
        115                 120                 125

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly
```

```
    130                 135                 140

Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Glu Val Gln
145                 150                 155                 160

Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg
                165                 170                 175

Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Thr Phe Asp Lys Ile Asn Asn Met Gly
            180                 185                 190

Trp Tyr Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gln Arg Asp Leu Val Ala Gln Ile
        195                 200                 205

Thr Pro Gly Gly Ile Thr Asp Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe
    210                 215                 220

Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asp Thr Met Tyr Leu Gln Met Asn
225                 230                 235                 240

Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Phe Cys Asn Ala Glu Ile
                245                 250                 255

Leu Lys Arg Ala Tyr Ile Asp Val Tyr Val Asn Tyr Trp Gly Gln Gly
            260                 265                 270

Thr Gln Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly
        275                 280                 285

Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
    290                 295                 300

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Glu Val Gln Leu Val Glu
305                 310                 315                 320

Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys
                325                 330                 335

Ala Ala Ser Gly Thr Phe Asp Lys Ile Asn Asn Met Gly Trp Tyr Arg
            340                 345                 350

Gln Ala Pro Gly Lys Gln Arg Asp Leu Val Ala Gln Ile Thr Pro Gly
        355                 360                 365

Gly Ile Thr Asp Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser
    370                 375                 380
```

Arg Asp Asn Ala Lys Asp Thr Met Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys
385 390 395 400

Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Phe Cys Asn Ala Glu Ile Leu Lys Arg
405 410 415

Ala Tyr Ile Asp Val Tyr Val Asn Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val
420 425 430

Thr Val Ser Ser
435

<210> 21
<211> 593
<212> PRT
<213> artificial

<220>
<223> Recombinant construct

<400> 21

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

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

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

Ala Gln Ile Thr Pro Gly Gly Ile Thr Asp Tyr Ala Asp Ser Val Lys
50 55 60

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

Gln Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Phe Cys Asn
85 90 95

Ala Glu Ile Leu Lys Arg Ala Tyr Ile Asp Val Tyr Val Asn Tyr Trp
100 105 110

Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
115 120 125

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly
130 135 140

Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Glu Val Gln

```
145                 150                 155                 160

Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg
                165                 170                 175

Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Thr Phe Asp Lys Ile Asn Asn Met Gly
            180                 185                 190

Trp Tyr Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gln Arg Asp Leu Val Ala Gln Ile
        195                 200                 205

Thr Pro Gly Gly Ile Thr Asp Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe
    210                 215                 220

Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asp Thr Met Tyr Leu Gln Met Asn
225                 230                 235                 240

Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Phe Cys Asn Ala Glu Ile
                245                 250                 255

Leu Lys Arg Ala Tyr Ile Asp Val Tyr Val Asn Tyr Trp Gly Gln Gly
            260                 265                 270

Thr Gln Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly
        275                 280                 285

Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
    290                 295                 300

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Glu Val Gln Leu Val Glu
305                 310                 315                 320

Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys
                325                 330                 335

Ala Ala Ser Gly Thr Phe Asp Lys Ile Asn Asn Met Gly Trp Tyr Arg
            340                 345                 350

Gln Ala Pro Gly Lys Gln Arg Asp Leu Val Ala Gln Ile Thr Pro Gly
        355                 360                 365

Gly Ile Thr Asp Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser
    370                 375                 380

Arg Asp Asn Ala Lys Asp Thr Met Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys
385                 390                 395                 400
```

```
Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Phe Cys Asn Ala Glu Ile Leu Lys Arg
                405                 410                 415

Ala Tyr Ile Asp Val Tyr Val Asn Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val
            420                 425                 430

Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly
        435                 440                 445

Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly
    450                 455                 460

Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly
465                 470                 475                 480

Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser
                485                 490                 495

Gly Thr Phe Asp Lys Ile Asn Asn Met Gly Trp Tyr Arg Gln Ala Pro
            500                 505                 510

Gly Lys Gln Arg Asp Leu Val Ala Gln Ile Thr Pro Gly Gly Ile Thr
        515                 520                 525

Asp Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn
    530                 535                 540

Ala Lys Asp Thr Met Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp
545                 550                 555                 560

Thr Ala Val Tyr Phe Cys Asn Ala Glu Ile Leu Lys Arg Ala Tyr Ile
                565                 570                 575

Asp Val Tyr Val Asn Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser
            580                 585                 590

Ser
```

<210> 22
<211> 750
<212> PRT
<213> artificial

<220>
<223> Recombinant construct

<400> 22

```
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
```

```
1               5                   10                  15

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

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

Ala Gln Ile Thr Pro Gly Gly Ile Thr Asp Tyr Ala Asp Ser Val Lys
    50                  55                  60

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

Gln Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Phe Cys Asn
                85                  90                  95

Ala Glu Ile Leu Lys Arg Ala Tyr Ile Asp Val Tyr Val Asn Tyr Trp
            100                 105                 110

Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
        115                 120                 125

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly
    130                 135                 140

Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Glu Val Gln
145                 150                 155                 160

Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg
                165                 170                 175

Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Thr Phe Asp Lys Ile Asn Asn Met Gly
            180                 185                 190

Trp Tyr Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gln Arg Asp Leu Val Ala Gln Ile
        195                 200                 205

Thr Pro Gly Gly Ile Thr Asp Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe
    210                 215                 220

Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asp Thr Met Tyr Leu Gln Met Asn
225                 230                 235                 240

Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Phe Cys Asn Ala Glu Ile
                245                 250                 255
```

```
Leu Lys Arg Ala Tyr Ile Asp Val Tyr Val Asn Tyr Trp Gly Gln Gly
            260                 265                 270

Thr Gln Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly
        275                 280                 285

Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
    290                 295                 300

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Glu Val Gln Leu Val Glu
305                 310                 315                 320

Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys
                325                 330                 335

Ala Ala Ser Gly Thr Phe Asp Lys Ile Asn Asn Met Gly Trp Tyr Arg
            340                 345                 350

Gln Ala Pro Gly Lys Gln Arg Asp Leu Val Ala Gln Ile Thr Pro Gly
        355                 360                 365

Gly Ile Thr Asp Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser
    370                 375                 380

Arg Asp Asn Ala Lys Asp Thr Met Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys
385                 390                 395                 400

Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Phe Cys Asn Ala Glu Ile Leu Lys Arg
                405                 410                 415

Ala Tyr Ile Asp Val Tyr Val Asn Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val
            420                 425                 430

Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly
        435                 440                 445

Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly
    450                 455                 460

Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly
465                 470                 475                 480

Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser
                485                 490                 495

Gly Thr Phe Asp Lys Ile Asn Asn Met Gly Trp Tyr Arg Gln Ala Pro
            500                 505                 510
```

Gly Lys Gln Arg Asp Leu Val Ala Gln Ile Thr Pro Gly Gly Ile Thr
515 520 525

Asp Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn
530 535 540

Ala Lys Asp Thr Met Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp
545 550 555 560

Thr Ala Val Tyr Phe Cys Asn Ala Glu Ile Leu Lys Arg Ala Tyr Ile
565 570 575

Asp Val Tyr Val Asn Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser
580 585 590

Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
595 600 605

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
610 615 620

Gly Gly Gly Ser Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val
625 630 635 640

Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Thr Phe
645 650 655

Asp Lys Ile Asn Asn Met Gly Trp Tyr Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gln
660 665 670

Arg Asp Leu Val Ala Gln Ile Thr Pro Gly Gly Ile Thr Asp Tyr Ala
675 680 685

Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asp
690 695 700

Thr Met Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Val
705 710 715 720

Tyr Phe Cys Asn Ala Glu Ile Leu Lys Arg Ala Tyr Ile Asp Val Tyr
725 730 735

Val Asn Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser
740 745 750

<210> 23
<211> 35

<212> PRT
<213> artificial

<220>
<223> Recombinant construct

<400> 23

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
1 5 10 15

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly
20 25 30

Gly Gly Ser
35

<210> 24
<211> 20
<212> PRT
<213> artificial

<220>
<223> Recombinant construct

<400> 24

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
1 5 10 15

Gly Gly Gly Ser
20

<210> 25
<211> 9
<212> PRT
<213> artificial

<220>
<223> Recombinant construct

<400> 25

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser
1 5

<210> 26
<211> 126
<212> PRT
<213> artificial

<220>
<223> Recombinant construct

<400> 26

Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly

eolf-seql

1 5 10 15

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

Arg Val Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Arg Glu Phe Val
35 40 45

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

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

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

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

Ala Val Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120 125

<210> 27
<211> 448
<212> PRT
<213> artificial

<220>
<223> Recombinant construct

<400> 27

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

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

Arg Val Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Arg Glu Phe Val
35 40 45

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

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

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

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

Ala Val Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly
        115                 120                 125

Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly
    130                 135                 140

Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly
145                 150                 155                 160

Ser Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly
                165                 170                 175

Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Arg Thr Phe Gly Ser
            180                 185                 190

Ile Arg Val Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Arg Glu Phe
        195                 200                 205

Val Ser Ala Ile Asn Arg Asn Asp Gly Thr Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser
    210                 215                 220

Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Val
225                 230                 235                 240

Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr
                245                 250                 255

Cys Ala Ala Gly Leu Gln Tyr Asn Arg Ala Ala Asp Arg Val Pro Val
            260                 265                 270

Gly Ala Val Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly
        275                 280                 285

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly
    290                 295                 300

Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly
305                 310                 315                 320

Gly Ser Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro
                325                 330                 335

Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Arg Thr Phe Gly
```

340 345 350

Ser Ile Arg Val Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Arg Glu
355 360 365

Phe Val Ser Ala Ile Asn Arg Asn Asp Gly Thr Thr Tyr Tyr Ala Asp
370 375 380

Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr
385 390 395 400

Val Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr
405 410 415

Tyr Cys Ala Ala Gly Leu Gln Tyr Asn Arg Ala Ala Asp Arg Val Pro
420 425 430

Val Gly Ala Val Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
435 440 445

<210> 28
<211> 609
<212> PRT
<213> artificial

<220>
<223> Recombinant construct

<400> 28

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

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

Arg Val Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Arg Glu Phe Val
35 40 45

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

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

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

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

```
Ala Val Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly
        115                 120                 125

Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly
    130                 135                 140

Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly
145                 150                 155                 160

Ser Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly
                165                 170                 175

Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Arg Thr Phe Gly Ser
            180                 185                 190

Ile Arg Val Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Arg Glu Phe
        195                 200                 205

Val Ser Ala Ile Asn Arg Asn Asp Gly Thr Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser
    210                 215                 220

Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Val
225                 230                 235                 240

Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr
                245                 250                 255

Cys Ala Ala Gly Leu Gln Tyr Asn Arg Ala Ala Asp Arg Val Pro Val
            260                 265                 270

Gly Ala Val Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly
        275                 280                 285

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly
    290                 295                 300

Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly
305                 310                 315                 320

Gly Ser Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro
                325                 330                 335

Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Arg Thr Phe Gly
            340                 345                 350

Ser Ile Arg Val Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Arg Glu
```

```
        355                 360                 365

Phe Val Ser Ala Ile Asn Arg Asn Asp Gly Thr Thr Tyr Tyr Ala Asp
    370                 375                 380

Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr
385                 390                 395                 400

Val Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr
                405                 410                 415

Tyr Cys Ala Ala Gly Leu Gln Tyr Asn Arg Ala Ala Asp Arg Val Pro
            420                 425                 430

Val Gly Ala Val Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
        435                 440                 445

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
    450                 455                 460

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly
465                 470                 475                 480

Gly Gly Ser Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln
                485                 490                 495

Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Arg Thr Phe
            500                 505                 510

Gly Ser Ile Arg Val Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Arg
        515                 520                 525

Glu Phe Val Ser Ala Ile Asn Arg Asn Asp Gly Thr Thr Tyr Tyr Ala
    530                 535                 540

Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn
545                 550                 555                 560

Thr Val Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Pro Glu Asp Thr Ala Val
                565                 570                 575

Tyr Tyr Cys Ala Ala Gly Leu Gln Tyr Asn Arg Ala Ala Asp Arg Val
            580                 585                 590

Pro Val Gly Ala Val Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser
        595                 600                 605
```

Ser

<210> 29
<211> 770
<212> PRT
<213> artificial

<220>
<223> Recombinant construct

<400> 29

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

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

Arg Val Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Arg Glu Phe Val
35 40 45

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

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

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

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

Ala Val Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly
115 120 125

Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly
130 135 140

Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly
145 150 155 160

Ser Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly
165 170 175

Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Arg Thr Phe Gly Ser
180 185 190

Ile Arg Val Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Arg Glu Phe

```
        195                 200                 205

Val Ser Ala Ile Asn Arg Asn Asp Gly Thr Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser
    210                 215                 220

Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Val
225                 230                 235                 240

Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr
                245                 250                 255

Cys Ala Ala Gly Leu Gln Tyr Asn Arg Ala Ala Asp Arg Val Pro Val
            260                 265                 270

Gly Ala Val Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly
        275                 280                 285

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly
    290                 295                 300

Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly
305                 310                 315                 320

Gly Ser Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro
                325                 330                 335

Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Arg Thr Phe Gly
            340                 345                 350

Ser Ile Arg Val Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Arg Glu
        355                 360                 365

Phe Val Ser Ala Ile Asn Arg Asn Asp Gly Thr Thr Tyr Tyr Ala Asp
    370                 375                 380

Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr
385                 390                 395                 400

Val Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr
                405                 410                 415

Tyr Cys Ala Ala Gly Leu Gln Tyr Asn Arg Ala Ala Asp Arg Val Pro
            420                 425                 430

Val Gly Ala Val Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
        435                 440                 445
```

```
Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
    450                 455                 460

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly
465                 470                 475                 480

Gly Gly Ser Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln
                485                 490                 495

Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Arg Thr Phe
            500                 505                 510

Gly Ser Ile Arg Val Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Arg
        515                 520                 525

Glu Phe Val Ser Ala Ile Asn Arg Asn Asp Gly Thr Thr Tyr Tyr Ala
    530                 535                 540

Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn
545                 550                 555                 560

Thr Val Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Pro Glu Asp Thr Ala Val
                565                 570                 575

Tyr Tyr Cys Ala Ala Gly Leu Gln Tyr Asn Arg Ala Ala Asp Arg Val
            580                 585                 590

Pro Val Gly Ala Val Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser
        595                 600                 605

Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
    610                 615                 620

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
625                 630                 635                 640

Gly Gly Gly Ser Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val
                645                 650                 655

Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Arg Thr
            660                 665                 670

Phe Gly Ser Ile Arg Val Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly
        675                 680                 685

Arg Glu Phe Val Ser Ala Ile Asn Arg Asn Asp Gly Thr Thr Tyr Tyr
    690                 695                 700
```

```
Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys
705                 710                 715                 720


Asn Thr Val Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Pro Glu Asp Thr Ala
                725                 730                 735


Val Tyr Tyr Cys Ala Ala Gly Leu Gln Tyr Asn Arg Ala Ala Asp Arg
            740                 745                 750


Val Pro Val Gly Ala Val Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val
        755                 760                 765


Ser Ser
    770


<210>  30
<211>  122
<212>  PRT
<213>  artificial

<220>
<223>  Recombinant construct

<400>  30

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


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


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


Ala Gln Ile Thr Pro Gly Gly Ile Thr Asp Tyr Ala Asp Ser Val Lys
    50                  55                  60


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


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


Ala Glu Ile Leu Lys Arg Ala Tyr Ile Asp Val Tyr Val Asn Tyr Trp
            100                 105                 110


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

<210> 31
<211> 436
<212> PRT
<213> artificial

<220>
<223> Recombinant construct

<400> 31

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

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

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

Ala Gln Ile Thr Pro Gly Gly Ile Thr Asp Tyr Ala Asp Ser Val Lys
    50                  55                  60

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

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

Ala Glu Ile Leu Lys Arg Ala Tyr Ile Asp Val Tyr Val Asn Tyr Trp
            100                 105                 110

Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
        115                 120                 125

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly
    130                 135                 140

Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Glu Val Gln
145                 150                 155                 160

Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg
                165                 170                 175

Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Thr Phe Asp Lys Ile Asn Asn Met Gly
            180                 185                 190

Trp Tyr Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gln Arg Asp Leu Val Ala Gln Ile
        195                 200                 205

Thr Pro Gly Gly Ile Thr Asp Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe
```

210 215 220

Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn
225 230 235 240

Ser Leu Arg Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Asn Ala Glu Ile
245 250 255

Leu Lys Arg Ala Tyr Ile Asp Val Tyr Val Asn Tyr Trp Gly Gln Gly
260 265 270

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly
275 280 285

Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
290 295 300

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Glu Val Gln Leu Leu Glu
305 310 315 320

Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys
325 330 335

Ala Ala Ser Gly Thr Phe Asp Lys Ile Asn Asn Met Gly Trp Tyr Arg
340 345 350

Gln Ala Pro Gly Lys Gln Arg Asp Leu Val Ala Gln Ile Thr Pro Gly
355 360 365

Gly Ile Thr Asp Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser
370 375 380

Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg
385 390 395 400

Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Asn Ala Glu Ile Leu Lys Arg
405 410 415

Ala Tyr Ile Asp Val Tyr Val Asn Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val
420 425 430

Thr Val Ser Ser
435

<210> 32
<211> 593
<212> PRT
<213> artificial

<220>
<223> Recombinant construct

<400> 32

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

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

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

Ala Gln Ile Thr Pro Gly Gly Ile Thr Asp Tyr Ala Asp Ser Val Lys
    50                  55                  60

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

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

Ala Glu Ile Leu Lys Arg Ala Tyr Ile Asp Val Tyr Val Asn Tyr Trp
            100                 105                 110

Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
        115                 120                 125

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly
    130                 135                 140

Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Glu Val Gln
145                 150                 155                 160

Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg
                165                 170                 175

Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Thr Phe Asp Lys Ile Asn Asn Met Gly
            180                 185                 190

Trp Tyr Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gln Arg Asp Leu Val Ala Gln Ile
        195                 200                 205

Thr Pro Gly Gly Ile Thr Asp Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe
    210                 215                 220

Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn
```

```
225                 230                 235                 240

Ser Leu Arg Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Asn Ala Glu Ile
                245                 250                 255

Leu Lys Arg Ala Tyr Ile Asp Val Tyr Val Asn Tyr Trp Gly Gln Gly
            260                 265                 270

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly
        275                 280                 285

Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
    290                 295                 300

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Glu Val Gln Leu Leu Glu
305                 310                 315                 320

Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys
                325                 330                 335

Ala Ala Ser Gly Thr Phe Asp Lys Ile Asn Asn Met Gly Trp Tyr Arg
            340                 345                 350

Gln Ala Pro Gly Lys Gln Arg Asp Leu Val Ala Gln Ile Thr Pro Gly
        355                 360                 365

Gly Ile Thr Asp Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser
    370                 375                 380

Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg
385                 390                 395                 400

Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Asn Ala Glu Ile Leu Lys Arg
                405                 410                 415

Ala Tyr Ile Asp Val Tyr Val Asn Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val
            420                 425                 430

Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly
        435                 440                 445

Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly
    450                 455                 460

Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly
465                 470                 475                 480
```

```
Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser
                485                 490                 495

Gly Thr Phe Asp Lys Ile Asn Asn Met Gly Trp Tyr Arg Gln Ala Pro
            500                 505                 510

Gly Lys Gln Arg Asp Leu Val Ala Gln Ile Thr Pro Gly Gly Ile Thr
        515                 520                 525

Asp Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn
    530                 535                 540

Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Pro Glu Asp
545                 550                 555                 560

Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Asn Ala Glu Ile Leu Lys Arg Ala Tyr Ile
                565                 570                 575

Asp Val Tyr Val Asn Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser
            580                 585                 590

Ser
```

<210> 33
<211> 750
<212> PRT
<213> artificial

<220>
<223> Recombinant construct

<400> 33

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

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

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

Ala Gln Ile Thr Pro Gly Gly Ile Thr Asp Tyr Ala Asp Ser Val Lys
    50                  55                  60

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

Gln Met Asn Ser Leu Arg Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Asn
```

```
                85                  90                  95

Ala Glu Ile Leu Lys Arg Ala Tyr Ile Asp Val Tyr Val Asn Tyr Trp
            100                 105                 110

Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
        115                 120                 125

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly
    130                 135                 140

Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Glu Val Gln
145                 150                 155                 160

Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg
                165                 170                 175

Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Thr Phe Asp Lys Ile Asn Asn Met Gly
            180                 185                 190

Trp Tyr Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gln Arg Asp Leu Val Ala Gln Ile
        195                 200                 205

Thr Pro Gly Gly Ile Thr Asp Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe
    210                 215                 220

Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn
225                 230                 235                 240

Ser Leu Arg Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Asn Ala Glu Ile
                245                 250                 255

Leu Lys Arg Ala Tyr Ile Asp Val Tyr Val Asn Tyr Trp Gly Gln Gly
            260                 265                 270

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly
        275                 280                 285

Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
    290                 295                 300

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Glu Val Gln Leu Leu Glu
305                 310                 315                 320

Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys
                325                 330                 335
```

```
Ala Ala Ser Gly Thr Phe Asp Lys Ile Asn Asn Met Gly Trp Tyr Arg
            340                 345                 350

Gln Ala Pro Gly Lys Gln Arg Asp Leu Val Ala Gln Ile Thr Pro Gly
        355                 360                 365

Gly Ile Thr Asp Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser
    370                 375                 380

Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg
385                 390                 395                 400

Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Asn Ala Glu Ile Leu Lys Arg
                405                 410                 415

Ala Tyr Ile Asp Val Tyr Val Asn Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val
            420                 425                 430

Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly
        435                 440                 445

Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly
    450                 455                 460

Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly
465                 470                 475                 480

Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser
                485                 490                 495

Gly Thr Phe Asp Lys Ile Asn Asn Met Gly Trp Tyr Arg Gln Ala Pro
            500                 505                 510

Gly Lys Gln Arg Asp Leu Val Ala Gln Ile Thr Pro Gly Gly Ile Thr
        515                 520                 525

Asp Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn
    530                 535                 540

Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Pro Glu Asp
545                 550                 555                 560

Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Asn Ala Glu Ile Leu Lys Arg Ala Tyr Ile
                565                 570                 575

Asp Val Tyr Val Asn Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser
            580                 585                 590
```

```
Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
        595                 600                 605

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
    610                 615                 620

Gly Gly Gly Ser Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val
625                 630                 635                 640

Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Thr Phe
                645                 650                 655

Asp Lys Ile Asn Asn Met Gly Trp Tyr Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gln
            660                 665                 670

Arg Asp Leu Val Ala Gln Ile Thr Pro Gly Gly Ile Thr Asp Tyr Ala
        675                 680                 685

Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn
    690                 695                 700

Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Pro Glu Asp Thr Ala Val
705                 710                 715                 720

Tyr Tyr Cys Asn Ala Glu Ile Leu Lys Arg Ala Tyr Ile Asp Val Tyr
                725                 730                 735

Val Asn Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
            740                 745                 750


<210>  34
<211>  30
<212>  PRT
<213>  artificial

<220>
<223>  Recombinant construct

<400>  34

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

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


<210>  35
<211>  30
<212>  PRT
<213>  artificial
```

<220>
<223> Recombinant construct

<400> 35

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

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

<210> 36
<211> 30
<212> PRT
<213> artificial

<220>
<223> Recombinant construct

<400> 36

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Ser Val Gln Ala Gly Asp
1   5   10   15

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

<210> 37
<211> 30
<212> PRT
<213> artificial

<220>
<223> Recombinant construct

<400> 37

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Thr Phe Asp Lys
            20   25   30

<210> 38
<211> 30
<212> PRT
<213> artificial

<220>
<223> Recombinant construct

<400> 38

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Thr Phe Asp Lys
20 25 30

<210> 39
<211> 30
<212> PRT
<213> artificial

<220>
<223> Recombinant construct

<400> 39

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Ser Ile Asp Ser
20 25 30

<210> 40
<211> 30
<212> PRT
<213> artificial

<220>
<223> Recombinant construct

<400> 40

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

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

<210> 41
<211> 5
<212> PRT
<213> artificial

<220>
<223> Recombinant construct

<400> 41

Asn Tyr Ala Met Gly
1 5

<210> 42
<211> 5
<212> PRT
<213> artificial

<220>
<223> Recombinant construct

<400> 42

Ser Ile Arg Val Gly
1 5

<210> 43
<211> 5
<212> PRT
<213> artificial

<220>
<223> Recombinant construct

<400> 43

Ile Asn Asn Met Gly
1 5

<210> 44
<211> 5
<212> PRT
<213> artificial

<220>
<223> Recombinant construct

<400> 44

Arg Tyr Trp Met Tyr
1 5

<210> 45
<211> 14
<212> PRT
<213> artificial

<220>
<223> Recombinant construct

<400> 45

Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg Glu Phe Val Ala
1 5 10

<210> 46
<211> 14
<212> PRT
<213> artificial

<220>
<223> Recombinant construct

<400> 46

Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Arg Glu Phe Val Ser
1 5 10

<210> 47

<211> 14
<212> PRT
<213> artificial

<220>
<223> Recombinant construct

<400> 47

Trp Phe Arg Gln Thr Pro Gly Lys Glu Arg Glu Phe Val Ala
1 5 10

<210> 48
<211> 14
<212> PRT
<213> artificial

<220>
<223> Recombinant construct

<400> 48

Trp Tyr Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gln Arg Asp Leu Val Ala
1 5 10

<210> 49
<211> 14
<212> PRT
<213> artificial

<220>
<223> Recombinant construct

<400> 49

Trp Tyr Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gln Arg Glu Leu Val Ala
1 5 10

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

<220>
<223> Recombinant construct

<400> 50

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

<210> 51
<211> 17
<212> PRT
<213> artificial

<220>
<223> Recombinant construct

<400> 51

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

Gly

<210> 52
<211> 17
<212> PRT
<213> artificial

<220>
<223> Recombinant construct

<400> 52

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

Gly

<210> 53
<211> 16
<212> PRT
<213> artificial

<220>
<223> Recombinant construct

<400> 53

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

<210> 54
<211> 16
<212> PRT
<213> artificial

<220>
<223> Recombinant construct

<400> 54

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

<210> 55
<211> 17
<212> PRT
<213> artificial

<220>
<223> Recombinant construct

<400> 55

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

Gly

<210> 56
<211> 32
<212> PRT
<213> artificial

<220>
<223> Recombinant construct

<400> 56

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

Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Ala
20 25 30

<210> 57
<211> 32
<212> PRT
<213> artificial

<220>
<223> Recombinant construct

<400> 57

Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Val Tyr Leu Gln
1 5 10 15

Met Asn Ser Leu Arg Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Ala
20 25 30

<210> 58
<211> 32
<212> PRT
<213> artificial

<220>
<223> Recombinant construct

<400> 58

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

Met Ala Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Ala
20 25 30

<210> 59
<211> 32
<212> PRT
<213> artificial

<220>
<223> Recombinant construct

<400> 59

Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln
1 5 10 15

Met Asn Ser Leu Arg Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Asn Ala
20 25 30

<210> 60
<211> 32
<212> PRT
<213> artificial

<220>
<223> Recombinant construct

<400> 60

Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asp Thr Met Tyr Leu Gln
1 5 10 15

Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Phe Cys Asn Ala
20 25 30

<210> 61
<211> 32
<212> PRT
<213> artificial

<220>
<223> Recombinant construct

<400> 61

Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Arg Thr Val Asn Leu Gln
1 5 10 15

Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Asn Ala
20 25 30

<210> 62
<211> 32
<212> PRT
<213> artificial

<220>
<223> Recombinant construct

<400> 62

Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Phe Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln
1 5 10 15

Met Asn Ser Leu Lys Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Lys
20 25 30

<210> 63
<211> 15
<212> PRT
<213> artificial

<220>
<223> Recombinant construct

<400> 63

Ala Gly Ser Phe Ser Leu Gly Gly Arg Pro Tyr Gly Asp Asp Tyr
1 5 10 15

<210> 64
<211> 17
<212> PRT
<213> artificial

<220>
<223> Recombinant construct

<400> 64

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

Tyr

<210> 65
<211> 17
<212> PRT
<213> artificial

<220>
<223> Recombinant construct

<400> 65

Gly Leu Gln Tyr Asn Arg Ser Ala Asp Arg Val Pro Val Gly Ala Val
1 5 10 15

Tyr

<210> 66
<211> 14

<212> PRT
<213> artificial

<220>
<223> Recombinant construct

<400> 66

Glu Ile Leu Lys Arg Ala Tyr Ile Asp Val Tyr Val Asn Tyr
1 5 10

<210> 67
<211> 14
<212> PRT
<213> artificial

<220>
<223> Recombinant construct

<400> 67

Glu Val Arg Glu Arg Gly Thr Ser Trp Tyr Arg Pro Asp Tyr
1 5 10

<210> 68
<211> 17
<212> PRT
<213> artificial

<220>
<223> Recombinant construct

<400> 68

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

Pro

<210> 69
<211> 11
<212> PRT
<213> artificial

<220>
<223> Recombinant construct

<400> 69

Trp Gly Lys Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
1 5 10

<210> 70
<211> 11
<212> PRT
<213> artificial

<220>
<223> Recombinant construct

<400> 70

Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
1 5 10

<210> 71
<211> 11
<212> PRT
<213> artificial

<220>
<223> Recombinant construct

<400> 71

Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser
1 5 10

<210> 72
<211> 11
<212> PRT
<213> artificial

<220>
<223> Recombinant construct

<400> 72

Gly Ala Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser
1 5 10

<210> 73
<211> 21
<212> PRT
<213> artificial

<220>
<223> Recombinant construct

<400> 73

Gly Gly Cys Thr Gly Ala Gly Cys Thr Gly Gly Gly Thr Gly Gly Thr
1 5 10 15

Cys Cys Thr Gly Gly
20

<210> 74
<211> 21
<212> PRT
<213> artificial

<220>
<223> Recombinant construct

<400> 74

Gly Gly Cys Thr Gly Ala Gly Thr Thr Thr Gly Gly Thr Gly Gly Thr
1 5 10 15

Cys Cys Thr Gly Gly
20

<210> 75
<211> 23
<212> PRT
<213> artificial

<220>
<223> Recombinant construct

<400> 75

Gly Gly Thr Ala Cys Gly Thr Gly Cys Thr Gly Thr Thr Gly Ala Ala
1 5 10 15

Cys Thr Gly Thr Thr Cys Cys
20

<210> 76
<211> 55
<212> PRT
<213> artificial

<220>
<223> Recombinant construct

<400> 76

Cys Ala Thr Thr Thr Gly Ala Gly Thr Thr Gly Gly Cys Cys Thr Ala
1 5 10 15

Gly Cys Cys Gly Gly Cys Cys Ala Thr Gly Gly Cys Ala Gly Ala Gly
20 25 30

Gly Thr Gly Cys Ala Ala Thr Thr Gly Gly Thr Gly Gly Ala Gly Thr
35 40 45

Cys Thr Gly Gly Gly Gly Gly
50 55

<210> 77
<211> 18
<212> PRT
<213> artificial

<220>
<223> Recombinant construct

<400> 77

Thr Gly Thr Ala Ala Ala Ala Cys Gly Ala Cys Gly Gly Cys Cys Ala
1 5 10 15

Gly Thr

<210> 78
<211> 18
<212> PRT
<213> artificial

<220>
<223> Recombinant construct

<400> 78

Cys Ala Gly Gly Ala Ala Ala Cys Ala Gly Cys Thr Ala Thr Gly Ala
1 5 10 15

Cys Cys

<210> 79
<211> 88
<212> PRT
<213> artificial

<220>
<223> Recombinant construct

<400> 79

Thr Cys Ala Gly Thr Ala Ala Cys Cys Thr Gly Gly Ala Thr Cys Cys
1 5 10 15

Cys Cys Cys Gly Cys Cys Ala Cys Cys Gly Cys Thr Gly Cys Cys Thr
20 25 30

Cys Cys Ala Cys Cys Gly Cys Cys Gly Cys Thr Ala Cys Cys Cys Cys
35 40 45

Cys Gly Cys Cys Ala Cys Cys Gly Cys Thr Gly Cys Cys Thr Cys Cys
50 55 60

Ala Cys Cys Gly Cys Cys Thr Gly Ala Gly Gly Ala Gly Ala Cys Gly
65 70 75 80

Gly Thr Gly Ala Cys Cys Thr Gly
85

<210> 80
<211> 84

<212> PRT
<213> artificial

<220>
<223> Recombinant construct

<400> 80

Ala Gly Gly Thr Thr Ala Cys Thr Gly Ala Gly Gly Ala Thr Cys Cys
1 5 10 15

Gly Gly Cys Gly Gly Thr Gly Gly Ala Gly Gly Cys Ala Gly Cys Gly
20 25 30

Gly Ala Gly Gly Thr Gly Gly Gly Gly Gly Cys Thr Cys Thr Gly Gly
35 40 45

Thr Gly Gly Cys Gly Gly Gly Gly Gly Thr Ala Gly Cys Gly Ala Gly
50 55 60

Gly Thr Gly Cys Ala Gly Cys Thr Gly Gly Thr Gly Gly Ala Gly Thr
65 70 75 80

Cys Thr Gly Gly

<210> 81
<211> 5
<212> PRT
<213> artificial

<220>
<223> Recombinant construct

<400> 81

Gly Gly Gly Gly Ser
1 5

<210> 82
<211> 4
<212> PRT
<213> artificial

<220>
<223> Recombinant construct

<400> 82

Gly Gly Gly Ser
1

<210> 83
<211> 22
<212> PRT

<213> artificial

<220>
<223> Recombinant construct

<400> 83

Cys Thr Gly Ala Thr Cys Ala Cys Cys Cys Ala Ala Cys Ala Ala Gly
1 5 10 15

Ala Cys Cys Thr Ala Gly
20

<210> 84
<211> 21
<212> PRT
<213> artificial

<220>
<223> Recombinant construct

<400> 84

Gly Cys Cys Thr Gly Ala Gly Ala Gly Ala Gly Ala Ala Cys Ala Gly
1 5 10 15

Gly Gly Ala Gly Ala
20

<210> 85
<211> 28
<212> PRT
<213> artificial

<220>
<223> Recombinant construct

<400> 85

Cys Ala Cys Cys Ala Thr Gly Gly Ala Ala Cys Ala Ala Cys Gly Gly
1 5 10 15

Gly Gly Ala Cys Ala Gly Ala Ala Cys Gly Cys Cys
20 25

<210> 86
<211> 30
<212> PRT
<213> artificial

<220>
<223> Recombinant construct

<400> 86

Thr Thr Ala Gly Gly Ala Cys Ala Thr Gly Gly Cys Ala Gly Ala Gly
1 5 10 15

Thr Cys Thr Gly Cys Ala Thr Thr Ala Cys Cys Thr Thr Cys
20 25 30

<210> 87
<211> 122
<212> PRT
<213> artificial

<220>
<223> Recombinant construct

<400> 87

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

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

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

Ala Gln Ile Thr Pro Gly Gly Ile Thr Asp Tyr Ala Asp Ser Val Lys
50 55 60

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

Gln Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Phe Cys Asn
85 90 95

Ala Glu Ile Leu Lys Arg Ala Tyr Ile Asp Val Tyr Val Asn Tyr Trp
100 105 110

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

<210> 88
<211> 593
<212> PRT
<213> artificial

<220>
<223> Recombinant construct

<400> 88

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Thr Phe Asp Lys Ile Asn

```
            20                  25                  30

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

Ala Gln Ile Thr Pro Gly Gly Ile Thr Asp Tyr Ala Asp Ser Val Lys
    50                  55                  60

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

Gln Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Phe Cys Asn
                85                  90                  95

Ala Glu Ile Leu Lys Arg Ala Tyr Ile Asp Val Tyr Val Asn Tyr Trp
            100                 105                 110

Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
        115                 120                 125

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly
    130                 135                 140

Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Glu Val Gln
145                 150                 155                 160

Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg
                165                 170                 175

Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Thr Phe Asp Lys Ile Asn Asn Met Gly
            180                 185                 190

Trp Tyr Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gln Arg Asp Leu Val Ala Gln Ile
        195                 200                 205

Thr Pro Gly Gly Ile Thr Asp Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe
    210                 215                 220

Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asp Thr Met Tyr Leu Gln Met Asn
225                 230                 235                 240

Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Phe Cys Asn Ala Glu Ile
                245                 250                 255

Leu Lys Arg Ala Tyr Ile Asp Val Tyr Val Asn Tyr Trp Gly Gln Gly
            260                 265                 270
```

```
Thr Gln Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly
        275                 280                 285

Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
    290                 295                 300

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Glu Val Gln Leu Val Glu
305                 310                 315                 320

Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys
                325                 330                 335

Ala Ala Ser Gly Thr Phe Asp Lys Ile Asn Asn Met Gly Trp Tyr Arg
            340                 345                 350

Gln Ala Pro Gly Lys Gln Arg Asp Leu Val Ala Gln Ile Thr Pro Gly
        355                 360                 365

Gly Ile Thr Asp Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser
    370                 375                 380

Arg Asp Asn Ala Lys Asp Thr Met Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys
385                 390                 395                 400

Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Phe Cys Asn Ala Glu Ile Leu Lys Arg
                405                 410                 415

Ala Tyr Ile Asp Val Tyr Val Asn Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val
            420                 425                 430

Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly
        435                 440                 445

Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly
    450                 455                 460

Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly
465                 470                 475                 480

Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser
                485                 490                 495

Gly Thr Phe Asp Lys Ile Asn Asn Met Gly Trp Tyr Arg Gln Ala Pro
            500                 505                 510

Gly Lys Gln Arg Asp Leu Val Ala Gln Ile Thr Pro Gly Gly Ile Thr
        515                 520                 525
```

```
Asp Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn
    530                 535                 540

Ala Lys Asp Thr Met Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp
545                 550                 555                 560

Thr Ala Val Tyr Phe Cys Asn Ala Glu Ile Leu Lys Arg Ala Tyr Ile
                565                 570                 575

Asp Val Tyr Val Asn Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser
            580                 585                 590

Ser
```

<210> 89
<211> 440
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 89

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Leu Pro Tyr Leu Lys Gly Ile Cys Ser Gly Gly Gly Gly Asp Pro Glu
                245                 250                 255

Arg Val Asp Arg Ser Ser Gln Arg Pro Gly Ala Glu Asp Asn Val Leu
            260                 265                 270

Asn Glu Ile Val Ser Ile Leu Gln Pro Thr Gln Val Pro Glu Gln Glu
        275                 280                 285

Met Glu Val Gln Glu Pro Ala Glu Pro Thr Gly Val Asn Met Leu Ser
    290                 295                 300

Pro Gly Glu Ser Glu His Leu Leu Glu Pro Ala Glu Ala Glu Arg Ser
305                 310                 315                 320

Gln Arg Arg Arg Leu Leu Val Pro Ala Asn Glu Gly Asp Pro Thr Glu
                325                 330                 335

Thr Leu Arg Gln Cys Phe Asp Asp Phe Ala Asp Leu Val Pro Phe Asp
            340                 345                 350

Ser Trp Glu Pro Leu Met Arg Lys Leu Gly Leu Met Asp Asn Glu Ile
        355                 360                 365

Lys Val Ala Lys Ala Glu Ala Ala Gly His Arg Asp Thr Leu Tyr Thr
    370                 375                 380

Met Leu Ile Lys Trp Val Asn Lys Thr Gly Arg Asp Ala Ser Val His
385                 390                 395                 400
```

Thr Leu Leu Asp Ala Leu Glu Thr Leu Gly Glu Arg Leu Ala Lys Gln
405 410 415

Lys Ile Glu Asp His Leu Leu Ser Ser Gly Lys Phe Met Tyr Leu Glu
420 425 430

Gly Asn Ala Asp Ser Ala Met Ser
435 440

<210> 90
<211> 126
<212> PRT
<213> artificial

<220>
<223> Recombinant construct

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (99)..(115)
<223> Wherein X is any amino acid

<400> 90

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

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

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

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

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

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

Ala Lys Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
100 105 110

Xaa Xaa Xaa Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120 125

<210> 91

<211> 11
<212> PRT
<213> artificial

<220>
<223> Recombinant construct

<400> 91

Glu Gln Lys Leu Ile Ser Glu Glu Asp Leu Asn
1 5 10

<210> 92
<211> 6
<212> PRT
<213> artificial

<220>
<223> Recombinant construct

<400> 92

His His His His His His
1 5

<210> 93
<211> 23
<212> PRT
<213> artificial

<220>
<223> Recombinant construct

<400> 93

Ala Ala Ala Glu Gln Lys Leu Ile Ser Glu Glu Asp Leu Asn Gly Ala
1 5 10 15

Ala His His His His His His
20

<210> 94
<211> 23
<212> PRT
<213> artificial

<220>
<223> Recombinant construct

<400> 94

Gly Ala Ala Glu Gln Lys Leu Ile Ser Glu Glu Asp Leu Asn Gly Ala
1 5 10 15

Ala His His His His His His
20

<210> 95
<211> 4
<212> PRT
<213> artificial

<220>
<223> Recombinant construct

<400> 95

Gly Gly Gly Cys
1

<210> 96
<211> 378
<212> DNA
<213> artificial

<220>
<223> Recombinant construct

<400> 96
gaggtgcagc tgctggagtc tggcggcgga ctggtgcagc ctggcggctc cctgagactg 60

tcctgcgccg cctccggccg gaccttcggc tccatcagag tgggctggtt ccggcaggcc 120

cctggcaagg gccgggagtt cgtgtccgcc atcaaccgga acgacggcac cacctactac 180

gccgactccg tgaagggccg gttcaccatc tcccgggaca actccaagaa caccgtgtac 240

ctgcagatga actccctgcg gcccgaggac accgccgtgt actactgcgc cgctggcctg 300

cagtacaaca gagccgccga cagagtgcct gtgggcgctg tgtactgggg ccagggcacc 360

ctggtgaccg tgtcctct 378

<210> 97
<211> 1827
<212> DNA
<213> artificial

<220>
<223> Recombinant construct

<400> 97
gaggtgcagc tgctggagtc tggcggcgga ctggtgcagc ctggcggctc cctgagactg 60

tcctgcgccg cctccggccg gaccttcggc tccatcagag tgggctggtt ccggcaggcc 120

cctggcaagg gccgggagtt cgtgtccgcc atcaaccgga acgacggcac cacctactac 180

gccgactccg tgaagggccg gttcaccatc tcccgggaca actccaagaa caccgtgtac 240

ctgcagatga actccctgcg gcccgaggac accgccgtgt actactgcgc cgctggcctg 300

cagtacaaca gagccgccga cagagtgcct gtgggcgctg tgtactgggg ccagggcacc 360

ctggtgaccg tgtcctctgg cggcggagga tctggagggg gaggaagcgg cggaggagga 420

tctggcggcg gaggaagtgg gggcggaggg agtggcggag gtggaagtgg tggagggggc 480

agcgaggtgc agctgctgga gagcggcgga ggactggtgc agccaggcgg atctctgcgc 540

ctgagctgcg ccgccagcgg cagaaccttt ggcagcatcc gcgtgggatg gttcagacag 600

gctcccggaa agggacgcga gtttgtgtct gctatcaatc gcaatgatgg caccacatac 660

tatgctgata gcgtgaaggg aagattcacc atcagccgcg acaatagcaa gaatacagtg 720

tatctgcaga tgaatagcct gcgcccagag gatacagctg tgtattactg tgctgccgga 780

ctgcagtata accgggctgc cgatcgggtg cccgtgggag ccgtgtattg gggacaggga 840

acactggtga cagtgtcctc tggcggcgga ggatctgggg gtggcggatc tggcggcgga 900

ggaagcggtg gcggaggatc tggcggcgga ggaagcggag ggggaggatc tggcggcgga 960

ggatctgagg tgcagctgct ggagtccggc ggaggactgg tgcagccagg cggcagcctg 1020

cggctgtctt gcgccgcttc tggcagaaca ttcggctcta tccgcgtggg ctggtttagg 1080

caggctccag gcaagggacg cgagttcgtg agcgctatca acagaaacga tggcacaacc 1140

tattatgctg attctgtgaa gggcaggttt acaatcagca gggataattc taagaatacc 1200

gtgtacctgc agatgaactc tctgaggcca gaggataccg ctgtgtacta ttgcgctgcc 1260

ggcctgcagt ataatagggc cgctgaccgc gtgccagtgg gcgccgtgta ttggggccag 1320

ggcaccctgg tgacagtgtc ctctggcgga ggtggcagcg gcggtggcgg atctggcggc 1380

ggaggaagtg ggggcggagg atctggcggc ggaggaagcg gcggaggggg atctggcggc 1440

ggaggatctg aggtgcagct gctggagtct ggcggaggac tggtgcagcc tggcggaagc 1500

ctgagactga gctgtgctgc ttctggccgc accttcggaa gcatcagagt gggatggttt 1560

cgccaggctc caggaaaggg ccgggagttc gtctctgcta tcaatagaaa tgacggaaca 1620

acatattacg ccgacagcgt gaagggacgc tttacaatct ctagggataa cagcaagaac 1680

accgtgtatc tgcagatgaa cagcctgcgg cccgaggata ccgccgtgta ttattgtgcc 1740

gctggactgc agtacaatcg ggccgctgat agagtgcctg tgggagccgt gtactggggc 1800

cagggcacac tggtgacagt gtctagc 1827

<210> 98
<211> 366
<212> DNA
<213> artificial

<220>
<223> Recombinant construct

<400> 98
gaggtgcagc tgctggagtc tggcggcgga ctggtgcagc ctggcggctc cctgagactg 60

tcctgcgccg cctccggcac cttcgacaag atcaacaaca tgggctggta caggcaggcc 120

cctggcaagc agagggacct ggtggcccag atcacccctg gcggcatcac cgactacgcc 180

gactccgtga agggccggtt caccatctcc cgggacaact ccaagaacac cctgtacctg 240

cagatgaact ccctgcggcc cgaggacacc gccgtgtact actgcaacgc cgagatcctg 300

aagcgggcct acatcgacgt gtacgtgaac tactggggcc agggcaccct ggtgaccgtg 360

tcctct 366

<210> 99
<211> 1779
<212> DNA
<213> artificial

<220>
<223> Recombinant construct

<400> 99
gaggtgcagc tgctggagtc tggcggcgga ctggtgcagc ctggcggctc cctgagactg 60

tcctgcgccg cctccggcac cttcgacaag atcaacaaca tgggctggta caggcaggcc 120

cctggcaagc agagggacct ggtggcccag atcacccctg gcggcatcac cgactacgcc 180

gactccgtga agggccggtt caccatctcc cgggacaact ccaagaacac cctgtacctg 240

cagatgaact ccctgcggcc cgaggacacc gccgtgtact actgcaacgc cgagatcctg 300

aagcgggcct acatcgacgt gtacgtgaac tactggggcc agggcaccct ggtgaccgtg 360

tcctctggcg gcggaggatc tggaggggga ggaagcggcg gaggaggatc tggcggcgga 420

ggaagtgggg gcggagggag tggcggaggt ggaagtggtg gaggggggcag cgaggtgcag 480

ctgctggaga gcggcggagg actggtgcag ccaggcggat ctctgcgcct gagctgcgcc 540

gccagcggca catttgataa gatcaataat atgggatggt atcgccaggc tccaggcaag 600

cagcgcgatc tggtggctca gatcacacca ggcggaatca cagattatgc cgatagcgtg 660

aagggaagat tcaccatcag ccgcgacaat agcaagaata cactgtatct gcagatgaat 720

agcctgcgcc cagaggatac agctgtgtat tactgtaatg ctgagatcct gaagcgcgct 780

tatatcgatg tgtatgtgaa ttattgggga cagggaacac tggtgacagt gtcctctggc 840

ggcggaggat ctgggggtgg cggatctggc ggcggaggaa gcggtggcgg aggatctggc 900

ggcggaggaa gcggaggggg aggatctggc ggcggaggat ctgaggtgca gctgctggag 960

tccggcggag gactggtgca gccaggcggc agcctgcggc tgtcttgcgc cgcttctggc 1020

accttcgata agatcaacaa tatgggatgg tacagacagg ctcccggaaa gcagcgggat 1080

ctggtggccc agatcacccc aggcggcatc acagattacg ctgattctgt gaagggcagg 1140

tttacaatca gcagggataa ttctaagaat accctgtacc tgcagatgaa ctctctgagg 1200

ccagaggata ccgctgtgta ctattgtaac gccgagatcc tgaagagggc ttacatcgat 1260

gtgtacgtga attattgggg ccagggcacc ctggtgacag tgtcctctgg cggaggtggc 1320

agcggcggtg gcggatctgg cggcggagga agtgggggcg gaggatctgg cggcggagga 1380

agcggcggag ggggatctgg cggcggagga tctgaggtgc agctgctgga gtctggcgga 1440

ggactggtgc agcctggcgg aagcctgaga ctgagctgtg ctgcttctgg caccttcgac 1500

aagatcaata atatgggctg gtatagacag gccccaggaa agcagaggga cctggtcgct 1560

cagatcacac ccggcggaat caccgactac gctgacagcg tgaagggacg ctttacaatc 1620

tctagggata acagcaagaa caccctgtat ctgcagatga acagcctgcg gcccgaggat 1680

accgccgtgt attattgcaa tgctgagatc ctgaagaggg cctatatcga cgtgtatgtg 1740

aattactggg gccagggcac actggtgaca gtgtcctct 1779

<210> 100
<211> 188
<212> PRT
<213> artificial

<220>
<223> Recombinant construct

<400> 100

Met Val Ser Ala Ile Val Leu Tyr Val Leu Leu Ala Ala Ala Ala His
1 5 10 15

Ser Ala Phe Ala Ala Asp Leu Gly Ser Leu Glu Val Leu Phe Gln Ala
20 25 30

Leu Ile Thr Gln Gln Asp Leu Ala Pro Gln Gln Arg Ala Ala Pro Gln
35 40 45

Gln Lys Arg Ser Ser Pro Ser Glu Gly Leu Cys Pro Pro Gly His His
50 55 60

Ile Ser Glu Asp Gly Arg Asp Cys Ile Ser Cys Lys Tyr Gly Gln Asp
65 70 75 80

Tyr Ser Thr His Trp Asn Asp Leu Leu Phe Cys Leu Arg Cys Thr Arg
85 90 95

Cys Asp Ser Gly Glu Val Glu Leu Ser Pro Cys Thr Thr Thr Arg Asn
100 105 110

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

Glu Met Cys Arg Lys Cys Arg Thr Gly Cys Pro Arg Gly Met Val Lys
130 135 140

Val Gly Asp Cys Thr Pro Trp Ser Asp Ile Glu Cys Val His Lys Glu
145 150 155 160

Ser Ala Ala Ala Leu Glu Val Leu Phe Gln Gly Pro Ser Ser Gly Lys
165 170 175

Leu Gly His His His His His His His His His His
180 185

<210> 101
<211> 186
<212> PRT
<213> artificial

<220>
<223> Recombinant construct

<400> 101

Met Val Ser Ala Ile Val Leu Tyr Val Leu Leu Ala Ala Ala Ala His
1 5 10 15

Ser Ala Phe Ala Ala Asp Leu Gly Ser Leu Glu Val Leu Phe Gln Gly
20 25 30

Pro Ser Met Ala Leu Ala Pro Gln Gln Arg Ala Ala Pro Gln Gln Lys
35 40 45

Arg Ser Ser Pro Ser Glu Gly Leu Cys Pro Pro Gly His His Ile Ser
50 55 60

Glu Asp Gly Arg Asp Cys Ile Ser Cys Lys Tyr Gly Gln Asp Tyr Ser
65 70 75 80

Thr His Trp Asn Asp Leu Leu Phe Cys Leu Arg Cys Thr Arg Cys Asp
85 90 95

Ser Gly Glu Val Glu Leu Ser Pro Cys Thr Thr Thr Arg Asn Thr Val
100 105 110

Cys Gln Cys Glu Glu Gly Thr Phe Arg Glu Glu Asp Ser Pro Glu Met
115 120 125

Cys Arg Lys Cys Arg Thr Gly Cys Pro Arg Gly Met Val Lys Val Gly
130 135 140

Asp Cys Thr Pro Trp Ser Asp Ile Glu Cys Val His Lys Glu Ser Ala
145 150 155 160

Ala Ala Leu Glu Val Leu Phe Gln Gly Pro Ser Ser Gly Lys Leu Gly
165 170 175

His His His His His His His His His His
180 185

<210> 102
<211> 166
<212> PRT
<213> artificial

<220>
<223> Recombinant construct

<400> 102

Met Lys Lys Thr Ala Ile Ala Ile Ala Val Ala Leu Ala Gly Leu Ala
1 5 10 15

Thr Val Ala Gln Ala Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu
20 25 30

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

Phe Asp Lys Ile Asn Asn Met Gly Trp Tyr Arg Gln Ala Pro Gly Lys
50 55 60

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

Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys
85 90 95

Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Pro Glu Asp Thr Ala
100 105 110

Val Tyr Tyr Cys Asn Ala Glu Ile Leu Lys Arg Ala Tyr Ile Asp Val
115 120 125

Tyr Val Asn Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala
130 135 140

Ala Ala Glu Gln Lys Leu Ile Ser Glu Glu Asp Leu Asn Gly Ala Ala
145 150 155 160

His His His His His His
165

<210> 103
<211> 153
<212> PRT
<213> artificial

<220>
<223> Recombinant construct

<400> 103

```
Met Lys Lys Thr Ala Ile Ala Ile Ala Val Ala Leu Ala Gly Leu Ala
1               5                  10                  15

Thr Val Ala Gln Ala Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu
            20                  25                  30

Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Arg
        35                  40                  45

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

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

Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser
                85                  90                  95

Lys Asn Thr Val Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Pro Glu Asp Thr
            100                 105                 110

Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Ala Gly Leu Gln Tyr Asn Arg Ala Ala Asp
        115                 120                 125

Arg Val Pro Val Gly Ala Val Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr
    130                 135                 140

Val Ser Ser His His His His His His
145                 150
```

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Novartis AG

CROMIE, Karen

DOMBRECHT, Bruno

ETTENBERG, Seth

KOLKMAN, Joost

LI, Jing

MEERSCHAERT, Kris

STOVER, David

ZHANG, Jingxin

<120> Compuestos Biológicos

<130> PAT054056A

<160> 103

<170> PatentIn versión 3.3

<210> 1

<211> 126

<212> PRT

<213> artificial

<220>

<223> Construcción recombinante

<400> 1

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Ser Val Gln Ala Gly Asp

1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Arg Thr Phe Gly Ser Ile

20 25 30

Arg Val Gly Trp Phe Arg Gln Thr Pro Gly Lys Glu Arg Glu Phe Val
35 40 45
Ala Ala Ile Asn Arg Asn Asp Gly Thr Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Val Tyr
65 70 75 80
Met Gln Met Ala Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95
Ala Ala Gly Leu Gln Tyr Asn Arg Ser Ala Asp Arg Val Pro Val Gly
100 105 110
Ala Val Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser
115 120 125

<210> 2

<211> 124

<212> PRT

<213> artificial

<220>

<223> Construcción recombinante

<400> 2

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

Ala Ala Leu Asn Trp Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Val Asp Ser Val
50 55 60

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

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

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

Tyr Trp Gly Lys Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 3

<211> 126

<212> PRT

<213> artificial

<220>

<223> Construcción recombinante

<400> 3

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

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

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

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

Arg Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Phe Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80
Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95
Ala Lys Ala Glu Gly Pro Pro Thr Phe Ser Leu Ile Arg Thr Met Thr
100 105 110
Val Asp Pro Gly Ala Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser
115 120 125

<210> 4
<211> 122
<212> PRT
<213> artificial
<220>
<223> Construcción recombinante

<400> 4

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

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

Ala Glu Val Arg Glu Arg Gly Thr Ser Trp Tyr Arg Pro Asp Tyr Trp
100 105 110

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

<210> 5

<211> 122

<212> PRT

<213> artificial

<220>

<223> Construcción recombinante

<400> 5

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

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

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

Ala Gln Ile Thr Pro Gly Gly Ile Thr Asp Tyr Ala Asp Ser Val Lys
50 55 60

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

Gln Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Phe Cys Asn
85 90 95

Ala Glu Ile Leu Lys Arg Ala Tyr Ile Asp Val Tyr Val Asn Tyr Trp
100 105 110

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

<210> 6

<211> 448

<212> PRT

<213> artificial

<220>

<223> Construcción recombinante

<400> 6

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Ser Val Gln Ala Gly Asp
1 5 10 15

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

Arg Val Gly Trp Phe Arg Gln Thr Pro Gly Lys Glu Arg Glu Phe Val
35 40 45

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

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

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

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

```
Ala Val Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser Gly Gly
        115                 120                 125
Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly
    130                 135                 140
Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly
145                 150                 155                 160
Ser Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Ser Val Gln Ala Gly
                165                 170                 175
Asp Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Arg Thr Phe Gly Ser
            180                 185                 190
Ile Arg Val Gly Trp Phe Arg Gln Thr Pro Gly Lys Glu Arg Glu Phe
        195                 200                 205
Val Ala Ala Ile Asn Arg Asn Asp Gly Thr Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser
    210                 215                 220
Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Val
225                 230                 235                 240
Tyr Met Gln Met Ala Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr
                245                 250                 255
Cys Ala Ala Gly Leu Gln Tyr Asn Arg Ser Ala Asp Arg Val Pro Val
            260                 265                 270
Gly Ala Val Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser Gly
        275                 280                 285
Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly
    290                 295                 300
```

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

<210> 7

<211> 609

<212> PRT

<213> artificial

<220>

<223> Construcción recombinante

<400> 7

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Ser Val Gln Ala Gly Asp
1 5 10 15

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

Arg Val Gly Trp Phe Arg Gln Thr Pro Gly Lys Glu Arg Glu Phe Val
35 40 45

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

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

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

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

Ala Val Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser Gly Gly
115 120 125

Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly
130 135 140

Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly
145 150 155 160

Ser Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Ser Val Gln Ala Gly
165 170 175

Asp Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Arg Thr Phe Gly Ser
180 185 190

Ile Arg Val Gly Trp Phe Arg Gln Thr Pro Gly Lys Glu Arg Glu Phe
195 200 205
Val Ala Ala Ile Asn Arg Asn Asp Gly Thr Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser
210 215 220
Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Val
225 230 235 240
Tyr Met Gln Met Ala Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr
245 250 255
Cys Ala Ala Gly Leu Gln Tyr Asn Arg Ser Ala Asp Arg Val Pro Val
260 265 270
Gly Ala Val Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser Gly
275 280 285
Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly
290 295 300
Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly
305 310 315 320
Gly Ser Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Ser Val Gln Ala
325 330 335
Gly Asp Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Arg Thr Phe Gly
340 345 350
Ser Ile Arg Val Gly Trp Phe Arg Gln Thr Pro Gly Lys Glu Arg Glu
355 360 365
Phe Val Ala Ala Ile Asn Arg Asn Asp Gly Thr Thr Tyr Tyr Ala Asp
370 375 380

Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr
385 390 395 400
Val Tyr Met Gln Met Ala Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr
405 410 415
Tyr Cys Ala Ala Gly Leu Gln Tyr Asn Arg Ser Ala Asp Arg Val Pro
420 425 430
Val Gly Ala Val Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser
435 440 445
Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
450 455 460
Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly
465 470 475 480
Gly Gly Ser Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Ser Val Gln
485 490 495
Ala Gly Asp Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Arg Thr Phe
500 505 510
Gly Ser Ile Arg Val Gly Trp Phe Arg Gln Thr Pro Gly Lys Glu Arg
515 520 525
Glu Phe Val Ala Ala Ile Asn Arg Asn Asp Gly Thr Thr Tyr Tyr Ala
530 535 540
Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn
545 550 555 560
Thr Val Tyr Met Gln Met Ala Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Val
565 570 575

Tyr Tyr Cys Ala Ala Gly Leu Gln Tyr Asn Arg Ser Ala Asp Arg Val
580 585 590
Pro Val Gly Ala Val Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser
595 600 605
Ser

<210> 8
<211> 770
<212> PRT
<213> artificial
<220>
<223> Construcción recombinante
<400> 8
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Ser Val Gln Ala Gly Asp
1 5 10 15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Arg Thr Phe Gly Ser Ile
20 25 30
Arg Val Gly Trp Phe Arg Gln Thr Pro Gly Lys Glu Arg Glu Phe Val
35 40 45
Ala Ala Ile Asn Arg Asn Asp Gly Thr Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Val Tyr
65 70 75 80
Met Gln Met Ala Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Ala Gly Leu Gln Tyr Asn Arg Ser Ala Asp Arg Val Pro Val Gly
100 105 110
Ala Val Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser Gly Gly
115 120 125
Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly
130 135 140
Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly
145 150 155 160
Ser Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Ser Val Gln Ala Gly
165 170 175
Asp Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Arg Thr Phe Gly Ser
180 185 190
Ile Arg Val Gly Trp Phe Arg Gln Thr Pro Gly Lys Glu Arg Glu Phe
195 200 205
Val Ala Ala Ile Asn Arg Asn Asp Gly Thr Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser
210 215 220
Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Val
225 230 235 240
Tyr Met Gln Met Ala Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr
245 250 255
Cys Ala Ala Gly Leu Gln Tyr Asn Arg Ser Ala Asp Arg Val Pro Val
260 265 270
Gly Ala Val Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser Gly
275 280 285

```
Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly
    290                 295                 300
Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly
305                 310                 315                 320
Gly Ser Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Ser Val Gln Ala
                325                 330                 335
Gly Asp Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Arg Thr Phe Gly
            340                 345                 350
Ser Ile Arg Val Gly Trp Phe Arg Gln Thr Pro Gly Lys Glu Arg Glu
        355                 360                 365
Phe Val Ala Ala Ile Asn Arg Asn Asp Gly Thr Thr Tyr Tyr Ala Asp
    370                 375                 380
Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr
385                 390                 395                 400
Val Tyr Met Gln Met Ala Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr
                405                 410                 415
Tyr Cys Ala Ala Gly Leu Gln Tyr Asn Arg Ser Ala Asp Arg Val Pro
            420                 425                 430
Val Gly Ala Val Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser
        435                 440                 445
Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
    450                 455                 460
Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly
465                 470                 475                 480
```

Gly Gly Ser Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Ser Val Gln
485 490 495
Ala Gly Asp Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Arg Thr Phe
500 505 510
Gly Ser Ile Arg Val Gly Trp Phe Arg Gln Thr Pro Gly Lys Glu Arg
515 520 525
Glu Phe Val Ala Ala Ile Asn Arg Asn Asp Gly Thr Thr Tyr Tyr Ala
530 535 540
Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn
545 550 555 560
Thr Val Tyr Met Gln Met Ala Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Val
565 570 575
Tyr Tyr Cys Ala Ala Gly Leu Gln Tyr Asn Arg Ser Ala Asp Arg Val
580 585 590
Pro Val Gly Ala Val Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser
595 600 605
Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
610 615 620
Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
625 630 635 640
Gly Gly Gly Ser Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Ser Val
645 650 655
Gln Ala Gly Asp Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Arg Thr
660 665 670

Phe Gly Ser Ile Arg Val Gly Trp Phe Arg Gln Thr Pro Gly Lys Glu
675 680 685
Arg Glu Phe Val Ala Ala Ile Asn Arg Asn Asp Gly Thr Thr Tyr Tyr
690 695 700
Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys
705 710 715 720
Asn Thr Val Tyr Met Gln Met Ala Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala
725 730 735
Val Tyr Tyr Cys Ala Ala Gly Leu Gln Tyr Asn Arg Ser Ala Asp Arg
740 745 750
Val Pro Val Gly Ala Val Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val
755 760 765
Ser Ser
770

<210> 9
<211> 442
<212> PRT
<213> artificial
<220>
<223> Construcción recombinante
<400> 9
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Ala Gly Gly
1 5 10 15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Arg Thr Phe Ser Asn Tyr
20 25 30

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

Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Val Tyr Leu
225 230 235 240
Gln Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
245 250 255
Ala Ala Gly Ser Phe Ser Leu Gly Gly Arg Pro Tyr Gly Asp Asp Tyr
260 265 270
Trp Gly Lys Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser
275 280 285
Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
290 295 300
Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Glu Val
305 310 315 320
Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Ala Gly Gly Ser Leu
325 330 335
Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Arg Thr Phe Ser Asn Tyr Ala Met
340 345 350
Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg Glu Phe Val Ala Ala
355 360 365
Leu Asn Trp Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Val Asp Ser Val Lys Gly
370 375 380
Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Val Tyr Leu Gln
385 390 395 400
Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Ala
405 410 415

Ala Gly Ser Phe Ser Leu Gly Gly Arg Pro Tyr Gly Asp Asp Tyr Trp
420 425 430

Gly Lys Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
435 440

<210> 10

<211> 601

<212> PRT

<213> artificial

<220>

<223> Construcción recombinante

<400> 10

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

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

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

Ala Ala Leu Asn Trp Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Val Asp Ser Val
50 55 60

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

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

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

```
Tyr Trp Gly Lys Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly
        115                 120                 125
Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
    130                 135                 140
Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Glu
145                 150                 155                 160
Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Ala Gly Gly Ser
                165                 170                 175
Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Arg Thr Phe Ser Asn Tyr Ala
            180                 185                 190
Met Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg Glu Phe Val Ala
        195                 200                 205
Ala Leu Asn Trp Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Val Asp Ser Val Lys
    210                 215                 220
Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Val Tyr Leu
225                 230                 235                 240
Gln Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
                245                 250                 255
Ala Ala Gly Ser Phe Ser Leu Gly Gly Arg Pro Tyr Gly Asp Asp Tyr
            260                 265                 270
Trp Gly Lys Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser
        275                 280                 285
Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
    290                 295                 300
```

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Glu Val
305 310 315 320
Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Ala Gly Gly Ser Leu
325 330 335
Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Arg Thr Phe Ser Asn Tyr Ala Met
340 345 350
Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg Glu Phe Val Ala Ala
355 360 365
Leu Asn Trp Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Val Asp Ser Val Lys Gly
370 375 380
Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Val Tyr Leu Gln
385 390 395 400
Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Ala
405 410 415
Ala Gly Ser Phe Ser Leu Gly Gly Arg Pro Tyr Gly Asp Asp Tyr Trp
420 425 430
Gly Lys Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
435 440 445
Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly
450 455 460
Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Glu Val Gln
465 470 475 480
Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Ala Gly Gly Ser Leu Arg
485 490 495

Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Arg Thr Phe Ser Asn Tyr Ala Met Gly
500 505 510

Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg Glu Phe Val Ala Ala Leu
515 520 525

Asn Trp Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Val Asp Ser Val Lys Gly Arg
530 535 540

Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Val Tyr Leu Gln Met
545 550 555 560

Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Ala Ala
565 570 575

Gly Ser Phe Ser Leu Gly Gly Arg Pro Tyr Gly Asp Asp Tyr Trp Gly
580 585 590

Lys Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
595 600

<210> 11

<211> 760

<212> PRT

<213> artificial

<220>

<223> Construcción recombinante

<400> 11

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

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

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

Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Val Tyr Leu
225 230 235 240
Gln Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
245 250 255
Ala Ala Gly Ser Phe Ser Leu Gly Gly Arg Pro Tyr Gly Asp Asp Tyr
260 265 270
Trp Gly Lys Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser
275 280 285
Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
290 295 300
Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Glu Val
305 310 315 320
Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Ala Gly Gly Ser Leu
325 330 335
Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Arg Thr Phe Ser Asn Tyr Ala Met
340 345 350
Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg Glu Phe Val Ala Ala
355 360 365
Leu Asn Trp Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Val Asp Ser Val Lys Gly
370 375 380
Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Val Tyr Leu Gln
385 390 395 400
Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Ala
405 410 415

Ala Gly Ser Phe Ser Leu Gly Gly Arg Pro Tyr Gly Asp Asp Tyr Trp
420 425 430
Gly Lys Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
435 440 445
Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly
450 455 460
Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Glu Val Gln
465 470 475 480
Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Ala Gly Gly Ser Leu Arg
485 490 495
Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Arg Thr Phe Ser Asn Tyr Ala Met Gly
500 505 510
Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg Glu Phe Val Ala Ala Leu
515 520 525
Asn Trp Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Val Asp Ser Val Lys Gly Arg
530 535 540
Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Val Tyr Leu Gln Met
545 550 555 560
Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Ala Ala
565 570 575
Gly Ser Phe Ser Leu Gly Gly Arg Pro Tyr Gly Asp Asp Tyr Trp Gly
580 585 590
Lys Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly
595 600 605

Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly
610 615 620
Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Glu Val Gln Leu
625 630 635 640
Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Ala Gly Gly Ser Leu Arg Leu
645 650 655
Ser Cys Ala Ala Ser Gly Arg Thr Phe Ser Asn Tyr Ala Met Gly Trp
660 665 670
Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg Glu Phe Val Ala Ala Leu Asn
675 680 685
Trp Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Val Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe
690 695 700
Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Val Tyr Leu Gln Met Asn
705 710 715 720
Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Ala Ala Gly
725 730 735
Ser Phe Ser Leu Gly Gly Arg Pro Tyr Gly Asp Asp Tyr Trp Gly Lys
740 745 750
Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
755 760

<210> 12

<211> 396

<212> PRT

<213> artificial

<220>

<223> Construcción recombinante

<400> 12

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

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

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

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

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

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

Ala Lys Ala Glu Gly Pro Pro Thr Phe Ser Leu Ile Arg Thr Met Thr
100 105 110

Val Asp Pro Gly Ala Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser Gly Gly
115 120 125

Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly
130 135 140

Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser
145 150 155 160

Gly Phe Thr Phe Ser Arg Tyr Trp Met Tyr Trp Val Arg Gln Ala Pro
165 170 175

Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ser Ala Ile Asn Ser Gly Gly Gly Asp
180 185 190
Thr Tyr Tyr Arg Asp Ser Val Arg Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp
195 200 205
Asn Phe Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Ser Glu
210 215 220
Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Lys Ala Glu Gly Pro Pro Thr Phe
225 230 235 240
Ser Leu Ile Arg Thr Met Thr Val Asp Pro Gly Ala Gln Gly Thr Gln
245 250 255
Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Glu Val
260 265 270
Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu
275 280 285
Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Arg Tyr Trp Met
290 295 300
Tyr Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ser Ala
305 310 315 320
Ile Asn Ser Gly Gly Gly Asp Thr Tyr Tyr Arg Asp Ser Val Arg Gly
325 330 335
Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Phe Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln
340 345 350
Met Asn Ser Leu Lys Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Lys
355 360 365

Ala Glu Gly Pro Pro Thr Phe Ser Leu Ile Arg Thr Met Thr Val Asp
370 375 380
Pro Gly Ala Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser
385 390 395

<210> 13
<211> 418
<212> PRT
<213> artificial
<220>
<223> Construcción recombinante
<400> 13

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

Val Asp Pro Gly Ala Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser Gly Gly
115 120 125
Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly
130 135 140
Gly Ser Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro
145 150 155 160
Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser
165 170 175
Arg Tyr Trp Met Tyr Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu
180 185 190
Trp Val Ser Ala Ile Asn Ser Gly Gly Gly Asp Thr Tyr Tyr Arg Asp
195 200 205
Ser Val Arg Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Phe Lys Asn Thr
210 215 220
Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr
225 230 235 240
Tyr Cys Ala Lys Ala Glu Gly Pro Pro Thr Phe Ser Leu Ile Arg Thr
245 250 255
Met Thr Val Asp Pro Gly Ala Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser
260 265 270
Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
275 280 285
Gly Gly Gly Ser Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val
290 295 300

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

<210> 14
<211> 448
<212> PRT
<213> artificial
<220>
<223> Construcción recombinante
<400> 14
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

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

```
Val Ser Ala Ile Asn Ser Gly Gly Gly Asp Thr Tyr Tyr Arg Asp Ser
    210                 215                 220
Val Arg Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Phe Lys Asn Thr Leu
225                 230                 235                 240
Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr
                245                 250                 255
Cys Ala Lys Ala Glu Gly Pro Pro Thr Phe Ser Leu Ile Arg Thr Met
            260                 265                 270
Thr Val Asp Pro Gly Ala Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser Gly
        275                 280                 285
Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly
    290                 295                 300
Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly
305                 310                 315                 320
Gly Ser Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro
                325                 330                 335
Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser
            340                 345                 350
Arg Tyr Trp Met Tyr Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu
        355                 360                 365
Trp Val Ser Ala Ile Asn Ser Gly Gly Gly Asp Thr Tyr Tyr Arg Asp
    370                 375                 380
Ser Val Arg Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Phe Lys Asn Thr
385                 390                 395                 400
```

Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr
405 410 415
Tyr Cys Ala Lys Ala Glu Gly Pro Pro Thr Phe Ser Leu Ile Arg Thr
420 425 430
Met Thr Val Asp Pro Gly Ala Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser
435 440 445

<210> 15

<211> 609

<212> PRT

<213> artificial

<220>

<223> Construcción recombinante

<400> 15

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

Ala Lys Ala Glu Gly Pro Pro Thr Phe Ser Leu Ile Arg Thr Met Thr
100 105 110
Val Asp Pro Gly Ala Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser Gly Gly
115 120 125
Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly
130 135 140
Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly
145 150 155 160
Ser Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly
165 170 175
Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Arg
180 185 190
Tyr Trp Met Tyr Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp
195 200 205
Val Ser Ala Ile Asn Ser Gly Gly Gly Asp Thr Tyr Tyr Arg Asp Ser
210 215 220
Val Arg Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Phe Lys Asn Thr Leu
225 230 235 240
Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr
245 250 255
Cys Ala Lys Ala Glu Gly Pro Pro Thr Phe Ser Leu Ile Arg Thr Met
260 265 270
Thr Val Asp Pro Gly Ala Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser Gly
275 280 285

```
Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly
    290                 295                 300
Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly
305                 310                 315                 320
Gly Ser Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro
                325                 330                 335
Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser
            340                 345                 350
Arg Tyr Trp Met Tyr Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu
        355                 360                 365
Trp Val Ser Ala Ile Asn Ser Gly Gly Gly Asp Thr Tyr Tyr Arg Asp
    370                 375                 380
Ser Val Arg Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Phe Lys Asn Thr
385                 390                 395                 400
Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr
                405                 410                 415
Tyr Cys Ala Lys Ala Glu Gly Pro Pro Thr Phe Ser Leu Ile Arg Thr
            420                 425                 430
Met Thr Val Asp Pro Gly Ala Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser
        435                 440                 445
Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
    450                 455                 460
Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly
465                 470                 475                 480
```

Gly Gly Ser Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln
485 490 495
Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe
500 505 510
Ser Arg Tyr Trp Met Tyr Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu
515 520 525
Glu Trp Val Ser Ala Ile Asn Ser Gly Gly Gly Asp Thr Tyr Tyr Arg
530 535 540
Asp Ser Val Arg Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Phe Lys Asn
545 550 555 560
Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Ser Glu Asp Thr Ala Val
565 570 575
Tyr Tyr Cys Ala Lys Ala Glu Gly Pro Pro Thr Phe Ser Leu Ile Arg
580 585 590
Thr Met Thr Val Asp Pro Gly Ala Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser
595 600 605
Ser

<210> 16
<211> 770
<212> PRT
<213> artificial
<220>
<223> Construcción recombinante

<400> 16

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

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

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

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

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

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

Ala Lys Ala Glu Gly Pro Pro Thr Phe Ser Leu Ile Arg Thr Met Thr
100 105 110

Val Asp Pro Gly Ala Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser Gly Gly
115 120 125

Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly
130 135 140

Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly
145 150 155 160

Ser Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly
165 170 175

Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Arg
180 185 190

```
Tyr Trp Met Tyr Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp
        195                 200                 205
Val Ser Ala Ile Asn Ser Gly Gly Gly Asp Thr Tyr Tyr Arg Asp Ser
    210                 215                 220
Val Arg Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Phe Lys Asn Thr Leu
225                 230                 235                 240
Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr
                245                 250                 255
Cys Ala Lys Ala Glu Gly Pro Pro Thr Phe Ser Leu Ile Arg Thr Met
            260                 265                 270
Thr Val Asp Pro Gly Ala Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser Gly
        275                 280                 285
Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly
    290                 295                 300
Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly
305                 310                 315                 320
Gly Ser Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro
                325                 330                 335
Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser
            340                 345                 350
Arg Tyr Trp Met Tyr Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu
        355                 360                 365
Trp Val Ser Ala Ile Asn Ser Gly Gly Gly Asp Thr Tyr Tyr Arg Asp
    370                 375                 380
```

```
Ser Val Arg Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Phe Lys Asn Thr
385                 390                 395                 400
Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr
                405                 410                 415
Tyr Cys Ala Lys Ala Glu Gly Pro Pro Thr Phe Ser Leu Ile Arg Thr
            420                 425                 430
Met Thr Val Asp Pro Gly Ala Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser
        435                 440                 445
Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
    450                 455                 460
Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly
465                 470                 475                 480
Gly Gly Ser Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln
                485                 490                 495
Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe
            500                 505                 510
Ser Arg Tyr Trp Met Tyr Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu
        515                 520                 525
Glu Trp Val Ser Ala Ile Asn Ser Gly Gly Gly Asp Thr Tyr Tyr Arg
    530                 535                 540
Asp Ser Val Arg Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Phe Lys Asn
545                 550                 555                 560
Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Ser Glu Asp Thr Ala Val
                565                 570                 575
```

Tyr Tyr Cys Ala Lys Ala Glu Gly Pro Pro Thr Phe Ser Leu Ile Arg
580 585 590
Thr Met Thr Val Asp Pro Gly Ala Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser
595 600 605
Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
610 615 620
Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
625 630 635 640
Gly Gly Gly Ser Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val
645 650 655
Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr
660 665 670
Phe Ser Arg Tyr Trp Met Tyr Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly
675 680 685
Leu Glu Trp Val Ser Ala Ile Asn Ser Gly Gly Gly Asp Thr Tyr Tyr
690 695 700
Arg Asp Ser Val Arg Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Phe Lys
705 710 715 720
Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Ser Glu Asp Thr Ala
725 730 735
Val Tyr Tyr Cys Ala Lys Ala Glu Gly Pro Pro Thr Phe Ser Leu Ile
740 745 750
Arg Thr Met Thr Val Asp Pro Gly Ala Gln Gly Thr Gln Val Thr Val
755 760 765

Ser Ser

770

<210> 17

<211> 436

<212> PRT

<213> artificial

<220>

<223> Construcción recombinante

<400> 17

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly

1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Ser Ile Asp Ser Ile Asn

20 25 30

Asn Met Gly Trp Tyr Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gln Arg Glu Leu Val

35 40 45

Ala Glu Ile Thr Pro Arg Gly Arg Thr Asn Tyr Ala Asp Ser Glu Lys

50 55 60

Ser Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Arg Thr Val Asn Leu

65 70 75 80

Gln Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Asn

85 90 95

Ala Glu Val Arg Glu Arg Gly Thr Ser Trp Tyr Arg Pro Asp Tyr Trp

100 105 110

Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly

115 120 125

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly
130 135 140
Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Glu Val Gln
145 150 155 160
Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg
165 170 175
Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Ser Ile Asp Ser Ile Asn Asn Met Gly
180 185 190
Trp Tyr Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gln Arg Glu Leu Val Ala Glu Ile
195 200 205
Thr Pro Arg Gly Arg Thr Asn Tyr Ala Asp Ser Glu Lys Ser Arg Phe
210 215 220
Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Arg Thr Val Asn Leu Gln Met Asn
225 230 235 240
Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Asn Ala Glu Val
245 250 255
Arg Glu Arg Gly Thr Ser Trp Tyr Arg Pro Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
260 265 270
Thr Gln Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly
275 280 285
Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
290 295 300
Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Glu Val Gln Leu Val Glu
305 310 315 320

Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys
325 330 335

Ala Ala Ser Gly Ser Ile Asp Ser Ile Asn Asn Met Gly Trp Tyr Arg
340 345 350

Gln Ala Pro Gly Lys Gln Arg Glu Leu Val Ala Glu Ile Thr Pro Arg
355 360 365

Gly Arg Thr Asn Tyr Ala Asp Ser Glu Lys Ser Arg Phe Thr Ile Ser
370 375 380

Arg Asp Asn Ala Lys Arg Thr Val Asn Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys
385 390 395 400

Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Asn Ala Glu Val Arg Glu Arg
405 410 415

Gly Thr Ser Trp Tyr Arg Pro Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val
420 425 430

Thr Val Ser Ser
435

<210> 18

<211> 593

<212> PRT

<213> artificial

<220>

<223> Construcción recombinante

<400> 18

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

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

```
Thr Pro Arg Gly Arg Thr Asn Tyr Ala Asp Ser Glu Lys Ser Arg Phe
    210                 215                 220
Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Arg Thr Val Asn Leu Gln Met Asn
225                 230                 235                 240
Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Asn Ala Glu Val
                245                 250                 255
Arg Glu Arg Gly Thr Ser Trp Tyr Arg Pro Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
            260                 265                 270
Thr Gln Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly
        275                 280                 285
Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
    290                 295                 300
Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Glu Val Gln Leu Val Glu
305                 310                 315                 320
Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys
                325                 330                 335
Ala Ala Ser Gly Ser Ile Asp Ser Ile Asn Asn Met Gly Trp Tyr Arg
            340                 345                 350
Gln Ala Pro Gly Lys Gln Arg Glu Leu Val Ala Glu Ile Thr Pro Arg
        355                 360                 365
Gly Arg Thr Asn Tyr Ala Asp Ser Glu Lys Ser Arg Phe Thr Ile Ser
    370                 375                 380
Arg Asp Asn Ala Lys Arg Thr Val Asn Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys
385                 390                 395                 400
```

Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Asn Ala Glu Val Arg Glu Arg
405 410 415
Gly Thr Ser Trp Tyr Arg Pro Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val
420 425 430
Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly
435 440 445
Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly
450 455 460
Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly
465 470 475 480
Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser
485 490 495
Gly Ser Ile Asp Ser Ile Asn Asn Met Gly Trp Tyr Arg Gln Ala Pro
500 505 510
Gly Lys Gln Arg Glu Leu Val Ala Glu Ile Thr Pro Arg Gly Arg Thr
515 520 525
Asn Tyr Ala Asp Ser Glu Lys Ser Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn
530 535 540
Ala Lys Arg Thr Val Asn Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp
545 550 555 560
Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Asn Ala Glu Val Arg Glu Arg Gly Thr Ser
565 570 575
Trp Tyr Arg Pro Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser
580 585 590
Ser

<210> 19

<211> 750

<212> PRT

<213> artificial

<220>

<223> Construcción recombinante

<400> 19

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Ser Ile Asp Ser Ile Asn
20 25 30

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

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

Ser Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Arg Thr Val Asn Leu
65 70 75 80

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

Ala Glu Val Arg Glu Arg Gly Thr Ser Trp Tyr Arg Pro Asp Tyr Trp
100 105 110

Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
115 120 125

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly
130 135 140

Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Glu Val Gln
145 150 155 160
Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg
165 170 175
Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Ser Ile Asp Ser Ile Asn Asn Met Gly
180 185 190
Trp Tyr Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gln Arg Glu Leu Val Ala Glu Ile
195 200 205
Thr Pro Arg Gly Arg Thr Asn Tyr Ala Asp Ser Glu Lys Ser Arg Phe
210 215 220
Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Arg Thr Val Asn Leu Gln Met Asn
225 230 235 240
Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Asn Ala Glu Val
245 250 255
Arg Glu Arg Gly Thr Ser Trp Tyr Arg Pro Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
260 265 270
Thr Gln Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly
275 280 285
Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
290 295 300
Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Glu Val Gln Leu Val Glu
305 310 315 320
Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys
325 330 335

Ala Ala Ser Gly Ser Ile Asp Ser Ile Asn Asn Met Gly Trp Tyr Arg
340 345 350

Gln Ala Pro Gly Lys Gln Arg Glu Leu Val Ala Glu Ile Thr Pro Arg
355 360 365

Gly Arg Thr Asn Tyr Ala Asp Ser Glu Lys Ser Arg Phe Thr Ile Ser
370 375 380

Arg Asp Asn Ala Lys Arg Thr Val Asn Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys
385 390 395 400

Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Asn Ala Glu Val Arg Glu Arg
405 410 415

Gly Thr Ser Trp Tyr Arg Pro Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val
420 425 430

Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly
435 440 445

Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly
450 455 460

Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly
465 470 475 480

Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser
485 490 495

Gly Ser Ile Asp Ser Ile Asn Asn Met Gly Trp Tyr Arg Gln Ala Pro
500 505 510

Gly Lys Gln Arg Glu Leu Val Ala Glu Ile Thr Pro Arg Gly Arg Thr
515 520 525

Asn Tyr Ala Asp Ser Glu Lys Ser Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn
530 535 540
Ala Lys Arg Thr Val Asn Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp
545 550 555 560
Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Asn Ala Glu Val Arg Glu Arg Gly Thr Ser
565 570 575
Trp Tyr Arg Pro Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser
580 585 590
Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
595 600 605
Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
610 615 620
Gly Gly Gly Ser Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val
625 630 635 640
Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Ser Ile
645 650 655
Asp Ser Ile Asn Asn Met Gly Trp Tyr Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gln
660 665 670
Arg Glu Leu Val Ala Glu Ile Thr Pro Arg Gly Arg Thr Asn Tyr Ala
675 680 685
Asp Ser Glu Lys Ser Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Arg
690 695 700
Thr Val Asn Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Val
705 710 715 720

Tyr Tyr Cys Asn Ala Glu Val Arg Glu Arg Gly Thr Ser Trp Tyr Arg
725 730 735
Pro Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser
740 745 750

<210> 20
<211> 436
<212> PRT
<213> artificial
<220>
<223> Construcción recombinante
<400> 20

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

```
Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
        115                 120                 125
Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly
    130                 135                 140
Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Glu Val Gln
145                 150                 155                 160
Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg
                165                 170                 175
Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Thr Phe Asp Lys Ile Asn Asn Met Gly
            180                 185                 190
Trp Tyr Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gln Arg Asp Leu Val Ala Gln Ile
        195                 200                 205
Thr Pro Gly Gly Ile Thr Asp Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe
    210                 215                 220
Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asp Thr Met Tyr Leu Gln Met Asn
225                 230                 235                 240
Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Phe Cys Asn Ala Glu Ile
                245                 250                 255
Leu Lys Arg Ala Tyr Ile Asp Val Tyr Val Asn Tyr Trp Gly Gln Gly
            260                 265                 270
Thr Gln Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly
        275                 280                 285
Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
    290                 295                 300
```

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

<210> 21
<211> 593
<212> PRT
<213> artificial
<220>
<223> Construcción recombinante

<400> 21

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

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

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

Ala Gln Ile Thr Pro Gly Gly Ile Thr Asp Tyr Ala Asp Ser Val Lys
50 55 60

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

Gln Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Phe Cys Asn
85 90 95

Ala Glu Ile Leu Lys Arg Ala Tyr Ile Asp Val Tyr Val Asn Tyr Trp
100 105 110

Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
115 120 125

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly
130 135 140

Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Glu Val Gln
145 150 155 160

Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg
165 170 175

Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Thr Phe Asp Lys Ile Asn Asn Met Gly
180 185 190

Trp Tyr Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gln Arg Asp Leu Val Ala Gln Ile
195 200 205
Thr Pro Gly Gly Ile Thr Asp Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe
210 215 220
Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asp Thr Met Tyr Leu Gln Met Asn
225 230 235 240
Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Phe Cys Asn Ala Glu Ile
245 250 255
Leu Lys Arg Ala Tyr Ile Asp Val Tyr Val Asn Tyr Trp Gly Gln Gly
260 265 270
Thr Gln Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly
275 280 285
Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
290 295 300
Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Glu Val Gln Leu Val Glu
305 310 315 320
Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys
325 330 335
Ala Ala Ser Gly Thr Phe Asp Lys Ile Asn Asn Met Gly Trp Tyr Arg
340 345 350
Gln Ala Pro Gly Lys Gln Arg Asp Leu Val Ala Gln Ile Thr Pro Gly
355 360 365
Gly Ile Thr Asp Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser
370 375 380

Arg Asp Asn Ala Lys Asp Thr Met Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys
385 390 395 400
Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Phe Cys Asn Ala Glu Ile Leu Lys Arg
405 410 415
Ala Tyr Ile Asp Val Tyr Val Asn Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val
420 425 430
Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly
435 440 445
Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly
450 455 460
Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly
465 470 475 480
Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser
485 490 495
Gly Thr Phe Asp Lys Ile Asn Asn Met Gly Trp Tyr Arg Gln Ala Pro
500 505 510
Gly Lys Gln Arg Asp Leu Val Ala Gln Ile Thr Pro Gly Gly Ile Thr
515 520 525
Asp Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn
530 535 540
Ala Lys Asp Thr Met Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp
545 550 555 560
Thr Ala Val Tyr Phe Cys Asn Ala Glu Ile Leu Lys Arg Ala Tyr Ile
565 570 575

Asp Val Tyr Val Asn Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser
580 585 590

Ser

<210> 22

<211> 750

<212> PRT

<213> artificial

<220>

<223> Construcción recombinante

<400> 22

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

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

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

Ala Gln Ile Thr Pro Gly Gly Ile Thr Asp Tyr Ala Asp Ser Val Lys
50 55 60

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

Gln Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Phe Cys Asn
85 90 95

Ala Glu Ile Leu Lys Arg Ala Tyr Ile Asp Val Tyr Val Asn Tyr Trp
100 105 110

Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
115 120 125
Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly
130 135 140
Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Glu Val Gln
145 150 155 160
Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg
165 170 175
Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Thr Phe Asp Lys Ile Asn Asn Met Gly
180 185 190
Trp Tyr Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gln Arg Asp Leu Val Ala Gln Ile
195 200 205
Thr Pro Gly Gly Ile Thr Asp Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe
210 215 220
Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asp Thr Met Tyr Leu Gln Met Asn
225 230 235 240
Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Phe Cys Asn Ala Glu Ile
245 250 255
Leu Lys Arg Ala Tyr Ile Asp Val Tyr Val Asn Tyr Trp Gly Gln Gly
260 265 270
Thr Gln Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly
275 280 285
Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
290 295 300

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Glu Val Gln Leu Val Glu
305 310 315 320
Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys
325 330 335
Ala Ala Ser Gly Thr Phe Asp Lys Ile Asn Asn Met Gly Trp Tyr Arg
340 345 350
Gln Ala Pro Gly Lys Gln Arg Asp Leu Val Ala Gln Ile Thr Pro Gly
355 360 365
Gly Ile Thr Asp Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser
370 375 380
Arg Asp Asn Ala Lys Asp Thr Met Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys
385 390 395 400
Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Phe Cys Asn Ala Glu Ile Leu Lys Arg
405 410 415
Ala Tyr Ile Asp Val Tyr Val Asn Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val
420 425 430
Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly
435 440 445
Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly
450 455 460
Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly
465 470 475 480
Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser
485 490 495

Gly Thr Phe Asp Lys Ile Asn Asn Met Gly Trp Tyr Arg Gln Ala Pro
500 505 510
Gly Lys Gln Arg Asp Leu Val Ala Gln Ile Thr Pro Gly Gly Ile Thr
515 520 525
Asp Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn
530 535 540
Ala Lys Asp Thr Met Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp
545 550 555 560
Thr Ala Val Tyr Phe Cys Asn Ala Glu Ile Leu Lys Arg Ala Tyr Ile
565 570 575
Asp Val Tyr Val Asn Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser
580 585 590
Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
595 600 605
Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
610 615 620
Gly Gly Gly Ser Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val
625 630 635 640
Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Thr Phe
645 650 655
Asp Lys Ile Asn Asn Met Gly Trp Tyr Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gln
660 665 670
Arg Asp Leu Val Ala Gln Ile Thr Pro Gly Gly Ile Thr Asp Tyr Ala
675 680 685

Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asp
690 695 700
Thr Met Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Val
705 710 715 720
Tyr Phe Cys Asn Ala Glu Ile Leu Lys Arg Ala Tyr Ile Asp Val Tyr
725 730 735
Val Asn Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser
740 745 750

<210> 23
<211> 35
<212> PRT
<213> artificial
<220>
<223> Construcción recombinante
<400> 23

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
1 5 10 15
Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly
20 25 30
Gly Gly Ser
35

<210> 24
<211> 20
<212> PRT
<213> artificial

<220>

<223> Construcción recombinante

<400> 24

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly

1 5 10 15

Gly Gly Gly Ser

20

<210> 25

<211> 9

<212> PRT

<213> artificial

<220>

<223> Construcción recombinante

<400> 25

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser

1 5

<210> 26

<211> 126

<212> PRT

<213> artificial

<220>

<223> Construcción recombinante

<400> 26

Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly

1 5 10 15

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

<210> 27

<211> 448

<212> PRT

<213> artificial

<220>

<223> Construcción recombinante

<400> 27

Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Arg Thr Phe Gly Ser Ile
20 25 30

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

Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Val
225 230 235 240
Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr
245 250 255
Cys Ala Ala Gly Leu Gln Tyr Asn Arg Ala Ala Asp Arg Val Pro Val
260 265 270
Gly Ala Val Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly
275 280 285
Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly
290 295 300
Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly
305 310 315 320
Gly Ser Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro
325 330 335
Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Arg Thr Phe Gly
340 345 350
Ser Ile Arg Val Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Arg Glu
355 360 365
Phe Val Ser Ala Ile Asn Arg Asn Asp Gly Thr Thr Tyr Tyr Ala Asp
370 375 380
Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr
385 390 395 400
Val Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr
405 410 415

Tyr Cys Ala Ala Gly Leu Gln Tyr Asn Arg Ala Ala Asp Arg Val Pro
420 425 430
Val Gly Ala Val Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
435 440 445

<210> 28
<211> 609
<212> PRT
<213> artificial
<220>
<223> Construcción recombinante
<400> 28

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

```
Ala Val Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly
        115                 120                 125
Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly
    130                 135                 140
Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly
145                 150                 155                 160
Ser Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly
                165                 170                 175
Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Arg Thr Phe Gly Ser
            180                 185                 190
Ile Arg Val Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Arg Glu Phe
        195                 200                 205
Val Ser Ala Ile Asn Arg Asn Asp Gly Thr Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser
    210                 215                 220
Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Val
225                 230                 235                 240
Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr
                245                 250                 255
Cys Ala Ala Gly Leu Gln Tyr Asn Arg Ala Ala Asp Arg Val Pro Val
            260                 265                 270
Gly Ala Val Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly
        275                 280                 285
Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly
    290                 295                 300
```

Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly
305 310 315 320
Gly Ser Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro
325 330 335
Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Arg Thr Phe Gly
340 345 350
Ser Ile Arg Val Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Arg Glu
355 360 365
Phe Val Ser Ala Ile Asn Arg Asn Asp Gly Thr Thr Tyr Tyr Ala Asp
370 375 380
Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr
385 390 395 400
Val Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr
405 410 415
Tyr Cys Ala Ala Gly Leu Gln Tyr Asn Arg Ala Ala Asp Arg Val Pro
420 425 430
Val Gly Ala Val Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
435 440 445
Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
450 455 460
Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly
465 470 475 480
Gly Gly Ser Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln
485 490 495

Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Arg Thr Phe
500 505 510
Gly Ser Ile Arg Val Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Arg
515 520 525
Glu Phe Val Ser Ala Ile Asn Arg Asn Asp Gly Thr Thr Tyr Tyr Ala
530 535 540
Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn
545 550 555 560
Thr Val Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Pro Glu Asp Thr Ala Val
565 570 575
Tyr Tyr Cys Ala Ala Gly Leu Gln Tyr Asn Arg Ala Ala Asp Arg Val
580 585 590
Pro Val Gly Ala Val Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser
595 600 605
Ser

<210> 29
<211> 770
<212> PRT
<213> artificial
<220>
<223> Construcción recombinante
<400> 29
Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

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

```
Val Ser Ala Ile Asn Arg Asn Asp Gly Thr Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser
    210                 215                 220
Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Val
225                 230                 235                 240
Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr
                245                 250                 255
Cys Ala Ala Gly Leu Gln Tyr Asn Arg Ala Ala Asp Arg Val Pro Val
            260                 265                 270
Gly Ala Val Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly
        275                 280                 285
Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly
    290                 295                 300
Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly
305                 310                 315                 320
Gly Ser Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro
                325                 330                 335
Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Arg Thr Phe Gly
            340                 345                 350
Ser Ile Arg Val Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Arg Glu
        355                 360                 365
Phe Val Ser Ala Ile Asn Arg Asn Asp Gly Thr Thr Tyr Tyr Ala Asp
    370                 375                 380
Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr
385                 390                 395                 400
```

Val Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr
405 410 415
Tyr Cys Ala Ala Gly Leu Gln Tyr Asn Arg Ala Ala Asp Arg Val Pro
420 425 430
Val Gly Ala Val Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
435 440 445
Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
450 455 460
Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly
465 470 475 480
Gly Gly Ser Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln
485 490 495
Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Arg Thr Phe
500 505 510
Gly Ser Ile Arg Val Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Arg
515 520 525
Glu Phe Val Ser Ala Ile Asn Arg Asn Asp Gly Thr Thr Tyr Tyr Ala
530 535 540
Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn
545 550 555 560
Thr Val Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Pro Glu Asp Thr Ala Val
565 570 575
Tyr Tyr Cys Ala Ala Gly Leu Gln Tyr Asn Arg Ala Ala Asp Arg Val
580 585 590

Pro Val Gly Ala Val Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser
595 600 605
Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
610 615 620
Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
625 630 635 640
Gly Gly Gly Ser Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val
645 650 655
Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Arg Thr
660 665 670
Phe Gly Ser Ile Arg Val Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly
675 680 685
Arg Glu Phe Val Ser Ala Ile Asn Arg Asn Asp Gly Thr Thr Tyr Tyr
690 695 700
Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys
705 710 715 720
Asn Thr Val Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Pro Glu Asp Thr Ala
725 730 735
Val Tyr Tyr Cys Ala Ala Gly Leu Gln Tyr Asn Arg Ala Ala Asp Arg
740 745 750
Val Pro Val Gly Ala Val Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val
755 760 765
Ser Ser
770

<210> 30

<211> 122

<212> PRT

<213> artificial

<220>

<223> Construcción recombinante

<400> 30

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

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

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

Ala Gln Ile Thr Pro Gly Gly Ile Thr Asp Tyr Ala Asp Ser Val Lys
50 55 60

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

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

Ala Glu Ile Leu Lys Arg Ala Tyr Ile Asp Val Tyr Val Asn Tyr Trp
100 105 110

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

<210> 31

<211> 436

<212> PRT

<213> artificial

<220>

<223> Construcción recombinante

<400> 31

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

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

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

Ala Gln Ile Thr Pro Gly Gly Ile Thr Asp Tyr Ala Asp Ser Val Lys
50 55 60

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

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

Ala Glu Ile Leu Lys Arg Ala Tyr Ile Asp Val Tyr Val Asn Tyr Trp
100 105 110

Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
115 120 125

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly
130 135 140

Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Glu Val Gln
145 150 155 160

Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg
165 170 175
Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Thr Phe Asp Lys Ile Asn Asn Met Gly
180 185 190
Trp Tyr Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gln Arg Asp Leu Val Ala Gln Ile
195 200 205
Thr Pro Gly Gly Ile Thr Asp Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe
210 215 220
Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn
225 230 235 240
Ser Leu Arg Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Asn Ala Glu Ile
245 250 255
Leu Lys Arg Ala Tyr Ile Asp Val Tyr Val Asn Tyr Trp Gly Gln Gly
260 265 270
Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly
275 280 285
Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
290 295 300
Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Glu Val Gln Leu Leu Glu
305 310 315 320
Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys
325 330 335
Ala Ala Ser Gly Thr Phe Asp Lys Ile Asn Asn Met Gly Trp Tyr Arg
340 345 350

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

<210> 32

<211> 593

<212> PRT

<213> artificial

<220>

<223> Construcción recombinante

<400> 32

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

```
Ala Gln Ile Thr Pro Gly Gly Ile Thr Asp Tyr Ala Asp Ser Val Lys
    50                  55                  60
Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu
65                  70                  75                  80
Gln Met Asn Ser Leu Arg Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Asn
                85                  90                  95
Ala Glu Ile Leu Lys Arg Ala Tyr Ile Asp Val Tyr Val Asn Tyr Trp
            100                 105                 110
Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
        115                 120                 125
Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly
    130                 135                 140
Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Glu Val Gln
145                 150                 155                 160
Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg
                165                 170                 175
Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Thr Phe Asp Lys Ile Asn Asn Met Gly
            180                 185                 190
Trp Tyr Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gln Arg Asp Leu Val Ala Gln Ile
        195                 200                 205
Thr Pro Gly Gly Ile Thr Asp Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe
    210                 215                 220
Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn
225                 230                 235                 240
```

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

Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly
435 440 445
Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly
450 455 460
Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly
465 470 475 480
Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser
485 490 495
Gly Thr Phe Asp Lys Ile Asn Asn Met Gly Trp Tyr Arg Gln Ala Pro
500 505 510
Gly Lys Gln Arg Asp Leu Val Ala Gln Ile Thr Pro Gly Gly Ile Thr
515 520 525
Asp Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn
530 535 540
Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Pro Glu Asp
545 550 555 560
Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Asn Ala Glu Ile Leu Lys Arg Ala Tyr Ile
565 570 575
Asp Val Tyr Val Asn Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser
580 585 590
Ser

<210> 33
<211> 750
<212> PRT

<213> artificial

<220>

<223> Construcción recombinante

<400> 33

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

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

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

Ala Gln Ile Thr Pro Gly Gly Ile Thr Asp Tyr Ala Asp Ser Val Lys
50 55 60

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

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

Ala Glu Ile Leu Lys Arg Ala Tyr Ile Asp Val Tyr Val Asn Tyr Trp
100 105 110

Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
115 120 125

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly
130 135 140

Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Glu Val Gln
145 150 155 160

Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg
165 170 175
Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Thr Phe Asp Lys Ile Asn Asn Met Gly
180 185 190
Trp Tyr Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gln Arg Asp Leu Val Ala Gln Ile
195 200 205
Thr Pro Gly Gly Ile Thr Asp Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe
210 215 220
Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn
225 230 235 240
Ser Leu Arg Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Asn Ala Glu Ile
245 250 255
Leu Lys Arg Ala Tyr Ile Asp Val Tyr Val Asn Tyr Trp Gly Gln Gly
260 265 270
Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly
275 280 285
Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
290 295 300
Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Glu Val Gln Leu Leu Glu
305 310 315 320
Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys
325 330 335
Ala Ala Ser Gly Thr Phe Asp Lys Ile Asn Asn Met Gly Trp Tyr Arg
340 345 350

```
Gln Ala Pro Gly Lys Gln Arg Asp Leu Val Ala Gln Ile Thr Pro Gly
        355                 360                 365
Gly Ile Thr Asp Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser
    370                 375                 380
Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg
385                 390                 395                 400
Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Asn Ala Glu Ile Leu Lys Arg
                405                 410                 415
Ala Tyr Ile Asp Val Tyr Val Asn Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val
            420                 425                 430
Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly
        435                 440                 445
Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly
    450                 455                 460
Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly
465                 470                 475                 480
Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser
                485                 490                 495
Gly Thr Phe Asp Lys Ile Asn Asn Met Gly Trp Tyr Arg Gln Ala Pro
            500                 505                 510
Gly Lys Gln Arg Asp Leu Val Ala Gln Ile Thr Pro Gly Gly Ile Thr
        515                 520                 525
Asp Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn
    530                 535                 540
```

Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Pro Glu Asp
545 550 555 560
Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Asn Ala Glu Ile Leu Lys Arg Ala Tyr Ile
565 570 575
Asp Val Tyr Val Asn Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser
580 585 590
Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
595 600 605
Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
610 615 620
Gly Gly Gly Ser Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val
625 630 635 640
Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Thr Phe
645 650 655
Asp Lys Ile Asn Asn Met Gly Trp Tyr Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gln
660 665 670
Arg Asp Leu Val Ala Gln Ile Thr Pro Gly Gly Ile Thr Asp Tyr Ala
675 680 685
Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn
690 695 700
Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Pro Glu Asp Thr Ala Val
705 710 715 720
Tyr Tyr Cys Asn Ala Glu Ile Leu Lys Arg Ala Tyr Ile Asp Val Tyr
725 730 735

Val Asn Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

740 745 750

<210> 34

<211> 30

<212> PRT

<213> artificial

<220>

<223> Construcción recombinante

<400> 34

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Ala Gly Gly

1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Arg Thr Phe Ser

20 25 30

<210> 35

<211> 30

<212> PRT

<213> artificial

<220>

<223> Construcción recombinante

<400> 35

Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly

1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Arg Thr Phe Gly

20 25 30

<210> 36

<211> 30

<212> PRT

<213> artificial

<220>

<223> Construcción recombinante

<400> 36

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Ser Val Gln Ala Gly Asp

1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Arg Thr Phe Gly

20 25 30

<210> 37

<211> 30

<212> PRT

<213> artificial

<220>

<223> Construcción recombinante

<400> 37

Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly

1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Thr Phe Asp Lys

20 25 30

<210> 38

<211> 30

<212> PRT

<213> artificial

<220>

<223> Construcción recombinante

<400> 38

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly

1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Thr Phe Asp Lys

20 25 30

<210> 39

<211> 30

<212> PRT

<213> artificial

<220>

<223> Construcción recombinante

<400> 39

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly

1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Ser Ile Asp Ser

20 25 30

<210> 40

<211> 30

<212> PRT

<213> artificial

<220>

<223> Construcción recombinante

<400> 40

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly

1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser

20 25 30

<210> 41

<211> 5

<212> PRT

<213> artificial

<220>

<223> Construcción recombinante

<400> 41

Asn Tyr Ala Met Gly

1 5

<210> 42

<211> 5

<212> PRT

<213> artificial

<220>

<223> Construcción recombinante

<400> 42

Ser Ile Arg Val Gly

1 5

<210> 43

<211> 5

<212> PRT

<213> artificial

<220>

<223> Construcción recombinante

<400> 43

Ile Asn Asn Met Gly

1 5

<210> 44

<211> 5

<212> PRT

<213> artificial

<220>

<223> Construcción recombinante

<400> 44

Arg Tyr Trp Met Tyr

1 5

<210> 45

<211> 14

<212> PRT

<213> artificial

<220>

<223> Construcción recombinante

<400> 45

Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg Glu Phe Val Ala

1 5 10

<210> 46

<211> 14

<212> PRT

<213> artificial

<220>

<223> Construcción recombinante

<400> 46

Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Arg Glu Phe Val Ser

1 5 10

<210> 47

<211> 14

<212> PRT

<213> artificial

<220>

<223> Construcción recombinante

<400> 47

Trp Phe Arg Gln Thr Pro Gly Lys Glu Arg Glu Phe Val Ala

1 5 10

<210> 48

<211> 14

<212> PRT

<213> artificial

<220>

<223> Construcción recombinante

<400> 48

Trp Tyr Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gln Arg Asp Leu Val Ala

1 5 10

<210> 49

<211> 14

<212> PRT

<213> artificial

<220>

<223> Construcción recombinante

<400> 49

Trp Tyr Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gln Arg Glu Leu Val Ala

1 5 10

<210> 50

<211> 14

<212> PRT

<213> artificial

<220>

<223> Construcción recombinante

<400> 50

Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ser

1 5 10

<210> 51

<211> 17

<212> PRT

<213> artificial

<220>

<223> Construcción recombinante

<400> 51

Ala Leu Asn Trp Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Val Asp Ser Val Lys

1 5 10 15

Gly

<210> 52

<211> 17

<212> PRT

<213> artificial

<220>

<223> Construcción recombinante

<400> 52

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

1 5 10 15

Gly

<210> 53

<211> 16

<212> PRT

<213> artificial

<220>

<223> Construcción recombinante

<400> 53

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

<210> 54

<211> 16

<212> PRT

<213> artificial

<220>

<223> Construcción recombinante

<400> 54

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

<210> 55

<211> 17

<212> PRT

<213> artificial

<220>

<223> Construcción recombinante

<400> 55

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

Gly

<210> 56

<211> 32

<212> PRT

<213> artificial

<220>

<223> Construcción recombinante

<400> 56

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

Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Ala
20 25 30

<210> 57

<211> 32

<212> PRT

<213> artificial

<220>

<223> Construcción recombinante

<400> 57

Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Val Tyr Leu Gln
1 5 10 15

Met Asn Ser Leu Arg Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Ala
20 25 30

<210> 58

<211> 32

<212> PRT

<213> artificial

<220>

<223> Construcción recombinante

<400> 58

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

Met Ala Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Ala
20 25 30

<210> 59

<211> 32

<212> PRT

<213> artificial

<220>

<223> Construcción recombinante

<400> 59

Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln
1 5 10 15

Met Asn Ser Leu Arg Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Asn Ala
20 25 30

<210> 60

<211> 32

<212> PRT

<213> artificial

<220>

<223> Construcción recombinante

<400> 60

Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asp Thr Met Tyr Leu Gln
1 5 10 15

Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Phe Cys Asn Ala
20 25 30

<210> 61

<211> 32

<212> PRT

<213> artificial

<220>

<223> Construcción recombinante

<400> 61

Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Arg Thr Val Asn Leu Gln
1 5 10 15

Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Asn Ala
20 25 30

<210> 62

<211> 32

<212> PRT

<213> artificial

<220>

<223> Construcción recombinante

<400> 62

Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Phe Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln
1 5 10 15

Met Asn Ser Leu Lys Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Lys

20 25 30

<210> 63

<211> 15

<212> PRT

<213> artificial

<220>

<223> Construcción recombinante

<400> 63

Ala Gly Ser Phe Ser Leu Gly Gly Arg Pro Tyr Gly Asp Asp Tyr

1 5 10 15

<210> 64

<211> 17

<212> PRT

<213> artificial

<220>

<223> Construcción recombinante

<400> 64

Gly Leu Gln Tyr Asn Arg Ala Ala Asp Arg Val Pro Val Gly Ala Val

1 5 10 15

Tyr

<210> 65

<211> 17

<212> PRT

<213> artificial

<220>

<223> Construcción recombinante

<400> 65

Gly Leu Gln Tyr Asn Arg Ser Ala Asp Arg Val Pro Val Gly Ala Val

1 5 10 15

Tyr

<210> 66

<211> 14

<212> PRT

<213> artificial

<220>

<223> Construcción recombinante

<400> 66

Glu Ile Leu Lys Arg Ala Tyr Ile Asp Val Tyr Val Asn Tyr

1 5 10

<210> 67

<211> 14

<212> PRT

<213> artificial

<220>

<223> Construcción recombinante

<400> 67

Glu Val Arg Glu Arg Gly Thr Ser Trp Tyr Arg Pro Asp Tyr

1 5 10

<210> 68

<211> 17

<212> PRT

<213> artificial

<220>

<223> Construcción recombinante

<400> 68

Ala Glu Gly Pro Pro Thr Phe Ser Leu Ile Arg Thr Met Thr Val Asp

1 5 10 15

Pro

<210> 69

<211> 11

<212> PRT

<213> artificial

<220>

<223> Construcción recombinante

<400> 69

Trp Gly Lys Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

1 5 10

<210> 70

<211> 11

<212> PRT

<213> artificial

<220>

<223> Construcción recombinante

<400> 70

Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

1 5 10

<210> 71

<211> 11

<212> PRT

<213> artificial

<220>

<223> Construcción recombinante

<400> 71

Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser

1 5 10

<210> 72

<211> 11

<212> PRT

<213> artificial

<220>

<223> Construcción recombinante

<400> 72

Gly Ala Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser

1 5 10

<210> 73

<211> 21

<212> PRT

<213> artificial

<220>

<223> Construcción recombinante

<400> 73

Gly Gly Cys Thr Gly Ala Gly Cys Thr Gly Gly Gly Thr Gly Gly Thr

1 5 10 15

Cys Cys Thr Gly Gly

20

<210> 74

<211> 21

<212> PRT

<213> artificial

<220>

<223> Construcción recombinante

<400> 74

Gly Gly Cys Thr Gly Ala Gly Thr Thr Thr Gly Gly Thr Gly Gly Thr

1 5 10 15

Cys Cys Thr Gly Gly

20

<210> 75

<211> 23

<212> PRT

<213> artificial

<220>

<223> Construcción recombinante

<400> 75

Gly Gly Thr Ala Cys Gly Thr Gly Cys Thr Gly Thr Thr Gly Ala Ala
1 5 10 15

Cys Thr Gly Thr Thr Cys Cys
20

<210> 76

<211> 55

<212> PRT

<213> artificial

<220>

<223> Construcción recombinante

<400> 76

Cys Ala Thr Thr Thr Gly Ala Gly Thr Thr Gly Gly Cys Cys Thr Ala
1 5 10 15

Gly Cys Cys Gly Gly Cys Cys Ala Thr Gly Gly Cys Ala Gly Ala Gly
20 25 30

Gly Thr Gly Cys Ala Ala Thr Thr Gly Gly Thr Gly Gly Ala Gly Thr
35 40 45

Cys Thr Gly Gly Gly Gly Gly
50 55

<210> 77

<211> 18

<212> PRT

<213> artificial

<220>

<223> Construcción recombinante

<400> 77

Thr Gly Thr Ala Ala Ala Ala Cys Gly Ala Cys Gly Gly Cys Cys Ala

1 5 10 15

Gly Thr

<210> 78

<211> 18

<212> PRT

<213> artificial

<220>

<223> Construcción recombinante

<400> 78

Cys Ala Gly Gly Ala Ala Ala Cys Ala Gly Cys Thr Ala Thr Gly Ala

1 5 10 15

Cys Cys

<210> 79

<211> 88

<212> PRT

<213> artificial

<220>

<223> Construcción recombinante

<400> 79

Thr Cys Ala Gly Thr Ala Ala Cys Cys Thr Gly Gly Ala Thr Cys Cys
1 5 10 15

Cys Cys Cys Gly Cys Cys Ala Cys Cys Gly Cys Thr Gly Cys Cys Thr
20 25 30

Cys Cys Ala Cys Cys Gly Cys Cys Gly Cys Thr Ala Cys Cys Cys Cys
35 40 45

Cys Gly Cys Cys Ala Cys Cys Gly Cys Thr Gly Cys Cys Thr Cys Cys
50 55 60

Ala Cys Cys Gly Cys Cys Thr Gly Ala Gly Gly Ala Gly Ala Cys Gly
65 70 75 80

Gly Thr Gly Ala Cys Cys Thr Gly
85

<210> 80

<211> 84

<212> PRT

<213> artificial

<220>

<223> Construcción recombinante

<400> 80

Ala Gly Gly Thr Thr Ala Cys Thr Gly Ala Gly Gly Ala Thr Cys Cys
1 5 10 15

Gly Gly Cys Gly Gly Thr Gly Gly Ala Gly Gly Cys Ala Gly Cys Gly
20 25 30

Gly Ala Gly Gly Thr Gly Gly Gly Gly Gly Cys Thr Cys Thr Gly Gly

35 40 45

Thr Gly Gly Cys Gly Gly Gly Gly Gly Thr Ala Gly Cys Gly Ala Gly

50 55 60

Gly Thr Gly Cys Ala Gly Cys Thr Gly Gly Thr Gly Gly Ala Gly Thr

65 70 75 80

Cys Thr Gly Gly

<210> 81

<211> 5

<212> PRT

<213> artificial

<220>

<223> Construcción recombinante

<400> 81

Gly Gly Gly Gly Ser

1 5

<210> 82

<211> 4

<212> PRT

<213> artificial

<220>

<223> Construcción recombinante

<400> 82

Gly Gly Gly Ser

1

<210> 83

<211> 22

<212> PRT

<213> artificial

<220>

<223> Construcción recombinante

<400> 83

Cys Thr Gly Ala Thr Cys Ala Cys Cys Cys Ala Ala Cys Ala Ala Gly
1 5 10 15

Ala Cys Cys Thr Ala Gly
20

<210> 84

<211> 21

<212> PRT

<213> artificial

<220>

<223> Construcción recombinante

<400> 84

Gly Cys Cys Thr Gly Ala Gly Ala Gly Ala Gly Ala Ala Cys Ala Gly
1 5 10 15

Gly Gly Ala Gly Ala
20

<210> 85

<211> 28

<212> PRT

<213> artificial

<220>

<223> Construcción recombinante

<400> 85

Cys Ala Cys Cys Ala Thr Gly Gly Ala Ala Cys Ala Ala Cys Gly Gly

1 5 10 15

Gly Gly Ala Cys Ala Gly Ala Ala Cys Gly Cys Cys

20 25

<210> 86

<211> 30

<212> PRT

<213> artificial

<220>

<223> Construcción recombinante

<400> 86

Thr Thr Ala Gly Gly Ala Cys Ala Thr Gly Gly Cys Ala Gly Ala Gly

1 5 10 15

Thr Cys Thr Gly Cys Ala Thr Thr Ala Cys Cys Thr Thr Cys

20 25 30

<210> 87

<211> 122

<212> PRT

<213> artificial

<220>

<223> Construcción recombinante

<400> 87

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

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

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

Ala Gln Ile Thr Pro Gly Gly Ile Thr Asp Tyr Ala Asp Ser Val Lys
50 55 60

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

Gln Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Phe Cys Asn
85 90 95

Ala Glu Ile Leu Lys Arg Ala Tyr Ile Asp Val Tyr Val Asn Tyr Trp
100 105 110

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

<210> 88

<211> 593

<212> PRT

<213> artificial

<220>

<223> Construcción recombinante

<400> 88

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

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

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

Ala Gln Ile Thr Pro Gly Gly Ile Thr Asp Tyr Ala Asp Ser Val Lys
50 55 60

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

Gln Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Phe Cys Asn
85 90 95

Ala Glu Ile Leu Lys Arg Ala Tyr Ile Asp Val Tyr Val Asn Tyr Trp
100 105 110

Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
115 120 125

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly
130 135 140

Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Glu Val Gln
145 150 155 160

Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg
165 170 175

Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Thr Phe Asp Lys Ile Asn Asn Met Gly
180 185 190

```
Trp Tyr Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gln Arg Asp Leu Val Ala Gln Ile
        195                 200                 205
Thr Pro Gly Gly Ile Thr Asp Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe
    210                 215                 220
Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asp Thr Met Tyr Leu Gln Met Asn
225                 230                 235                 240
Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Phe Cys Asn Ala Glu Ile
                245                 250                 255
Leu Lys Arg Ala Tyr Ile Asp Val Tyr Val Asn Tyr Trp Gly Gln Gly
            260                 265                 270
Thr Gln Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly
        275                 280                 285
Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
    290                 295                 300
Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Glu Val Gln Leu Val Glu
305                 310                 315                 320
Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys
                325                 330                 335
Ala Ala Ser Gly Thr Phe Asp Lys Ile Asn Asn Met Gly Trp Tyr Arg
            340                 345                 350
Gln Ala Pro Gly Lys Gln Arg Asp Leu Val Ala Gln Ile Thr Pro Gly
        355                 360                 365
Gly Ile Thr Asp Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser
    370                 375                 380
```

Arg Asp Asn Ala Lys Asp Thr Met Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys
385 390 395 400
Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Phe Cys Asn Ala Glu Ile Leu Lys Arg
405 410 415
Ala Tyr Ile Asp Val Tyr Val Asn Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val
420 425 430
Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly
435 440 445
Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly
450 455 460
Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly
465 470 475 480
Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser
485 490 495
Gly Thr Phe Asp Lys Ile Asn Asn Met Gly Trp Tyr Arg Gln Ala Pro
500 505 510
Gly Lys Gln Arg Asp Leu Val Ala Gln Ile Thr Pro Gly Gly Ile Thr
515 520 525
Asp Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn
530 535 540
Ala Lys Asp Thr Met Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp
545 550 555 560
Thr Ala Val Tyr Phe Cys Asn Ala Glu Ile Leu Lys Arg Ala Tyr Ile
565 570 575

Asp Val Tyr Val Asn Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser
580 585 590

Ser

<210> 89

<211> 440

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 89

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

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

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

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

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

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

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

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

Cys Thr Thr Thr Arg Asn Thr Val Cys Gln Cys Glu Glu Gly Thr Phe
130 135 140
Arg Glu Glu Asp Ser Pro Glu Met Cys Arg Lys Cys Arg Thr Gly Cys
145 150 155 160
Pro Arg Gly Met Val Lys Val Gly Asp Cys Thr Pro Trp Ser Asp Ile
165 170 175
Glu Cys Val His Lys Glu Ser Gly Thr Lys His Ser Gly Glu Ala Pro
180 185 190
Ala Val Glu Glu Thr Val Thr Ser Ser Pro Gly Thr Pro Ala Ser Pro
195 200 205
Cys Ser Leu Ser Gly Ile Ile Ile Gly Val Thr Val Ala Ala Val Val
210 215 220
Leu Ile Val Ala Val Phe Val Cys Lys Ser Leu Leu Trp Lys Lys Val
225 230 235 240
Leu Pro Tyr Leu Lys Gly Ile Cys Ser Gly Gly Gly Gly Asp Pro Glu
245 250 255
Arg Val Asp Arg Ser Ser Gln Arg Pro Gly Ala Glu Asp Asn Val Leu
260 265 270
Asn Glu Ile Val Ser Ile Leu Gln Pro Thr Gln Val Pro Glu Gln Glu
275 280 285
Met Glu Val Gln Glu Pro Ala Glu Pro Thr Gly Val Asn Met Leu Ser
290 295 300
Pro Gly Glu Ser Glu His Leu Leu Glu Pro Ala Glu Ala Glu Arg Ser
305 310 315 320

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

<210> 90

<211> 126

<212> PRT

<213> artificial

<220>

<223> Construcción recombinante

<220>

<221> CARACTERÍSTICAS_VARIAS

<222> (99)..(115)

<223> En donde X es cualquier aminoácido

<400> 90

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

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

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

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

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

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

Ala Lys Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
100 105 110

Xaa Xaa Xaa Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120 125

<210> 91

<211> 11

<212> PRT

<213> artificial

<220>

<223> Construcción recombinante

<400> 91

Glu Gln Lys Leu Ile Ser Glu Glu Asp Leu Asn

1 5 10

<210> 92

<211> 6

<212> PRT

<213> artificial

<220>

<223> Construcción recombinante

<400> 92

His His His His His His

1 5

<210> 93

<211> 23

<212> PRT

<213> artificial

<220>

<223> Construcción recombinante

<400> 93

Ala Ala Ala Glu Gln Lys Leu Ile Ser Glu Glu Asp Leu Asn Gly Ala

1 5 10 15

Ala His His His His His His

20

<210> 94

<211> 23

<212> PRT

<213> artificial

<220>

<223> Construcción recombinante

<400> 94

Gly Ala Ala Glu Gln Lys Leu Ile Ser Glu Glu Asp Leu Asn Gly Ala

1 5 10 15

Ala His His His His His His

20

<210> 95

<211> 4

<212> PRT

<213> artificial

<220>

<223> Construcción recombinante

<400> 95

Gly Gly Gly Cys

1

<210> 96

<211> 378

<212> ADN

<213> artificial

<220>

<223> Construcción recombinante

<400> 96

gaggtgcagc tgctggagtc tggcggcgga ctggtgcagc ctggcggctc cctgagactg 60

tcctgcgccg cctccggccg gaccttcggc tccatcagag tgggctggtt ccggcaggcc 120

cctggcaagg gccgggagtt cgtgtccgcc atcaaccgga acgacggcac cacctactac 180

gccgactccg tgaagggccg gttcaccatc tcccgggaca actccaagaa caccgtgtac 240

ctgcagatga actccctgcg gcccgaggac accgccgtgt actactgcgc cgctggcctg 300

cagtacaaca gagccgccga cagagtgcct gtgggcgctg tgtactgggg ccagggcacc 360

ctggtgaccg tgtcctct 378

<210> 97

<211> 1827

<212> ADN

<213> artificial

<220>

<223> Construcción recombinante

<400> 97

gaggtgcagc tgctggagtc tggcggcgga ctggtgcagc ctggcggctc cctgagactg 60

tcctgcgccg cctccggccg gaccttcggc tccatcagag tgggctggtt ccggcaggcc 120

cctggcaagg gccgggagtt cgtgtccgcc atcaaccgga acgacggcac cacctactac 180

gccgactccg tgaagggccg gttcaccatc tcccgggaca actccaagaa caccgtgtac 240

ctgcagatga actccctgcg gcccgaggac accgccgtgt actactgcgc cgctggcctg 300

cagtacaaca gagccgccga cagagtgcct gtgggcgctg tgtactgggg ccagggcacc 360

ctggtgaccg tgtcctctgg cggcggagga tctggagggg gaggaagcgg cggaggagga 420

tctggcggcg gaggaagtgg gggcggaggg agtggcggag gtggaagtgg tggaggggggc 480

agcgaggtgc agctgctgga gagcggcgga ggactggtgc agccaggcgg atctctgcgc 540

ctgagctgcg ccgccagcgg cagaaccttt ggcagcatcc gcgtgggatg gttcagacag 600

gctcccggaa agggacgcga gtttgtgtct gctatcaatc gcaatgatgg caccacatac 660

tatgctgata gcgtgaaggg aagattcacc atcagccgcg acaatagcaa gaatacagtg 720

tatctgcaga tgaatagcct gcgcccagag gatacagctg tgtattactg tgctgccgga 780

ctgcagtata accgggctgc cgatcgggtg cccgtgggag ccgtgtattg gggacaggga 840

acactggtga cagtgtcctc tggcggcgga ggatctgggg gtggcggatc tggcggcgga 900

ggaagcggtg gcggaggatc tggcggcgga ggaagcggag ggggaggatc tggcggcgga 960

ggatctgagg tgcagctgct ggagtccggc ggaggactgg tgcagccagg cggcagcctg 1020

cggctgtctt gcgccgcttc tggcagaaca ttcggctcta tccgcgtggg ctggtttagg 1080

caggctccag gcaagggacg cgagttcgtg agcgctatca acagaaacga tggcacaacc 1140

tattatgctg attctgtgaa gggcaggttt acaatcagca gggataattc taagaatacc 1200

gtgtacctgc agatgaactc tctgaggcca gaggataccg ctgtgtacta ttgcgctgcc 1260

ggcctgcagt ataatagggc cgctgaccgc gtgccagtgg gcgccgtgta ttggggccag 1320

ggcaccctgg tgacagtgtc ctctggcgga ggtggcagcg gcggtggcgg atctggcggc 1380

ggaggaagtg ggggcggagg atctggcggc ggaggaagcg gcggaggggg atctggcggc 1440

ggaggatctg aggtgcagct gctggagtct ggcggaggac tggtgcagcc tggcggaagc 1500

ctgagactga gctgtgctgc ttctggccgc accttcggaa gcatcagagt gggatggttt 1560

cgccaggctc caggaaaggg ccgggagttc gtctctgcta tcaatagaaa tgacggaaca 1620

acatattacg ccgacagcgt gaagggacgc tttacaatct ctagggataa cagcaagaac 1680

accgtgtatc tgcagatgaa cagcctgcgg cccgaggata ccgccgtgta ttattgtgcc 1740

gctggactgc agtacaatcg ggccgctgat agagtgcctg tgggagccgt gtactggggc 1800

cagggcacac tggtgacagt gtctagc 1827

<210> 98

<211> 366

<212> ADN

<213> artificial

<220>

<223> Construcción recombinante

<400> 98

gaggtgcagc tgctggagtc tggcggcgga ctggtgcagc ctggcggctc cctgagactg 60

tcctgcgccg cctccggcac cttcgacaag atcaacaaca tgggctggta caggcaggcc 120

cctggcaagc agagggacct ggtggcccag atcacccctg gcggcatcac cgactacgcc 180

gactccgtga agggccggtt caccatctcc cgggacaact ccaagaacac cctgtacctg 240

cagatgaact ccctgcggcc cgaggacacc gccgtgtact actgcaacgc cgagatcctg 300

aagcgggcct acatcgacgt gtacgtgaac tactggggcc agggcaccct ggtgaccgtg 360

tcctct 366

<210> 99

<211> 1779

<212> ADN

<213> artificial

<220>

<223> Construcción recombinante

<400> 99

gaggtgcagc tgctggagtc tggcggcgga ctggtgcagc ctggcggctc cctgagactg 60

tcctgcgccg cctccggcac cttcgacaag atcaacaaca tgggctggta caggcaggcc 120

cctggcaagc agagggacct ggtggcccag atcacccctg gcggcatcac cgactacgcc 180

gactccgtga agggccggtt caccatctcc cgggacaact ccaagaacac cctgtacctg 240

cagatgaact ccctgcggcc cgaggacacc gccgtgtact actgcaacgc cgagatcctg 300

aagcgggcct acatcgacgt gtacgtgaac tactggggcc agggcaccct ggtgaccgtg 360

tcctctggcg gcggaggatc tggaggggga ggaagcggcg gaggaggatc tggcggcgga 420

ggaagtgggg gcggagggag tggcggaggt ggaagtggtg gaggggggcag cgaggtgcag 480

ctgctggaga gcggcggagg actggtgcag ccaggcggat ctctgcgcct gagctgcgcc 540

gccagcggca catttgataa gatcaataat atgggatggt atcgccaggc tccaggcaag 600

cagcgcgatc tggtggctca gatcacacca ggcggaatca cagattatgc cgatagcgtg 660

aagggaagat tcaccatcag ccgcgacaat agcaagaata cactgtatct gcagatgaat 720

agcctgcgcc cagaggatac agctgtgtat tactgtaatg ctgagatcct gaagcgcgct 780

tatatcgatg tgtatgtgaa ttattgggga cagggaacac tggtgacagt gtcctctggc 840

ggcggaggat ctgggggtgg cggatctggc ggcggaggaa gcggtggcgg aggatctggc 900

ggcggaggaa gcggaggggg aggatctggc ggcggaggat ctgaggtgca gctgctggag 960

tccggcggag gactggtgca gccaggcggc agcctgcggc tgtcttgcgc cgcttctggc 1020

accttcgata agatcaacaa tatgggatgg tacagacagg ctcccggaaa gcagcgggat 1080

ctggtggccc agatcacccc aggcggcatc acagattacg ctgattctgt gaagggcagg 1140

tttacaatca gcagggataa ttctaagaat accctgtacc tgcagatgaa ctctctgagg 1200

ccagaggata ccgctgtgta ctattgtaac gccgagatcc tgaagagggc ttacatcgat 1260

gtgtacgtga attattgggg ccagggcacc ctggtgacag tgtcctctgg cggaggtggc 1320

agcggcggtg gcggatctgg cggcggagga agtgggggcg gaggatctgg cggcggagga 1380

agcggcggag ggggatctgg cggcggagga tctgaggtgc agctgctgga gtctggcgga 1440

ggactggtgc agcctggcgg aagcctgaga ctgagctgtg ctgcttctgg caccttcgac 1500

aagatcaata atatgggctg gtatagacag gccccaggaa agcagaggga cctggtcgct 1560

cagatcacac ccggcggaat caccgactac gctgacagcg tgaagggacg ctttacaatc 1620

tctagggata acagcaagaa caccctgtat ctgcagatga acagcctgcg gcccgaggat 1680

accgccgtgt attattgcaa tgctgagatc ctgaagaggg cctatatcga cgtgtatgtg 1740

aattactggg gccagggcac actggtgaca gtgtcctct 1779

<210> 100

<211> 188

<212> PRT

<213> artificial

<220>

<223> Construcción recombinante

<400> 100

Met Val Ser Ala Ile Val Leu Tyr Val Leu Leu Ala Ala Ala Ala His
1 5 10 15

Ser Ala Phe Ala Ala Asp Leu Gly Ser Leu Glu Val Leu Phe Gln Ala
20 25 30

Leu Ile Thr Gln Gln Asp Leu Ala Pro Gln Gln Arg Ala Ala Pro Gln
35 40 45

Gln Lys Arg Ser Ser Pro Ser Glu Gly Leu Cys Pro Pro Gly His His
50 55 60

Ile Ser Glu Asp Gly Arg Asp Cys Ile Ser Cys Lys Tyr Gly Gln Asp
65 70 75 80

Tyr Ser Thr His Trp Asn Asp Leu Leu Phe Cys Leu Arg Cys Thr Arg
85 90 95

Cys Asp Ser Gly Glu Val Glu Leu Ser Pro Cys Thr Thr Thr Arg Asn
100 105 110

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

Glu Met Cys Arg Lys Cys Arg Thr Gly Cys Pro Arg Gly Met Val Lys
130 135 140

Val Gly Asp Cys Thr Pro Trp Ser Asp Ile Glu Cys Val His Lys Glu
145 150 155 160

Ser Ala Ala Ala Leu Glu Val Leu Phe Gln Gly Pro Ser Ser Gly Lys
165 170 175

Leu Gly His His His His His His His His His His
180 185

<210> 101

<211> 186

<212> PRT

<213> artificial

<220>

<223> Construcción recombinante

<400> 101

Met Val Ser Ala Ile Val Leu Tyr Val Leu Leu Ala Ala Ala Ala His
1 5 10 15

Ser Ala Phe Ala Ala Asp Leu Gly Ser Leu Glu Val Leu Phe Gln Gly
20 25 30

Pro Ser Met Ala Leu Ala Pro Gln Gln Arg Ala Ala Pro Gln Gln Lys
35 40 45

Arg Ser Ser Pro Ser Glu Gly Leu Cys Pro Pro Gly His His Ile Ser
50 55 60

Glu Asp Gly Arg Asp Cys Ile Ser Cys Lys Tyr Gly Gln Asp Tyr Ser
65 70 75 80

Thr His Trp Asn Asp Leu Leu Phe Cys Leu Arg Cys Thr Arg Cys Asp
85 90 95

Ser Gly Glu Val Glu Leu Ser Pro Cys Thr Thr Thr Arg Asn Thr Val
100 105 110

Cys Gln Cys Glu Glu Gly Thr Phe Arg Glu Glu Asp Ser Pro Glu Met
115 120 125
Cys Arg Lys Cys Arg Thr Gly Cys Pro Arg Gly Met Val Lys Val Gly
130 135 140
Asp Cys Thr Pro Trp Ser Asp Ile Glu Cys Val His Lys Glu Ser Ala
145 150 155 160
Ala Ala Leu Glu Val Leu Phe Gln Gly Pro Ser Ser Gly Lys Leu Gly
165 170 175
His His His His His His His His His His
180 185

<210> 102

<211> 166

<212> PRT

<213> artificial

<220>

<223> Construcción recombinante

<400> 102

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

Gln Arg Asp Leu Val Ala Gln Ile Thr Pro Gly Gly Ile Thr Asp Tyr
65 70 75 80
Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys
85 90 95
Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Pro Glu Asp Thr Ala
100 105 110
Val Tyr Tyr Cys Asn Ala Glu Ile Leu Lys Arg Ala Tyr Ile Asp Val
115 120 125
Tyr Val Asn Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala
130 135 140
Ala Ala Glu Gln Lys Leu Ile Ser Glu Glu Asp Leu Asn Gly Ala Ala
145 150 155 160
His His His His His His
165

<210> 103
<211> 153
<212> PRT
<213> artificial
<220>
<223> Construcción recombinante
<400> 103

Met Lys Lys Thr Ala Ile Ala Ile Ala Val Ala Leu Ala Gly Leu Ala
1 5 10 15
Thr Val Ala Gln Ala Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu
20 25 30

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

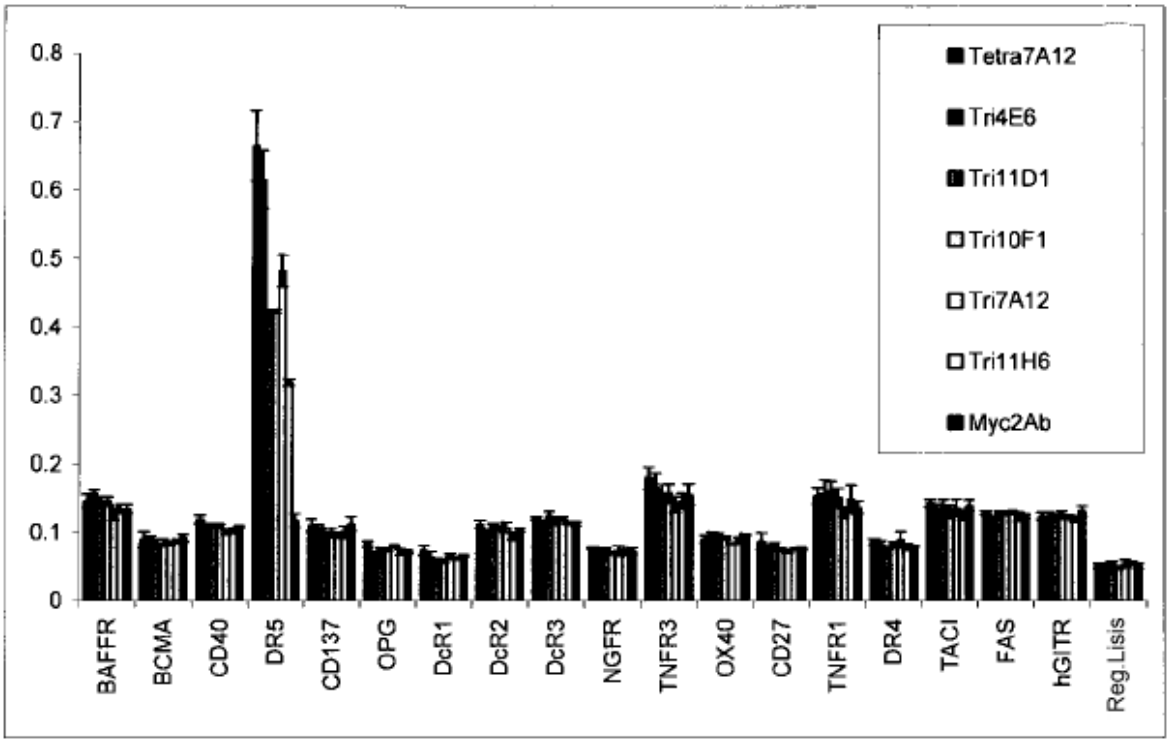

0.8
0.7
0.6
0.5
0.4
0.3
0.2
0.1
0
Tetra7A12
Tri4E6
Tri11D1
Tri10F1
Tri7A12
Tri11H6
Myc2Ab
BAFFR
BCMA
CD40
DR5
CD137
OPG
DcR1
DcR2
DcR3
NGFR
TNFR3
OX40
CD27
TNFR1
DR4
TACI
FAS
hGITR
Reg.Lisis

FIG. 1

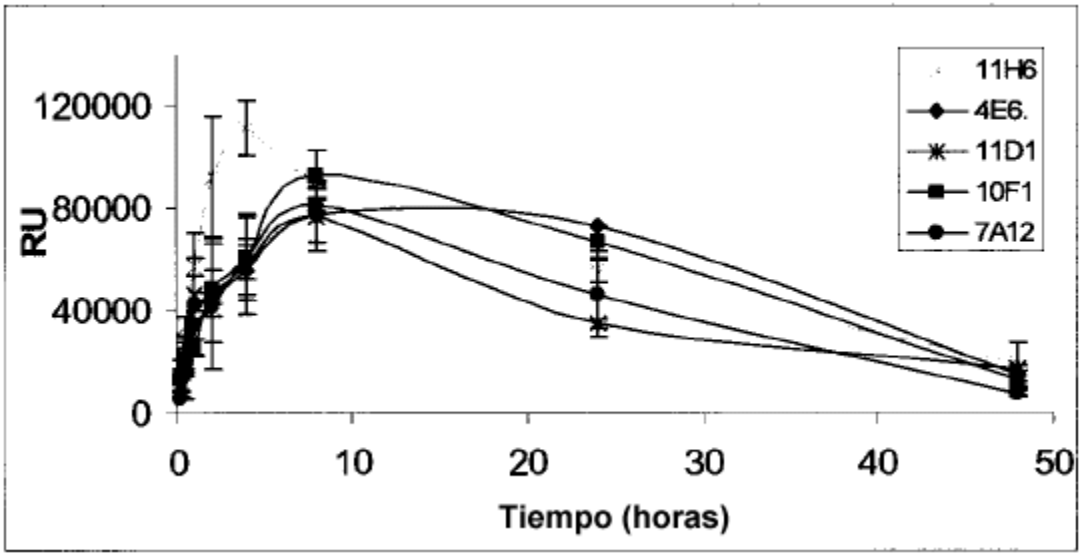

11H6
4E6.
11D1
10F1
7A12
120000
80000
40000
0
RU
0
10
20
30
40
50
Tiempo (horas)

FIG. 2

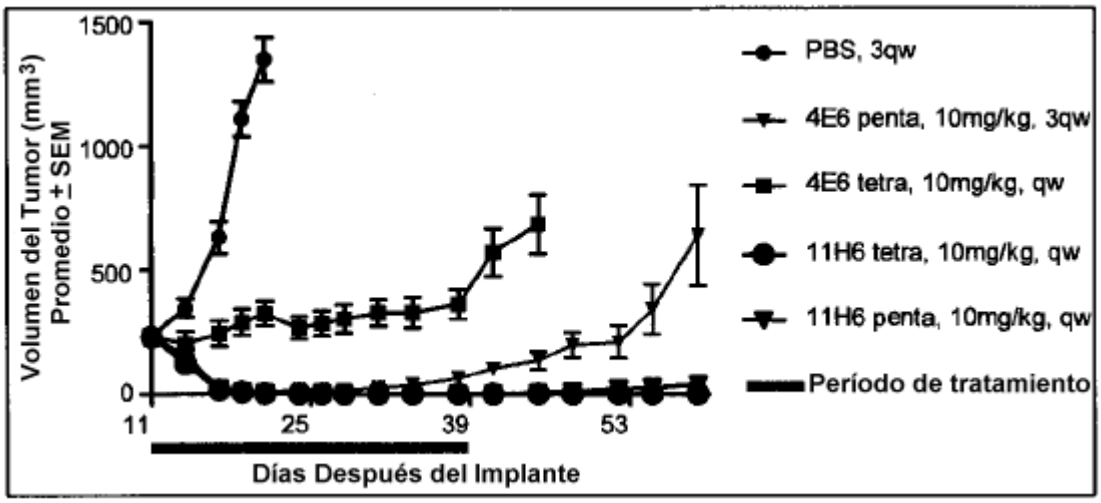

1500
1000
500
0
Volumen del Tumor (mm3)
Promedio ± SEM
11
25
39
53
Días Después del Implante
PBS, 3qw
4E6 penta, 10mg/kg, 3qw
4E6 tetra, 10mg/kg, qw
11H6 tetra, 10mg/kg, qw
11H6 penta, 10mg/kg, qw
Período de tratamiento

FIG. 3

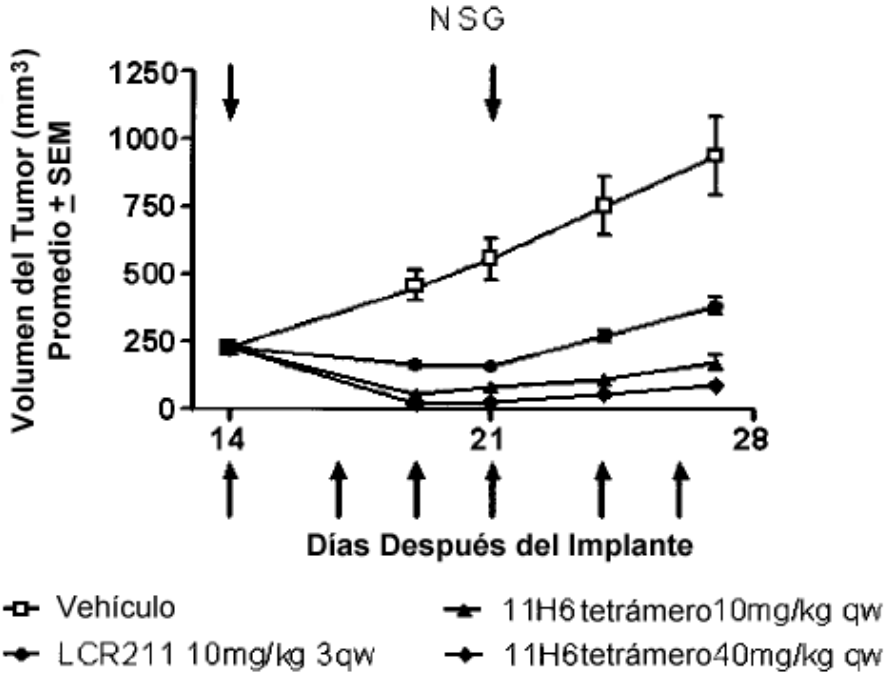

NSG
Volumen del Tumor (mm3)
Promedio ± SEM
1250
1000
750
500
250
0
14
21
28
Días Después del Implante
Vehículo
LCR211 10mg/kg 3qw
11H6tetrámero10mg/kg qw
11H6tetrámero40mg/kg qw

FIG. 4A

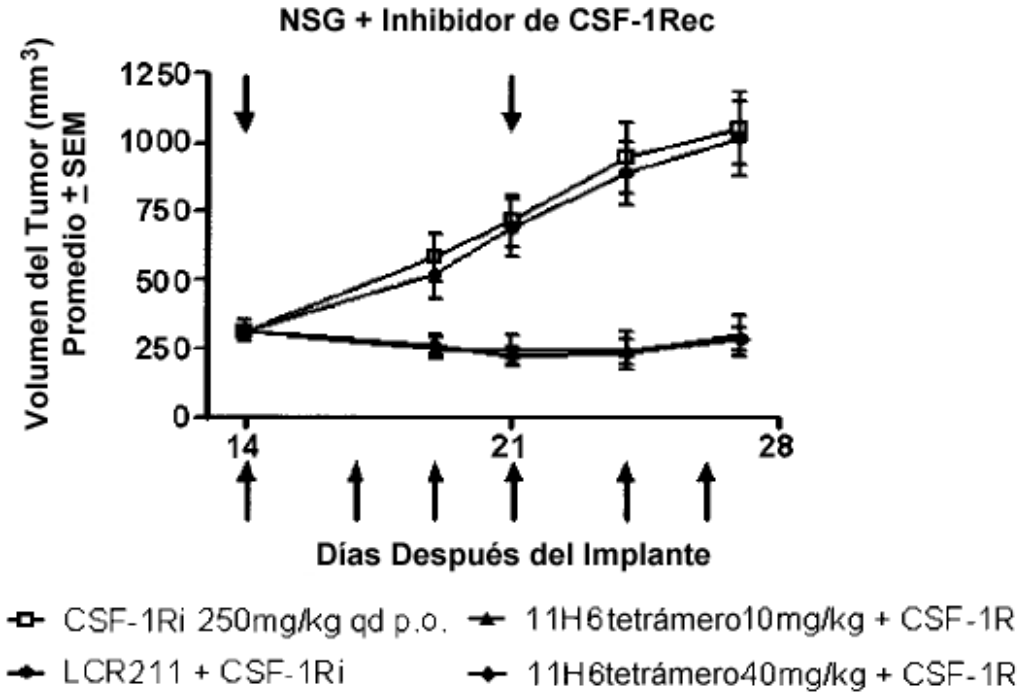

NSG + Inhibidor de CSF-1Rec
Volumen del Tumor (mm3)
Promedio ± SEM
1250
1000
750
500
250
0
14
21
28
Días Después del Implante
CSF-1Ri 250mg/kg qd p.o.
LCR211 + CSF-1Ri
11H6tetrámero10mg/kg + CSF-1R
11H6tetrámero40mg/kg + CSF-1R

FIG. 4B

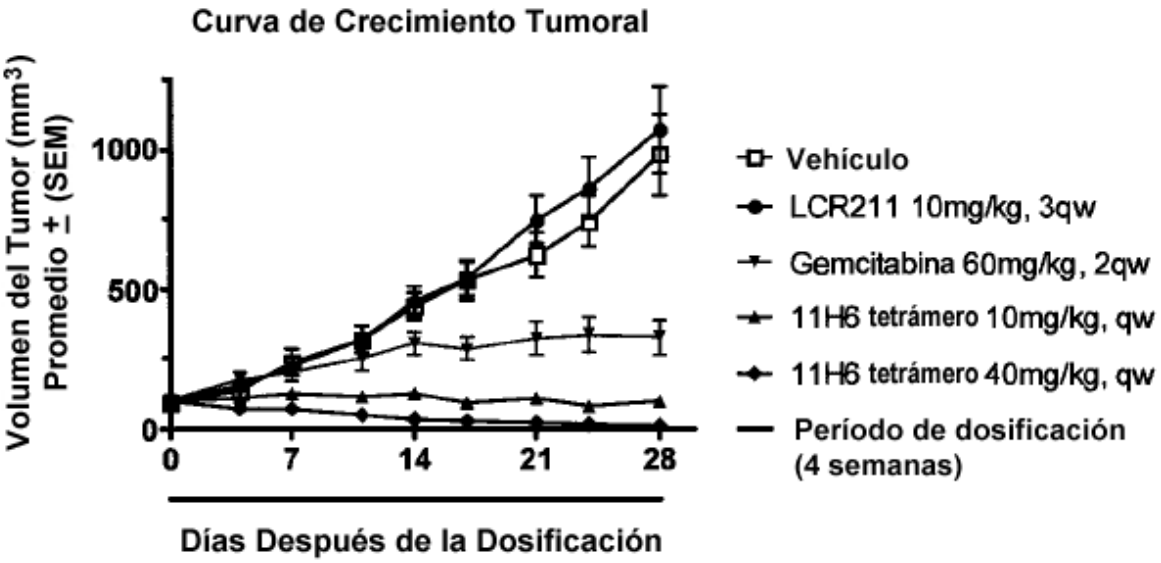

Curva de Crecimiento Tumoral
Volumen del Tumor (mm3)
Promedio ± (SEM)
1000
500
0
0
7
14
21
28
Días Después de la Dosificación
Vehículo
LCR211 10mg/kg, 3qw
Gemcitabina 60mg/kg, 2qw
11H6 tetrámero 10mg/kg, qw
11H6 tetrámero 40mg/kg, qw
Período de dosificación
(4 semanas)

FIG. 5

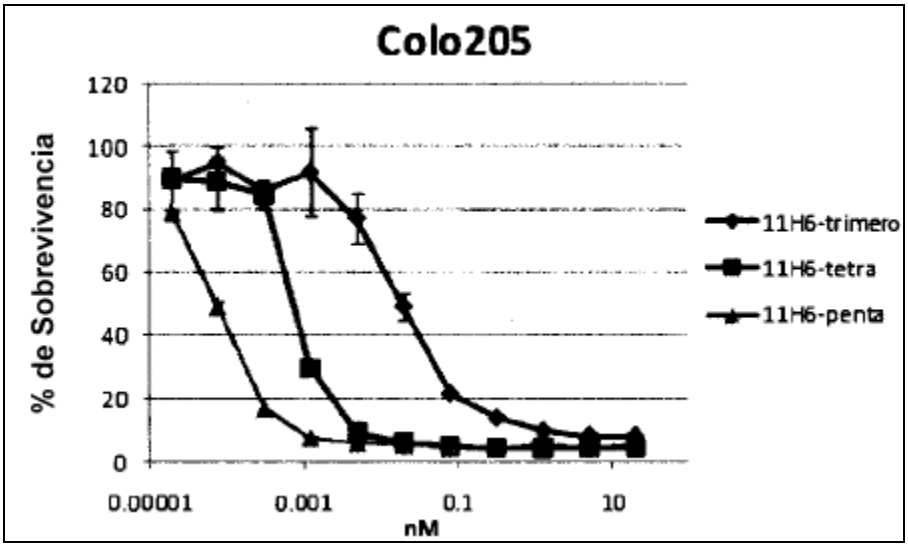

Colo205
% de Sobrevivencia
120
100
80
60
40
20
0
0.00001
0.001
0.1
10
nM
11H6-trimero
11H6-tetra
11H6-penta

FIG. 6A

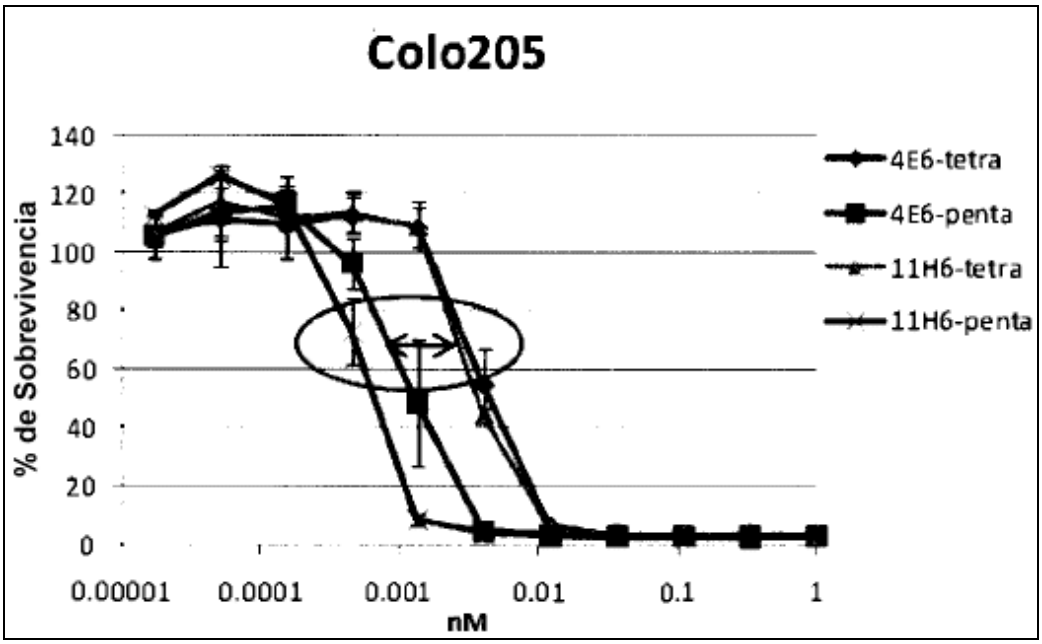

Colo205
% de Sobrevivencia
140
120
100
80
60
40
20
0
0.00001
0.0001
0.001
0.01
0.1
1
nM
4E6-tetra
4E6-penta
11H6-tetra
11H6-penta

FIG. 6B

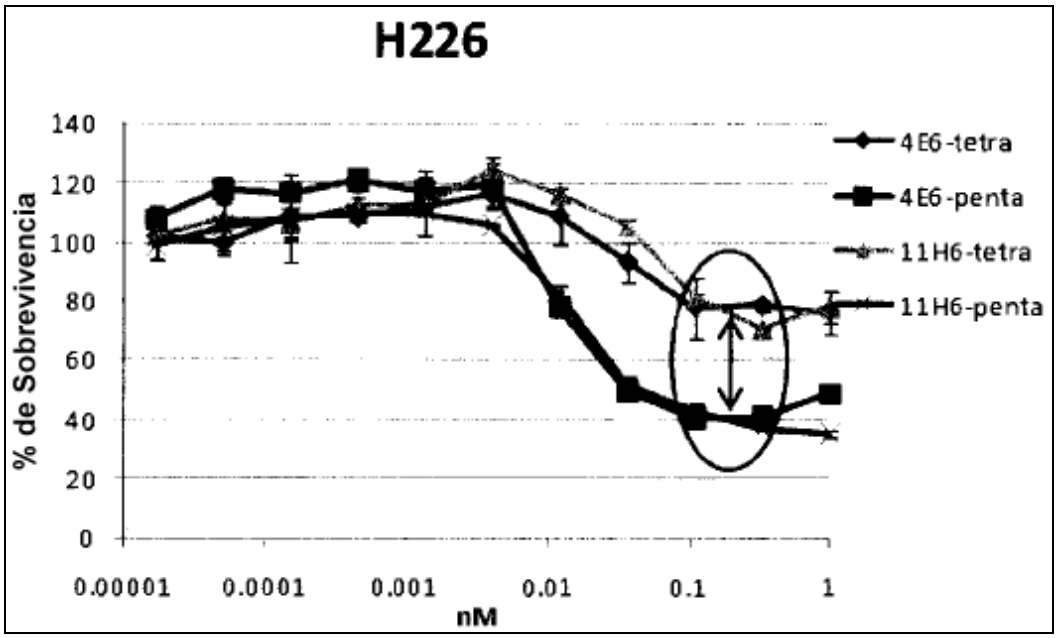

H226
% de Sobrevivencia
140
120
100
80
60
40
20
0
0.00001
0.0001
0.001
0.01
0.1
1
nM
4E6-tetra
4E6-penta
11H6-tetra
11H6-penta

FIG. 6C

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

(PCT Article 18 and Rules 43 and 44)

Applicant's or agent's file reference	**FOR FURTHER ACTION**	see Form PCT/ISA/220 as well as, where applicable, item 5 below.
54056-WO-PCT		
International application No.	International filing date *(day/month/year)*	(Earliest) Priority Date *(day/month/year)*
PCT/EP2011/051958	10/02/2011	10/02/2010
Applicant		
NOVARTIS AG		

This international search report has been prepared by this International Searching Authority and is transmitted to the applicant according to Article 18. A copy is being transmitted to the International Bureau.

This international search report consists of a total of 5 sheets.

[X] It is also accompanied by a copy of each prior art document cited in this report.

1. **Basis of the report**
   a. With regard to the **language,** the international search was carried out on the basis of:
      [X] the international application in the language in which it was filed
      [ ] a translation of the international application into _____, which is the language of a translation furnished for the purposes of international search (Rules 12.3(a) and 23.1(b))
   b. [ ] This international search report has been established taking into account the **rectification of an obvious mistake** authorized by or notified to this Authority under Rule 91 (Rule 43.6*bis*(a)).
   c. [ ] With regard to any **nucleotide and/or amino acid sequence** disclosed in the international application, see Box No. I.

2. [ ] **Certain claims were found unsearchable** (See Box No. II)

3. [ ] **Unity of invention is lacking** (see Box No III)

4. With regard to the **title,**
   [ ] the text is approved as submitted by the applicant
   [X] the text has been established by this Authority to read as follows:

   AGONIST DR5 BINDING POLYPEPTIDES

5. With regard to the **abstract,**
   [X] the text is approved as submitted by the applicant
   [ ] the text has been established, according to Rule 38.2(b), by this Authority as it appears in Box No. IV. The applicant may, within one month from the date of mailing of this international search report, submit comments to this Authority

6. With regard to the **drawings,**
   a. the figure of the **drawings** to be published with the abstract is Figure No. 6b
      [X] as suggested by the applicant
      [ ] as selected by this Authority, because the applicant failed to suggest a figure
      [ ] as selected by this Authority, because this figure better characterizes the invention
   b. [ ] none of the figures is to be published with the abstract

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2011/051958

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
INV. C07K16/28 A61K39/395
ADD.

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
C07K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)
EPO-Internal, WPI Data, BIOSIS

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2009/030285 A1 (ABLYNX NV [BE]; DOLK EDWARD [NL]; SAUNDERS MICHAEL JOHN SCOTT [BE]; DE) 12 March 2009 (2009-03-12) abstract page 64 - page 69 -----	1,17-30
X	LI JING ET AL: "LBY135, a novel anti-DR5 agonistic antibody induces tumor cell-specific cytotoxic activity in human colon tumor cell lines and xenografts", DRUG DEVELOPMENT RESEARCH,, vol. 69, no. 2, 1 March 2008 (2008-03-01), pages 69-82, XP002633902, the whole document ----- -/--	1,17-22

[X] Further documents are listed in the continuation of Box C.

[X] See patent family annex.

* Special categories of cited documents :

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
9 May 2011	25/05/2011

Name and mailing address of the ISA/	Authorized officer
European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016	Kalsner, Inge

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (April 2005)

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2008/066854 A2 (NOVARTIS AG [CH]; LI JING [US]; STOVER DAVID RAYMOND [US]) 5 June 2008 (2008-06-05) the whole document	1,17-30
X	LI B ET AL: "Activation of the Proapoptotic Death Receptor DR5 by Oligomeric Peptide and Antibody Agonists", JOURNAL OF MOLECULAR BIOLOGY, LONDON, GB, vol. 361, no. 3, 18 August 2006 (2006-08-18), pages 522-536, XP024951299, ISSN: 0022-2836, DOI: DOI:10.1016/J.JMB.2006.06.042 [retrieved on 2006-08-18] the whole document	1
X	LI JING ET AL: "Antitumor efficacy of LBY135, an anti-DR5 monoclonal antibody, alone or in combination with chemotherapy in human colon tumor cell lines and xenografts", PROCEEDINGS OF THE ANNUAL MEETING OF THE AMERICAN ASSOCIATION FOR CANCER RESEARCH, AMERICAN ASSOCIATION FOR CANCER RESEARCH, US, vol. 48, 18 April 2007 (2007-04-18), page 1153, XP009147613, ISSN: 0197-016X abstract	1,17-30
X	MOTOKI KAZUHIRO ET AL: "Enhanced apoptosis and tumor regression induced by a direct agonist antibody to tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand receptor 2.", CLINICAL CANCER RESEARCH : AN OFFICIAL JOURNAL OF THE AMERICAN ASSOCIATION FOR CANCER RESEARCH 15 APR 2005 LNKD-PUBMED:15837769, vol. 11, no. 8, 15 April 2005 (2005-04-15) , pages 3126-3135, XP002634834, ISSN: 1078-0432 the whole document	1,17-22

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No
PCT/EP2011/051958

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2009030285 A1	12-03-2009	AU 2007358569 A1	12-03-2009
		CA 2698419 A1	12-03-2009
		EP 2195342 A1	16-06-2010
WO 2008066854 A2	05-06-2008	NONE	