



Organizacion y  
Digitalizacion CSA Ltda

# Industria y Comercio

SUPERINTENDENCIA

BT

OK

Delegatura de Propiedad Industrial  
División de Nuevas Creaciones

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO  
INVENTARIO

PCT

## SOLICITUD PATENTE DE INVENCION

09-53830

21. EXPEDIENTE No.

54. TÍTULO

FUSIONES Fc CON RECEPTOR PARA FGF SOLUBLE

MODIFICADAS CON ACTIVIDAD BIOLOGICA MEJORADA

### CLASIFICACIÓN INTERNACIONAL

71. SOLICITANTE

CENTELION

DOMICILIO

VITRY-SUR-SEINE, FRANCIA

74. APODERADO

EMILIO FERRERO

C.C. 438.019 de Usaquén

22. BOGOTÁ, D. C.,

**Industria y Comercio**

SUPERINTENDENCIA

**PETITORIO**

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 09-053830- -00000-0000

Fecha: 2009-05-26 16:49:26 Dep. 2020 NUECREACIONE  
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI  
Act. 411 PRESENTACION Folios: 205**FORMULARIO UNICO DE SOLICITUD DE PATENTE  
PCT  
ENTRADA EN FASE NACIONAL****SOLICITUD DE:**

1

☒ Patente de Invención.☐ Patente de Modelo de Utilidad.☒ Capítulo I.☐ Capítulo II.

2

**SOLICITANTE  
(71)**Nombre: **CENTELION**  
sociedad constituida y existente bajo las  
leyes de Francia.Dirección: 72-92 rue Léon Geffroy,  
94400 Vitry-Sur-Seine,  
FranciaDomicilio: Vitry-Sur-Seine,  
Francia**IDENTIFICACIÓN**C.C. ☐ NIT ☐  
C.E. ☐ Otro ☐  
Cual \_\_\_\_\_  
Número \_\_\_\_\_

3

**REPRESENTANTE  
O APODERADO**Nombre: **EMILIO FERRERO** (folios 213)  
Dirección: Carrera 4ª. No. 72-35  
Teléfono: 347 36 11  
Fax: 211 86 50  
E-mail: [clientes@cavelier.com](mailto:clientes@cavelier.com)  
Domicilio: Bogotá, Colombia.**IDENTIFICACIÓN**C.C. ☒ NIT ☐  
C.E. ☐ Otro ☐  
Cual \_\_\_\_\_  
Número 438.019 T.P 31.929

4

**INVENTOR (ES)  
(72)****1. Mark NESBIT**  
c/o Sanofi-Aventis,  
Patent Department,  
174 Avenue de France,  
75013 Paris,  
Francia**3. Francis BLANCHE**  
c/o Sanofi-Aventis,  
Patent Department,  
174 Avenue de France,  
75013 Paris,  
Francia**5. Céline NICOLAZZI**  
c/o Sanofi-Aventis,  
Patent Department,  
174 Avenue de France,  
75013 Paris,  
Francia**2. Béatrice CAMERON**  
c/o Sanofi-Aventis,  
Patent Department,  
174 Avenue de France,  
75013 Paris,  
Francia**4. Sylvie SORDELLO**  
c/o Sanofi-Aventis,  
Patent Department,  
174 Avenue de France,  
75013 Paris,  
Francia**6. Marc TROMBE**  
c/o Sanofi-Aventis,  
Patent Department,  
174 Avenue de France,  
75013 Paris,  
Francia

5

**PCT (86)**Solicitud Internacional No. PCT/IB2007/004354Fecha: 28 de noviembre de 2007Publicación Internacional No. WO 2008/065543 A3Fecha: 5 de junio de 2008

6

**Título (54)****FUSIONES Fc CON RECEPTOR PARA FGF SOLUBLE MODIFICADAS, CON  
ACTIVIDAD BIOLÓGICA MEJORADA**

7

**Clasificación Internacional (51) C12N 015/062**

A61K 47/48 C07K 17/44

|   |                                                                    |                        |                                                              |                                        |
|---|--------------------------------------------------------------------|------------------------|--------------------------------------------------------------|----------------------------------------|
| 8 | Prioridad                                                          | (33) País de Origen    | (32) Fecha                                                   | (31) Número de Solicitud               |
|   | SI <input checked="" type="checkbox"/> NO <input type="checkbox"/> | <u>EP</u><br><u>EP</u> | <u>28 de noviembre de 2006</u><br><u>11 de enero de 2007</u> | <u>06291824.8</u><br><u>07290042.6</u> |

9

Comprobante de pago No.: 09-34,475  
09-34,438  
09- 3,054

Fecha: 11 de mayo de 2009  
11 de mayo de 2009  
14 de enero de 2009

10

Anexos:

☒

Comprobante de pago de la tasa de presentación de la solicitud por \$ 540.000.oo.

☒

Comprobante de pago por 24 reivindicaciones adicionales después de la decimoquinta reivindicación por \$600.000.oo.

☐

Documento que acredita la existencia y representación legal cuando el solicitante sea persona jurídica.

☐

Poderes, si fuere el caso.

☐

Documento de cesión del inventor al solicitante o a su causante.

☐

Declaraciones.

☒

Copia de la solicitud internacional. (Resumen, descripción, reivindicaciones, dibujos)

☒

Traducción de la solicitud internacional al castellano. (Resumen, descripción, reivindicaciones, dibujos)

☐

Copia del examen preliminar efectuado por la IPEA.

☐

Traducción del examen preliminar 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 12x12

☐

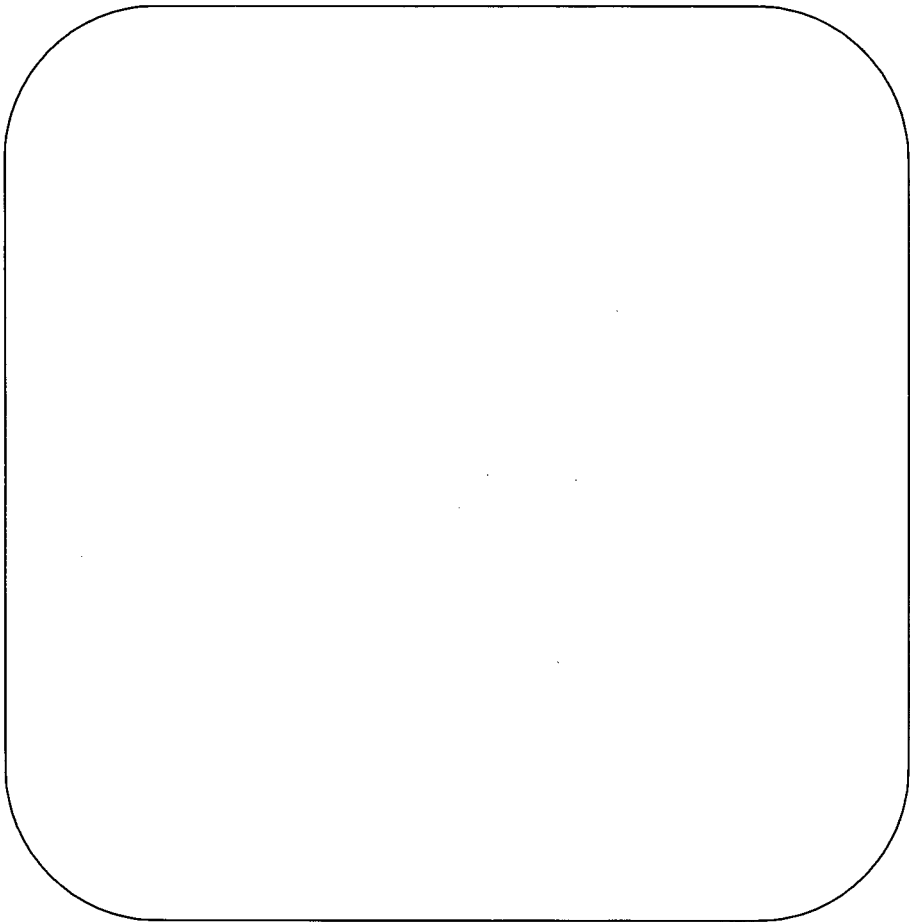
De ser el caso, información sobre otras solicitudes de patente o títulos obtenidos en el extranjero por el mismo titular o su causante, relacionadas parcial o totalmente con la invención de esta solicitud.

☒

Otros: VER HOJA DE DOCUMENTOS ANEXOS

11

FIGURA CARACTERÍSTICA



12

Solicito la concesión de la patente,

NOMBRE: EMILIO FERRERO

FIRMA :   
C.C. 438.019 de Usaquén T.P. 31.929

JGG

**DOCUMENTOS ANEXOS**

1. ☒ Publicación Internacional WO 2008/065543 A3

Descripción:

Páginas 46 en el idioma original

Páginas 48 en español

Reivindicaciones: Número (s) 39

Figuras: Número (s) 23

2. ☒ **Forma PCT/ISA/210.** Informe de Búsqueda Internacional.
3. ☒ Listado de Secuencias.
4. ☒ Extracto de publicación.

**NO SE REALIZARON MODIFICACIONES EN  
LA FASE INTERNACIONAL**

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

(19) World Intellectual Property Organization  
International Bureau



(43) International Publication Date  
5 June 2008 (05.06.2008)

PCT

(10) International Publication Number  
**WO 2008/065543 A3**

(51) International Patent Classification:

C12N 15/62 (2006.01) A61K 38/17 (2006.01)  
A61K 47/48 (2006.01) C07K 14/71 (2006.01)  
C07K 14/47 (2006.01)

(21) International Application Number:

PCT/IB2007/004354

(22) International Filing Date:

28 November 2007 (28.11.2007)

(25) Filing Language:

English

(26) Publication Language:

English

(30) Priority Data:

06291824.8 28 November 2006 (28.11.2006) EP  
07290042.6 11 January 2007 (11.01.2007) EP

(71) Applicant (for all designated States except US): CENTE-  
LION [FR/FR]; 72-92 rue Léon Geffroy, F-94400 Vitry-  
sur-Seine (FR).

(72) Inventors; and

(75) Inventors/Applicants (for US only): NESBIT, Mark  
[GB/FR]; c/o Sanofi-aventis, 174 avenue de France,  
F-75013 Paris (FR). CAMERON, Béatrice [FR/FR];  
c/o Sanofi-aventis, 174 avenue de France, F-75013 Paris  
(FR). BLANCHE, Francis [FR/FR]; c/o Sanofi-aventis,  
174 avenue de France, F-75013 Paris (FR). SORDELLO,  
Sylvie [FR/FR]; c/o Sanofi-aventis, 174 avenue de France,  
F-75013 Paris (FR). NICOLAZZI, Céline [FR/FR]; c/o  
Sanofi-aventis, 174 avenue de France, F-75013 Paris  
(FR). TROMBE, Marc [FR/FR]; c/o Sanofi-aventis, 174  
avenue de France, F-75013 Paris (FR).

(74) Agent: BOUVET, Philippe; sanofi-aventis, Département  
Brevets, 174 avenue de France, F-75013 Paris (FR).

(81) Designated States (unless otherwise indicated, for every  
kind of national protection available): AE, AG, AL, AM,  
AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH,  
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, PG, PH, PL,  
PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, SV, SY,  
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, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM,  
ZW), Eurasian (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM),  
European (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI,  
FR, GB, GR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MT, NL, PL,  
PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM,  
GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Published:

- with international search report
- before the expiration of the time limit for amending the  
claims and to be republished in the event of receipt of  
amendments
- with sequence listing part of description published sepa-  
rately in electronic form and available upon request from  
the International Bureau
- the filing date of the international application is within two  
months from the date of expiration of the priority period

(88) Date of publication of the international search report:  
14 August 2008

(54) Title: MODIFIED SOLUBLE FGF RECEPTOR FC FUSIONS WITH IMPROVED BIOLOGICAL ACTIVITY

(57) Abstract: The invention relates to modified soluble FGF receptor Fc fusions comprising a fusion of a soluble fragment or do-  
main of the FGF receptor part (targeting or binding moiety) with an Fc region of an immunoglobulin part (effector function moiety),  
having improved biological activity including ADCC/CDC activities, compositions containing them, and method of producing such  
modified soluble FGF receptor Fc fusion molecules.

WO 2008/065543 A3

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

(19) World Intellectual Property Organization  
International Bureau



(43) International Publication Date  
5 June 2008 (05.06.2008)

PCT

(10) International Publication Number  
**WO 2008/065543 A2**

(51) International Patent Classification:

C12N 15/62 (2006.01) C07K 14/15 (2006.01)  
A61K 38/17 (2006.01) A61P 35/00 (2006.01)

(21) International Application Number:

PCT/IB2007/004354

(22) International Filing Date:

28 November 2007 (28.11.2007)

(25) Filing Language:

English

(26) Publication Language:

English

(30) Priority Data:

06291824.8 28 November 2006 (28.11.2006) EP  
07290042.6 11 January 2007 (11.01.2007) EP

(71) Applicant (for all designated States except US): CENTE-  
LION [FR/FR]; 72-92 rue Léon Geffroy, F-94400 Vitry-  
sur-Seine (FR).

(72) Inventors; and

(75) Inventors/Applicants (for US only): NESBIT, Mark  
[GB/FR]; c/o Sanofi-aventis, 174 avenue de France,  
F-75013 Paris (FR). CAMERON, Béatrice [FR/FR];  
c/o Sanofi-aventis, 174 avenue de France, F-75013 Paris  
(FR). BLANCHE, Francis [FR/FR]; c/o Sanofi-aventis,  
174 avenue de France, F-75013 Paris (FR). SORDELLO,  
Sylvie [FR/FR]; c/o Sanofi-aventis, 174 avenue de France,  
F-75013 Paris (FR). NICOLAZZI, Céline [FR/FR]; c/o  
Sanofi-aventis, 174 avenue de France, F-75013 Paris  
(FR). TROMBE, Marc [FR/FR]; c/o Sanofi-aventis, 174  
avenue de France, F-75013 Paris (FR).

(74) Agent: BOUVET, Philippe; sanofi-aventis, Département  
Brevets, 174 avenue de France, F-75013 Paris (FR).

(81) Designated States (unless otherwise indicated, for every  
kind of national protection available): AE, AG, AL, AM,  
AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH,  
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, PG, PH, PL,  
PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, SV, SY,  
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, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM,  
ZW), Eurasian (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM),  
European (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI,  
FR, GB, GR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MT, NL, PL,  
PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM,  
GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Published:

- without international search report and to be republished  
upon receipt of that report
- with sequence listing part of description published sepa-  
rately in electronic form and available upon request from  
the International Bureau
- the filing date of the international application is within two  
months from the date of expiration of the priority period

(54) Title: MODIFIED SOLUBLE FGF RECEPTOR FC FUSIONS WITH IMPROVED BIOLOGICAL ACTIVITY

(57) Abstract: The invention relates to modified soluble FGF receptor Fc fusions comprising a fusion of a soluble fragment or do-  
main of the FGF receptor part (targeting or binding moiety) with an Fc region of an immunoglobulin part (effector function moiety),  
having improved biological activity including ADCC/CDC activities, compositions containing them, and method of producing such  
modified soluble FGF receptor Fc fusion molecules.



WO 2008/065543 A2

## MODIFIED SOLUBLE FGF RECEPTOR Fc FUSIONS WITH IMPROVED BIOLOGICAL ACTIVITY

### Field of the Invention and Introduction

5

The invention relates to modified soluble FGF receptor Fc fusions comprising a fusion of a soluble fragment or domain of the FGF receptor with an Fc region of an immunoglobulin, having improved biological activity, compositions containing them, and method of producing such modified soluble FGF receptor Fc fusion molecules.

10 Particularly, the modified soluble FGF receptor Fc fusions have improved anti-angiogenic activity and anti-tumoral antibody-dependent cell mediated cytotoxicity activities, namely ADCC (antibody-dependent cellular cytotoxicity) and/or CDC (complement-dependent cytotoxicity), and are thus useful in the treatment of cancer, metastatic tumors and for reducing tumor growth in a subject. The invention further

15 relates to methods of inhibiting tumor growth and methods for the treatment or prevention of pathological situations including, but not limited to, breast cancer, melanoma, leukemia, brain metastases, renal cancer, primary melanoma, primary colon cancer, primary bladder cancer, infantile hemangioma, ovarian cancer, prostate cancer and lung cancer.

20

### Background of and Relevance of the Invention

Angiogenesis, *i.e.*, the formation of new blood vessels from pre-existing ones, involves a complex coordination of endothelial cell proliferation, migration, basement membrane

25 degradation and neovessel organization (Ji *et al.*, 1998, *FASEB J.* 12:1731-1738). The local, uncontrolled release of angiogenic growth factors and/or alterations of the production of natural angiogenic inhibitors, with a consequent alteration of the angiogenic balance (Hanahan *et al.*, 1996, *Cell.* 86: 353-64) are responsible for the uncontrolled endothelial cell proliferation that takes place during tumor

30 neovascularization and in angiogenesis-dependent diseases (Folkman, 1995, *Nat. Med.* 1:27-31).

Numerous natural inducers of angiogenesis have been identified, including members of the vascular endothelial growth factor (VEGF) family, angiopoietins, transforming growth factor- $\alpha$  and - $\beta$  (TGF- $\alpha$  and - $\beta$ ), platelet-derived growth factors (PDGF), tumor

35 necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), interleukins, chemokines, and the members of the fibroblast growth factor (FGF) family. These potent angiogenic factors are often over-

- expressed by tumor tissues (Presta, 2005, *Cytokine & Growth Factors Reviews*. **16**: 159-178; Grose, 2005, *Cytokine & Growth Factors Reviews*. **16**: 179-186).
- Indeed, FGFs, and more specially FGF2, are over-expressed in numerous human cancer including melanoma (Halaban, 1996, *Semin Oncol*. **23**:673-81; Hanada, 2001, *Cancer Res*. **61**: 5511-5516), leukemia (Krejci *et al*, 2001 *Leukemia*. **15**:228-37, Bieker *et al*, 2003, *Cancer Res*. **63**: 7241-7246) renal cancer (Hanada, 2001, *Cancer Res*. **61**: 5511-5516), colon cancer (Tassi, 2006, *Cancer Res*. **66**:1191-1198), ovarian cancer (Whitworth *et al*, 2005, *Clin Cancer Res*. **11**:4282-4288, Gan *et al*, 2006, *Pharm Res*. **23**:1324-31), prostate cancer (Aigner *et al*, 2002 *Oncogene*, **21**:5733-42; Kwabi-Addo *et al*, 2004, *Endocr Relat Cancer*. **11**:709-24) and lung cancer (Takanami *et al*, 1996, *Pathol Res Pract*. **192**:1113-20; Volm *et al*, 1997, *Anticancer Res*. **17**:99-103; Brattstrom *et al*, 1998, *Anticancer Res*. **18**: 1123-1127). In addition, FGF2 over-expression can be correlated with a chemoresistance in certain cancers including bladder, breast, head and neck cancers (Gan *et al*, 2006, *Pharm Res*. **23**:1324-31).
- With respect to FGF family members, as FGFs secreted by tumor cells have affinities for the glycosaminoglycan side-chains of cell surface and matrix proteoglycans, these secreted FGFs are most likely sequestered nearby tumor cells forming FGF reservoirs. This particularity makes FGF addressing a good strategy to direct an active molecule that needs a target molecule stably expressed and easily accessible.
- Various antibody-based products are currently used as therapeutic drugs and several monoclonal antibodies (mAbs) are now approved in various therapeutic areas such as oncology, inflammation, infectious disease and cardiovascular disease. These mAbs induce tumor cells killing by multiple mechanisms including recruitment of immune system (Harris, 2004, *Lancet Oncol*, **5**: 292-302). The Fc moiety of mAbs is responsible for these immune-mediated effector functions that include two major mechanisms: Antibody-Dependent Cell-mediated Cytotoxicity (ADCC) and Complement-Dependent Cytotoxicity (CDC). ADCC occurs when an mAb first binds via its antigen-binding site to its target on tumor cells, and then the Fc portion is recognized by specific Fc receptors (FcR) on effector cells (i.e. NK, neutrophils, macrophages...) that attack the target cell. CDC is a process where a cascade of different complement proteins become activated when an mAb binds to C1q leading to formation of C3b on the surface of antibody-coated tumor cells near the site of complement activation. The presence of C3b controls formation of the C5-C9 membrane attack complex that can insert into the membrane to lyse tumor cells (Sharkey, 2007, *CA Cancer J Clin*, **56**: 226-243). The ability of mAbs to stimulate ADCC depends on their isotype. IgG1 and IgG3 antibodies bind highly to FcRs, while IgG4 and IgG2 antibodies bind weakly. CDC

capacity of mAb also depends on mAb isotype. IgG3 and, to a lesser extent, IgG1 are the most effective isotypes for stimulating the classic complement cascade. IgG2 mAbs are less efficient in activating the complement cascade, whereas IgG4 is unable to do so (Strome, 2007, *The Oncologist*, 12:1084-1095).

5

The use of a fusion protein that can have, as antibodies, a dual functionality with a binding part exhibiting a specific targeting and an effector part able to induce the lysis of target cells by recruitment of immune system, is one aspect of these therapeutic strategies. In addition, to be useful in therapy, this molecule would need to have advantageous pharmacokinetic properties PK. The Fc moiety can detectably increase the serum half life of the modified soluble FGF receptor Fc fusion, but there is still a need for fusion protein with a longer serum half life. Finally, if this fusion protein is to be used as a drug, it is necessary that it is produced reliably, efficiently and with appropriate productivity.

15

Thus there is a need for a fusion protein with ADCC and/or CDC activities targeting FGF for treatment of cancer, metastatic tumors and for reducing tumor growth in a subject, with improved PK features, and which can be produced efficiently.

20 The applicants have now discovered that soluble fusion proteins between soluble FGF receptor part (binding or targeting moiety) and Fc part (effector function moiety) (sFGFR-Fc) that are modified to have a particular glycan profile have in fact substantially improved biological activities, including ADCC and/or CDC activities, and may thus be used as efficacious anti-angiogenic and anti-tumoral drugs, for the treatment of uncontrolled cell growth or cancer. These modified soluble fusion proteins have advantageous PK properties due to their sialylation rate, and can be produced with appropriate productivity and minimal aggregation because of their glycosylation pattern.

### 30 **Summary of the Invention**

The present invention is thus directed to a modified soluble FGF receptor Fc comprising a fusion of a soluble fragment or domain of a FGF receptor with an Fc region of an immunoglobulin, wherein at least the 5<sup>th</sup> N-glycosylation site of the FGF receptor moiety is occupied, and wherein at most 45% of the N-glycans of the FGF receptor moiety have no sialyl group. In addition, according to a further preferred

35

embodiment of the invention, the 3<sup>rd</sup>, 4<sup>th</sup>, 6<sup>th</sup> and 7<sup>th</sup> N-glycosylation sites of the FGF receptor moiety are occupied. Preferably, all N-glycosylation sites are occupied. In a further preferred embodiment, the average number of sialic acid per N-glycan in the FGF receptor moiety of the fusions of the invention is at least 0.9; even more preferably, it is at least 1.2. Each N-glycan molecule of the modified soluble FGF receptor Fc fusion according to the present invention comprises 3 mannose residues, on average 1.5 to 3.0 galactose residues, 3.5 to 5 of N-acetylglucosamine, and 0.6 to 1 fucose residues.

The present invention is also directed to modified soluble FGF receptor Fc fusions comprising a fusion of a soluble fragment or domain of a FGF receptor with an Fc region of an immunoglobulin, wherein all N-glycosylation sites are occupied, and wherein at most 45% of the N-glycans of the FGF receptor moiety have no sialyl group and wherein the N-glycan of the Fc region is 60 to 100% fucosylated.

In one embodiment, the soluble fragment or domain of the FGF receptor is the soluble or extracellular domain of FGF receptor 1 (sFGFR1) or of FGF receptor 2 (sFGFR2). In another embodiment, the soluble fragment or domain of the FGF receptor is the soluble or extracellular domain of FGF receptor 1 isotype or variant IIIc (sFGFR1(IIIc)) or of FGF receptor 2 isotype IIIc (sFGFR2(IIIc)).

According to a preferred embodiment, the modified soluble FGF receptor Fc fusion is encoded by a polynucleotide having the nucleotide sequence as set forth in the SEQ ID NO: 1, or a polynucleotide having at least 80% identity with the nucleotide sequence of SEQ ID NO: 1. In a further preferred embodiment, the modified soluble FGF receptor Fc fusion of the invention has the amino acid sequence as set forth in the SEQ ID NO: 2 or a sequence having at least 95%, 97%, 98%, or 99% identity with the sequence as set forth in SEQ ID NO: 2.

The modified soluble FGF receptor Fc fusion of the invention has ADCC and/or CDC activity and is thus useful for the treatment of diseases such as cancer.

The present invention also relates to pharmaceutical compositions comprising such modified soluble FGF receptor Fc fusions.

The present invention further relates to the combination of the modified soluble FGF receptor Fc fusion with a chemotherapeutic agent or a biotherapeutic agent with anti-tumoral and/or anti-angiogenic properties.

Another object of the present invention is a method of treatment of cancer, or a method of preventing or reducing tumor growth and volume and metastatic tumors comprising administering to a subject the modified soluble FGF receptor Fc fusion of the present invention in a therapeutically effective amount.

### Brief Description of the Figures

**Figure 1A and B** show maps of the expression vectors for SIAT6 (ST3GAL3) and B4GT1(B4GALT1), respectively.

5

**Figure 2 A and B** show the nucleic acid (SEQ ID No. 9) and amino acid (SEQ ID No. 10) sequences of B4GT1(B4GALT1) for expression from pXL4551

**Figure 3 A and B** show the nucleic acid (SEQ ID No. 11) and amino acid (SEQ ID No. 12) sequences of SIAT6 (ST3GAL3) for expression from pXL4544

**Figure 4 A** corresponds to the nucleic acid sequence of sFGFR2-Fc for expression from pXL4410, pXL4429 or pXL4636 (SEQ ID N° 1), **Fig 4 B** to the amino acid sequence of sFGFR2-Fc (the N-glycosylation sites are indicated in bold type) encoded by pXL4410 pXL4429 or pXL4636 (SEQ ID N° 2), **Fig 4 C** to the amino acid sequence of sFGFR2 (SEQ ID N° 4), **Fig 4 D** to the amino acid sequence of Fc (SEQ ID N° 6), **Fig 4 E** to the amino acid sequence of the linker, and **Fig 4F** to the amino acid sequence of the signal peptide (SEQ ID N° 8). It is the signal peptide described for interleukin-2. It was observed that fusion of this peptide upstream of the sequence represented by SEQ ID No.2 leads to a secreted protein with a homogeneous N-terminal amino acid sequence.

**Figure 5** is a schematic representation of the strategy used for constructing pXL4636, encoding sFGFR2-Fc and Glutamine Synthetase

25

**Figure 6 A and B** show maps of the expression vectors pXL4429 for sFGFR2-Fc and DHFR and pXL4417 encoding neomycin resistance gene

**Figure 7** is a graph showing the correlation between the average number of sialic acid per sFGFR2 N-glycan and clearance of sFGFR2-Fc in blood - Optimal ratio > 1.2. preferred ratio > 0.9.

**Figure 8** shows SDS-PAGE (non reducing conditions) of 1 µg of sFGFR2-Fc incubated in the absence (-) or in the presence (+) of PNGase F. M: molecular weight marker

35

- Figure 9** shows the N-glycan position and numbering in sFGFR2-Fc dimer. The numbering starts from the N-terminal amino acid sequence of FGFR2 (FGFR2\_HUMAN) such that position N1 correspond to Asn83, N2 to Asn123, N3 to Asn228, N4 to Asn241, N5 to Asn 265, N6 to Asn 297, N7 to Asn318, N8 to Asn331.
- 5 Position N297 correspond to the Asn position on human Fc (IgG1).

**Figure 10** is a graph showing the kinetics of disappearance of protein sFGFR2-Fc (squares) in blood over time up to 72 hours.

- 10 **Figure 11** shows the amount of recoveries of protein sFGFR2-Fc in plasma and liver expressed in % of injected dose.

- Figure 12** is a graph of the A549 tumor volume analysis after treatment up to day 40 (100 µg/mouse/admin: triangles; 300 µg/mouse/admin: squares; 500 µg/mouse/admin: closed circles; PBS control: open circles).
- 15

**Figure 13** is a graph of the A549 tumor weight analysis after treatment at day 40.

- Figure 14** is a graph of the H460 tumor volume analysis after treatment up to day 22 (treated group: closed circles; PBS control group: open circles).
- 20

**Figure 15** is a graph of the H460 tumor weight analysis after treatment at day 22.

- Figure 16** is a graph of the evaluation of the *in vitro* ADCC activity of sFGFR2-Fc on H460 and A549 tumor cells.
- 25

- Figure 17** shows graphs of the A549 tumor volume analysis when implanted in three mouse strains, i.e. SCID (Fig. 17A), NOD/SCID (Fig. 17B), and SCID/bg (Fig. 17C), up to day 41 (sFGFR2-Fc 100 µg/mouse/admin: diamonds; PBS control: open circles).
- 30

**Figure 18** shows graphs of the H460 tumor volume analysis when implanted in three mouse strains, i.e. SCID (Fig. 18A), NOD/SCID (Fig. 18B), and SCID/bg (Fig. 18C), up to day 22 (sFGFR2-Fc 100 µg/mouse/admin: diamonds; PBS control: open circles).

- 35 **Figure 19A** shows a map of the plasmid encoding sFGFR2-Fc (A265 in Fc), and **Fig. 19B** shows the protein sequence of sFGFR2-Fc (A265 in Fc) (SEQ ID No. 14).

Position 392 is the position of the mutation in the Fc domain (Asp265Ala) and is represented in bold type.

**Figure 20** is a graph showing the H460 tumor volume analysis when implanted in nude mouse strains up to day 23 (open circles: PBS control; diamonds: sFGFR2-Fc 500 µg/mouse/admin; open square: sFGFR2-Fc (A265Fc) 500 µg/mouse/admin). \*\*: p<0.01 vs control Anova & Newman-Keuls post test)

10     **Detailed Description**

Throughout this disclosure, applicants refer to journal articles, patent documents, published references, web pages, sequence information available in databases, and other sources of information. One skilled in the art can use the entire contents of any of the cited sources of information to make and use aspects of this invention. Each and every cited source of information is specifically incorporated herein by reference in its entirety. Portions of these sources may be included in this document as allowed or required. However, the meaning of any term or phrase specifically defined or explained in this disclosure shall not be modified by the content of any of the sources. The description and examples that follow are merely exemplary of the scope of this invention and content of this disclosure. One skilled in the art can devise and construct numerous modifications to the examples listed below without departing from the scope of this invention.

25     The present invention relates to soluble protein fusions comprising domains of FGF receptors. The invention generally encompasses FGF receptor fragments, domains, and especially soluble or extracellular domains. The extracellular domain of the FGF receptor is linked to an appropriate fusion partner, such as an immunoglobulin Fc unit. Therefore, in the broadest sense, the modified soluble FGF receptor fusions of the invention can be FGF receptor (FGFR) proteins, fragments, domains, extracellular domains, soluble domains, and any of these linked to a fusion partner, especially an Fc region fusion partner.

35     This applicant has found that a modified soluble FGF receptor Fc fusion comprising a fusion of a soluble domain of a FGF receptor with an Fc region of an immunoglobulin wherein at most 45% of the N-glycans have no sialyl group have advantageous

properties. Advantages of the sialylation pattern of the modified soluble FGF receptor Fc fusion of the invention include a better pharmacokinetic profile and an improved resistance to cleavage in vivo.

- 5 Typically N-glycans are attached cotranslationally through specific asparagine (Asn) residues. The consensus sequence Asn-X-Ser/Thr (where X is any amino acid except Pro) is essential but not sufficient in that local secondary structure may determine addition (Jefferis *et al.*, 2006, *Nature Biotechnology* **24**:1241). Several factors are believed to account for unoccupied N-glycosylation sites (Jones *et al.*, 2005, *Biochimica et Biophysica Acta* **1726**: 121). Several N-glycosylation sites are present within the soluble FGF receptors of the invention. For example, there are 8 N-glycosylation sites in the extracellular domain of FGFR2IIIc (see Fig. 9). The N-glycans contain a conserved oligosaccharide core linked to Asn. This core is composed of three mannose (Man) and two N-acetylglucosamine (GlcNAcs) monosaccharide residues.
- 10 Additional GlcNAcs are normally linked to  $\beta$ 1,2-linked to the  $\alpha$ 6 Man or  $\alpha$ 3 Man, while the N-acetylneuraminic acid (NeuAc $\alpha$ 2,6), galactose (Gal $\beta$ 1,4), fucose (Fuc $\alpha$ 1,6) and bisecting GlcNAc ( $\beta$ 1,4) can be present or absent (Jefferis *et al.*, 2006, *Nature Biotechnology* **24**:1241).
- 15 The applicant has demonstrated that the presence of a N-glycan on the 5<sup>th</sup> N-glycosylation site from the N-terminus of the FGFR moiety confers advantageous properties for productivity and low aggregation, as shown in the Experimental Examples. In particular, in the absence of glycosylation on this particular site, productivity drops dramatically, while aggregation is increased. In addition, the presence of this N-glycan was found to be necessary for FGF binding.
- 20
- 25

The present invention is thus directed to a modified soluble FGF receptor Fc fusion comprising a fusion of a soluble domain of a FGF receptor with an Fc region of an immunoglobulin, wherein at least the 5<sup>th</sup> N-glycosylation site of the FGF receptor moiety is occupied, and at most 45% of the N-glycans of said FGF receptor moiety have no sialyl group.

30

According to a further embodiment of the invention, the 3<sup>rd</sup>, 4<sup>th</sup>, 6<sup>th</sup> and 7<sup>th</sup> N-glycosylation sites of the FGF receptor moiety are occupied. When at least 7 of the N-glycosylation sites of the FGF receptor moiety are glycosylated, the fusion of the

35

invention has even better properties as regards productivity and low aggregation. Thus, in another aspect, the invention is directed to a fusion of a soluble fragment or domain of a FGF receptor with an Fc region of an immunoglobulin, wherein at least 7 N-glycosylation sites are occupied and at most 45 % of the N-glycans of the FGF receptor Fc fusion have no sialyl group. In a specific embodiment of the invention, all the N-glycosylation sites are occupied.

In another aspect, the modified soluble FGF receptor Fc fusion of the invention has an average number of sialic acid per N-glycan of the FGF receptor moiety is at least 0.9, i.e. this number can be 0.9 or any value above 0.9. In a preferred embodiment, the modified soluble FGF receptor Fc fusion of the invention has an average number of sialic acid per N-glycan of at least 1.2. Such a ratio was found by the applicant to ensure a maximized concentration in the blood of the soluble FGF receptor fusion of the invention, that would be comparable to the optimal concentration in the blood found for Fc molecules.

The present invention is further directed to a modified soluble FGF receptor Fc fusion comprising a fusion of a soluble fragment or domain of a FGF receptor with an Fc region of an immunoglobulin, wherein all N-glycosylation sites are occupied, and wherein at most 45% of the N-glycans of the FGF receptor moiety have no sialyl group and wherein the N-glycans of the Fc region are not fucosylated. In another embodiment, the modified soluble FGF receptor Fc fusion of the invention is partially fucosylated, e.g., 0 to 60 % fucosylated. In yet another embodiment, the modified soluble FGF receptor Fc fusion of the invention is entirely fucosylated. In a preferred embodiment, the modified soluble FGF receptor Fc fusion of the invention is 60 to 100 % fucosylated. In a further preferred embodiment, each N-glycan molecule of the modified soluble FGF receptor Fc fusion according to the present invention further comprises 3 mannose residues, and a mean of 1.5 to 3.0 galactose residues, 3.5 to 5 of N-acetylglucosamine per molecule of glycan, and 0.6 to 1 fucose residues.

According to the invention, the modified soluble FGF receptor Fc fusion binds FGF ligand with high affinity. For example, said fusion binds FGF2 with a  $K_D$  value measured by Biacore™ comprised between 1 and 5 nM. In a preferred embodiment of the invention, the  $K_D$  value of said fusion for FGF2 measured by Biacore™ is around 1.5 nM.

Such modified fusions as described above are useful as potent and therapeutically effective inhibitors of tumor growth. Indeed the applicant has demonstrated that the modified soluble FGF receptor Fc fusions of the invention are capable of inhibiting

tumor growth in vivo. Moreover, said modified soluble FGF receptor Fc fusions of the invention are capable of triggering ADCC and/or CDC responses both in vitro and in vivo. As effective ADCC and/or CDC mediating molecules, these compounds are especially useful to treat FGF-overexpressing cancerous tumors.

5

The FGFR sequences used for the FGFR compounds, full length or fragments of an FGFR, synthetic FGFR sequences, extracellular domains, soluble domains, or fusions of these, can be selected from any available or known sequences. FGFR belongs to the tyrosine kinase family of receptors and to the immunoglobulin (Ig) supergene family. In transmembrane forms of the receptor, the tyrosine kinase domain is intracellular and the Ig-like domains are extracellular. Both transmembrane and secreted forms bind FGF. There are at least four genes that encode FGFRs that have a common structure of two or three extracellular immunoglobulin (Ig)-like loops (IgI-IgIII) and one intracellular tyrosine kinase domain. Alternative splicing products are also known, from exons encoding the extracellular region, resulting in multiple receptor forms. The third Ig-like loop leads to at least three receptor variants and two membrane-spanning forms are produced by alternative splicing of two exons (IIIb and IIIc) encoding the second half of loop III. For example, a selective polyadenylation site preceding exons IIIb and IIIc is used to produce a soluble form of FGFR1 (IIIa). In humans and mice, the IgIIIa splice variant of FGFR1 encodes a protein that apparently has no hydrophobic membrane-spanning domain and may therefore be a secreted or soluble form of the receptor. The FGFR compounds may also utilize sequences from FGFR1 (Protein locus on NCBI, NP\_075598); FGFR2 (Protein locus on NCBI, NP\_000132); FGFR3 (Protein locus on NCBI, P22607); and FGFR4 (Protein locus on NCBI, NP\_002002) (Kiefer *et al.*, 1991, *Growth Factors* 5:115-127).

25

Soluble forms of FGF receptors, comprising the extracellular domains, have also been discussed in U.S. Pat. Nos. 5,288,855; 6,656,728; WO 91/00916; WO 92/00999; WO 00/46380; WO 2005/016966; WO 2005/113295; WO 2006/113277; WO 2007/014123; and European Patent 529 076. The FGFR fragments, domains, or soluble or extracellular domains as used in the invention may include the fragment of an FGFR that is extracellular in its native form or consists of all or part of the naturally secreted form. Furthermore, the FGFR sequences as used in this invention can be those specifically described or listed and sequences having about 98%, 97%, 96%, 95%, 94%, 93%, 92%, 91%, or 90% amino acid sequence identity over the full length of the polypeptide sequence described or depicted, or having about 95%, 90%, 85%, 80%, or

35

75% nucleic acid sequence identity over the polypeptide encoding region for nucleic acids encoding the FGFR sequences of the invention. The fragment or domain could also include additional amino acids or other regions of the FGFR as long as these additional amino acids or regions do not prevent or significantly reduce the ability of the  
5 FGFR compound to be used as described in this invention. A polypeptide or fusion protein consisting essentially of a FGFR domain or fragment may contain other amino acids as long as the ability to be expressed in a mammalian cell and bind to FGF are retained, and optionally, in addition, as long as the ability to reduce cell growth or reduce vascularization is retained.

10 In one embodiment, the soluble fragment or domain of the FGF receptor is the soluble or extracellular domain of FGF receptor 1 (sFGFR1) or FGF receptor 2 (sFGFR2).

The fragments of FGFR1 and FGFR2 selected can have one or more of the following mutations, an N-terminal deletion; of 1-7 amino acids; or N-term substitution; a deletion of the loop1 sequence; a deletion of the acidic box sequence. Polynucleotides  
15 encoding amino acid sequence mutants can be prepared by a variety of methods known in the art, including, but not limited to, oligonucleotide-mediated (or site-directed) mutagenesis, PCR mutagenesis and cassette mutagenesis of an earlier prepared mutant or a non-mutant version of the molecule of interest (see, e.g., Kunkel, 1985, *Proc Natl Acad Sci USA* 82:488).

20 In another embodiment, the soluble fragment or domain of the FGF receptor is the soluble or extracellular domain of FGF receptor 1 isotype IIIc (sFGFR1(IIIc)) and FGF receptor 2 isotype IIIc (sFGFR2(IIIc)).

Preferred embodiments include soluble fragment or domain of the FGF receptor 2 isotype or variant IIIc encoded by a polynucleotide having the sequence of SEQ ID NO:  
25 3, and/or having the amino acid sequence of SEQ ID NO: 4 or a sequence with at least 95%, 97%, 98%, or 99% identity with the SEQ ID NO: 4.

According to this latest embodiment, the modified soluble FGF receptor Fc fusion (sFGFR2-Fc) of the present invention advantageously has a high affinity for its natural ligand FGF2 or high  $K_D$  value of the order of the nanomolar, comprised between 1 and  
30 5 nM and more precisely around 1.5 nM.

Specific examples of immunoglobulin domains include, but are not limited to, the Fc region of an immunoglobulin molecule; the hinge region of an immunoglobulin molecule; the CH<sub>1</sub> region of an immunoglobulin molecule; the CH<sub>2</sub> region of an  
35 immunoglobulin molecule; the CH<sub>3</sub> region of an immunoglobulin molecule; the CH<sub>4</sub>

region of an immunoglobulin molecule; and the light chain of an immunoglobulin molecule, and humanized variants of any of these. The sequences for these regions are also available to one of skill in the art (see, for example, Huck *et al.*, 1986, *Nucleic Acids Res.* **14**:1779).

5

As used in the specification and claims, "immunoglobulin Fc region or Fc" means the carboxyl-terminal portion of an immunoglobulin heavy chain constant region. The Fc regions are particularly important in determining the biological functions of the immunoglobulin and these biological functions are termed effector functions. As known in the art, the heavy chains of the immunoglobulin subclasses comprise four or five domains: IgM and IgE have five heavy chain domains, and IgA, IgD and IgG have four heavy chain domains. The Fc region of IgA, IgD and IgG is a dimer of the hinge-CH<sub>2</sub>--CH<sub>3</sub> domains, and in IgM and IgE it is a dimer of the hinge-CH<sub>2</sub>--CH<sub>3</sub>--CH<sub>4</sub> domains. Further the CH<sub>3</sub> domain of IgM and IgE is structurally equivalent to the CH<sub>2</sub> domain of IgG, and the CH<sub>4</sub> domain of IgM and IgE is the homolog of the CH<sub>3</sub> domain of IgG (see, W. E. Paul, ed., 1993, *Fundamental Immunology*, Raven Press, New York, New York). Any of the known Fc regions would be useful as the Fc region in the modified soluble FGF receptor Fc fusions of the invention.

20 In one embodiment, the gene encoding the Fc region of human IgG (Fc<sub>γ</sub>) is obtained by reverse transcription and PCR using RNA prepared from human leukocytes and appropriate 5' and 3' primers. The resulting DNA fragments contain complete sequences of the hinge, CH<sub>2</sub>, and CH<sub>3</sub> domains of IgG and can be used as the template to generate variants in which certain amino acids are substituted, as known in the art. A primer encoding a peptide linker, including an optional restriction enzyme site, can be incorporated into the PCR process. The resulting DNA fragments are inserted into a holding vector and confirmed by DNA sequencing.

30 Preferably, the Fc region of immunoglobulin gamma-1 is used, which includes at least part of the hinge region, CH<sub>1</sub> region, CH<sub>2</sub> region, and CH<sub>3</sub> region. In addition, the Fc region of immunoglobulin gamma-1 can be a CH<sub>1</sub>-deleted -Fc or a CH<sub>2</sub>-deleted-Fc, and includes a part of a hinge region and a CH<sub>3</sub> region wherein the CH<sub>1</sub> and/or CH<sub>2</sub> region has been deleted. A CH<sub>2</sub>-deleted-Fc has been described by Gillies *et al.*, (1990, *Hum. Antibod. Hybridomas*, **1**:47).

35

Most preferably, the Fc region of IgG1 comprises the sequence encoded by a

polynucleotide having the sequence of SEQ ID NO: 5, and/or the amino acid sequence as set forth in SEQ ID NO: 6 or a sequence with at least 95% identity with SEQ ID NO: 6. However, Fc regions from the other classes of immunoglobulins, IgA, IgD, IgE, and IgM, would also be useful as the Fc region.

5

Further, deletion constructs of these Fc regions, in which one or more of the constant domains are deleted, may be prepared. One of ordinary skill in the art could prepare such deletion constructs using well known molecular biology techniques. In addition, the Fc region used can be one that has about 99%, or about 98%, or about 95%, or about 90%, or about 85%, or about 80%, or about 75% amino acid identity to that shown in SEQ ID NO:6.

10

Specific mutations as compared to SEQ ID NO: 6 that can be selected from and used individually or in any combination are: a deletion or substitution of one of the Cys within the first 20 N-term amino acids; a deletion of Cys at position 5 in SEQ ID NO: 6; or a substitution of Cys at position 5. The Fc region sequence chosen can detectably increase the serum half life of the modified soluble FGF receptor Fc fusion.

15

The modified soluble FGF receptor Fc fusion of the invention may comprise a hinge or a spacer region can be used between the soluble receptor part and the Fc region, (Ashkenazi *et al.*, 1997, *Current Opinion in Immunology*, 9:195-200). Examples include a flexible peptide linker of about 20 or fewer amino acids in length. More preferably, the peptide linker may be at least three amino acids in length, and/or a peptide linker comprising two or more of the following amino acids: glycine, serine, alanine, and threonine. In a preferred embodiment, the peptide linker does not include a protease cleavage site. Most preferred linker is SAL (Ser-Ala-Leu).

20

The present invention also provides for the construction of polynucleotides encoding the modified soluble FGF receptor Fc fusion according to the present invention as well as a vector capable of expressing the modified soluble FGF receptor Fc fusion when introduced into an appropriate host cell. According to the preferred embodiment, the polynucleotide encoding the modified soluble FGF receptor Fc fusion has the sequence of SEQ ID NO: 1, or a sequence sharing at least 80% identity with SEQ ID NO: 1. As used herein, "vector" is understood to mean any nucleic acid comprising a nucleotide sequence of interest and capable of being incorporated into a host cell, and optionally to express an encoded protein or polypeptide. Vectors include linear nucleic acids,

30

35

plasmids, phagemids, cosmids and the like, all within the knowledge of a person skilled in the art. Polynucleotides encoding the FGFR or fusion compound of the invention, as well as vectors containing these nucleic acids and host cells wherein these vectors have been introduced, are also specifically incorporated into the scope of the invention.

5

Most preferably, the fusion molecules of the invention are encoded by DNA comprising an extracellular domain of an FGFR fused at the C terminus to the Fc $\gamma$ 1 region of the human immunoglobulin  $\gamma$ 1 gene. The Fc $\gamma$ 1 region of the immunoglobulin  $\gamma$ 1 gene includes at least a portion of the hinge domain and CH<sub>3</sub> domain, or at least a portion of the hinge domain, CH<sub>2</sub> domain and CH<sub>3</sub> domain. The DNA encoding the chimeric polypeptide molecules according to the present invention can be in its genomic configuration or its cDNA configuration. Signal peptides may be used to efficiently initiate the transport of a protein across the membrane of the endoplasmic reticulum. Signal sequences have been well characterized in the art and are known typically to contain 16 to 30 amino acid residues, although other sizes are possible. A detailed discussion of signal peptide sequences is provided by von Heijne (1986, *Nucleic Acids Res.*, 14:4683). According to a preferred embodiment, the signal peptide is taken from Interleukin-2 signal peptide (SEQ ID No. 8) as known in the art. The applicant has observed that fusing this peptide to an extracellular domain of an FGFR leads to a secreted protein with a homogenous N-terminal amino acid sequence, which is not the case when the endogenous FGFR signal peptide is used.

An expression vector containing the coding sequences of the modified soluble FGF receptor Fc fusion of the invention placed under the control of appropriate transcriptional and translational regulatory sequences can be constructed by recombinant DNA technology as known in the art. Such expression vector is introduced into a host cell by any technique known to the person skilled in the art. The resulting vector-containing cell is then grown to produce a modified soluble FGF receptor Fc fusion or fragment thereof, using any technique known to the person skilled in the art.

30

According to the invention, a variety of expression systems may be used to express the modified soluble FGF receptor Fc fusion molecules. In one aspect, such expression systems represent vehicles by which the coding sequences of interest may be produced and subsequently purified, but also represent cells which may, when transiently transfected with the appropriate nucleotide coding sequences, express a modified soluble FGF receptor Fc fusion molecule of the invention in situ. Mammalian

35

cells are commonly used for the expression of a recombinant modified soluble FGF receptor Fc fusion molecule, especially for the expression of whole recombinant modified soluble FGF receptor Fc fusion molecule. For example, mammalian cells such as HEK293 or CHO cells, in conjunction with a vector, containing the expression signal  
5 such as one carrying the major intermediate early gene promoter element from human cytomegalovirus, are an effective system for expressing the modified soluble FGF receptor Fc fusions of the invention (Foecking *et al.*, 1986, *Gene* 45:101; Cockett *et al.*, 1990, *Bio/Technology* 8:2).

10 In addition, a host cell is chosen which modulates the expression of the inserted sequences, or modifies and processes the gene product in the specific fashion desired. Such modifications (e.g., glycosylation) and processing of protein products may be important for the function of the protein. Different host cells have features and specific mechanisms for the post-translational processing and modification of proteins and  
15 gene products. Appropriate cell lines or host systems are chosen to ensure the correct modification and processing of the expressed modified soluble FGF receptor Fc fusion of interest. Hence, eukaryotic host cells which possess the cellular machinery for proper processing of the primary transcript, glycosylation of the gene product may be used. Such mammalian host cells include, but are not limited to, CHO, COS, HEK293,  
20 3T3 or myeloma cells. The host cell may be co-transfected with two or more expression vectors, including the vector expressing the protein of the invention. For example, a host cell can be transfected with a first vector encoding a modified soluble FGF receptor Fc fusion polypeptide, as described above, and a second vector encoding a glycosyltransferase polypeptide. Alternatively, the second vector could express a small  
25 interfering RNA against a glycosyltransferase.

For long-term, high-yield production of recombinant proteins, stable expression is preferred. In one embodiment of the invention, cell lines which stably express the modified soluble FGF receptor Fc fusion molecule may be engineered. Rather than  
30 using expression vectors which contain viral origins of replication, host cells are transformed with DNA under the control of the appropriate expression regulatory elements, including promoters, enhancers, transcription terminators, polyadenylation sites, and other appropriate sequences known to the person skilled in art, and a selectable marker. Following the introduction of the foreign DNA, engineered cells may  
35 be allowed to grow for one to two days in an enriched media, and then are moved to a selective media. The selectable marker on the recombinant plasmid confers resistance

to the selection and allows cells to stably integrate the plasmid into a chromosome and be expanded into a cell line.

A number of selection systems may be used according to the invention, including but not limited to the Herpes simplex virus thymidine kinase (Wigler *et al.*, 1977, *Cell* 11:223), hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase (Szybalska *et al.*, 1992, *Proc Natl Acad Sci USA* 48:202), glutamate synthase selection in the presence of methionine sulfoximide (*Adv Drug Del Rev*, 2006, 58: 671, and website or literature of Lonza Group Ltd.) and adenine phosphoribosyltransferase (Lowy *et al.*, 1980, *Cell* 22:817) genes in tk, hgp<sup>rt</sup> or ap<sup>rt</sup> cells, respectively. Also, antimetabolite resistance can be used as the basis of selection for the following genes: dhfr, which confers resistance to methotrexate (Wigler *et al.*, 1980, *Proc Natl Acad Sci USA* 77:357); gpt, which confers resistance to mycophenolic acid (Mulligan *et al.*, 1981, *Proc Natl Acad Sci USA* 78:2072); neo, which confers resistance to the aminoglycoside, G-418 (Wu *et al.*, 1991, *Biotherapy* 3:87); and hyg<sup>ro</sup>, which confers resistance to hygromycin (Santerre *et al.*, 1984, *Gene* 30:147). Methods known in the art of recombinant DNA technology may be routinely applied to select the desired recombinant clone, and such methods are described, for example, in Ausubel *et al.*, eds., *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons (1993). The expression levels of a modified soluble FGF receptor Fc fusion molecule can be increased by vector amplification. When a marker in the vector system expressing a modified soluble FGF receptor Fc fusion is amplifiable, an increase in the level of inhibitor present in the culture will increase the number of copies of the marker gene. Since the amplified region is associated with the gene encoding the modified soluble FGF receptor Fc fusion of the invention, production of said modified soluble FGF receptor Fc fusion will also increase (Crouse *et al.*, 1983, *Mol Cell Biol* 3:257).

A number of factors are known to the person skilled in the art to influence the glycosylation level of a glycoprotein. For example, modified mammalian host cells can be used to alter the glycosylation profile of modified soluble FGF receptor Fc fusion by increasing or diminishing the expression of glycosyltransferase. Such modified mammalian host cells include, but are not limited to, CHO, COS, HEK293, PER.C6, 3T3, YB2/O and myeloma cells (Stanley *et al.*, 1986, *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 249:533; Mori *et al.*, 2006, *Biotechnology and Bioengineering* 94:68; Chitlaru *et al.*, 1998, *Biochem. J.* 336:647; Umana *et al.*, 1999 *Nature Biotechnology* 17:176). It is also known to the person skilled in the art that bioprocess factors affect

glycoprotein oligosaccharide biosynthesis (Goochee *et al.*, 1994, *Curr Opin Biotechnol.* 5:546). The effect of cell culture conditions, such as glucose or ammonium ions concentration, pH, serum, and the effects of other bioprocess factors, such as cell growth rate, cultivation time, influence N-linked glycosylation (*Biotechnol. Bioeng.* 39:327 (1993); *Biotechnol. Bioeng.* 68:370 (2000); *Bio/technology* 11:720 (1993); *Cytotechnology* 17:13 (1995); *Biochem J.* 272:333 (1990)). It is also known that in addition to the host cells and the bioprocess factors, the oligosaccharide processing is influenced by the local environment at each N-glycosylation site pending on the local glycoprotein environment. Site-to-site differences may be extensive as was observed with t-PA or may involve more subtle differences in branching and terminal processing as observed for the three N-glycosylation sites of EPO (Goochee *et al.*, 1991, *Bio/Technology* 9: 1347).

After it has been produced, a modified soluble FGF receptor Fc fusion of the invention may be purified by any method known in the art for purification of an immunoglobulin molecule, for example, by chromatography (e.g., ion exchange, affinity, particularly by Protein A affinity for Fc after and so on), centrifugation, differential solubility or by any other standard technique for the purification of proteins.

Quantitative sialic acid identification (N-acetylneuraminic acid residues), carbohydrate composition analysis and quantitative oligosaccharide mapping of N-glycans in the purified modified soluble FGF receptor Fc fusion proteins can be performed essentially as described previously (Saddic *et al.* *Methods Mol. Biol.* 194:23-36 (2002) and Anumula *et al.* *Glycobiology* 8:685-694 (1998)).

Fusion proteins incorporating soluble FGF receptor domains can be produced by methods familiar to those in the art for any other mammalian, expressible or biologically active fusion, *mutatis mutandis*. For example, methods reported to combine the Fc regions of IgG with the domains of cytokines and soluble receptors can be adopted to design and produce the FGFR compounds of the invention (*see, for example*, Capon *et al.*, *Nature*, 337:525-531 (1989); Chamow *et al.*, *Trends Biotechnol.*, 14:52-60 (1996); U.S. 5,116,964, 5,349,053 and 5,541,087). Other examples of receptor-Ig fusion proteins that can be adopted include those of U.S. 5,726,044; 5,707,632; and 5,750,375. Because FGF receptor extracellular domains share a significant degree of homology to the immunoglobulin gene family and the FGFR extracellular domain contains Ig-like segments, the use of Fc regions is especially preferred. In one example, the fusion is a homodimeric protein linked through cysteine

residues in the hinge region of IgG Fc, resulting in a molecule with similar characteristics to an IgG molecule. One advantage to using an Fc region is extended circulating half-life. In addition, the glycosylation modifications of the modified soluble FGF receptor Fc fusion proteins of the invention lead to improved pharmacokinetic properties, as the fusions of the invention exhibit *in vivo* pharmacokinetic profiles comparable to human IgG of a similar isotype.

A further embodiment of the present invention provides a method for making a modified soluble FGF receptor Fc fusion protein comprising a FGFR fragment or domain, a flexible peptide linker, and a human IgG Fc variant, which method comprises: (a) generating a CHO-derived cell line; (b) growing the cell line under conditions such that the recombinant fusion protein is expressed; and (c) purifying the expressed protein from step (b). In this case, preferably, the flexible peptide linker comprising at least about 3 amino acids between the soluble FGF receptor and the human IgG Fc variant comprises two or more amino acids selected from the group consisting of glycine, serine, alanine, and threonine. In additional and related embodiments, the linker peptide is not present or is only one amino acid in length. In a preferred embodiment, the peptide linker does not include a protease cleavage site. The most preferred linker is SAL (Ser-Ala-Leu).

Preferably, the modified soluble FGF receptor fusion protein is produced in CHO cells in a suspension mode as described in the Examples herein.

As shown in the Examples herein, the modified soluble FGF receptor Fc fusions of the present invention have anti-tumoral activity, at least through induction of ADCC and/or CDC responses, and are thus useful in the treatment of metastatic tumors and diseases such as cancer. One aspect of the invention is thus directed to a modified soluble FGF receptor Fc fusion as described above with ADCC and/or CDC activities.

Of special interest are modified soluble FGF receptor Fc fusions with enhanced ability to mediate cellular cytotoxic effector functions such as ADCC. Such proteins may be obtained by making single or multiple substitutions in the Fc region of the molecule, thus altering its interaction with the Fc receptors. Methods for designing such mutants can be found for example in Lazar *et al.* (2006, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 103(11): 4005-4010) and Okazaki *et al.* (2004, *J. Mol. Biol.* 336(5):1239-49). See also WO 03/074679, WO 2004/029207, WO 2004/099249, WO2006/047350, WO 2006/019447,

- WO 2006/105338, WO 2007/041635. It is also possible to use cell lines specifically engineered for production of improved modified soluble FGF receptor Fc fusions. In particular, these lines have altered regulation of the glycosylation pathway, resulting in modified soluble FGF receptor Fc fusions which are poorly fucosylated or even totally defucosylated. Such cell lines and methods for engineering them are disclosed in e.g. Shinkawa *et al.* (2003, *J. Biol. Chem.* **278**(5): 3466-3473), Ferrara *et al.* (2006, *J. Biol. Chem.* **281**(8): 5032-5036; 2006, *Biotechnol. Bioeng.* **93**(5): 851-61), EP 1331266, EP 1498490, EP 1498491, EP 1676910, EP 1792987, and WO 99/54342.
- 10 Methods of inhibiting tumor growth in a subject, and methods for the treatment or prevention of metastasis in a subject, comprising administering an efficient amount of such modified soluble FGF receptor Fc fusions as described above, are an aspect of the invention. The invention thus also relates to the modified soluble FGF receptor Fc fusion as described above as a medicament. The present invention also relates to the
- 15 use of the modified soluble FGF receptor Fc fusion as described above for the preparation of a medicament for treating or inhibiting tumor growth in a subject. Another aspect of the invention relates to pharmaceutical compositions of the modified soluble FGF receptor Fc fusion of the invention. The pharmaceutical compositions of the invention typically comprise the modified soluble FGF receptor Fc fusion of the
- 20 invention and a pharmaceutically acceptable carrier. As used herein, "pharmaceutically acceptable carrier" includes any and all solvents, buffers, salt solutions, dispersion media, coatings, antibacterial and antifungal agents, isotonic and absorption delaying agents, and the like that are physiologically compatible. The type of carrier can be selected based upon the intended route of administration. In various embodiments, the
- 25 carrier is suitable for intravenous, intraperitoneal, subcutaneous, intramuscular, topical, transdermal or oral administration. Pharmaceutically acceptable carriers include sterile aqueous solutions or dispersions and sterile powders for the extemporaneous preparation of sterile injectable solutions or dispersion. The use of media and agents for pharmaceutically active substances is well known in the art. As detailed herebelow,
- 30 additional active compounds can also be incorporated into the compositions, such as anti-cancer and/or anti-angiogenesis agents; in particular, the additional active compound can be an anti-angiogenic agent, a chemotherapeutic agent, or a low-molecular weight agent. A typical pharmaceutical composition for intravenous infusion could be made up to contain 250 ml of sterile Ringer's solution, and 100 mg of the
- 35 combination. Actual methods for preparing parenterally administrable compounds will be known or apparent to those skilled in the art and are described in more detail in for

example, Remington's Pharmaceutical Science, 17th ed., Mack Publishing Company, Easton, Pa. (1985), and the 18<sup>th</sup> and 19<sup>th</sup> editions thereof, which are incorporated herein by reference.

- 5 The modified soluble FGF receptor Fc fusion of the invention can also be prepared with carriers and controlled-release formulations, including implants and microencapsulated delivery systems. Biodegradable and biocompatible polymers can be used, such as ethylene vinyl acetate, polyanhydrides, polyglycolic acid, collagen, polyorthoesters, polylactic acid and polylactic, polyglycolic copolymers (PLG). Many methods for the  
10 preparation of such formulations are generally known to those skilled in the art.

- The modified soluble FGF receptor Fc fusion in the composition preferably is formulated in an effective amount. An "effective amount" refers to an amount effective, at dosages and for periods of time necessary, to achieve the desired result, such as  
15 modulation of FGF and/or FGFR activities and induction of ADCC and/or CDC responses. A "therapeutically effective amount" means an amount sufficient to influence the therapeutic course of a particular disease state. A therapeutically effective amount is also one in which any toxic or detrimental effects of the agent are outweighed by the therapeutically beneficial effects.

20

- For therapeutic applications, the modified soluble FGF receptor Fc fusions of the invention are administered to a mammal, preferably a human, in a pharmaceutically acceptable dosage form such as those discussed above, including those that may be administered to a human intravenously as a bolus or by continuous infusion over a  
25 period of time, by intramuscular, intraperitoneal, intracerebrospinal, subcutaneous, intraarticular, intrasynovial, intrathecal, oral, topical, or inhalation routes. The modified soluble FGF receptor Fc fusions also are suitably administered by intratumoral, peritumoral, intralesional, or perilesional routes, to exert local as well as systemic therapeutic effects. The intraperitoneal route is expected to be particularly useful, for  
30 example, in the treatment of ovarian tumors.

- Dosage regimens may be adjusted to provide the optimum response. For example, a single bolus may be administered, several divided doses may be administered over time, or the dose may be proportionally reduced or increased. The compositions of the  
35 invention can be administered to a subject to effect cell growth activity in a subject. As used herein, the term "subject" is intended to include living organisms in which an FGF-

dependent cell growth exists and specifically includes mammals, such as rabbits, dogs, cats, mice, rats, monkey transgenic species thereof, and humans.

The modified soluble FGF receptor Fc fusions and the pharmaceutical compositions of the invention are useful in the treatment or prevention of a variety of cancers, including (but not limited to) the following: carcinoma, including that of the bladder, breast, colon, head and neck, kidney, including renal cell carcinoma, liver, lung, ovary, pancreas, stomach, cervix, thyroid and skin; including squamous cell carcinoma; hematopoietic tumors of lymphoid lineage, including leukemia, acute lymphocytic leukemia, acute lymphoblastic leukemia, B-cell lymphoma, T-cell lymphoma, Burkitt's lymphoma; hematopoietic tumors of myeloid lineage, including acute and chronic myelogenous leukemias and promyelocytic leukemia; tumors of mesenchymal origin, including fibrosarcoma and rhabdomyosarcoma; other tumors, including melanoma, seminoma, teratocarcinoma, neuroblastoma and glioma; tumors of the central and peripheral nervous system, including astrocytoma, neuroblastoma, glioma, and schwannomas; tumors of mesenchymal origin, including fibrosarcoma, rhabdomyosarcoma, and osteosarcoma; and other tumors, including melanoma, xeroderma pigmentosum, keratoactanthoma, seminoma, thyroid follicular cancer and teratocarcinoma, and other cancers yet to be determined which are caused by FGF overexpression. In a preferred embodiment, the modified soluble FGF receptor Fc fusion of the invention is used to treat melanoma, leukemia, renal cancer, colon cancer, ovarian cancer, prostate cancer, lung cancer, bladder cancer, breast cancer, or head and neck cancer.

The present invention thus relates to the use of the modified soluble FGF receptor Fc fusion described above for the preparation of a medicament for treating or inhibiting cancer-related diseases in a subject. It is an aspect or object of the present invention to provide a method of treating diseases and processes that result from cancer cell proliferation, and a composition for treating or repressing the growth of a cancer. Yet another aspect of the invention is to provide compositions and methods useful for gene therapy for the modulation of cancer. The method of the present invention may be used in particular for the treatment of melanoma, leukemia, renal cancer, colon cancer, ovarian cancer, prostate cancer, lung cancer, bladder cancer, breast cancer, or head and neck cancer.

The effectiveness of the modified soluble FGF receptor Fc fusion in preventing or treating disease may be improved by administering said fusion serially or in

combination with another agent that is effective for those purposes, such as tumor necrosis factor (TNF), an antagonist capable of inhibiting or neutralizing the angiogenic activity of acidic or basic fibroblast growth factor (FGF), platelet-derived growth factor (PDGF), or hepatocyte growth factor (HGF); an antagonist capable of inhibiting or neutralizing the coagulant activities of tissue factor, protein C, or protein S (see WO 91/01753), an antagonist such as an antibody capable of binding to HER2 receptor (see US 5,772,997), or one or more conventional therapeutic agents such as, for example, alkylating agents, folic acid antagonists, anti-metabolites of nucleic acid metabolism, antibiotics, pyrimidine analogs, 5-fluorouracil, cisplatin, purine nucleosides, amines, amino acids, triazol nucleosides, or corticosteroids.

In another aspect of the invention, the administration is combined with an administration of therapeutically effective amount of chemotherapeutic agent, such as for example, taxol (paclitaxel) or taxotere (docetaxel).

Chemotherapeutic agents include without any limitations, anti-microtubule agents such as diterpenoids and vinca alkaloids; platinum coordination complexes; alkylating agents such as nitrogen mustards, oxazaphosphorines, alkylsulfonates, nitrosoureas, and triazenes; antibiotic agents such as anthracyclins, actinomycins and bleomycins; topoisomerase II inhibitors such as epipodophyllotoxins; antimetabolites such as purine and pyrimidine analogues and antifolate compounds; topoisomerase I inhibitors such as camptothecins; hormones and hormonal analogues; signal transduction pathway inhibitors; non-receptor tyrosine kinase angiogenesis inhibitors; immunotherapeutic agents; proapoptotic agents; and cell cycle signaling inhibitors. In addition, the methods of the invention can be combined with another anti-cancer treatment, anti-angiogenic agent, or chemotherapeutic agent or radiation therapy. A preferred example is docetaxel or taxotere. Other examples include, gemcitabine, cisplatin diterpenoids and vinca alkaloids, paclitaxel, vinblastine, vincristine, and vinorelbine, carboplatin, cyclophosphamide, melphalan, and chlorambucil, busulfan, carmustine, dacarbazine, cyclophosphamide, melphalan, chlorambucil, busulfan, carmustine, dacarbazine, anti-neoplastic agents including, but not limited to, actinomycins such as dactinomycin, anthracyclins such as daunorubicin and doxorubicin, bleomycins, epipodophyllotoxins, etoposide and teniposide; antimetabolite neoplastic agents, 5-fluorouracil, methotrexate, cytarabine, mecaptopurine, thioguanine, camptothecins, irinotecan HCl, and topotecan HCl.

A variety of different chemotherapeutic agents or anti-cancer polypeptides can also be selected. Information sources such as [www.clinicaltrials.gov](http://www.clinicaltrials.gov), [www.ncbi.nlm.nih](http://www.ncbi.nlm.nih), and [www.drugs.com](http://www.drugs.com), include references to polypeptides and agents that can be selected.

- 5 Such other agents, e.g. anti-angiogenic agents or chemotherapeutic agents may be present in the composition being administered or may be administered separately. In one aspect of the invention, the administration is performed with the other active principle, either simultaneously, separately or sequentially over time. When the administration is performed simultaneously, the two active principles may be combined
- 10 in a single pharmaceutical composition, comprising the two compositions, such as a tablet or a gel capsule. On the other hand, the two active principles may, whether or not they are administered simultaneously, be present in separate pharmaceutical compositions. To this end, the combination may be in the form of a kit comprising, on the one hand, the modified soluble FGF receptor Fc fusion as described above and, on
- 15 the other hand, the second active principle, the modified soluble FGF receptor Fc fusion as described above and the second active principle being in separate compartments and being intended to be administered simultaneously, separately, or sequentially over time.
- 20 The combination according to the present invention can be administered especially for tumor therapy in combination with chemotherapy, protein therapy ( i.e. using a therapeutic agent such as an antibody or recombinant protein), gene therapy, radiotherapy, immunotherapy, surgical intervention, or a combination of these. Long-term therapy is equally possible as is adjuvant therapy in the context of other treatment
- 25 strategies, as described above.

- The examples that follow are merely exemplary of the scope of this invention and content of this disclosure. One skilled in the art can devise and construct numerous modifications to the examples listed below without departing from the scope of this
- 30 invention.

## Examples

### Example 1: Production in HEK293 of sFGFR2-Fc with a high sialic acid content and low blood clearance.

- 5 cDNAs encoding human  $\alpha$ -1,4-galactosyltransferase (B4GT1) (SEQ ID No. 9) or human  $\beta$ -2,3-sialyltransferase (SIAT6) (SEQ ID No. 11) were retrieved from clone collection (Invitrogen) and cloned into the mammalian expression vector pXL4214 from which expression is driven from the CMV promoter. The same expression vector was
- 10 also used to clone the protein fusion sFGFR2-Fc and generate pXL4410. Map of plasmids pXL4551 encoding B4GT1, pXL4544 encoding SIAT6 and pXL4410 encoding the modified soluble FGFR2IIIc-Fc fusion (herein designated as sFGFR2-Fc) are presented on Fig. 1 and 5 as well as the nucleic acid and corresponding amino acid
- 15 sequence of B4GT1 (Fig. 2), SIAT6 (Fig. 3) and sFGFR2-Fc (Fig. 4 A and B). sFGFR2-Fc was produced in adherent HEK293 EBNA cells (Invitrogen) by transient transfection of one to three expression plasmids encoding sFGFR2-Fc, B4GT1 or SIAT6 complexed with JET PEI (Q-Biogen). Plasmid ratio was 90/5/5 for pXL4410/pXL4544/pXL4551. Plasmid ratio had to be optimized to ensure optimal productivity and quality of the
- 20 sFGFR2-Fc polypeptide. Secreted proteins were harvested eight days post-transfection and centrifuged. Proteins were purified by affinity chromatography on Protein G Sepharose (Amersham Biosciences) after elution from the column with 100 mM glycine/HCl pH 2.7. The sFGFR2-Fc proteins were formulated in PBS and 0.22  $\mu$ m filtered. Protein concentration was determined by the microBC Assay (Interchim).
- 25 Quantitative sialic acid identification, carbohydrate composition analysis and quantitative oligosaccharide mapping of N-glycans in the sFGFR2-Fc purified proteins were performed essentially as described previously (Saddic *et al.* 2002. *Methods Mol. Biol.* 194:23-36 and Anumula *et al.* 1998. *Glycobiology* 8:685-694). First, sialic acid residues were released after mild hydrolysis of sFGFR2-Fc and fluorescently labeled
- 30 with ortho-phenylenediamine and separated by reversed-phase HPLC. Individual peaks were detected by fluorescence detection (excitation, 230 nm; emission, 425 nm), identified and quantitated by comparison with N-acetylneuraminic and N-glycolylneuraminic acid standards. Second, the carbohydrate composition was determined after acid hydrolysis of sFGFR2-Fc samples to release the individual
- 35 monosaccharides. After hydrolysis, the monosaccharides (neutral and amino sugars) were derivatized with anthranilic acid and then separated by reversed-phase HPLC and

detected by fluorescence detection (excitation, 360 nm; emission, 425 nm). Individual peaks were identified and quantitated by comparison with monosaccharide standards. Third, oligosaccharides were enzymatically released with PNGase F and fluorescently labeled with anthranilic acid before separation according to their number of sialic acid residues by normal phase-anion exchange HPLC on an Asahipak-NH2P (Phenomenex) column. Labeled glycans were detected and quantitated by fluorescence detection (excitation, 360 nm; emission, 425 nm). The average number of sialic acid per N-glycan in the FGFR2 domain was calculated based on the total amount of moles of N-glycan per mole of FGFR2-Fc and the moles of N-glycan per Fc mole obtained after release of the Fc by papain.

The purified sFGFR2-Fc proteins were injected in the tail of Swiss Nude mice (Charles River). A total of three mice were used per protein batch. Blood was collected 6-hour post injection of 500 µg of sFGFR2-Fc, plasma was obtained and FGFR2-Fc concentration was determined by ELISA utilizing the sandwich method with an anti-human FGFR2 monoclonal antibody (R&D system) and an anti-human IgG-HRP conjugate polyclonal antibody (Pierce) (2 analysis at 2 dilutions in triplicate). In the control experiments mice were pretreated with fetuin and asiolo fetuin one hour prior to injection of sFGFR2-Fc.

Table 1 summarizes the condition of production of the different sFGFR2-Fc batches, the N-glycan profile and monosaccharide composition of each batch and the plasma concentration of sFGFR2-Fc 6-hour post intravenous injection in mice.

Table 1- N-Glycan content and pharmacokinetic of FGFR2-Fc produced in HEK293

| Expressed protein in HEK293EBNA                                                                      | sFGFR2-Fc | sFGFR2-Fc + SIAT6 | sFGFR2-Fc + SIAT6 & B4GT1 |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|-------------------|---------------------------|
| % sFGFR2-Fc sialylated species:                                                                      |           |                   |                           |
| 1-non sialylated                                                                                     | 69 %      | 46 %              | 34 %                      |
| 2-monosialylated                                                                                     | 23 %      | 19 %              | 22 %                      |
| 2-disialylated                                                                                       | 6 %       | 26 %              | 35 %                      |
| 3-trisialylated                                                                                      | 1.5 %     | 10 %              | 10 %                      |
| Sialic acid content:                                                                                 |           |                   |                           |
| 1-pmol of N-acetylneuraminic acid per pmol of sFGFR2-Fc                                              | 3.4       | 6.4               | 6.8                       |
| 2-Average number of sialic acid per sFGFR2 N-glycan                                                  | 0.4       |                   | 1                         |
| Monosaccharide composition of sFGFR2-Fc N-glycans for 3 mannoses                                     |           |                   |                           |
| 1-Glucosamine (number per 3 mannoses)                                                                | 4.3       | 4.1               | 4.1                       |
| 2-Galactose (number per 3 mannoses)                                                                  | 1.5       | 1.4               | 1.6                       |
| Number of fucose in Fc N-glycans for 3 mannoses                                                      | 0.73      | 0.61              | 0.63                      |
| Blood clearance                                                                                      |           |                   |                           |
| [sFGFR2-Fc] in plasma 6-hour post i.v. injection (ng/mL)                                             | 258       |                   | 20000                     |
| [sFGFR2-Fc] in plasma 6-hour post i.v. injection (ng/mL) when mice were pretreated with fetuin       | 229       | Not done          | Not done                  |
| [sFGFR2-Fc] in plasma 6-hour post i.v. injection (ng/mL) when mice were pretreated with asialofetuin | 19276     | Not done          | Not done                  |

Improved sialylation pattern of sFGFR2-Fc fusion proteins produced in HEK293EBNA  
5 has been demonstrated by transient co-expression of the fusion protein with human  $\alpha$ -1,4-galactosyltransferase or human  $\beta$ -2,3-sialyltransferase. This large improvement of sialylation status was evidenced by a 2-fold reduction of the percentage of non-sialylated glycans, a 2-fold increase in the total sialic acid content per mol of protein

and a 2.5-fold increase in the average number of sialic acid per N-glycan. Of note the monosaccharide content was not affected (see Table 1).

5 This 2.5-fold increase in sialylated N-glycan is directed correlated with the significantly improved pharmacokinetic parameters of sFGFR2-Fc. In particular a 100-fold increase of the sFGFR2-Fc presence in the plasma has been measured 6-hour post iv injection in mice.

10 The pharmacokinetic was also improved by 100-fold when mice were pretreated with asialofetuin compared to the pretreatment with fetuin. Asialofetuin, but not fetuin, is known to bind to the hepatic asialoglycoprotein receptor (ASGPR) (Webster *et al.*, 2003, *Xenobiotica* 33:945)

15 Taken together, these results indicate that specific binding to asialoglycoprotein receptor via exposed terminal galactose residues from N-glycan are responsible for clearance of sFGFR2-Fc whereas the presence of one sialic acid per N-glycan on sFGFR2-Fc decreased significantly this clearance.

20 **Example 2: Screening of CHO stable clones expressing sFGFR2-Fc protein with an average number of sialic acid residues per FGFR2 N-glycan greater than 1.2 for optimal pharmacokinetics**

25 Mammalian expression plasmid pXL4636 for stable expression of sFGFR2-Fc in CHO cells was generated from plasmid pEE14.4 encoding glutamine synthetase selection marker (Lonza) and plasmid pXL4410 containing the cDNA sequence encoding sFGFR2-Fc, Fig 5. Plasmid pXL4636 was introduced into CHO K1 cells by nucleofection utilizing AMAXA cell line Nucleofactor kit as recommended by the supplier. Transfected cells were transferred into selective medium and after cell amplification the seven best producer CHO/GS semi-clones (SC# 9, 11, 26, 58, 112, 118, 170) were screened for the sialic acid content of the purified sFGFR2-Fc molecules. The two semi-clones with the highest sialic acid content (SC # 11 and 118) were selected for cloning and up-scale production; in particular clone from SC# 118 was further described as GC111.

35 Although sFGFR2-Fc molecules produced from all the semi-clones had a high sialic acid content, they did not lead to the same pharmacokinetics. Interestingly, it was observed that from two semi-clones (SC#11 and 118), sFGFR2-Fc with the highest

sialic acid content led to the highest sFGFR2-Fc concentration in the blood 6-hour post iv injection in mice, as described on Table 2. And from the two clones (SC# 9 and 170) sFGFR2-Fc with the lowest sialic acid content had the lowest sFGFR2-Fc concentration in the blood 6-hour post iv injection in mice.

5

Table 2- CHO stable clones expressing sFGFR2-Fc protein with a ratio of sialic acid residues per sFGFR2 N-glycan greater than 1.2 for optimal pharmacokinetics

|                                                                                                                        |          |           |           |           |            |            |            |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------|-----------|-----------|-----------|------------|------------|------------|
| Purified sFGFR2-Fc from CHO-GS semi-clone SC #                                                                         | SC#<br>9 | SC#<br>11 | SC#<br>26 | SC#<br>58 | SC#<br>112 | SC#<br>118 | SC#<br>170 |
| % sFGFR2-Fc sialylated species                                                                                         |          |           |           |           |            |            |            |
| 1-non sialylated                                                                                                       | 50       | 42        | 48        | 48        | 45         | 43         | 53         |
| 2-monosialylated                                                                                                       | 28       | 30        | 30        | 30        | 30         | 30         | 28         |
| 3-disialylated                                                                                                         | 14       | 18        | 14        | 15        | 16         | 17         | 13         |
| 4-trisialylated                                                                                                        | 8        | 10        | 7         | 8         | 9          | 10         | 6          |
| Average number of sialic acid per sFGFR2 N-glycan                                                                      | 1.07     | 1.45      |           |           |            | 1.29       | 0.98       |
| [sFGFR2-Fc]/[sFGFR2-Fc]max<br>[sFGFR2-Fc] found in plasma 6-hour post i.v. injection<br>[sFGFR2-Fc]max found for SC#11 | 55%      | 100 %     |           |           |            | 81 %       | 45 %       |

10    The screening of clones based on high sialylated N-glycan of sFGFR2-Fc is predictive of optimal pharmacokinetics parameters of sFGFR2-Fc.

**Example 3: Correlation between the average number of sialic acid per sFGFR2-Fc N-glycan and the clearance of sFGFR2-Fc in blood**

15

In other experiment similar to the experiment described in Example 2, stable CHO/DHFR clones expressing sFGFR2-Fc were generated using the DHFR selection

and amplification system with the appropriate mammalian expression plasmids pXL4429 and plasmid pXL4417 (Fig. 6). These CHO-DHFR clones have also been screened for the content of sialic acid per sFGFR2-Fc molecule and the clearance of sFGFR2-Fc produced by these clones was also assayed.

5

The average number of sialic acid per N-glycan in the FGFR2 domain was calculated based on the total amount of moles of N-glycan per mole of FGFR2-Fc and the moles of N-glycan per Fc mole obtained after release of the Fc by papain. The results presented on Fig. 7 showed that a ratio of sialic acid residues per FGFR2 N-glycan greater than 1.2 ensured optimal sFGFR2-Fc concentration in the blood as compared to the optimal concentration in the blood found for Fc molecules. Only the selected clones reached this optimal ratio.

10

Therefore screening clones by the ratio of sialic acid residues per FGFR2 N-glycan allows the skilled person to predict the low clearance of sFGFR2-Fc in blood.

15

**Example 4: Amino acid sequence of the sFGFR2-Fc fusion protein**

The protein sFGFR2-Fc encoded by plasmid pXL4410 or pXL4636 or pXL4429 (Figure 5 and 6) is a fusion protein of the soluble FGFR2 human sequence with the Fc fragment derived from the human IgG1 sequence.

20

The sequence of the polynucleotide encoding sFGFR2-Fc is set forth in SEQ ID NO: 1 and in Figure 4 A. Likewise, the full amino acid sequence of the sFGFR2-Fc protein is set forth in SEQ ID NO: 2 in Figure 4B. Amino acids from positions 1 to 350 correspond to the FGFR2IIIc isotype (see Fig 4 C SEQ ID; NO: 4) and are the amino acids from position 27 to 376 described in SwissProt (FGFR2\_HUMAN). Amino acids from positions 354 to 584 are amino acids of IgG1 from position 99 to 329 as described in SwissProt (IGHG1\_HUMAN); see Fig 4 D and SEQ ID NO: 6. Amino acids from positions 351 to 353 are amino acids of a synthetic linker: SAL (Ser Ala Leu) see Fig 4 E.

25

30

**Example 5: Defined N-glycan content of sFGFR2-Fc produced in CHO stable clone GC111**

Conditions have been optimized to produce sFGFR2-Fc such that the ratio of sialic acid residues per sFGFR2 N-glycan would be higher than 1.2. This example provides conditions to reach this condition.

35

A 5-L Celligen bioreactor (New Brunswick) filled with 4.4 L of CD-CHO protein-free media, supplemented with 100  $\mu$ M MSX and 1X GS supplements was seeded at an initial cell density of  $3.5 \times 10^5$  cells/mL of clone GC111 and cultured at 37°C. Sparger  
5 aeration was employed using a mixture of oxygen, nitrogen, air and carbon dioxide or pur oxygen, and dissolved oxygen was maintained at 30 % of air saturation. The pH was maintained at 7.2 by addition of carbon dioxide and injection of 1 M sodium bicarbonate in the culture medium. The agitation rate used was 110 rpm using a Cell Lift Impeller. The feed solution (450 g/L glucose) was continuously fed to maintain the  
10 glucose at a target level of 2-3 g/L. Feeding was started at day 5 when residual glucose concentration reached 2.5 g/L. Continuous nutrient feeding was based on the predicted cell growth and glucose consumption with a nutrient feeding rate equal to the glucose consumption rate. The glutamate concentration was maintained at 1-3 mmol/L by pulse addition following daily off-line control. The cell culture was monitored for cell count,  
15 viability and metabolites (glucose, lactate, glutamine, ammonia and glutamate) and for product concentration during the production phase. The culture was stopped when cell viability dropped down to 55%, and the culture harvest was collected.

The cell culture harvest was clarified and sFGFR2-Fc was purified by affinity chromatography (Prosepva, Millipore) and two ion-exchange chromatography steps  
20 then filtered sterile and stored in phosphate buffer saline before further analysis and *in vivo* testing.

The apparent molecular mass of sFGFR2-Fc obtained from SDS-PAGE analysis under non-reducing conditions was 180 kDa. This was in contrast with the theoretical  
25 molecular mass of 130 kDa calculated based on the amino acid sequence of the sFGFR2-Fc homodimer. This large difference between apparent and calculated molecular masses was attributed to the additional presence of about 30 % of N-glycans, see Table 3. Indeed upon digestion of the sFGFR2-Fc by Peptide-N-glycosidase F (PNGase F, Roche) followed by analysis by SDS-PAGE under non-reducing conditions,  
30 the molecular mass of deglycosylated sFGFR2-Fc was around 160 kDa (Fig. 7).

The carbohydrate composition and the N-glycan profile of sFGFR2-Fc was analyzed as described on Example 1 and reported on Table 3.

Table 3 Carbohydrate composition and N-glycan profile of sFGFR2-Fc produced in  
35 optimal conditions

37

|                                                                  |           |
|------------------------------------------------------------------|-----------|
| Expressed protein from stable CHO-GS clone GC111                 | sFGFR2-Fc |
| % sFGFR2-Fc sialylated species:                                  |           |
| 1-non sialylated                                                 | 30 %      |
| 2-Monosialylated                                                 | 34 %      |
| 3-Disialylated                                                   | 23 %      |
| 4-trisialylated                                                  | 13 %      |
| Average number of sialic acid per sFGFR2 N-glycan                | 1.34      |
| Monosaccharide composition of sFGFR2-Fc N-glycans per 3 mannoses |           |
| 1-Glucosamine (number per 3 mannoses)                            | 4.9       |
| 2-Galactose (number per 3 mannoses)                              | 2.7       |
| 3-Fucose (number per 3 mannoses)                                 | 0.96      |
| Fucose composition of Fc N-glycan per 3 mannoses                 | 1.1       |

Compared to the results obtained on Table 2, sFGFR2-Fc, produced from clone GC111 in the optimal conditions, had more sialylated N-glycan than sFGFR2-Fc produced from the semi-clone SC#118, parent of clone GC111 produced in standard conditions. For example the % of non-sialylated species decreased from 43% to 30%.

Based on the total amount of moles of N-glycan per mole of FGFR2-Fc and the moles of N-glycan per Fc mole obtained after release of the Fc by papain, it was measured that there were seven N-glycans per FGFR2. Therefore most the sites of the FGFR2 domain are almost all fully occupied.

**Example 6: N-glycosylation sites important for FGF affinity and productivity**

The sFGFR2-Fc fusion protein has eight N-glycosylation sites in the FGFR2 domain and one in the Fc domain, see Fig 8 and Table 5 for definition of N-glycan positions N1 to N8. Proteins 4493 and 4565, two variants of sFGFR2-Fc no longer having Ig-like domain 1, were produced. 4493 exhibited characteristics similar to wild type FGFR2-Fc derived from pXL4636 in terms of productivity and binding to FGF-2 or heparin. In contrast, 4565 in which all glycosylation sites in the sFGFR2 domain were mutated (N- to Q substitution) could not be characterized due to the more than 50-fold reduction in productivity of the mutant; see Table 4.

Table 4. Physico-chemical characteristics of sFGFR2-Fc variants

| Protein ID | N-Glycosylation sites in FGFR2 domain | Amino acid residue at N-glycosylation site | Production (mg/L) | FGF-2 binding **                    | Heparin binding                      |
|------------|---------------------------------------|--------------------------------------------|-------------------|-------------------------------------|--------------------------------------|
|            |                                       |                                            |                   | K <sub>D</sub> (10 <sup>-9</sup> M) | [NaCl] for elution from heparin (mM) |
| 4410       | 8 (N1 to N8)                          | N                                          | 75                | 1.39                                | 370                                  |
| 4493       | 6 (N3 to N8)                          | N                                          | 67                | 1.19                                | 442                                  |
| 4565       | 6 (N3 to N8)                          | Q                                          | < 1               | ND                                  | ND                                   |

5       \*\* Binding to FGF-2 was determined on a BIAcore™ instrument utilizing a "two-state reaction with conformation change" model as described by Gamsjaeger *et al.*, Biochem. J. 7 Apr. 2005 / BJ20050156. In brief, integration was performed on the entire sensogram except in the "bulk effect" areas. Concentration range was selected between 1 to 8 nM. The simultaneous ka/kd kinetics method allows the measurements of two ka and two kd assuming the following equations:

10

ka1 and kd1 for A+B ⇌ AB  
ka2 and kd2 for AB ⇌ AB\* that may represent dimerization of (FGF - FGFR2-Fc) complexes

15       The dissociation constant K<sub>D</sub> was calculated from the following formula:

$$\frac{1}{(ka_1 / kd_1) \times (1 + ka_2 / kd_2)}$$

20

According to the two competing models reported (the symmetric two-end model from Mohammadi and the asymmetric model from Pellegrini), sites N3 to N7 could potentially interact with amino acid residues of either FGF1 or FGFR2c and/or interact

with heparin, whereas site N8 is unlikely to be involved in interactions in all crystal structures (Pellegrini *et al.* 2000. *Nature* **407**: 1029; Ibrahimi *et al.* 2005 *Mol. Cell. Biol.* **25** : 671).

5     Based on the above information, it was relevant to study the N-glycosylation sites at positions N3 to N7 by substitution of the corresponding Asn to Gln and by keeping position N8 unchanged to allow for significant productivity. The positional influence of N-glycans on physico-chemical characteristics of sFGFR2-Fc was evaluated statistically with a two-level fractional factorial experiment. Five variables (glycosylation site occupancy at positions N3 to N7) were selected and 16 independent constructs were studied. The experimental  $2^{5-1}$  fractional design and data analysis were performed as described (Statistics for Experimenters, G. Box Ed., Willey, 1978).

**Fractional Factorial Design**

15     Site-specific N-glycosylation variants were designed based on 4493 and the factorial design at two levels with five variables (N3 to N7) that could either be at a plus level (N) or a minus level (Q). The design was fractional with 16 constructs ( $2^{5-1}$ , i.e. resolution V design), allowing the identification of the main effects and of 2-factor interactions but confounding 2-factor with 3-factor interactions.

20     The 16 plasmid constructs were obtained by sequential PCR and cloning to generate the N to Q substitution at position N3, N4, N5, N6 or N7 but keeping position N8 and the N-glycosylation site of the Fc domain unchanged. These protein variants only differed from 4493 by the 2- or 4-point mutations listed on Table 5.

25

30

35

Table 5. Design matrix

| Asn position on<br>Figure 9    | Construct | N-glycosylation position status |     |     |     |     |     |               |
|--------------------------------|-----------|---------------------------------|-----|-----|-----|-----|-----|---------------|
|                                |           | N3                              | N4  | N5  | N6  | N7  | N8  | N 297<br>(Fc) |
| Asn position on<br>FGFR2_HUMAN |           | 228                             | 241 | 265 | 297 | 318 | 331 |               |
|                                | 4572      | -                               | -   | -   | -   | +   | +   | +             |
|                                | 4570      | +                               | -   | -   | -   | -   | +   | +             |
|                                | 4577      | -                               | +   | -   | -   | -   | +   | +             |
|                                | 4571      | +                               | +   | -   | -   | +   | +   | +             |
|                                | 4587      | -                               | -   | +   | -   | -   | +   | +             |
|                                | 4585      | +                               | -   | +   | -   | +   | +   | +             |
|                                | 4586      | -                               | +   | +   | -   | +   | +   | +             |
|                                | 4573      | +                               | +   | +   | -   | -   | +   | +             |
|                                | 4574      | -                               | -   | -   | +   | -   | +   | +             |
|                                | 4575      | +                               | -   | -   | +   | +   | +   | +             |
|                                | 4588      | -                               | +   | -   | +   | +   | +   | +             |
|                                | 4576      | +                               | +   | -   | +   | -   | +   | +             |
|                                | 4579      | -                               | -   | +   | +   | +   | +   | +             |
|                                | 4569      | +                               | -   | +   | +   | -   | +   | +             |
|                                | 4578      | -                               | +   | +   | +   | -   | +   | +             |
|                                | 4493      | +                               | +   | +   | +   | +   | +   | +             |

5 The 16 designed constructs were tested for production at small scale. Two variants (4572 and 4574) were very low producers (around 2 mg/L). The remaining 14 constructs were produced at liter-scale and purified in parallel under standard conditions with reasonable product recovery. They were then analyzed by SDS-PAGE, gel filtration, BIAcore™. Results were analyzed with the statistical fractional factorial resolution-  $2^{5-1}$  DOE.

## 10 Productivity

N-glycosylation at N3, N4, N5, N6, N7 had a positive contribution on productivity. There was a similar quantitative effect for all the positions studied (i.e. N3, N4, N5, N6 and N7) and no significant effect of two-factor interactions.

Table 6. Productivity

| Construct | Titer (mg/L) from production at 1-L | Response (mg/L) | Variable |
|-----------|-------------------------------------|-----------------|----------|
| 4572      | 0                                   | 28              | Mean     |
| 4570      | 13                                  | 17              | N3       |
| 4577      | 9                                   | 14              | N4       |
| 4571      | 34                                  | 20              | N5       |
| 4587      | 5                                   | 13              | N6       |
| 4585      | 40                                  | 13              | N7       |
| 4586      | 42                                  | -8              | N3-N4    |
| 4573      | 32                                  | 3               | N3-N5    |
| 4574      | 0                                   | 1               | N3-N6    |
| 4575      | 30                                  | -2              | N3-N7    |
| 4588      | 37                                  | -2              | N4-N5    |
| 4576      | 27                                  | -1              | N4-N6    |
| 4579      | 30                                  | 6               | N4-N7    |
| 4569      | 54                                  | 4               | N5-N6    |
| 4578      | 37                                  | 0               | N5-N7    |
| 4493      | 67                                  | -1              | N6-N7    |

Aggregation

5

Purified proteins were analyzed by gel filtration (Superdex 2000) to quantitate the percentage of high molecular weight species (HMW; %) in purified preparations. The highest value (worst-case) of 80.2 % HMW was obtained for 4587 and was used in the DOE analysis for the two constructs (4572 and 4574) that could not be produced (the mean percentage of HMW value obtained from the 14 constructs was also used for comparison, giving a similar conclusion). N-glycosylation at position N5 and to a lesser extent at position N6 disfavored the appearance of HMW species. The N5-N6 interaction exhibited a similar effect on aggregation.

15

Table 7. Aggregate formation

| Construct | HMW (%) | Response(%) | Variable |
|-----------|---------|-------------|----------|
| 4572      | 80      | 57          | Mean     |
| 4570      | 73.0    | -12         | N3       |
| 4577      | 71.6    | -5          | N4       |
| 4571      | 72.1    | -33         | N5       |
| 4587      | 80.2    | -18         | N6       |
| 4585      | 47.5    | -7          | N7       |
| 4586      | 47.7    | 6           | N3-N4    |
| 4573      | 57.5    | -8          | N3-N5    |
| 4574      | 80      | -5          | N3-N6    |
| 4575      | 69.6    | 2           | N3-N7    |
| 4588      | 71.8    | -2          | N4-N5    |
| 4576      | 72.9    | 3           | N4-N6    |
| 4579      | 35.2    | -4          | N4-N7    |
| 4569      | 12.0    | -18         | N5-N6    |
| 4578      | 39.4    | -6          | N5-N7    |
| 4493      | 3.6     | 1           | N6-N7    |

Binding to FGF-2

- 5
- The binding affinity to FGF-2 was determined with BIAcore™ for each construct. Dissociation constant (K<sub>D</sub>) values between 0.49 and 2.31 nM were obtained for constructs showing measurable affinity. For constructs that did not bind to FGF-2 or could not be produced, a value of 10 nM was used for the DOE analysis. N-glycosylation at positions N5 and to a lower extent at positions N6 and N3 had a
- 10
- positive effect on binding to FGF-2. Interactions N3-N5 & N5-N6 had a significant positive effect on binding whereas interactions N3-N6 and N4-N7 had a negative effect on binding.

Table 8. Binding to FGF-2

| Construct | K <sub>D</sub> (nM) | Response(nM) | Variable |
|-----------|---------------------|--------------|----------|
| 4572      | 10                  | 6.8          | Mean     |
| 4570      | 10                  | -2.2         | N3       |
| 4577      | 10                  | -0.5         | N4       |
| 4571      | 10                  | -6.5         | N5       |
| 4587      | 10                  | -2.3         | N6       |
| 4585      | 2.7                 | 0.5          | N7       |
| 4586      | 10                  | 0.0          | N3-N4    |
| 4573      | 0.49                | -2.2         | N3-N5    |
| 4574      | 10                  | 2.0          | N3-N6    |
| 4575      | 10                  | 0.1          | N3-N7    |
| 4588      | 10                  | -0.5         | N4-N5    |
| 4576      | 10                  | 0.1          | N4-N6    |
| 4579      | 2.31                | 2.0          | N4-N7    |
| 4569      | 0.99                | -2.3         | N5-N6    |
| 4578      | 0.66                | 0.5          | N5-N7    |
| 4493      | 1.19                | 0.0          | N6-N7    |

5 This resolution-V 2<sup>5-1</sup> D.O.E. revealed that N-glycosylation had a positive contribution on productivity, at positions N3, N4, N5, N6, N7; had a positive impact on binding to FGF-2, at positions N5 >> N6 and N3; and disfavored the appearance of high molecular-weight molecules at all positions, especially N5 > N6.

10 Therefore N-glycan occupancy is mandatory at position N5, and recommended at positions N3, N4, N6 and N7 respectively (position 265, 228, 241, 297and 318 respectively on FGFR2\_HUMAN (Swissprot).

**Example 7: Pharmacokinetics of sFGFR2-Fc fusion protein**

15 In example 7, sFGFR2-Fc is the fusion protein corresponding to amino acid sequence SEQ ID N° 2 with an average number of sialic acid per sFGFR2 N-glycan of 1.3. Three mice per time point were injected with 500 µg of the fusion protein in the tail vein. At various time points after injection of the product, blood was collected, Figure 10 shows

protein concentration in plasma and liver. Figure 11 shows the amount of protein recovery at early time points in plasma and liver expressed in percentage of injected dose.

Pharmacokinetic parameters were calculated using non-compartmental analysis.

- 5 Elimination half-life was calculated with the last 6 data points that provided the best fit of the log-linear terminal phase (Table 9).

Table 9

| Parameter           | Units    | sFGFR2-Fc |
|---------------------|----------|-----------|
| t <sub>1/2</sub>    | hr       | 70.1      |
| T <sub>last</sub>   | hr       | 72.0      |
| C <sub>last</sub>   | µg/mL    | 27.6      |
| AUC <sub>last</sub> | hr*µg/mL | 3138      |
| Cl <sub>obs</sub>   | mL/hr/kg | 4.2       |
| V <sub>ss</sub>     | mL/kg    | 406       |

10

|                     |                                                                                    |
|---------------------|------------------------------------------------------------------------------------|
| AUC <sub>last</sub> | Area under the curve from the time of dosing to the last measurable concentration. |
| Cl <sub>obs</sub>   | Total body clearance for extravascular administration                              |
| C <sub>last</sub>   | Concentration corresponding to T <sub>last</sub>                                   |
| t <sub>1/2</sub>    | Terminal half-life                                                                 |
| T <sub>last</sub>   | Time of last measurable (non-zero) concentration.                                  |
| V <sub>ss</sub>     | an estimate of the volume of distribution at steady state                          |

- 15 Following intravenous administration, sFGFR2-Fc showed a favorable pharmacokinetic profile with a long elimination half-life (almost 3 days) and a reduced total body clearance. The volume of distribution was limited and lower than total body water volume, suggesting limited tissue distribution. At 72 h, sFGFR2-Fc plasma concentration stays at a very high concentration and clearance is also good. Pharmacokinetic parameters of sFGFR2-Fc are very compatible with the use of this fusion protein as a therapeutic. In effect as shown in the Examples, plasma concentration after intravenous injection in mice is substantially high, and clearance
- 20 stays very low at 72 h after injection. Importantly, the kinetics of sFGFR2-Fc cleavage in vivo is also very low, since the sFGFR2-Fc was only partially cleaved (40% after 18h) and the full-length molecule concentration remained unchanged until 72 h.

Therefore, the fusion molecule, as listed in SEQ ID NO: 2 and an average number of sialic acid per sFGFR2 N-glycan of 1.3, showed a favorable pharmacokinetic profile with a long elimination half-life (almost 3 days) and a satisfactory total body clearance.

5    **Example 8: Efficacy of the sFGFR2-Fc fusion protein in A549 subcutaneous tumor model**

10    In this example, sFGFR2-Fc is the fusion protein corresponding to amino acid sequence SEQ ID N° 2 with an average number of sialic acid per sFGFR2 N-glycan of 1.3.

**A549 subcutaneous tumor model**

15    A549 cells line had been identified as a tumor cell line to assess the efficacy of sFGFR2-Fc. It has been demonstrated in vitro by the Applicant that this cell line expresses FGF2 and also that sFGFR2-Fc can abrogate autocrine proliferation of these cells. A subcutaneous A549 tumor model was set up by the Applicant in Balb/c nude mice. Moreover the tumor in vivo expresses FGF2.

20    In this experiment, the efficacy of sFGFR2-Fc molecule was assessed on A549 tumor growth model. Products were injected subcutaneously twice a week. Different doses, i.e. 25, 15, and 5 mg/kg of the sFGFR2-Fc were assessed.

      After overall analysis of tumor volume evolution of the three treated group with sFGFR2-Fc were statically different to the tumor evolution of the group treated with PBS. sFGFR2-Fc is efficient on tumor growth in this model at the dose of 5 mg/kg twice a week.

25    **Experimental Design**

30    5.10<sup>6</sup> A549 cells in 200 µl were injected subcutaneous in Balb/c nude mice at day 0. After cell injection the same day, mice were randomized per block of 4 in four groups based on body weight. The treatments started after randomization the day after cell injection. Each group received subcutaneously 500, 300 or 100 µg/mouse/administration corresponding respectively to 25, 15 and 5 mg/kg, two times per week: Monday and Friday, during 39 days.

**Results**

**Tumor volume analysis**

As shown in Figure 12, the volume of the tumor was analyzed up to day 40. The groups 100 µg (triangle), 300 µg (squares) and 500 µg/mouse/administration (closed circles) were statistically different from group PBS (open circles). We concluded that sFGFR2-Fc decreased tumor growth at the dose 25, 15 and 5 mg/kg.

**Tumor weight at day 40**

As shown in Figure 13, the tumors were harvested and weighed at the end of the experiment. The groups 100 µg, 300 µg and 500 µg/mouse/administration were statically different to group PBS. We concluded that sFGFR2-Fc according to the present invention decreased tumor weight at the dose 25, 15 and 5 mg/kg.

Evolution of tumor growth of sFGFR2-Fc\_100, sFGFR2-Fc\_300 and sFGFR2-Fc\_500 groups were statistically different to the evolution of the group treated with PBS. The sFGFR2-Fc fusion protein according to the present invention (amino acid sequence SEQ ID N° 2 with an average number of sialic acid per sFGFR2 N-glycan of 1.3, is able to substantially decrease tumor growth at the dose of 5 mg/kg.

**Example 9: Efficacy of sFGFR2-Fc fusion protein in H460 subcutaneous tumor model**

In example 9, sFGFR2-Fc is the fusion protein corresponding to amino acid sequence SEQ ID N° 2 with an average number of sialic acid per sFGFR2 N-glycan of 1.6.

**H460 subcutaneous tumor model**

H460 cells line had been identified as a tumor cell line to assess the efficacy of sFGFR2-Fc. It has been demonstrated in vitro that this cell line expresses FGF2. In this experiment the efficacy of sFGFR2-Fc was assessed on tumor growth. Products were injected subcutaneously twice a week at the dose of 25 mg/kg. After overall analysis of tumor volume evolution, sFGFR2-Fc decreased tumor growth.

43

**Experimental Design**

5.10<sup>6</sup> H460 cells in 200 µl were injected subcutaneous in right flank of Balb/c nude mice at day 0. After cells injection, on the day of cell inoculation (Day 0) mice were  
5 randomized on the body weight measured and will be allocated to the treatments groups.

Treatments were administered twice a week by subcutaneously injections (200 µl) for 3 consecutive weeks (Monday and Friday). The first administration was performed on Day 1 after cell inoculation to maximize the exposure of the cells to the treatment.

10

**Results**

**Tumor volume analysis**

Figure 14 shows the tumor volume analysis up to day 22. We concluded that sFGFR2-Fc substantially decreased the tumor growth.  
15

**Tumor weight analysis**

Figure 15 shows the tumor weight analysis at day 22. We concluded that sFGFR2-Fc substantially decreased the tumor weight.  
20 Evolution of tumor growth of sFGFR2-Fc group was statically different of evolution of group treated with PBS. We clearly concluded that the fusion protein according to the present invention (amino acid sequence SEQ ID N° 2 with an average number of sialic acid per sFGFR2 N-glycan of 1.6 is able to substantially decrease H460 tumor growth at the dose of 25 mg/kg.

25

**Example 10: Evaluation of in vitro ADCC activity of sFGFR2-Fc fusion protein on A549 and H460 cell lines**

In this example sFGFR2-Fc is the fusion protein corresponding to amino acid sequence  
30 SEQ ID N° 2 with an average number of sialic acid per sFGFR2 N-glycan greater than 1.6. The capacity of sFGFR2-Fc to mediate an *in vitro* ADCC activity has been evaluated in both selected models H460 and A549 tumor cells (see examples 8 and 9).

**Experimental Design**

Tumor cells (A549 and H460) in PBS 2% BSA (1 million/mL) have been incubated 30 min at 4°C with 500 ng/mL of FGF2 (R&DSYSTEMS) and 2 µg/mL of sFGFR2-Fc or control human IgG1 (Sigma). Tumor cells have been diluted in RPMI 1% FBS and incubated in 96-well plate at 5000 cells per well. Purified NK have been added in ratio NK/tumor cells 20/1 and 6/1. Plates have been incubated 4 hours at 37°C, then centrifuged and lactate dehydrogenase has been titrated in the supernatant (kit ROCHE). 100% lysis was obtained using triton X100 0.2%. Specific sFGFR2-Fc induced ADCC was calculated as required by the manufacturer.

**Results**

The results illustrated on Figure 16, show a tumor cell lysis mediated by natural killer cells (NK) in the presence of sFGFR2-Fc on both A549 and H460 tumor cells close to 25 % in the 20/1 (NK/tumor cell) conditions, indicating that sFGFR2-Fc is able to mediate ADCC effect on these tumor cells.

**Example 11: Evaluation of in vivo ADCC and CDC activities of sFGFR2-Fc fusion protein in A549 subcutaneous tumor model**

In this example, sFGFR2-Fc is the fusion protein corresponding to amino acid sequence SEQ ID N° 2 with an average number of sialic acid per sFGFR2 N-glycan greater than 1.6.

**A549 subcutaneous tumor model**

A549 cell line has been identified as a tumor cell line to assess the efficacy of sFGFR2-Fc, since these cells expressed high level of FGF2 in vivo and were sensitive to *in vitro* sFGFR2-Fc-mediated-ADCC.

**Mouse strains**

Three different mouse strains (SCID, NOD/SCID and SCID/bg mice) were selected to evaluate the capacity of sFGFR2-Fc to mediate *in vivo* ADCC and/or CDC activities. SCID mice kept NK and complement functions and are able to develop ADCC and CDC responses and were selected as positive control. NOD/SCID mice have neither

NK function nor the ability to stimulate complement activity and were unable to develop neither ADCC nor CDC activities. SCID/bg mice have no NK function and were unable to develop ADCC activity.

In this experiment, the efficacy of sFGFR2-Fc molecule line was assessed on A549  
5 tumor subcutaneously implanted in three different mouse strains. sFGFR2-Fc was injected subcutaneously twice a week at the dose of 5 mg/kg during the entire study course.

**Experimental Design**

10 A549 was subcutaneously implanted in SCID, NOD/SCID and SCID/bg mice as previously described (see example 8). The treatments have been administered twice a week by subcutaneously injections for 6 consecutive weeks. During the study course, the body weight and the tumor volume have been measured twice a week.

**Results**

15 As shown in Figure 17, the volume of the tumor was analyzed up to day 41 in the 3 experiments. In SCID mice, the group treated by sFGFR2-Fc at 5 mg/kg (diamonds) was statistically different from group control (open circles) and showed a tumor inhibition (calculated as  $100 - (\text{Treated group volume} / \text{Control group volume} \times 100)$ ) of  
20 39%. In the NOD/SCID mice, sFGFR2-Fc at 5 mg/kg exhibited no activity. In the SCID/bg mice, sFGFR2-Fc at 5 mg/kg recovered partially its activity (tumor inhibition = 18%). According to these results, CDC and ADCC mechanisms were involved in sFGFR2-Fc efficacy.

25 **Example 12: Evaluation of in vivo ADCC and CDC activities of sFGFR2-Fc fusion protein in H460 subcutaneous tumor model**

In this example sFGFR2-Fc is the fusion protein corresponding to amino acid sequence SEQ ID N° 2 with an average number of sialic acid per sFGFR2 N-glycan greater than  
30 1.6.

**H460 subcutaneous tumor model**

H460 cell line has been identified as a tumor cell line to assess the efficacy of sFGFR2-Fc, these cells expressed high level of FGF2 in vivo and were sensitive to *in vitro*  
35 sFGFR2-Fc mediated-ADCC.

### Mouse strains

As previously described in example 11, three mouse strains with different immune functions (SCID, NOD/SCID and SCID/bg mice) were selected to evaluate the capacity of sFGFR2-Fc to mediate in vivo ADCC and/or CDC activities in H460.

In this experiment, the efficacy of sFGFR2-Fc molecule was assessed on H460 tumor subcutaneously implanted in the three different mouse strains. sFGFR2-Fc was injected subcutaneously twice a week at the dose of 25 mg/kg during the entire study course.

### Experimental Design

H460 was subcutaneously implanted in SCID, NOD/SCID and SCID/bg mice as previously described (see example 9). The treatments have been administered twice a week by subcutaneous injections for 3 consecutive weeks. During the study course, the body weight and the tumor volume have been measured twice a week.

### Results

As shown in Figure 18, the volume of the tumor was analyzed up to day 22 in the 3 experiments. In SCID mice, the group treated with sFGFR2-Fc at 25 mg/kg (diamonds) was statistically different from group control (open circles) and showed a tumor inhibition of 29%. In the NOD/SCID mice, sFGFR2-Fc at 5 mg/kg exhibited a lost of activity with a tumor inhibition of 14%. In the SCID/bg mice, sFGFR2-Fc at 5 mg/kg recovered all its activity (tumor inhibition = 32%). In these studies, as observed in the A549 tumor model (see example 11), CDC and ADCC mechanisms were involved in sFGFR2-Fc efficacy.

### Example 13 Evaluation of in vivo efficacy of sFGFR2-Fc compared to sFGFR2-Fc (A265 Fc) in H460 subcutaneous tumor model

Shields et al. described a point mutation Asp265Ala in the Fc domain of human IgG1 named (A265 Fc) that conferred reduced binding to all FcγR receptors and very low antibody-dependent cell cytotoxicity (2001 J. Biol. Chem 276:6591). This point mutation was introduced into the Fc domain of sFGFR2-Fc coding DNA sequence of plasmid pXL4547 (Fig. 19), resulting in the polynucleotide sequence represented by SEQ ID No. 13. Stable CHO/DHFR clones expressing sFGFR2-Fc (A265 Fc) (SEQ ID NO. 14)

were generated using the DHFR selection and amplification system with the appropriate mammalian expression plasmids pXL4547 and plasmid pXL4417 as described in Example 3. The protein sFGFR2-Fc (A265 Fc) was then produced and purified for *in vivo* studies. It was verified that its glycan content was similar to the glycan content found for sFGFR2-Fc produced in Examples 3 or 5.

| Expressed protein from stable CHO-DHFR                           | sFGFR2-Fc (A265 Fc) |
|------------------------------------------------------------------|---------------------|
| % sFGFR2-Fc sialylated species:                                  |                     |
| 1-non sialylated                                                 | 40 %                |
| 2-Monosialylated                                                 | 28 %                |
| 3-Disialylated                                                   | 22 %                |
| 4-trisialylated                                                  | 10 %                |
| Monosaccharide composition of sFGFR2-Fc N-glycans per 3 mannoses |                     |
| 1-Glucosamine (number per 3 mannoses)                            | 4.35                |
| 2-Galactose (number per 3 mannoses)                              | 2.74                |
| 3-Fucose (number per 3 mannoses)                                 | 0.89                |

460 subcutaneous tumor model

H460 cell line has been identified as a tumor cell line to assess the efficacy of sFGFR2-Fc; these cells expressed high level of FGF2 *in vivo* and were sensitive to *in vitro* sFGFR2-Fc-mediated-ADCC.

In this experiment, the efficacy of sFGFR2-Fc molecule and the modified sFGFR2-Fc (A265 Fc) molecule was assessed on H460 tumor subcutaneously implanted in nude mice.

Experimental Design

H460 was subcutaneously implanted in nude Balb/C mice as previously described (see example 9). The treatments have been administered twice a week during the entire study course. During the study course, the body weight and the tumor volume have been measured twice a week.

52

## Results

As shown in Figure 20, the volume of the tumor was analyzed up to day 23. The group treated by sFGFR2-Fc at 25 mg/kg (diamonds) was statistically different from the control group (open circles) and showed a tumor inhibition of 50%. The modified sFGFR2-Fc (A265 Fc) at 25 mg/kg exhibited a lost of activity with only a tumor inhibition of 25% (NS). The mutation within the Fc of sFGFR2-Fc (A265 Fc) induced a decrease of the activity.

Since this modification was shown to decrease antibody-dependent cell cytotoxicity, example 13 provides an indirect evidence that sFGFR2-Fc acted *in vivo* by a mechanism involving ADCC.

CLAIMS

1. A modified soluble FGF receptor Fc fusion comprising a fusion of a soluble fragment or domain of a FGF receptor with an Fc region of an immunoglobulin, wherein at least the 5<sup>th</sup> N-glycosylation site of the FGF receptor moiety is occupied, and at most 45% of the N-glycans of said FGF receptor moiety have no sialyl group.
2. The modified soluble FGF receptor Fc fusion of claim 1, wherein, in addition, the 3<sup>rd</sup>, 4<sup>th</sup>, 6<sup>th</sup> and 7<sup>th</sup> N-glycosylation sites of the FGF receptor moiety are occupied.
3. The modified soluble FGF receptor Fc fusion of claim 2, wherein at least 7 N-glycosylation sites of the FGF receptor moiety are occupied.
4. The modified soluble FGF receptor Fc fusion of claim 3, wherein all N-glycosylation sites of the FGF receptor moiety are occupied.
5. The modified soluble FGF receptor Fc fusion of any of the previous claims wherein the average number of sialic acid per N-glycan of the FGF receptor moiety is 0.9 or above.
6. The modified soluble FGF receptor Fc fusion of claim 5, wherein the average number of sialic acid per N-glycan of the FGF receptor moiety is 1.2 or above.
7. The modified soluble FGF receptor Fc fusion of any of the previous claims, wherein the K<sub>D</sub> value of said fusion for FGF2 measured by Biacore™ is comprised between 1 and 5 nM
8. The modified soluble FGF receptor Fc fusion of claim 7, wherein the K<sub>D</sub> value of said fusion for FGF2 measured by Biacore™ is around 1.5 nM.
9. The modified soluble FGF receptor Fc fusion of any of the previous claims wherein said fusion possesses ADCC and/or CDC activities.
10. The modified soluble FGF receptor Fc fusion of any of the previous claims, wherein the N-glycans of said fusion are 60-100 % fucosylated.
11. The modified soluble FGF receptor Fc fusion of any of the previous claims, wherein said modified soluble FGF receptor Fc fusion comprises 3 mannose residues, a mean of 1.5 to 3.0 galactose residues, a mean of 3.5 to 5 of N-acetylglucosamine residues, and a mean of 0.6 to 1 fucose residues per molecule of glycan.
12. The modified soluble FGF receptor Fc fusion of any of claims 1 to 9 wherein the N-glycans of said fusion are 0-60 % fucosylated.

54

- 13. The modified soluble FGF receptor Fc fusion of any of the previous claims ,  
wherein the FGF receptor is selected among FGF receptor 1 (FGFR1) or  
FGF receptor 2 (FGFR2).
- 5 14. The modified soluble FGF receptor Fc fusion of any of the previous claims,  
wherein the FGF receptor is selected among FGF receptor 1 isotype IIIc and  
FGF receptor 2 isotype IIIc.
- 10 15. The modified soluble FGF receptor Fc fusion of any of the previous claims,  
wherein the FGF receptor soluble domain has a sequence as set forth in  
SEQ ID NO: 4, or a sequence having an identity of at least 95% with the  
SEQ ID NO: 4.
- 15 16. The modified soluble FGF receptor Fc fusion of any of the previous claims,  
wherein the Fc portion has a sequence as set forth in SEQ ID NO: 6, or a  
sequence having an identity of at least 95% with the SEQ ID NO: 6.
- 17. The modified soluble FGF receptor Fc fusion of any of the previous claims,  
wherein said modified soluble FGF receptor Fc fusion further comprises a  
linker sequence of at least 3 amino acid residues.
- 18. The modified soluble FGF receptor Fc fusion of claim 17, wherein the linker  
sequence is SAL (Ser-Ala-Leu).
- 20 19. The modified soluble FGF receptor Fc fusion of any of the previous claims,  
wherein modified soluble FGF receptor Fc fusion has a polypeptide  
sequence as set forth in SEQ ID NO: 2, or a sequence having an identity of  
at least 95% with the SEQ ID NO: 2.
- 25 20. The modified soluble FGF receptor Fc fusion of any of the previous claims,  
wherein modified soluble FGF receptor Fc fusion further comprises the  
signal peptide of SEQ ID NO: 8.
- 21. A polynucleotide encoding the modified fusion FGF receptor of any of the  
previous claims.
- 22. The polynucleotide of claim 21 wherein said polynucleotide comprises a  
nucleotide sequence having at least 80 % identity with the nucleotide  
30 sequence of SEQ ID NO: 1.
- 23. A vector comprising a polynucleotide of any of claims 21 and 22.
- 24. A cell comprising a vector of claim 23.
- 25. The modified soluble FGF receptor Fc fusion of any one of claims 1 to 20 as  
a medicament.
- 35 26. A pharmaceutical composition comprising a modified fusion FGF receptor of  
any one of claims 1 to 20.

SS

27. The pharmaceutical composition of claim 26, wherein said composition contains a further therapeutic agent.
28. The pharmaceutical composition of claim 27, wherein said further therapeutic agent is an anti-angiogenic agent or a chemotherapeutic agent.
- 5 29. The pharmaceutical composition of claim 28, wherein said anti-angiogenic agent is a tumor necrosis factor, or an antagonist of an acidic or basic fibroblast growth factor (FGF), hepatocyte growth factor (HGF), tissue factor (TF), protein C, protein S, platelet-derived growth factor (PDGF), or HER2 receptor.
- 10 30. The pharmaceutical composition of claim 28, wherein said chemotherapeutic agent is selected from the group: anti-microtubule agents; platinum coordination complexes; alkylating agents; antibiotic agents; topoisomerase II inhibitors; antimetabolites; topoisomerase I inhibitors; hormones and hormone analogues; signal transduction pathway inhibitors;
- 15 non-receptor tyrosine kinase angiogenesis inhibitors; immunotherapeutic agents; pro-apoptotic agents; and cell cycle signaling inhibitors.
31. The pharmaceutical composition of claim 28, wherein said chemotherapeutic agent is selected from the group of taxol and taxotere.
- 20 32. The use of a modified soluble FGF receptor Fc fusion of any one of claims 1 to 20 for the preparation of a medicament for treating cancer.
33. The use of claim 32, comprising the use of a further therapeutic agent in the manufacture of the same or different composition.
34. The use of claim 33, wherein said further therapeutic agent is an anti-angiogenic agent or a chemotherapeutic agent.
- 25 35. The use of claim 34, wherein said anti-angiogenic agent is a tumor necrosis factor, or an antagonist of an acidic or basic fibroblast growth factor (FGF), hepatocyte growth factor (HGF), tissue factor (TF), protein C, protein S, platelet-derived growth factor (PDGF), or HER2 receptor.
- 30 36. The use of claim 34, wherein said chemotherapeutic agent is selected from the group: anti-microtubule agents; platinum coordination complexes; alkylating agents; antibiotic agents; topoisomerase II inhibitors; antimetabolites; topoisomerase I inhibitors; hormones and hormone analogues; signal transduction pathway inhibitors; non-receptor tyrosine kinase angiogenesis inhibitors; immunotherapeutic agents; pro-apoptotic
- 35 agents; and cell cycle signaling inhibitors.

56

37. The use of claim 34, wherein said chemotherapeutic agent is selected from the group of taxol and taxotere.
38. The use of claim 32, wherein said cancer is selected from the group of carcinoma, including that of the bladder, breast, colon, head and neck, kidney, including renal cell carcinoma, liver, lung, ovary, pancreas, stomach, cervix, thyroid and skin; including squamous cell carcinoma ; hematopoietic tumors of lymphoid lineage, including leukemia, acute lymphocytic leukemia, acute lymphoblastic leukemia, B-cell lymphoma, T-cell lymphoma, Burkitt's lymphoma ; hematopoietic tumors of myeloid lineage, including acute and chronic myelogenous leukemias and promyelocytic leukemia; tumors of mesenchymal origin, including fibrosarcoma and rhabdomyosarcoma; other tumors, including melanoma, seminoma, teratocarcinoma, neuroblastoma and glioma; tumors of the central and peripheral nervous system, including astrocytoma, neuroblastoma, glioma, and schwannomas; tumors of mesenchymal origin, including fibrosarcoma, rhabdomyosarcoma, and osteosarcoma; and other tumors, including melanoma, xeroderma pigmentosum, keratoactanthoma, seminoma, thyroid follicular cancer and teratocarcinoma.
39. The use of claim 38, wherein said cancer is selected from the group of melanoma, leukemia, renal cancer, colon cancer, ovarian cancer, prostate cancer, lung cancer, bladder cancer, breast cancer, and head and neck cancer

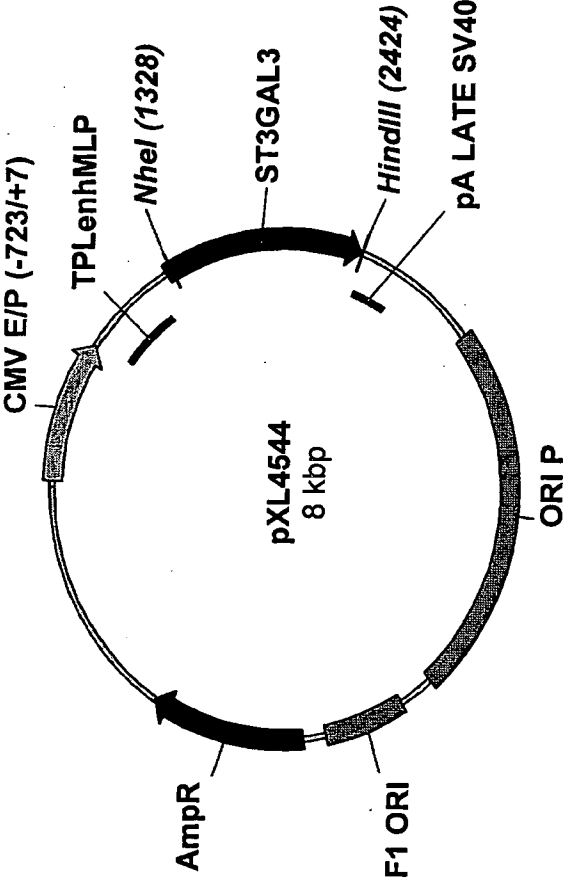


Fig. 1A

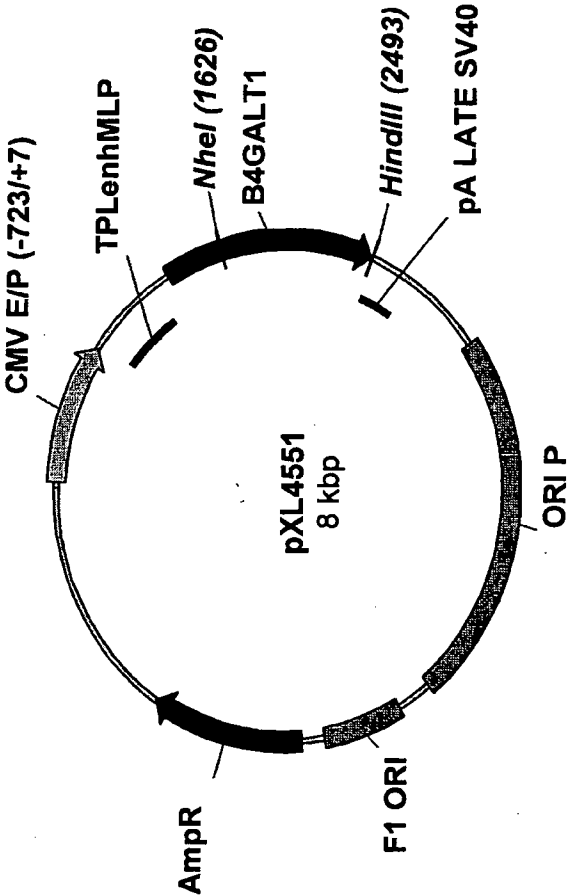


Fig. 1B

Fig. 2A

|      |                                                                                            |
|------|--------------------------------------------------------------------------------------------|
| 1281 | ATGAGG CTTGCGGAGC CGTCTCTGAG CGGCAGGCGC GCGATGCCAG GCGCTCCCT ACAGCGGGCC                    |
| 1361 | TACTCC GAAGCCCTCG GCGAGACTC GCGTGGCG GGTACGGT CCGCAGGGA TGTGCGCGG                          |
| 1441 | TGCGCGCTGC TCGTGGCGGT CTGCGCTCTG CACCTTGGG TCACCTCGT TTACTACTG GCTGGCCGG ACCTGAGCCG        |
| 1521 | ACGGCGGACG AGCAGCGGAC GACGCGGAG GTGGAACCGC AGTGGAGCA AATGATGAC CGACGGCGG TGGACTCGGC        |
| 1601 | CTGCCCCAA CTGGTCGGAG TCTCCACACC GCTGCAAGG GGTGCAACA GTCCGCGCG CATCGCGGG TCCTCGGGG          |
| 1681 | GGACGGGTT GACCAGCTC AGAGGTGTGG CGAGCTTGT CAGCGCGGG GTAGCCGTC AGGAGGCCCC                    |
| 1761 | AGCTCCGAC CGAGGGGC CGGCGCGC CTCTCTAG CGCTCTCC CAGCGCGC CGGCTGGCA CTCACGCCA                 |
| 1841 | TCGAGCCCTG GCCTCCCGG GCGGCGGG GAGAGATCC GCGAGGAG GTGCGCGGG GCCACCGT GAGTCCGGT              |
| 1921 | GTCGTGGATT CTGCGCTGG CCCCCTAGC AACTGACCT CGTCCCACT GCGGCTGCA CCGGTGTGG TGGGTGACA GCGACGGGG |
| 2001 | CAGCACTAA GACCGGACC GGGCGGATCG TTGAACCTGA GCGAGGTCA CCGGTGTGG TGGGTGACA GCGACGGGG          |
| 2081 | GACGGACTC CTCAGGGCG AGAACACCC GGGTACGAC TAATCAAT TGTACGGACA CTGGACCTC GATACCGTT            |
| 2161 | AGCAGAACCC AATGTGAAG ATGGCGGCC GCTATGCCG CAGGACTGC GTCTCTCTC ACRAGGTGG CATCATCTT           |
| 2241 | TCGTCTTGG TTACACTTC TACCGCGG CGATACGGG GTCCCTGACG CAGAGAGAG TGTCCACCG GTAGTAGTAA           |
| 2321 | CCATCCGCA ACCGGCAGG GCACCTCAAG TACTGGCTAT ATTATTGCA YCCAGTCTG CAGCGCCAGC AGCTGGACTA        |
| 2401 | GGTAAGGCGT TGGCGCTCCT CGTGGAGTTC ATGACCGATA TAATAACGT RGGTCAGAC GTGCGGGTGG TCGACCTGAT      |
| 2481 | TGGCATCTAT GTTATCAACC AGCGGGGAGA CACTATATTC AATCGTCTA AGCTCCTCAA TGTGGCTTT CAAGAAGCCT      |
|      | ACCGTAGATA CAATAGTTGG TCGCGCCTCT GTGATATAAG TTAGCAGAT TCGAGGAGT ACACCCGAA GTTCTTCGGA       |
|      | TGAAGGACTA TGACTACAC TGCTTTGTGT TTAGTGACT GGACCTCAT CCAATGAATG ACCATAATG GTACAGGTGT        |
|      | ACTTCCTGAT ACTGATGTG AGAACACACA AATCACTGCA CCTGGAGTAA GGTACTTAC TGTATTACG CATGTCCACA       |
|      | TTTTACAGC CAGGCACAT TTCCGTGCA ATGATAAGT TTGATTCAG CCTACCTTAT GTTCAGTAT TTGGAGGTGT          |
|      | AAAAGTGTG GTGCGGTGA AAGGCAAGT TACTATTCA AACCTAAGT GCATGATA CAAGTCATAA AACCTCCACA           |
|      | CTCTGCTTA AGTAACAAC AGTTCTAAC CATCAATGGA TTCTCTAATA ATTATTGGG CTGGGAGGA GAAGATGATG         |
|      | GAGACGAGT TCATTTGTG TTAAGAGATG GTACTATATC TCGCCCAAT TAATAACCC GACCCCTCTT CTCTACTAC         |
|      | ACATTTTAA CAGATTAGT TTTAGAGCA TGCTATATC TCGCCCAAT TAATAACCC GACCCCTCTT CTCTACTAC           |
|      | TGTAATAATT GTCTAATCAA AATCTCGT ACAGATATAG AGCGGTTTA CGACACAGC CCTCCACAG GTACTAGGG          |
|      | CACTCAAGAG ACAAGAAA TGAACCAAT CCTCAGAGT TTGACCGAAT TGCACACACA AAGGAGACAA TGTCTCTGA         |
|      | GTGAGTTCTC TGTCTTTT ACTTGGGTTA GGAGTCTCCA AACTGGCTTA AGTGTGTGT TTCTCTGT ACAGAGACT          |
|      | TGTTTGAAC TCACTCACCT ACCAGGTGCT GGATGTACAG AGATACCCAT TGTATACCA AATCACAGT GACATCGGA        |
|      | ACCAAACTG AGTGAGTGA TGGTCCAG CACTACATGC TCTATGGGA ACATATGGT TTAGTGTAC CTGTAGCCCT           |
|      | CACCGAGCTA G                                                                               |
|      | GTGGCTCGAT C                                                                               |

Fig. 2B

|     |                                                       |
|-----|-------------------------------------------------------|
| 1   | MRLREPLLGS SAAMPGLSLQ RACRLVAVC ALHLGVTLY YLAGRDLRL   |
| 51  | PQLVGVSTPL QGGSNSAAAI QSSGELRTG GARPPPLGA SSQPRPGDS   |
| 101 | SPVDSGPGP ASNLTSVPVP HTTALSFPAC PEESPLLVGP MLIEFNMFVD |
| 151 | LELVAKQNPV KVMGGRYAPR DCVSPHKVAI IIPFRNRQEH LKYWLYLHP |
| 201 | VLQRQQLDYG IYVINQAGDT IFNRKLLNV GFQELKDYD YTCFVSDVD   |
| 251 | LIPMNDHNAY RCFSPRHS VAMDKFGSL PYVQYFGVS ALSKQFLTI     |
| 301 | NGFPNNYWG GGEDDDIFNR LVFRGMSISR PNAVVGRCRM IRHSRDKNE  |
| 351 | PNQRFEDRIA HTKETMLSDG LNSLTYQVLD VQRYPLYTQI TVDIGTFS  |

58

59

3/23

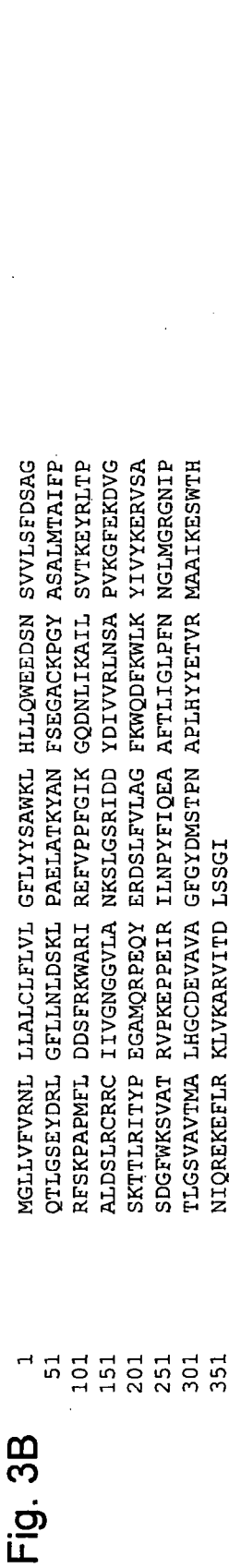
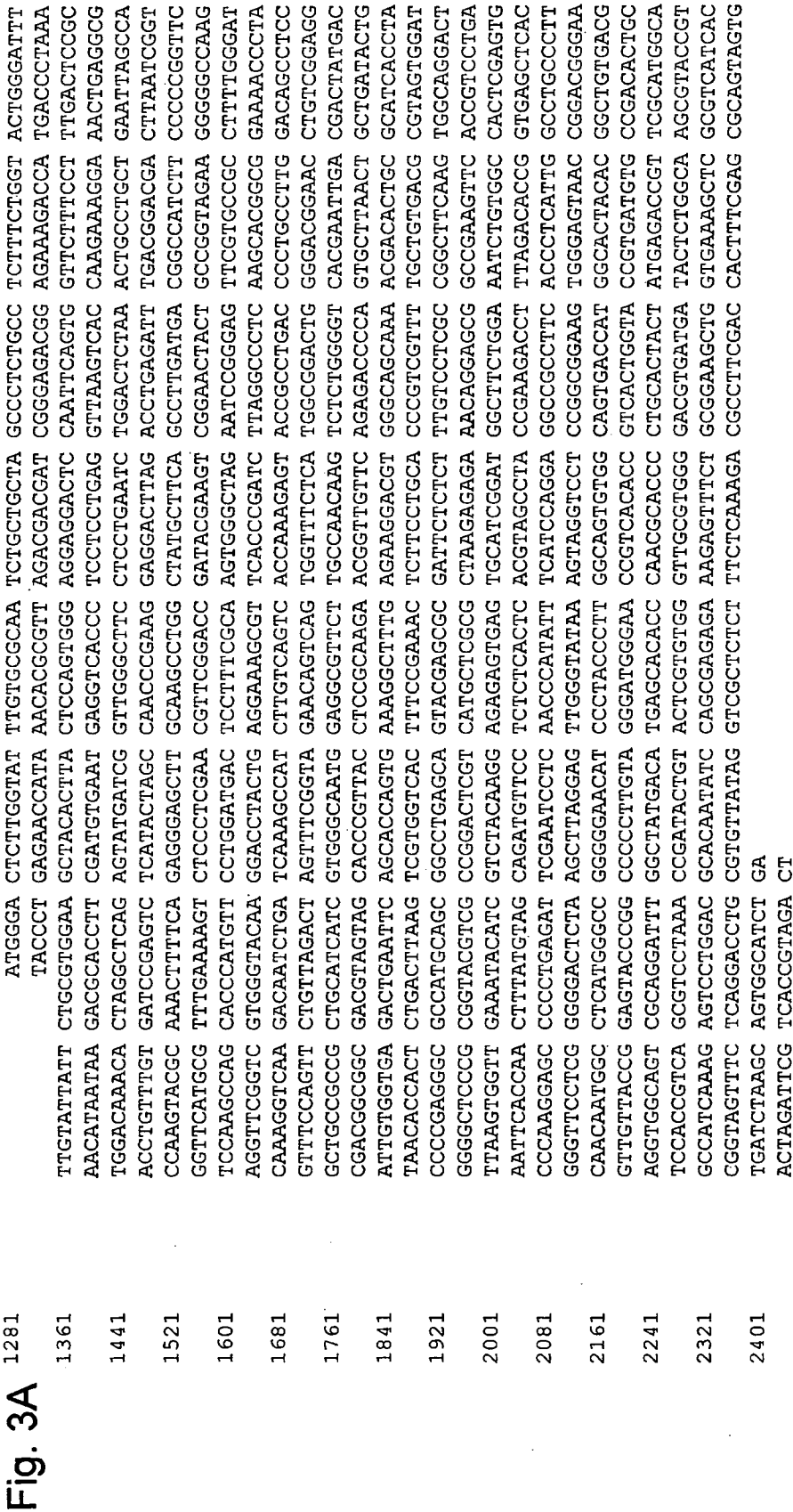


Fig. 4A

|      |                                                                                                   |                                                    |
|------|---------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------|
| 6241 | TGTCACGAAAT TCATTAGTTG AGGATACCAC ATTAGAGCCA GAAGAGCCAC CAATFAAATA CCAAATCTCT CAGACAGTGA          | ATGTACA GGATGCAACT CCTGTCTTGC ATTGCACTAA GCTTGCACT |
| 6321 | ACAGTGCTTA AGTAATCAAC TCCTATGGTG TAATCTGGGT CTCTCGGTG GTTGATTAT GGTTAGAGA GTTGGCTTC               | TACATGT CCTACGTTGA GGACAGAAG TAACGTGATT CAGACAGTGA |
| 6401 | TGTACGTGGC TGCACAGGG GAGTCCTAG AGGTGCGTG CCTGTGAAA GATGCGCGG TGATCAGTTG GACTAAGGAT                | CTTCTCGGTG GTTGATTAT GGTTAGAGA GTTGGCTTC           |
| 6481 | ACATGCACCG ACGTGGTCCC CTCAGGGATC TCCAGCGGAC TGGGAGGAGT GGTGAGGAGT CTACGCGGC ACTAGTCAAC CTGATTCTTA | CTACGCGGC ACTAGTCAAC CTGATTCTTA                    |
| 6561 | GGGTGCACT TGGGGCCCAA CAATAGACA GTGCTTATTG GGGAGTACTT GCAGATARA GCGGCCACGC CTAGAGACTC              | GGGAGTACTT GCAGATARA GCGGCCACGC CTAGAGACTC         |
| 6641 | CCGCACGTGA ACCCGGGTT GTTATCTCTGT CAGGATAAC CCCTCATGAA CGTCTATTTC CCGCGGTGCG GATCTCTGAG            | CGTCTATTTC CCGCGGTGCG GATCTCTGAG                   |
| 6721 | CGGCTCTAT GCTTGTACTG CCATAGGAC TGTAGACAGT GAATCTGGT ACTTCATGTT GAATGTACA GATGCCATCT               | ACTTCATGTT GAATGTACA GATGCCATCT                    |
| 6801 | GCCGGAGTA CGACATGAC GGTATCTTG ACATCTGTCA CTTTGACCA TGRAGTACCA CTTACAGTGT CTACGGTAGA               | CTTTGACCA TGRAGTACCA CTTACAGTGT CTACGGTAGA         |
| 6881 | CATCCGAGA TGTAGAGAT GACACCGATG GAAAGAGCGG CTCCATGCTG TGCCTGCGC CAACACTGTC AAGTTTCGCT GCCAGCGCG    | TTTGTCACT GAGAACAGTA ACAACAGAG AGCACCATAC          |
| 6961 | GTAGGCTCT ACTACTCTTA CTGTGCTTAC CAGGCTTCT AAGAGTCA CTCTGTCTAT TGTGTCTC TGTGTCTC TCGTGTATG         | CTCTGTCTAT TGTGTCTC TGTGTCTC TCGTGTATG             |
| 7041 | TGGACCAACA CAGAAAGAT GGAAGAGCGG GAGTATGTTA AAGAGTCA GGTGAGAC TCCAAAGCGA GGGTCGGCC                 | TTTGTCACT GAGAACAGTA ACAACAGAG AGCACCATAC          |
| 7121 | ACCTGGTGT GTCCTTCTTA CTTTTCGCC GAGTATGCT GAGTATGCT GAGTATGCT GAGTATGCT GAGTATGCT GAGTATGCT        | TGCCTGCGC CAACACTGTC AAGTTTCGCT GCCAGCGCG          |
| 7201 | GGGAAACCA ATGCCAACCA TGGGTGGCT GAAAGAGCGG GAGTATGCT GAGTATGCT GAGTATGCT GAGTATGCT GAGTATGCT       | AGGAGTCA GGTGAGAC TCCAAAGCGA GGGTCGGCC             |
| 7281 | CCCTTGGGT TACGTTGGT GAGTATGCT GAGTATGCT GAGTATGCT GAGTATGCT GAGTATGCT GAGTATGCT GAGTATGCT         | TTCTCAAT TCGTCTCT AGCGTAACT CCGATGTTCC             |
| 7361 | TACGAACCA GCATGGAGC CTCATTATGG AAGTGTGGT CCATCTGAC AAGGAAAT ATACCTGTGT GGTGAGAAAT                 | TTCTCAAT TCGTCTCT AGCGTAACT CCGATGTTCC             |
| 7441 | ATGCTTGGT CGTGACCTG GAGTATGCT GAGTATGCT GAGTATGCT GAGTATGCT GAGTATGCT GAGTATGCT GAGTATGCT         | TTCTCAAT TCGTCTCT AGCGTAACT CCGATGTTCC             |
| 7521 | GAATACGGT CCATCAATCA CAGTATGCT GAGTATGCT GAGTATGCT GAGTATGCT GAGTATGCT GAGTATGCT GAGTATGCT        | TTCTCAAT TCGTCTCT AGCGTAACT CCGATGTTCC             |
| 7601 | CTTATGCCA GGTATGCT GAGTATGCT GAGTATGCT GAGTATGCT GAGTATGCT GAGTATGCT GAGTATGCT GAGTATGCT          | TTCTCAAT TCGTCTCT AGCGTAACT CCGATGTTCC             |
| 7681 | GCCGCAAT GCCTCCACAG TGGTCGAGG AGACGTAGT TTTCTCTCA AGTTTACAG TGATGCCAG CCCACATCC                   | TTCTCAAT TCGTCTCT AGCGTAACT CCGATGTTCC             |
| 7761 | CGCCGTTTA CGAGGTGTC ACCAGCTCC TGTCTCTCA AGTTTACAG TGATGCCAG CCCACATCC                             | TTCTCAAT TCGTCTCT AGCGTAACT CCGATGTTCC             |
| 7841 | AGTGATCAA GCAGTGGAA AAGAGCGCA GTAAATACGG CCGGACCGG CTGCTCTAC TCAAGTTCT CAAGCCGCG                  | TTCTCAAT TCGTCTCT AGCGTAACT CCGATGTTCC             |
| 7921 | TCACCTAGT CGTGACCTT TTTCTGCCGT CATTTAGCC CGGCTGCCG GACGATGCT TCGGAGTGC GGGTGTAGG                  | TTCTCAAT TCGTCTCT AGCGTAACT CCGATGTTCC             |
| 8001 | GGTGTAA CAACGACAA AGAGATGAG GTTCTCTATA TTGGAATGT AACTTTTGT GACGCTGGG AATATACGTG                   | TTCTCAAT TCGTCTCT AGCGTAACT CCGATGTTCC             |
| 8081 | CCACAATGT GGTGCTGTT TGTCTAATC CAAGATATG AAGCTTACA TTGAAACTC TCGGACCCC TTATATGAC                   | TTCTCAAT TCGTCTCT AGCGTAACT CCGATGTTCC             |
|      | CTTGCGGCT AATCTATTG GGATATCCTT TCACTCTGCA TGTGTGAC AACTCTCA CATGCCACC GTGCCAGCA                   | TTCTCAAT TCGTCTCT AGCGTAACT CCGATGTTCC             |
|      | GAACGCCCA TTAGATATC CCTATAGGAA AGTAGAGCT ACCAATCTC AAGACGTCG GCGACCTTCT CTTTCTCT                  | TTCTCAAT TCGTCTCT AGCGTAACT CCGATGTTCC             |
|      | TTACAGCTC CCCAGACTAC CTGTACGCG TAGAGCCCA ATCTGTGAC AACTCTCA CATGCCACC GTGCCAGCA                   | TTCTCAAT TCGTCTCT AGCGTAACT CCGATGTTCC             |
|      | AATGCGAAG GGTCTGATG GACAGTCCG ATCTCGGCT TGAACACTG TTTGAGTGT TACGGGTGG CAGGGTCTG                   | TTCTCAAT TCGTCTCT AGCGTAACT CCGATGTTCC             |
|      | CCTGAATCC TGGGGGACC GTGAGTCTC CTCTTCCCG CAAACCCCA GGACACCTC ATGATCTCC GGACCCCTGA                  | TTCTCAAT TCGTCTCT AGCGTAACT CCGATGTTCC             |
|      | GGACTTGGG ACCCCCTGG CAGTCAGAAG GAGAAGGGG GTTTGGGT CTTGTGGAG TACTAGAGG CTTGGGACT                   | TTCTCAAT TCGTCTCT AGCGTAACT CCGATGTTCC             |
|      | GGTACATGC GTGTGGTGG ACGTAGCCA CGAAGACCT GTTCTGGA CTCAGTCA AGTTGACCAT GCACCTGCC CACTCCAG           | TTCTCAAT TCGTCTCT AGCGTAACT CCGATGTTCC             |
|      | CCAGTACG GACAAAGCC CGGAGGAGC AGTACACAG CACGTACCT GTGTGAGG TCCCTACCT CTTGCCACG                     | TTCTCAAT TCGTCTCT AGCGTAACT CCGATGTTCC             |
|      | ATAATGCCA GACAAAGCC CGGAGGAGC AGTACACAG CACGTACCT GTGTGAGG TCCCTACCT CTTGCCACG                    | TTCTCAAT TCGTCTCT AGCGTAACT CCGATGTTCC             |
|      | TATTACGGT CTGTTTGGC GCGCTCTCG TCAATGTGTC GTGATGGA CACCACTGC AGGAGTGGCA GGACGTGGT                  | TTCTCAAT TCGTCTCT AGCGTAACT CCGATGTTCC             |
|      | GACTGGCTGA ATGCAAGGA GTACAGTGC AAGTCTCCA ACAAAGCCCT CCCAGCCCC ATCGAGAAA CCACTCCAA                 | TTCTCAAT TCGTCTCT AGCGTAACT CCGATGTTCC             |
|      | CTGACCGACT TACGTTCTT CATGTTTACG TTCCAGAGT TGTTCGGA GGGTGGGG TAGCTCTTT GTTAGAGTT                   | TTCTCAAT TCGTCTCT AGCGTAACT CCGATGTTCC             |
|      | AGCCAAAGG CAGCCCCGAG ACCACAGGT GTACACCTG CCCCCATCC GGGATGAGT GACCAAGAC CAGTACGCC                  | TTCTCAAT TCGTCTCT AGCGTAACT CCGATGTTCC             |
|      | TCGTTTCCC GTGCGGCTC TTGTTTCCA CATGTGGAC GGGGTAGG CCGTCTGGA CTTGTTCTT GTTAGAGTT                    | TTCTCAAT TCGTCTCT AGCGTAACT CCGATGTTCC             |
|      | TGACTGCTT GGTCAAGG TTTATATCCA GGCATCTG CCGTGTAGG CCGTCTGGA CTTGTTCTT GTTAGAGTT                    | TTCTCAAT TCGTCTCT AGCGTAACT CCGATGTTCC             |
|      | ACTGGACGA CCAGTTTCC AGATAGAGT CCGTGTAGG CCGTGTAGG CCGTGTAGG CCGTGTAGG CCGTGTAGG                   | TTCTCAAT TCGTCTCT AGCGTAACT CCGATGTTCC             |
|      | AAGACACGC CTCGGTGTG GACTCCGAG GGTCTCTCT TCCTCTACG CAAGTACCC GTGGAAGA GCAGGTGGCA                   | TTCTCAAT TCGTCTCT AGCGTAACT CCGATGTTCC             |
|      | TTCTGGTGG GAGGACAGA CCTGAGGCT CCGAGGAGA AGGAGATGCT GTTCAGTGG CACTGTCT CCGTCCACCT                  | TTCTCAAT TCGTCTCT AGCGTAACT CCGATGTTCC             |
|      | GCAGGGGAC GTCTCTCAT GCTCCGTGAT GCATGAGCT CTGCACAACC ACTACACGA GAAGACCTC TCCCTGTCT                 | TTCTCAAT TCGTCTCT AGCGTAACT CCGATGTTCC             |
|      | CGTCCCTTG CAGAGAGTA CGAGGCACTA CGTACTCCA GACGTGTGG TGATGTGCT CTTCTCGGAG AGGACACAG                 | TTCTCAAT TCGTCTCT AGCGTAACT CCGATGTTCC             |
|      | GCCCAACT                                                                                          |                                                    |

60

Fig. 4B

1 LVEDTTLEPE EPPTYQISQ PEVYVAAPGE SLEVRCLLKD AAVISWTKDG  
51 VHLGPNRTV LIGELYQIKG ATPRDSGLYA CTASRTVDSE TWYFMVNTD  
101 AISSGDEDD TDGAEDFVSE NSNNKRAPYW TTEKMEKRL HAVPAANTVK  
151 FRCPAGGNPM PTMRWLKNGK EFKQEHRIIG YKVRNQHWSL IMESVVPSPDK  
201 GNYTCVWENE YGSINHTYHL DVVERSPHRP ILQAGLPANA STVVGGDVEF  
251 VCKVYSDAQF HIQWIKHVEK NGSKYGPDLG PYLKVLAAG VNTTDKEIEV  
301 LYIRNVTFED AGEYTCLAGN SIGISFHSW LTVLPAPGRE KEITASPDYL  
351 SALEPKSCDK THTCPPCPAP ELLGGPSVFL FPPKPKDTLM ISRTPEVTCV  
401 VVDVSHEDPE VKFNWYVDGV EVHNAKTKPR EEQYNSTYRV VSVLTVLHQD  
451 WINGKEYKCK VSNKALPAPI EKTISKAKGQ PREPQVYTLF PSRDELTKNQ  
501 VSLTCLVKGF YPSDIAVEWE SNGQPENNYK TTPPVLDSDG SFFLYSKLTV  
551 DKSRWQQGNV FSCSVMEAL HNHYTQKSLS LSPG

Fig. 4C

1 LVEDTTLEPE EPPTYQISQ PEVYVAAPGE SLEVRCLLKD AAVISWTKDG  
51 VHLGPNRTV LIGELYQIKG ATPRDSGLYA CTASRTVDSE TWYFMVNTD  
101 AISSGDEDD TDGAEDFVSE NSNNKRAPYW TTEKMEKRL HAVPAANTVK  
151 FRCPAGGNPM PTMRWLKNGK EFKQEHRIIG YKVRNQHWSL IMESVVPSPDK  
201 GNYTCVWENE YGSINHTYHL DVVERSPHRP ILQAGLPANA STVVGGDVEF  
251 VCKVYSDAQF HIQWIKHVEK NGSKYGPDLG PYLKVLAAG VNTTDKEIEV  
301 LYIRNVTFED AGEYTCLAGN SIGISFHSW LTVLPAPGRE KEITASPDYL

Fig. 4D

1 EPKSCDKTHT CPDPAPELL GGPSVFLFPP KPKDTLMISR TPEVTCVVVD  
51 VSHEDPEVKF NWYVDGVEVH NAKTKPREEQ YNSTYRVSV LTVLHQDWLN  
101 GKEYKCKVSN KALPAPIEKT ISKAKGPPE PQVYTLPPSR DELTKNQVSL  
151 TCLVKGFYPS DIAVEWESNG QPENNYKTP PVLDSDGSFF LYSKLTVDKS  
201 RWQQGNVFSC SVMHEALHNN YTQKSLSLSP G

Fig. 4E

1 SAL

Fig. 4F

1 MYRMLLSCL ALSIALVTNS

6/23

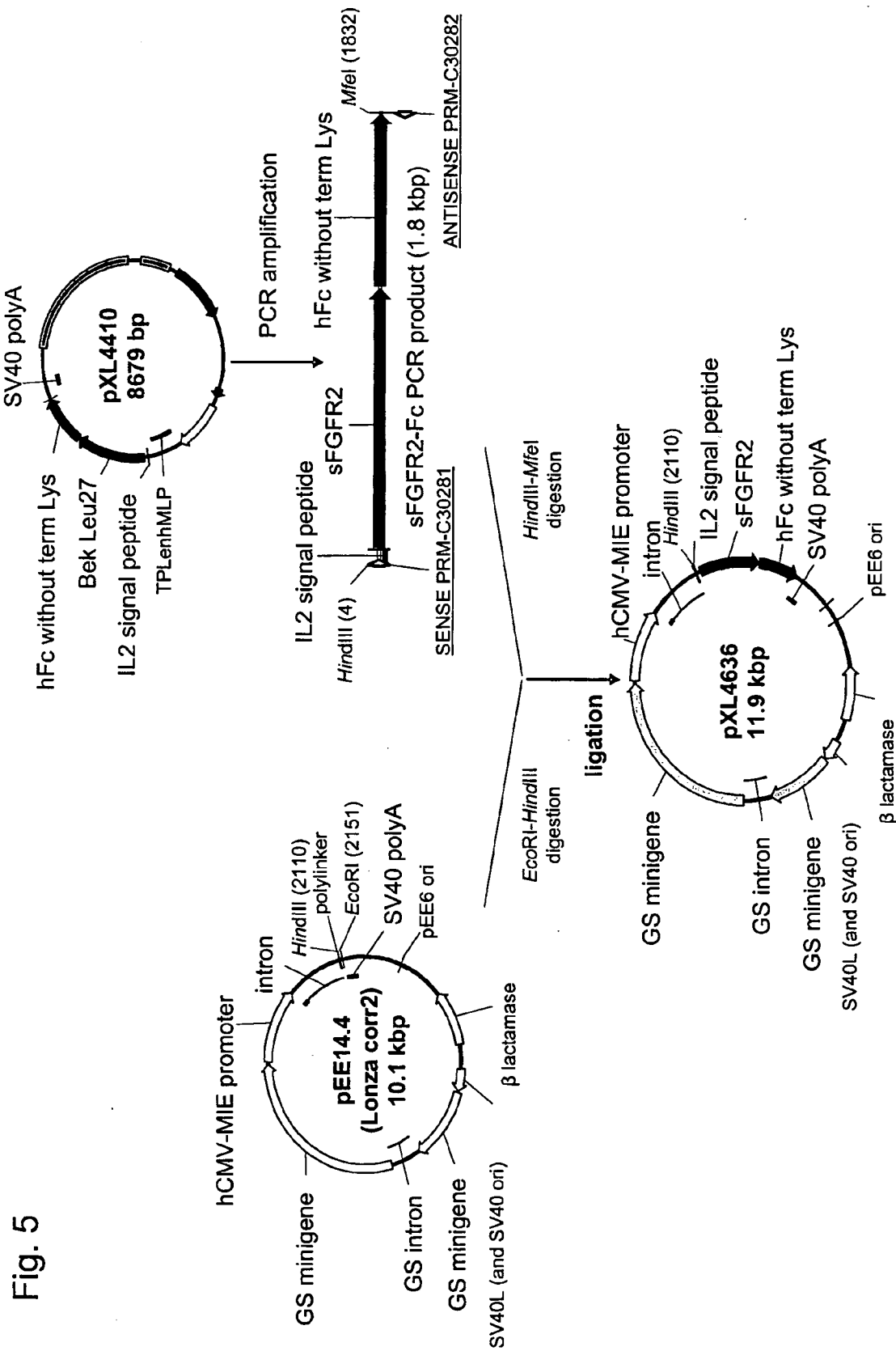


Fig. 5

7/23

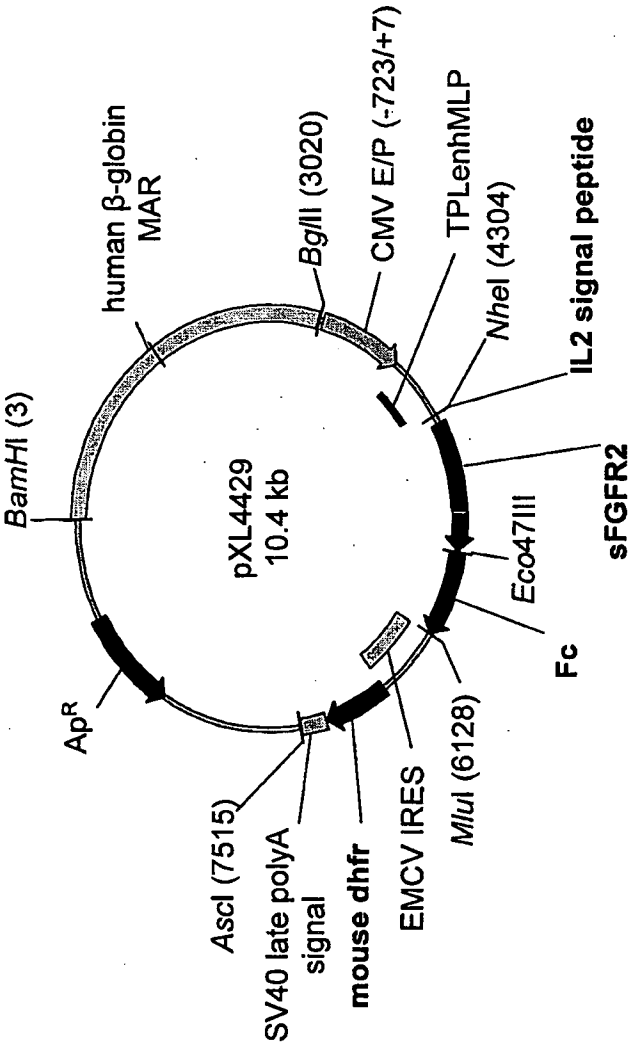


Fig. 6A

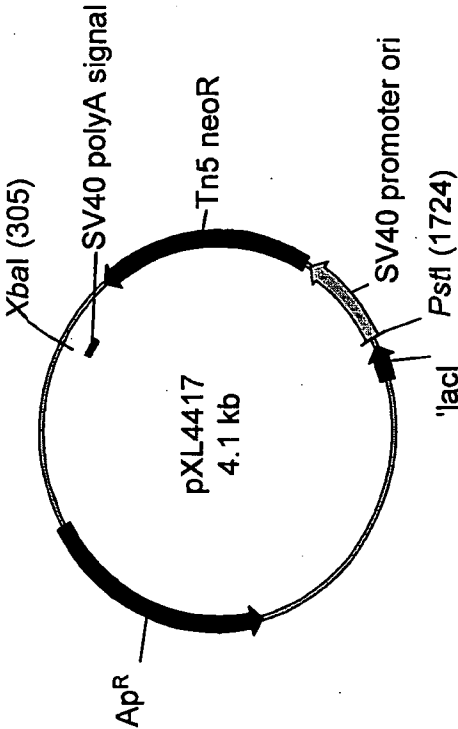
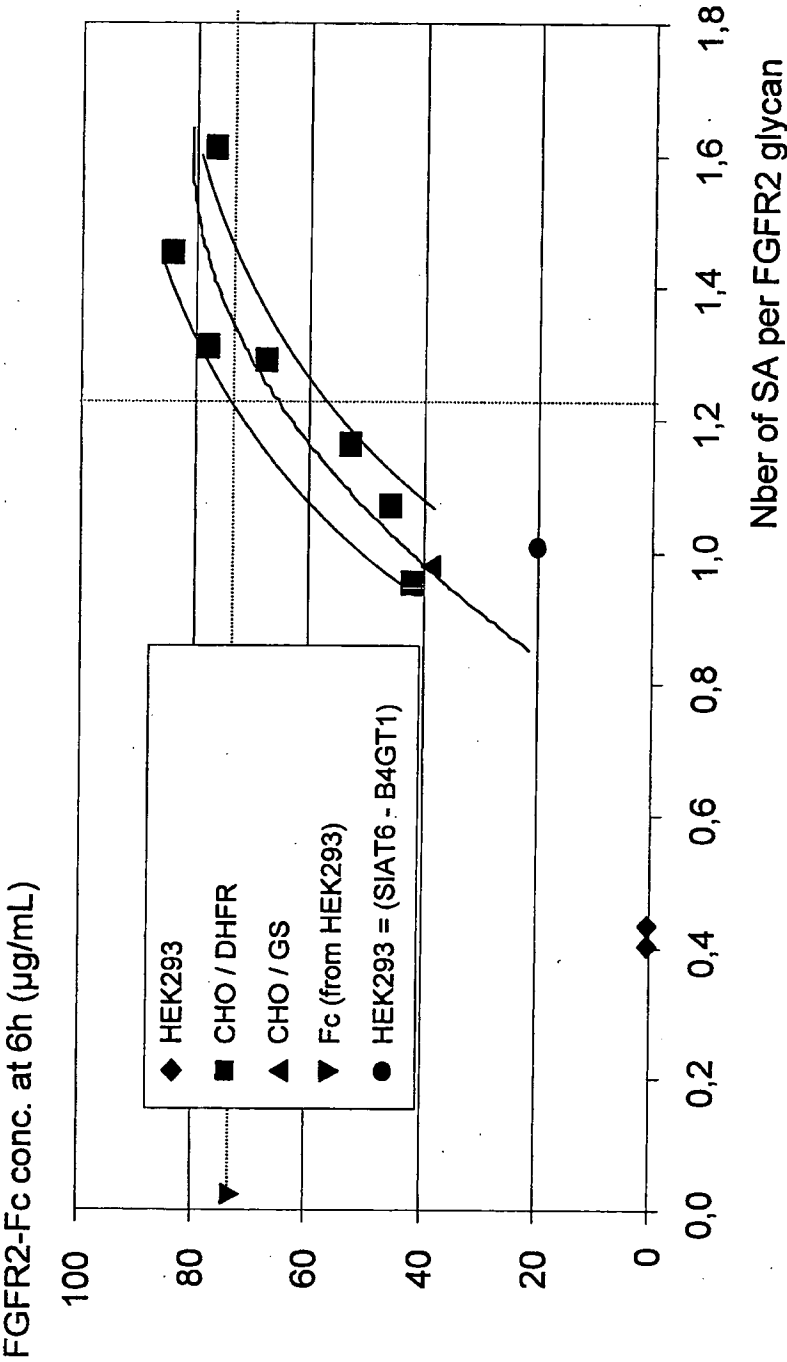


Fig. 6B

8/23

64

Fig. 7



68

9/23

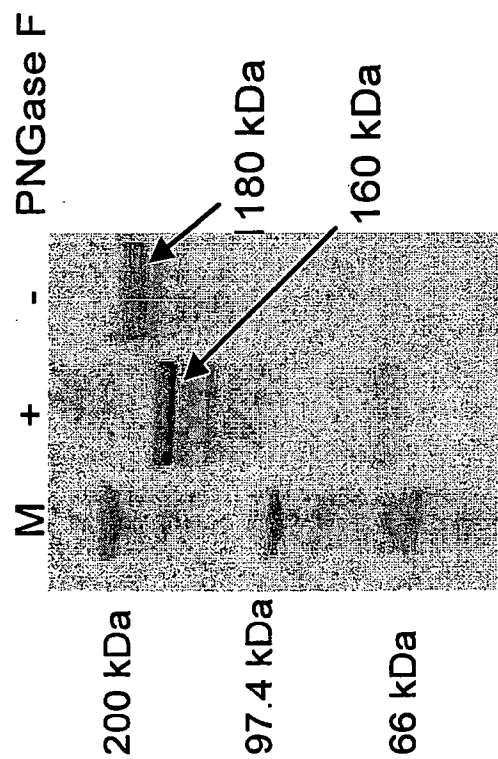


Fig. 8

68

10/23

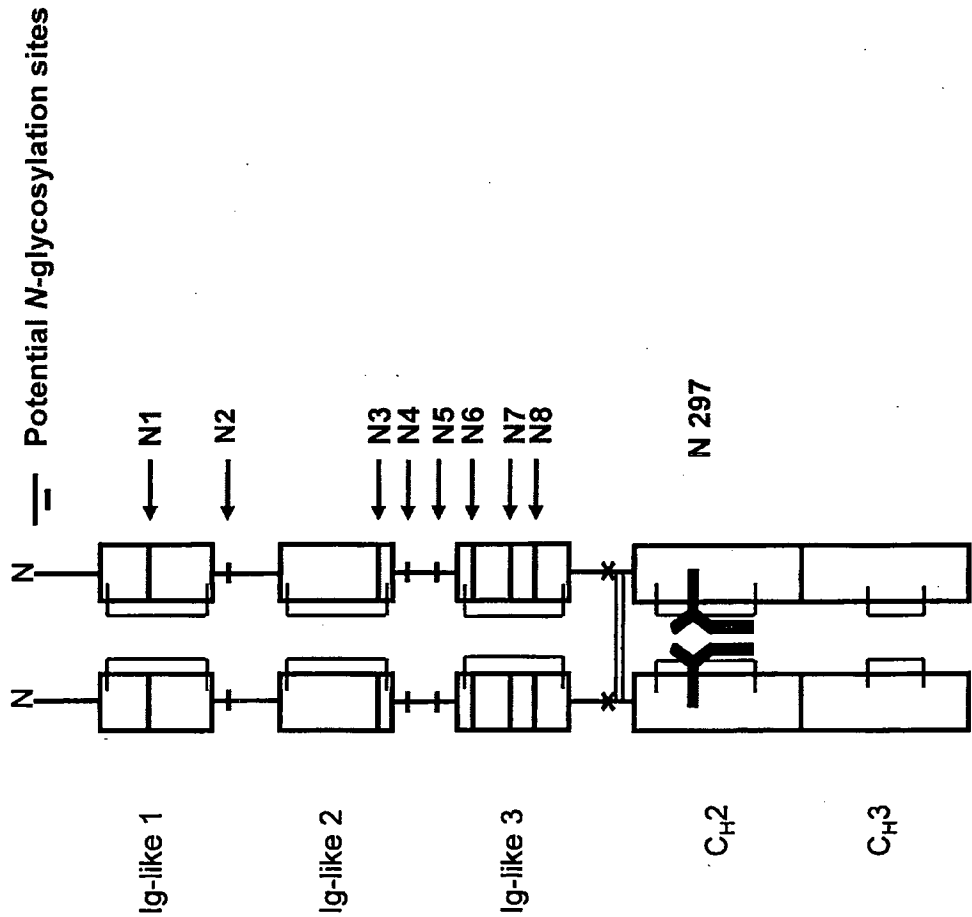
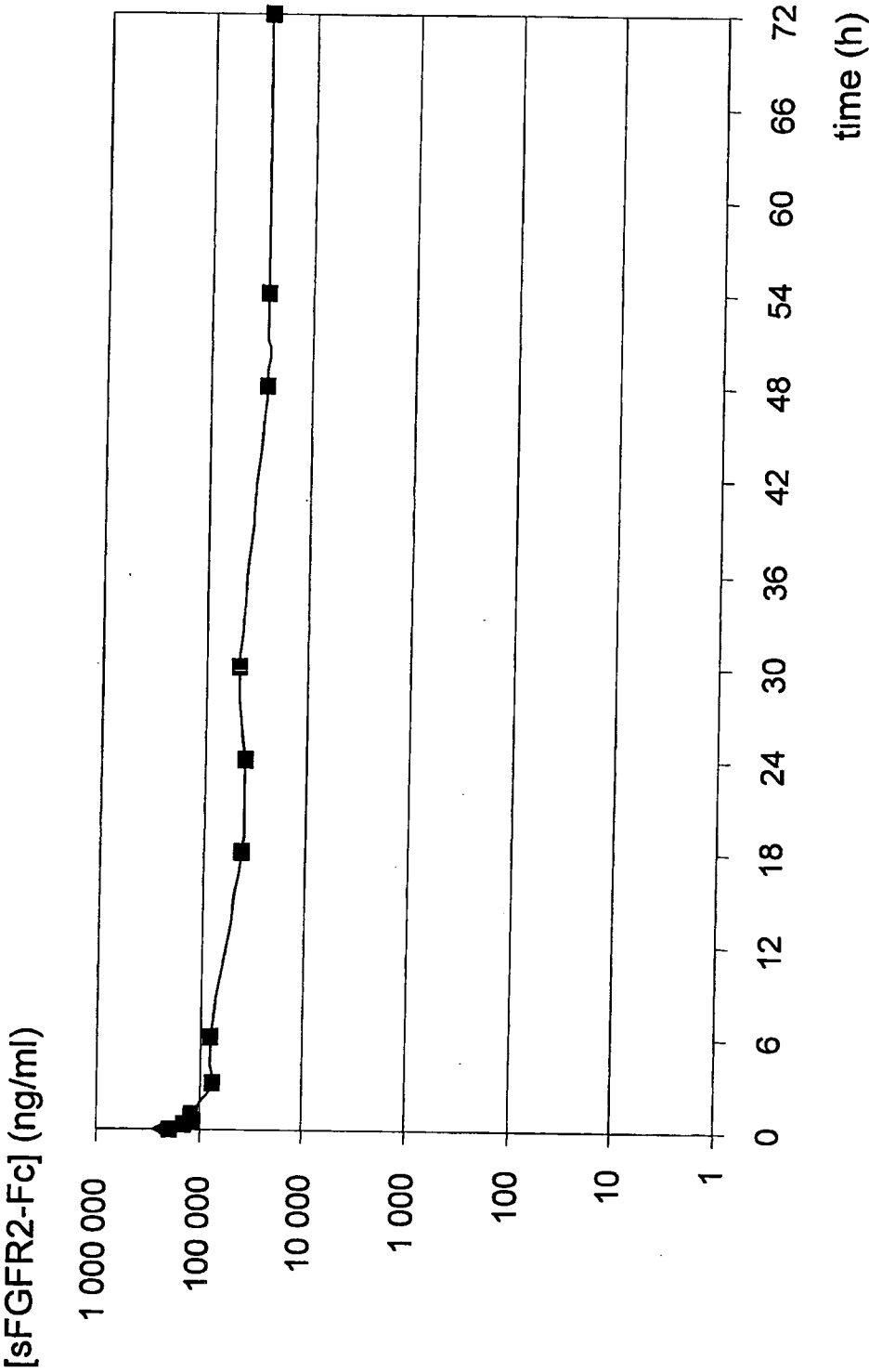


Fig. 9

11/23

Fig. 10



27

12/23

Fig. 11

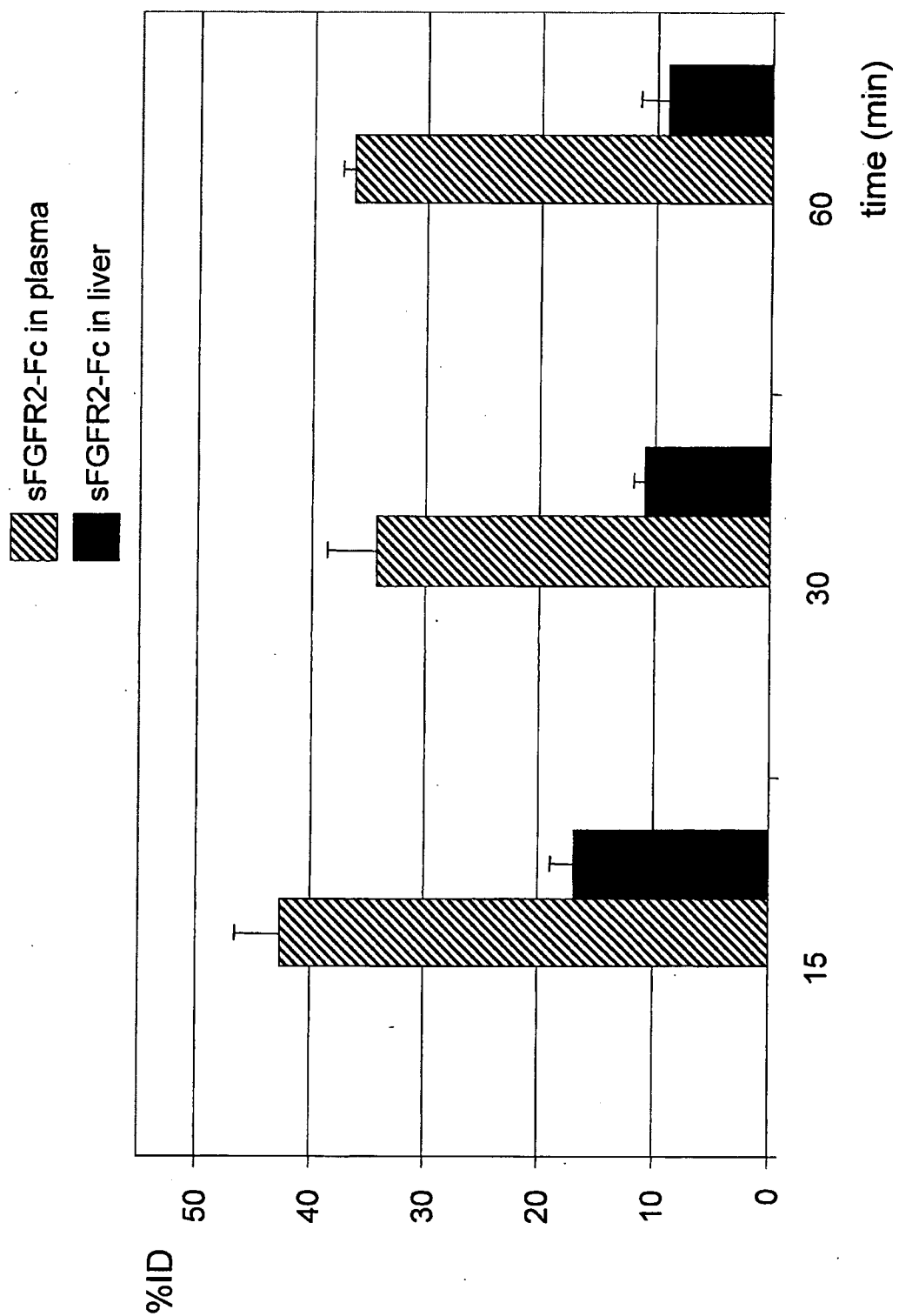
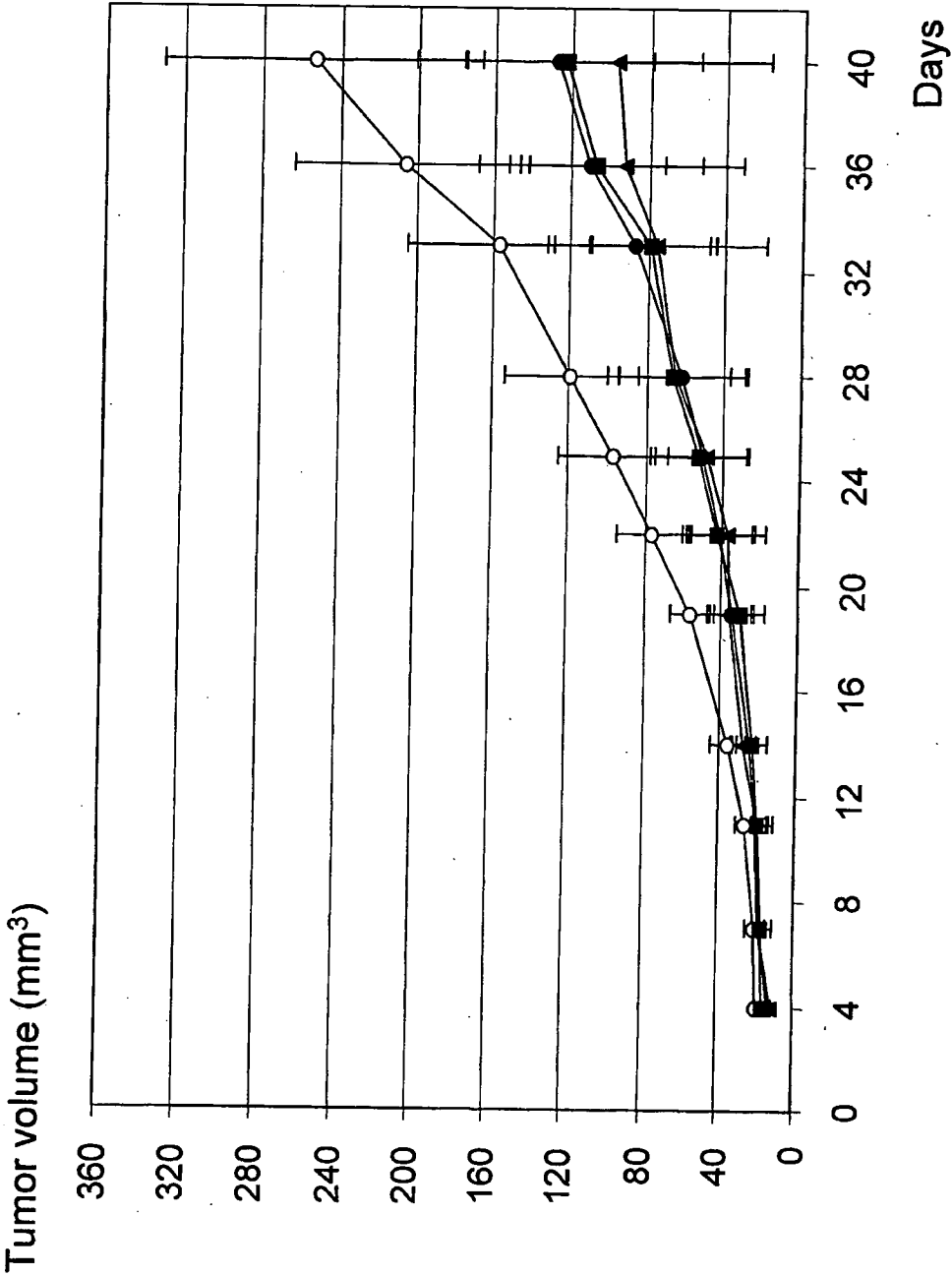
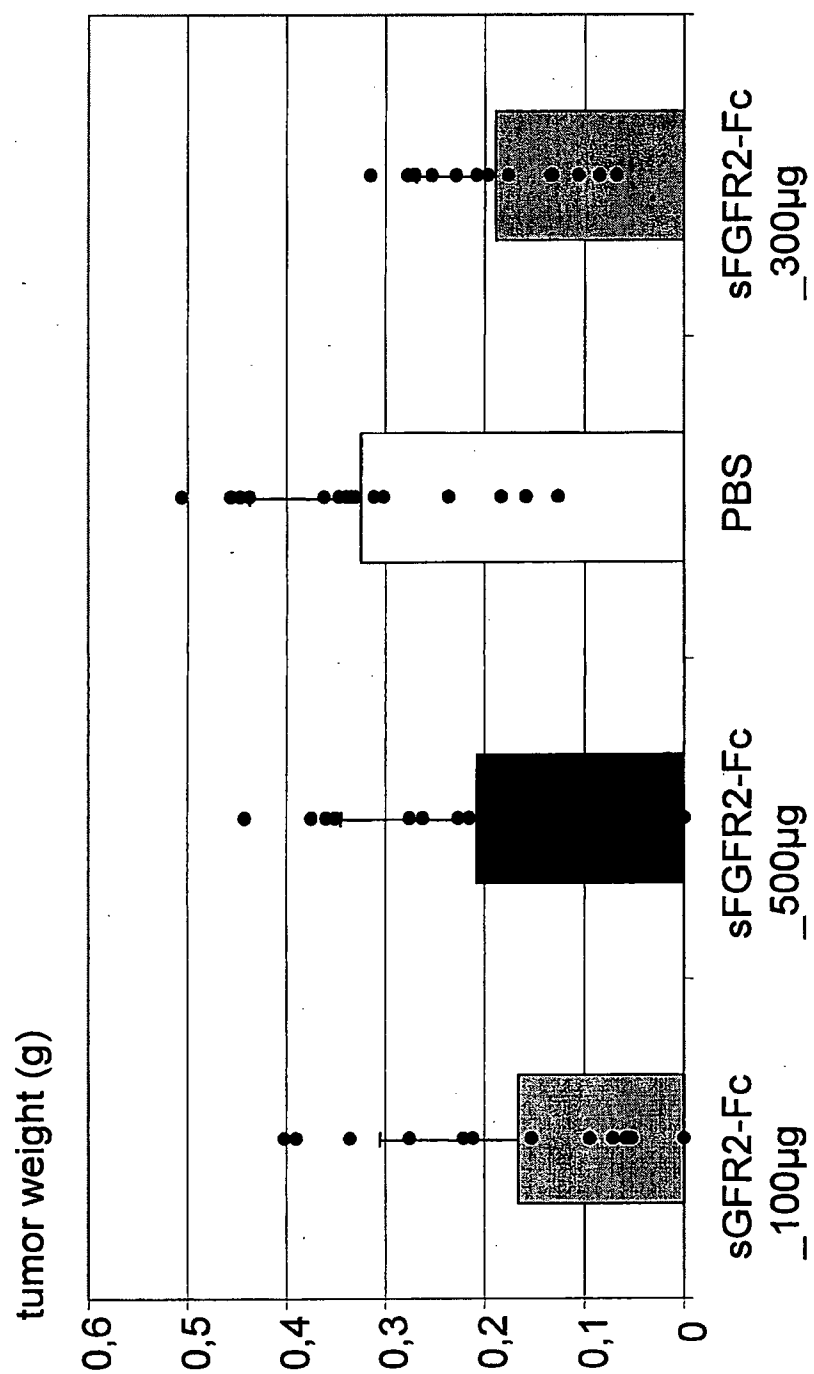


Fig. 12



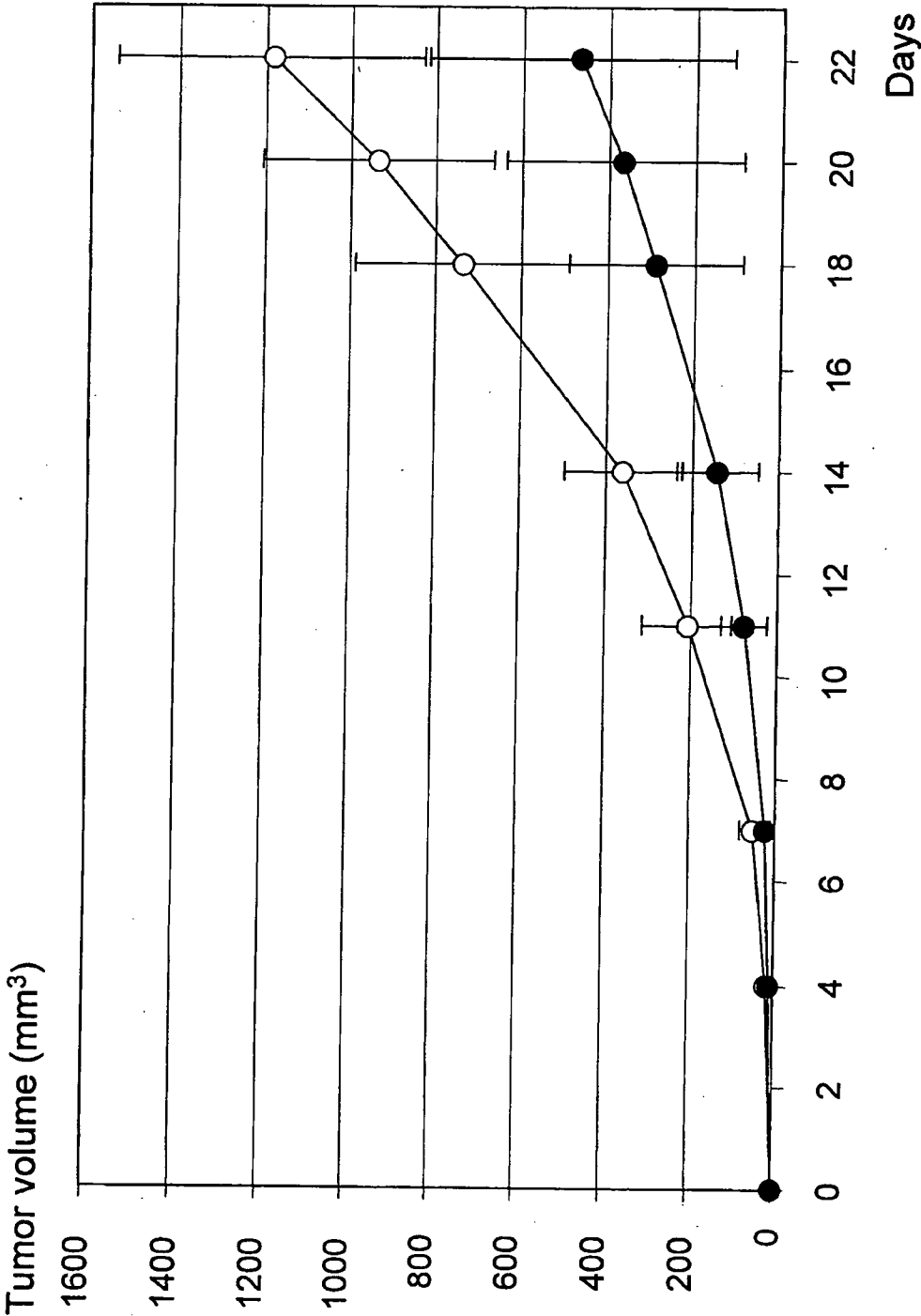
14/23

Fig. 13



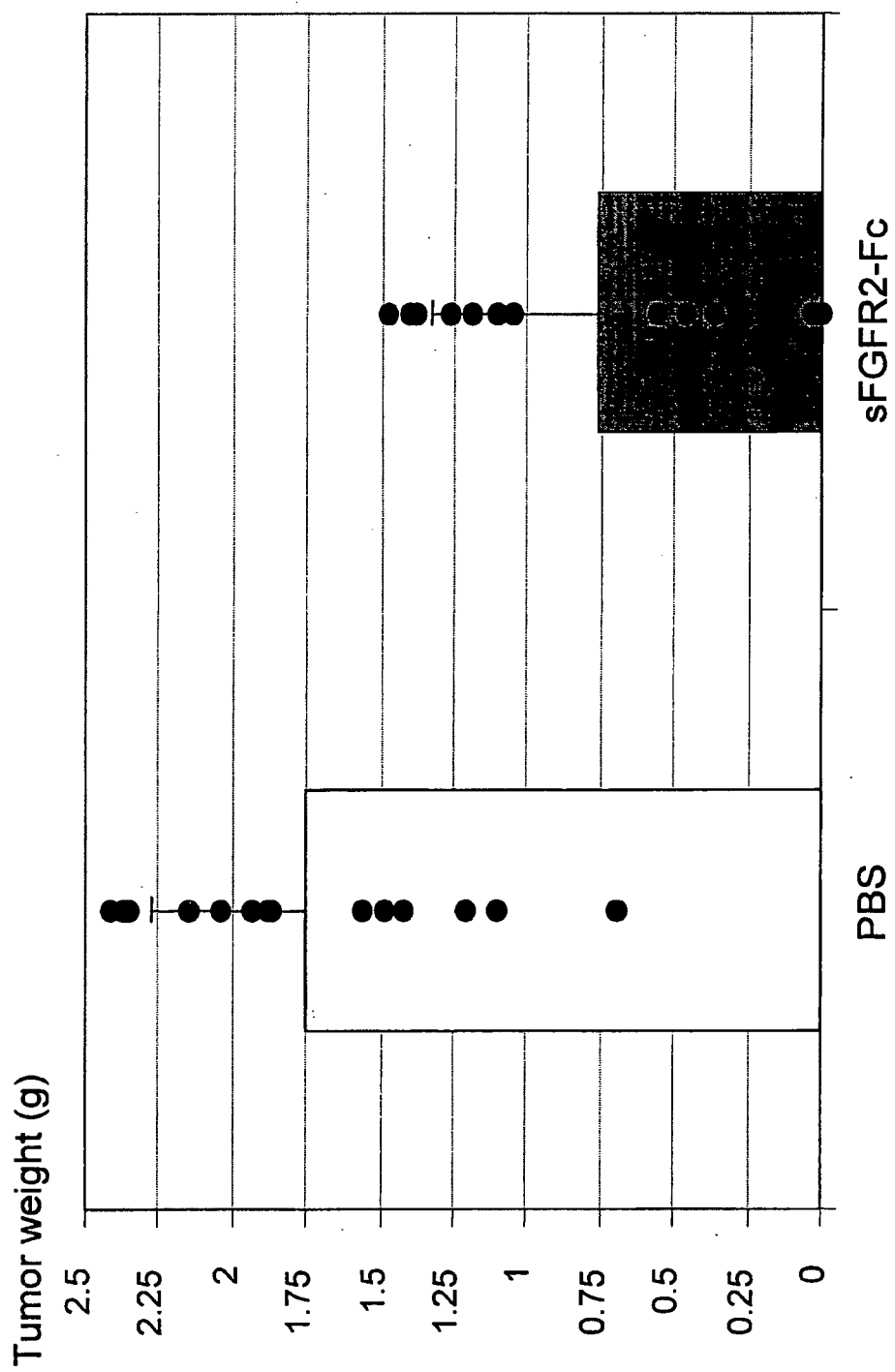
15/23

Fig. 14



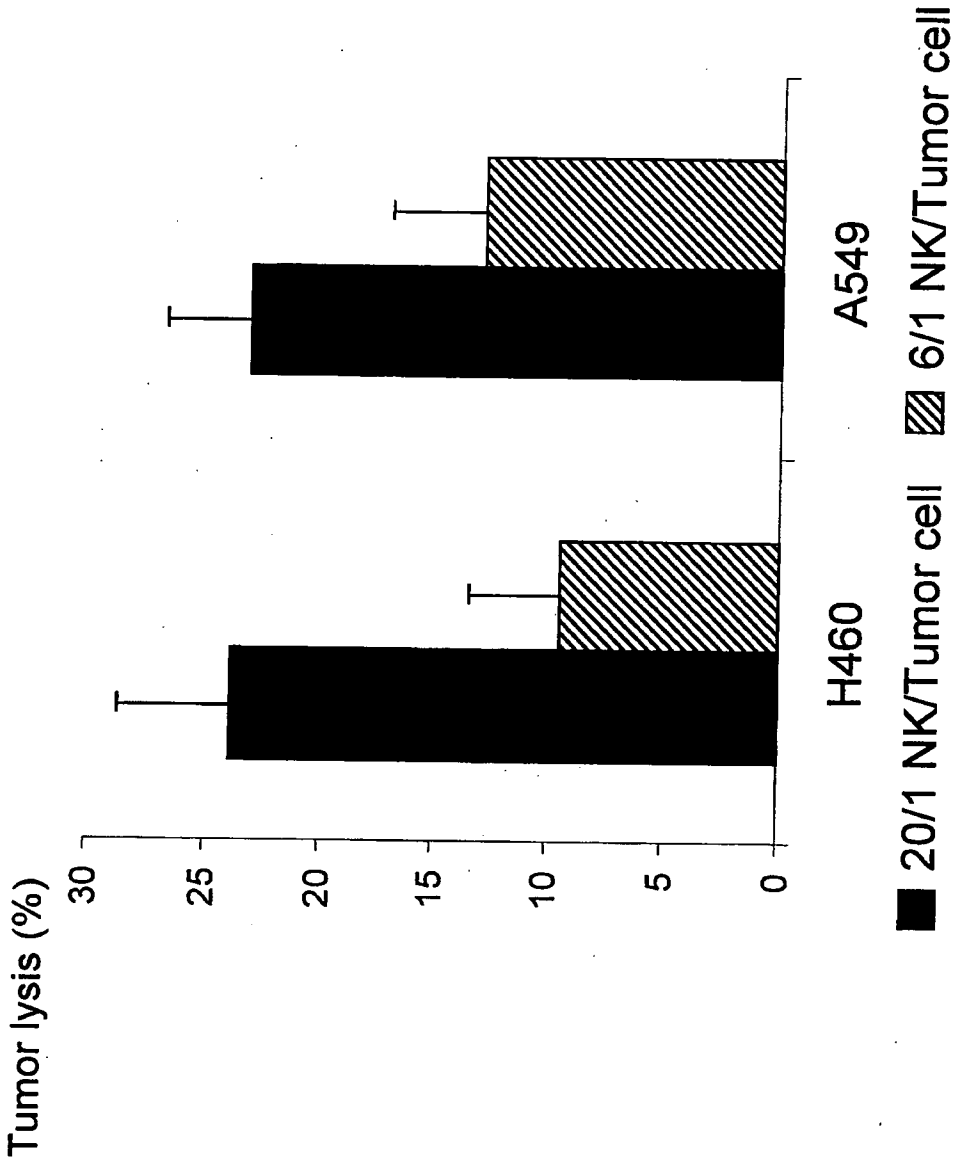
72

**Fig. 15**



17/23

Fig. 16



23

24

Fig. 17A

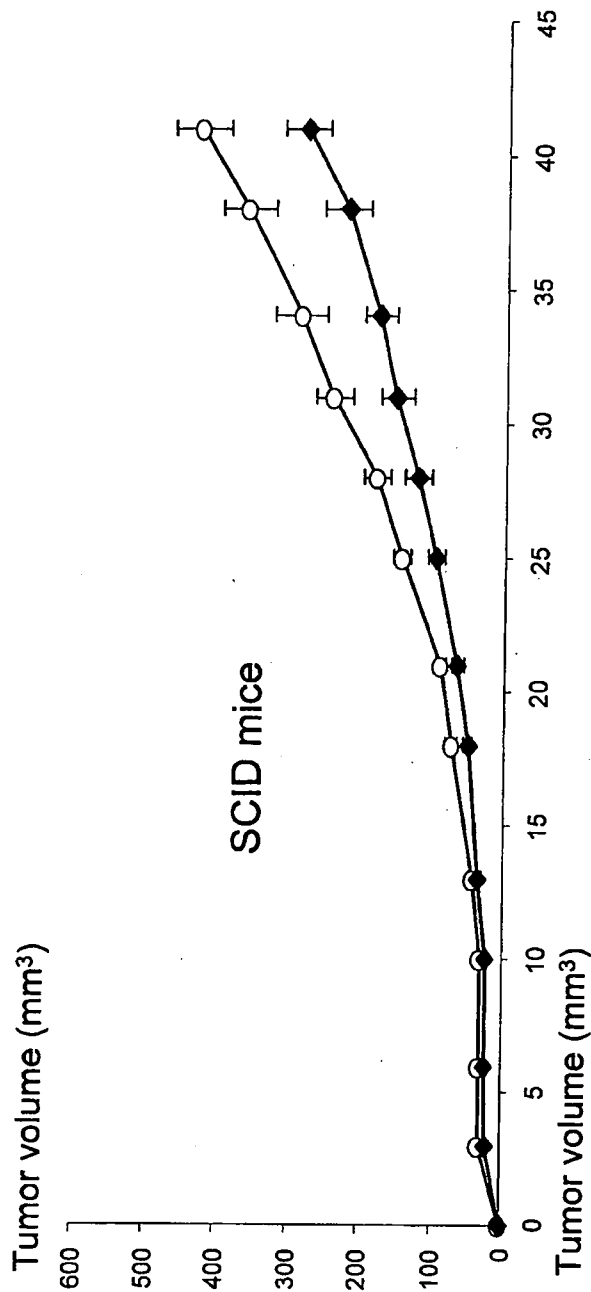
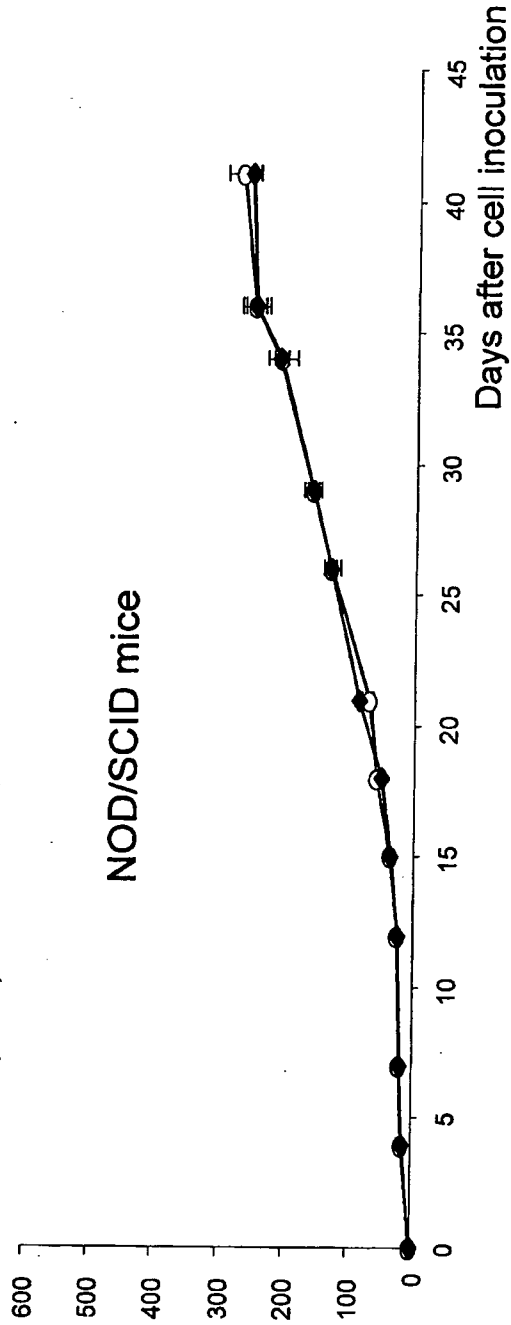


Fig. 17B



25

19/23

Fig. 17C

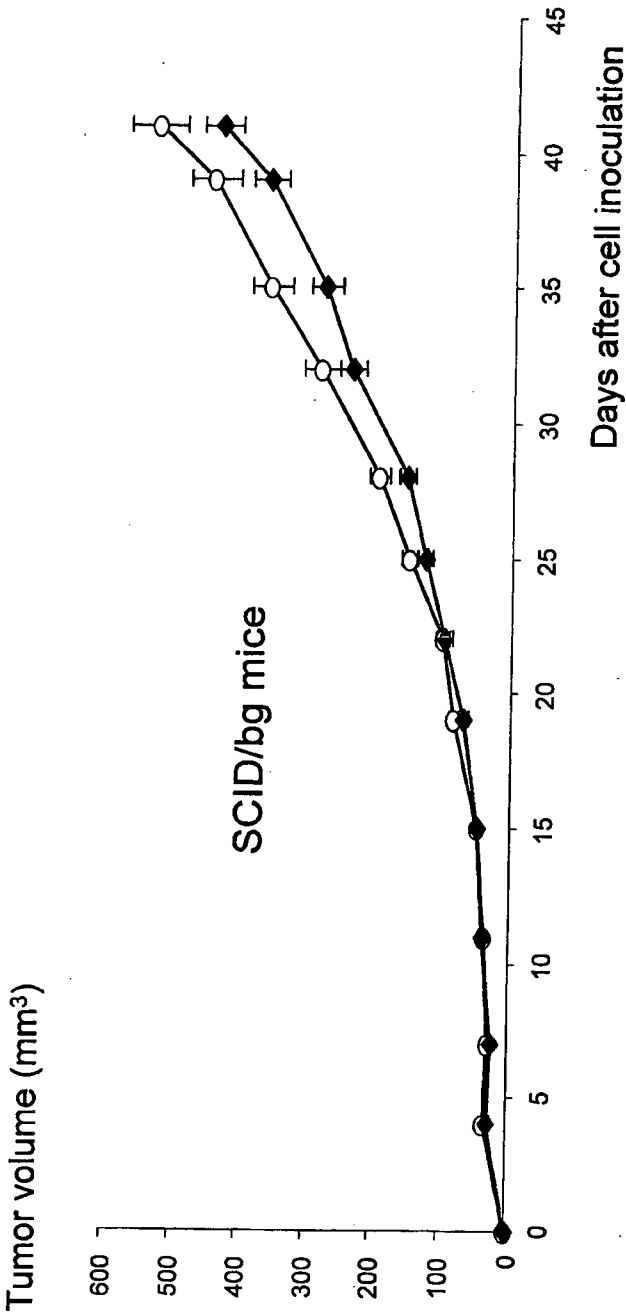


Fig. 18A Tumor volume (mm<sup>3</sup>)

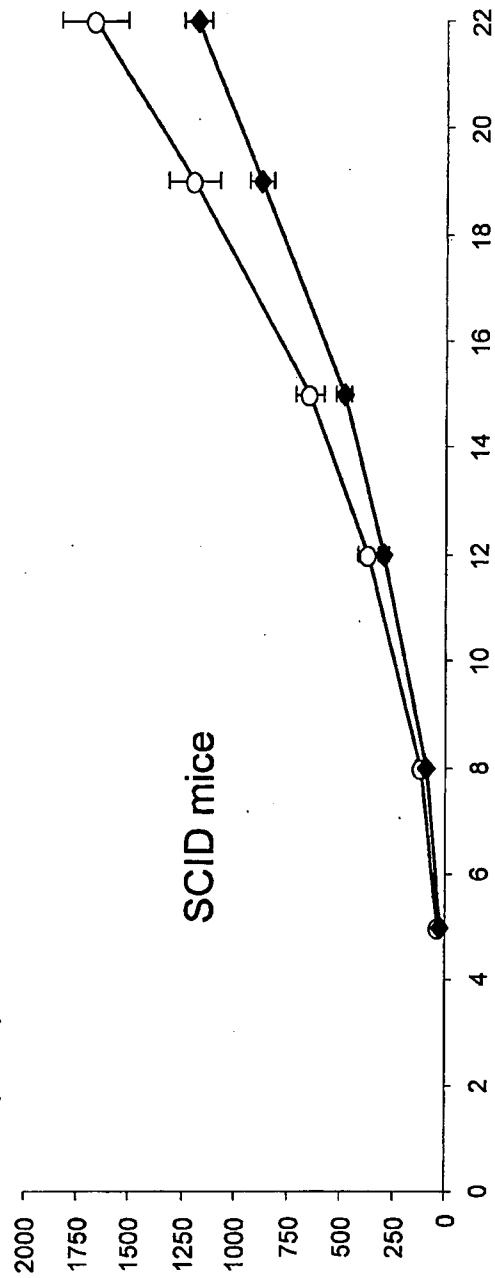
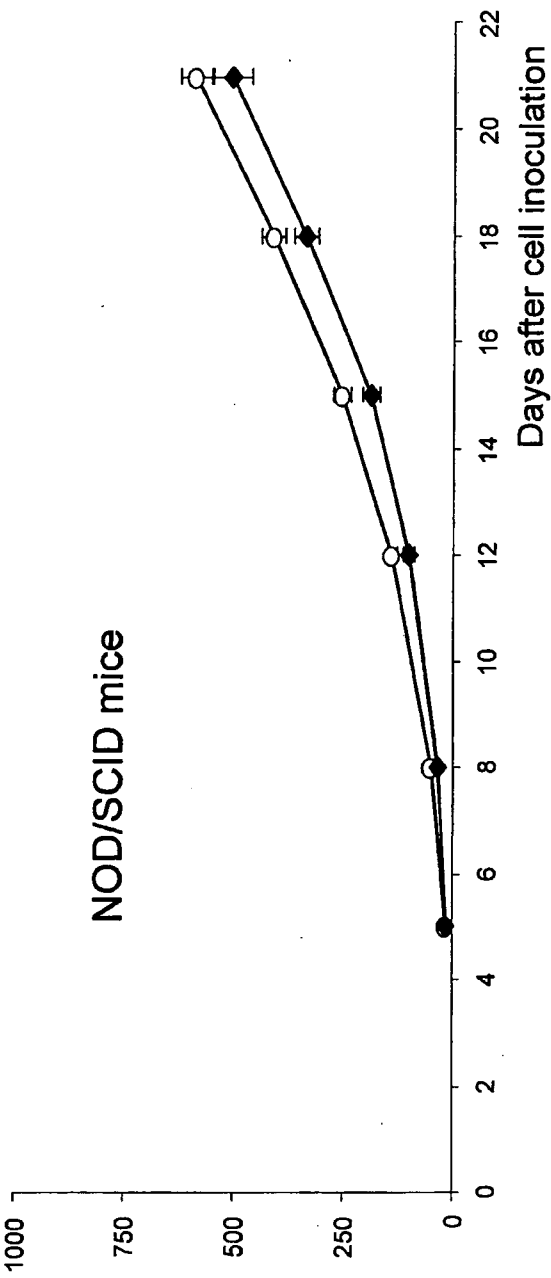


Fig. 18B Tumor volume (mm<sup>3</sup>)



21/23

Fig. 18C

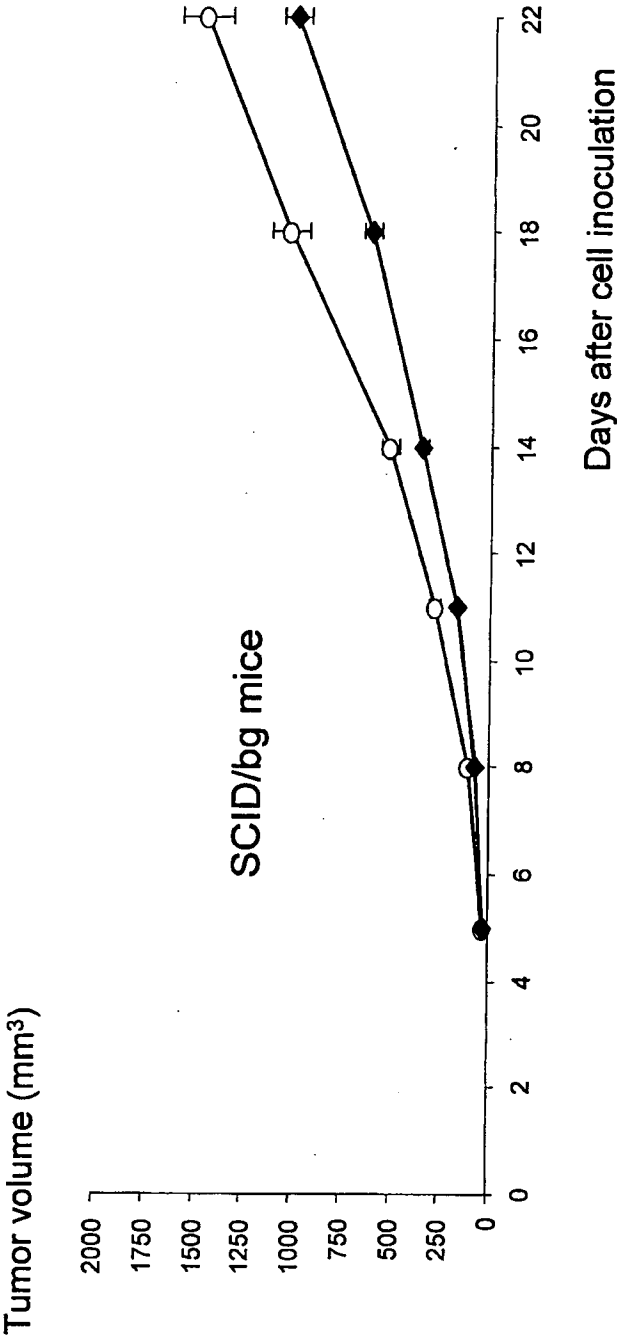


Fig. 19A

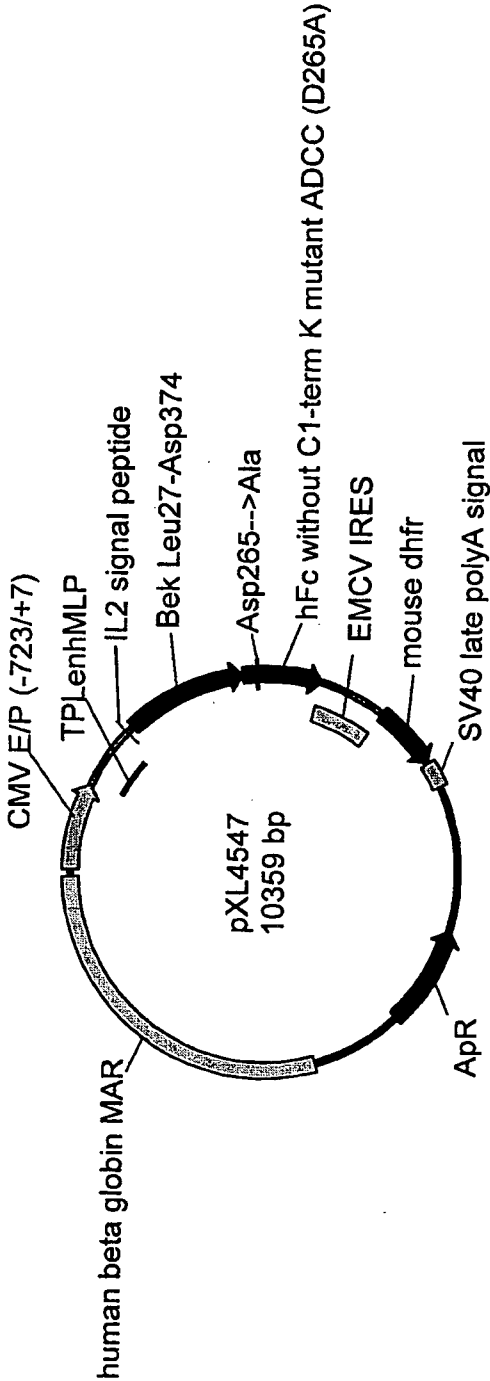
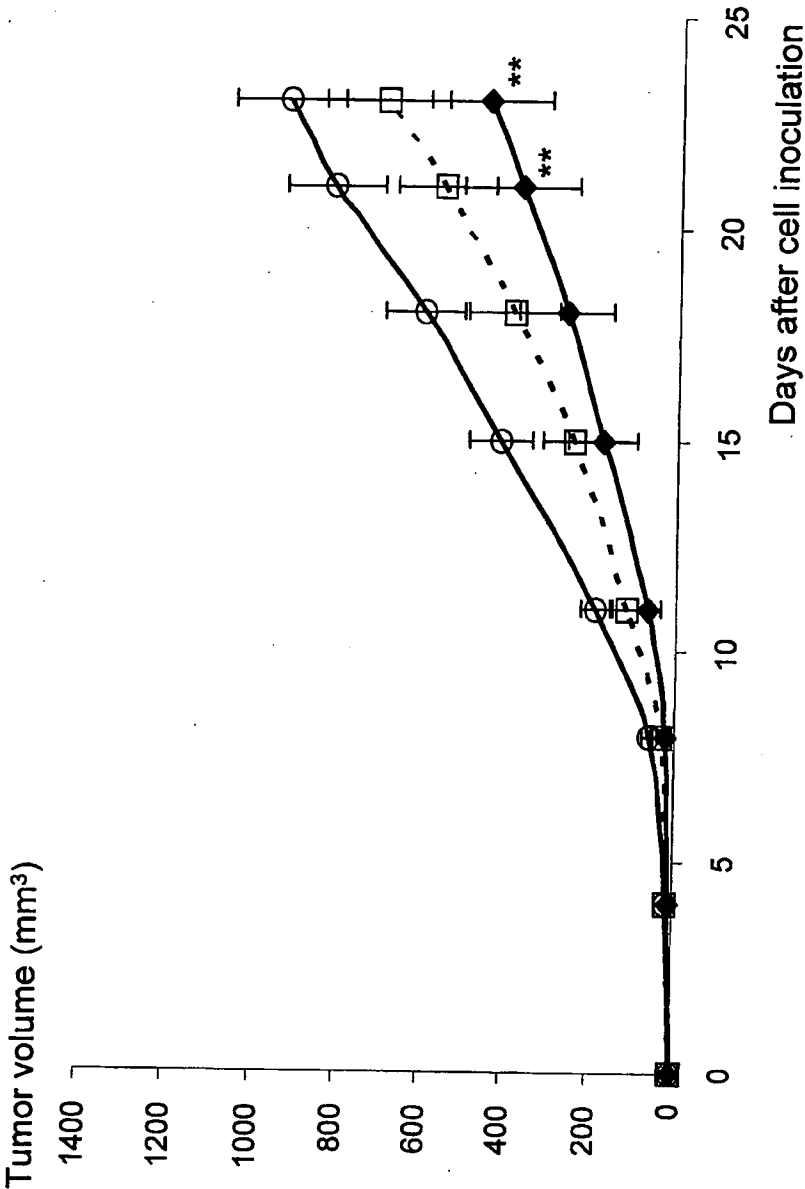


Fig. 19B

1 LVEDTTLEPE EPPTKYQISQ PEVYVAAPGE SLEVRCLLKD AAVISWTKDG  
51 VHLGPNRTV LIGEYLQIKG ATPRDSGLYA CTASRTVDSE TWYFMVNVTD  
101 AISSGDDDD TDGAEDFVSE NSNNKRAPYW NTEKMEKRL HAVPAANTVK  
151 FRCPAGGNPM PTMRWLKNGK EFKQEHRIIG YKVRNQHWSL IMESVVPSPDK  
201 GNYTCVVENE YGSINHTYHL DVVERSPHRP ILQAGLPANA STVVGGDVEF  
251 VCKVYSDAQP HIQWIKHVEK NGSKYGPDL PYLKVLAAG VNTTDKEIEV  
301 LYIRNVTFED AGEYTCLAGN SIGISFHSW LTVLPAFGR KEITASPDKT  
351 HTPPCPAPE LLGGPSVFLF PPKPKDTIMI SRTEVTCVV VAVSHEDPEV  
401 KFNWYVDGVE VHNAKTKPRE EQYNSTYRV SVLTVLHQDW LNGKEYCKV  
451 SNKALPAPIE KTISKAKGQP REPQVYTLPP SRDELTKNQV SLTCLVKGFY  
501 PSDIAVEWES NGQPENNYKT TTPVLDSDGS FFLYSKLTVD KSRWQQGNVF  
551 SCSVMHEALH NHYTQKSLSL SPG

RC

Fig. 20



80

PCT/IB20 7 / 004354

FR2006-084 PCT.ST25.txt  
SEQUENCE LISTING

```

<110> CENTELION
<120> MODIFIED SOLUBLE FGF RECEPTOR FC FUSIONS WITH IMPROVED BIOLOGICAL
        ACTIVITY
<130> FR2006-084 PCT
<150> EP 06291824.8
<151> 2006-11-28
<150> EP 07290042.6
<151> 2007-01-11
<160> 14
<170> PatentIn version 3.3
<210> 1
<211> 1755
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(1755)

<400> 1
tta gtt gag gat acc aca tta gag cca gaa gag cca cca act aaa tac      48
Leu Val Glu Asp Thr Thr Leu Glu Pro Glu Glu Pro Pro Thr Lys Tyr
1                               5                               10                               15

caa atc tct caa cca gaa gtg tac gtg gct gca cca ggg gag tcg cta      96
Gln Ile Ser Gln Pro Glu Val Tyr Val Ala Ala Pro Gly Glu Ser Leu
                20                25                30

gag gtg cgc tgc ctg ttg aaa gat gcc gcc gtg atc agt tgg act aag      144
Glu Val Arg Cys Leu Leu Lys Asp Ala Ala Val Ile Ser Trp Thr Lys
                35                40                45

gat ggg gtg cac ttg ggg ccc aac aat agg aca gtg ctt att ggg gag      192
Asp Gly Val His Leu Gly Pro Asn Asn Arg Thr Val Leu Ile Gly Glu
50                               55                               60

tac ttg cag ata aag ggc gcc acg cct aga gac tcc ggc ctc tat gct      240
Tyr Leu Gln Ile Lys Gly Ala Thr Pro Arg Asp Ser Gly Leu Tyr Ala
65                               70                               75                               80

tgt act gcc agt agg act gta gac agt gaa act tgg tac ttc atg gtg      288
Cys Thr Ala Ser Arg Thr Val Asp Ser Glu Thr Trp Tyr Phe Met Val
                        85                        90                        95

aat gtc aca gat gcc atc tca tcc gga gat gat gag gat gac acc gat      336
Asn Val Thr Asp Ala Ile Ser Ser Gly Asp Asp Glu Asp Asp Thr Asp
100                               105                               110

ggt gcg gaa gat ttt gtc agt gag aac agt aac aac aag aga gca cca      384
Gly Ala Glu Asp Phe Val Ser Glu Asn Ser Asn Asn Lys Arg Ala Pro
115                               120                               125

tac tgg acc aac aca gaa aag atg gaa aag cgg ctc cat gct gtg cct      432
Tyr Trp Thr Asn Thr Glu Lys Met Glu Lys Arg Leu His Ala Val Pro
130                               135                               140

gcg gcc aac act gtc aag ttt cgc tgc cca gcc ggg ggg aac cca atg      480
Ala Ala Asn Thr Val Lys Phe Arg Cys Pro Ala Gly Gly Asn Pro Met

```

FR2006-084 PCT.ST25.txt

|                                                                 |  |                                                                 |  |     |  |     |      |
|-----------------------------------------------------------------|--|-----------------------------------------------------------------|--|-----|--|-----|------|
| 145                                                             |  | 150                                                             |  | 155 |  | 160 |      |
| cca acc atg cgg tgg ctg aaa aac ggg aag gag ttt aag cag gag cat |  | Pro Thr Met Arg Trp Leu Lys Asn Gly Lys Glu Phe Lys Gln Glu His |  |     |  |     | 528  |
|                                                                 |  | 165                                                             |  | 170 |  | 175 |      |
| cgc att gga ggc tac aag gta cga aac cag cac tgg agc ctc att atg |  | Arg Ile Gly Gly Tyr Lys Val Arg Asn Gln His Trp Ser Leu Ile Met |  |     |  |     | 576  |
|                                                                 |  | 180                                                             |  | 185 |  | 190 |      |
| gaa agt gtg gtc cca tct gac aag gga aat tat acc tgt gtg gtg gag |  | Glu Ser Val Val Pro Ser Asp Lys Gly Asn Tyr Thr Cys Val Val Glu |  |     |  |     | 624  |
|                                                                 |  | 195                                                             |  | 200 |  | 205 |      |
| aat gaa tac ggg tcc atc aat cac acg tac cac ctg gat gtt gtg gag |  | Asn Glu Tyr Gly Ser Ile Asn His Thr Tyr His Leu Asp Val Val Glu |  |     |  |     | 672  |
|                                                                 |  | 210                                                             |  | 215 |  | 220 |      |
| cga tcg cct cac cgg ccc atc ctc caa gcc gga ctg ccg gca aat gcc |  | Arg Ser Pro His Arg Pro Ile Leu Gln Ala Gly Leu Pro Ala Asn Ala |  |     |  |     | 720  |
|                                                                 |  | 225                                                             |  | 230 |  | 235 |      |
| tcc aca gtg gtc gga gga gac gta gag ttt gtc tgc aag gtt tac agt |  | Ser Thr Val Val Gly Gly Asp Val Glu Phe Val Cys Lys Val Tyr Ser |  |     |  |     | 768  |
|                                                                 |  | 245                                                             |  | 250 |  | 255 |      |
| gat gcc cag ccc cac atc cag tgg atc aag cac gtg gaa aag aac ggc |  | Asp Ala Gln Pro His Ile Gln Trp Ile Lys His Val Glu Lys Asn Gly |  |     |  |     | 816  |
|                                                                 |  | 260                                                             |  | 265 |  | 270 |      |
| agt aaa tac ggg ccc gac ggg ctg ccc tac ctc aag gtt ctc aag gcc |  | Ser Lys Tyr Gly Pro Asp Gly Leu Pro Tyr Leu Lys Val Leu Lys Ala |  |     |  |     | 864  |
|                                                                 |  | 275                                                             |  | 280 |  | 285 |      |
| gcc ggt gtt aac acc acg gac aaa gag att gag gtt ctc tat att cgg |  | Ala Gly Val Asn Thr Thr Asp Lys Glu Ile Glu Val Leu Tyr Ile Arg |  |     |  |     | 912  |
|                                                                 |  | 290                                                             |  | 295 |  | 300 |      |
| aat gta act ttt gag gac gct ggg gaa tat acg tgc ttg gcg ggt aat |  | Asn Val Thr Phe Glu Asp Ala Gly Glu Tyr Thr Cys Leu Ala Gly Asn |  |     |  |     | 960  |
|                                                                 |  | 305                                                             |  | 310 |  | 315 |      |
| tct att ggg ata tcc ttt cac tct gca tgg ttg aca gtt ctg cca gcg |  | Ser Ile Gly Ile Ser Phe His Ser Ala Trp Leu Thr Val Leu Pro Ala |  |     |  |     | 1008 |
|                                                                 |  | 325                                                             |  | 330 |  | 335 |      |
| cct gga aga gaa aag gag att aca gct tcc cca gac tac ctg tca gcg |  | Pro Gly Arg Glu Lys Glu Ile Thr Ala Ser Pro Asp Tyr Leu Ser Ala |  |     |  |     | 1056 |
|                                                                 |  | 340                                                             |  | 345 |  | 350 |      |
| cta gag ccc aaa tct tgt gac aaa act cac aca tgc cca ccg tgc cca |  | Leu Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro |  |     |  |     | 1104 |
|                                                                 |  | 355                                                             |  | 360 |  | 365 |      |
| gca cct gaa ctc ctg ggg gga ccg tca gtc ttc ctc ttc ccc cca aaa |  | Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys |  |     |  |     | 1152 |
|                                                                 |  | 370                                                             |  | 375 |  | 380 |      |
| ccc aag gac acc ctc atg atc tcc cgg acc cct gag gtc aca tgc gtg |  | Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val |  |     |  |     | 1200 |
|                                                                 |  | 385                                                             |  | 390 |  | 395 |      |
| gtg gtg gac gtg agc cac gaa gac cct gag gtc aag ttc aac tgg tac |  | Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr |  |     |  |     | 1248 |
|                                                                 |  | 405                                                             |  | 410 |  | 415 |      |
| gtg gac ggc gtg gag gtg cat aat gcc aag aca aag ccg cgg gag gag |  | Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu |  |     |  |     | 1296 |

Page 2

## FR2006-084 PCT.ST25.txt

| 420 |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     | 425 |     |     |      | 430 |  |  |  |  |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|------|-----|--|--|--|--|
| cag | tac | aac | agc | acg | tac | cgt | gtg | gtc | agc | gtc | ctc | acc | gtc | ctg | cac | 1344 |     |  |  |  |  |
| Gln | Tyr | Asn | Ser | Thr | Tyr | Arg | Val | Val | Ser | Val | Leu | Thr | Val | Leu | His |      |     |  |  |  |  |
|     |     | 435 |     |     |     |     | 440 |     |     |     |     | 445 |     |     |     |      |     |  |  |  |  |
| cag | gac | tgg | ctg | aat | ggc | aag | gag | tac | aag | tgc | aag | gtc | tcc | aac | aaa | 1392 |     |  |  |  |  |
| Gln | Asp | Trp | Leu | Asn | Gly | Lys | Glu | Tyr | Lys | Cys | Lys | Val | Ser | Asn | Lys |      |     |  |  |  |  |
|     | 450 |     |     |     |     | 455 |     |     |     |     | 460 |     |     |     |     |      |     |  |  |  |  |
| gcc | ctc | cca | gcc | ccc | atc | gag | aaa | acc | atc | tcc | aaa | gcc | aaa | ggg | cag | 1440 |     |  |  |  |  |
| Ala | Leu | Pro | Ala | Pro | Ile | Glu | Lys | Thr | Ile | Ser | Lys | Ala | Lys | Gly | Gln |      |     |  |  |  |  |
| 465 |     |     |     |     | 470 |     |     |     |     | 475 |     |     |     |     | 480 |      |     |  |  |  |  |
| ccc | cga | gaa | cca | cag | gtg | tac | acc | ctg | ccc | cca | tcc | cgg | gat | gag | ctg | 1488 |     |  |  |  |  |
| Pro | Arg | Glu | Pro | Gln | Val | Tyr | Thr | Leu | Pro | Pro | Ser | Arg | Asp | Glu | Leu |      |     |  |  |  |  |
|     |     |     |     | 485 |     |     |     |     | 490 |     |     |     |     | 495 |     |      |     |  |  |  |  |
| acc | aag | aac | cag | gtc | agc | ctg | acc | tgc | ctg | gtc | aaa | ggc | ttc | tat | ccc | 1536 |     |  |  |  |  |
| Thr | Lys | Asn | Gln | Val | Ser | Leu | Thr | Cys | Leu | Val | Lys | Gly | Phe | Tyr | Pro |      |     |  |  |  |  |
|     |     |     | 500 |     |     |     |     | 505 |     |     |     |     | 510 |     |     |      |     |  |  |  |  |
| agc | gac | atc | gcc | gtg | gag | tgg | gag | agc | aat | ggg | cag | ccg | gag | aac | aac | 1584 |     |  |  |  |  |
| Ser | Asp | Ile | Ala | Val | Glu | Trp | Glu | Ser | Asn | Gly | Gln | Pro | Glu | Asn | Asn |      |     |  |  |  |  |
|     |     | 515 |     |     |     |     | 520 |     |     |     |     | 525 |     |     |     |      |     |  |  |  |  |
| tac | aag | acc | acg | cct | ccc | gtg | ctg | gac | tcc | gac | ggc | tcc | ttc | ttc | ctc | 1632 |     |  |  |  |  |
| Tyr | Lys | Thr | Thr | Pro | Pro | Val | Leu | Asp | Ser | Asp | Gly | Ser | Phe | Phe | Leu |      |     |  |  |  |  |
|     | 530 |     |     |     |     | 535 |     |     |     |     | 540 |     |     |     |     |      |     |  |  |  |  |
| tac | agc | aag | ctc | acc | gtg | gac | aag | agc | agg | tgg | cag | cag | ggg | aac | gtc | 1680 |     |  |  |  |  |
| Tyr | Ser | Lys | Leu | Thr | Val | Asp | Lys | Ser | Arg | Trp | Gln | Gln | Gly | Asn | Val |      |     |  |  |  |  |
| 545 |     |     |     |     | 550 |     |     |     |     | 555 |     |     |     |     | 560 |      |     |  |  |  |  |
| ttc | tca | tgc | tcc | gtg | atg | cat | gag | gct | ctg | cac | aac | cac | tac | acg | cag | 1728 |     |  |  |  |  |
| Phe | Ser | Cys | Ser | Val | Met | His | Glu | Ala | Leu | His | Asn | His | Tyr | Thr | Gln |      |     |  |  |  |  |
|     |     |     |     | 565 |     |     |     |     | 570 |     |     |     |     | 575 |     |      |     |  |  |  |  |
| aag | agc | ctc | tcc | ctg | tct | ccg | ggg | tga |     |     |     |     |     |     |     | 1755 |     |  |  |  |  |
| Lys | Ser | Leu | Ser | Leu | Ser | Pro | Gly |     |     |     |     |     |     |     |     |      |     |  |  |  |  |
|     |     |     | 580 |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |      |     |  |  |  |  |

<210> 2  
 <211> 584  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

<400> 2

Leu Val Glu Asp Thr Thr Leu Glu Pro Glu Glu Pro Pro Thr Lys Tyr  
1 5 10 15

Gln Ile Ser Gln Pro Glu Val Tyr Val Ala Ala Pro Gly Glu Ser Leu  
20 25 30

Glu Val Arg Cys Leu Leu Lys Asp Ala Ala Val Ile Ser Trp Thr Lys  
35 40 45

Asp Gly Val His Leu Gly Pro Asn Asn Arg Thr Val Leu Ile Gly Glu  
50 55 60

Tyr Leu Gln Ile Lys Gly Ala Thr Pro Arg Asp Ser Gly Leu Tyr Ala  
65 70 75 80

83

PCT/IB20 7 / 0 0 4 3 5 4

FR2006-084 PCT.ST25.txt

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

Asn Val Thr Asp Ala Ile Ser Ser Gly Asp Asp Glu Asp Asp Thr Asp  
100 105 110

Gly Ala Glu Asp Phe Val Ser Glu Asn Ser Asn Asn Lys Arg Ala Pro  
115 120 125

Tyr Trp Thr Asn Thr Glu Lys Met Glu Lys Arg Leu His Ala Val Pro  
130 135 140

Ala Ala Asn Thr Val Lys Phe Arg Cys Pro Ala Gly Gly Asn Pro Met  
145 150 155 160

Pro Thr Met Arg Trp Leu Lys Asn Gly Lys Glu Phe Lys Gln Glu His  
165 170 175

Arg Ile Gly Gly Tyr Lys Val Arg Asn Gln His Trp Ser Leu Ile Met  
180 185 190

Glu Ser Val Val Pro Ser Asp Lys Gly Asn Tyr Thr Cys Val Val Glu  
195 200 205

Asn Glu Tyr Gly Ser Ile Asn His Thr Tyr His Leu Asp Val Val Glu  
210 215 220

Arg Ser Pro His Arg Pro Ile Leu Gln Ala Gly Leu Pro Ala Asn Ala  
225 230 235 240

Ser Thr Val Val Gly Gly Asp Val Glu Phe Val Cys Lys Val Tyr Ser  
245 250 255

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

Ser Lys Tyr Gly Pro Asp Gly Leu Pro Tyr Leu Lys Val Leu Lys Ala  
275 280 285

Ala Gly Val Asn Thr Thr Asp Lys Glu Ile Glu Val Leu Tyr Ile Arg  
290 295 300

Asn Val Thr Phe Glu Asp Ala Gly Glu Tyr Thr Cys Leu Ala Gly Asn  
305 310 315 320

Ser Ile Gly Ile Ser Phe His Ser Ala Trp Leu Thr Val Leu Pro Ala  
325 330 335

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

84

FR2006-084 PCT.ST25.txt

Leu Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro  
355 360 365

Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys  
370 375 380

Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val  
385 390 395 400

Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr  
405 410 415

Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu  
420 425 430

Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His  
435 440 445

Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys  
450 455 460

Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln  
465 470 475 480

Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu  
485 490 495

Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro  
500 505 510

Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn  
515 520 525

Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu  
530 535 540

Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val  
545 550 555 560

Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln  
565 570 575

Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly  
580

<210> 3  
<211> 1050  
<212> DNA  
<213> Homo sapiens

75

PCT/IB20 7 / 0 0 4 3 5 4

FR2006-084 PCT.ST25.txt

```

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(1050)

<400> 3
tta gtt gag gat acc aca tta gag cca gaa gag cca cca act aaa tac      48
Leu Val Glu Asp Thr Thr Leu Glu Pro Glu Glu Pro Pro Thr Lys Tyr
1                               5                               10                               15

caa atc tct caa cca gaa gtg tac gtg gct gca cca ggg gag tcg cta      96
Gln Ile Ser Gln Pro Glu Val Tyr Val Ala Ala Pro Gly Glu Ser Leu
                               20                               25                               30

gag gtg cgc tgc ctg ttg aaa gat gcc gcc gtg atc agt tgg act aag      144
Glu Val Arg Cys Leu Leu Lys Asp Ala Ala Val Ile Ser Trp Thr Lys
                               35                               40                               45

gat ggg gtg cac ttg ggg ccc aac aat agg aca gtg ctt att ggg gag      192
Asp Gly Val His Leu Gly Pro Asn Asn Arg Thr Val Leu Ile Gly Glu
                               50                               55                               60

tac ttg cag ata aag ggc gcc acg cct aga gac tcc ggc ctc tat gct      240
Tyr Leu Gln Ile Lys Gly Ala Thr Pro Arg Asp Ser Gly Leu Tyr Ala
65                               70                               75                               80

tgt act gcc agt agg act gta gac agt gaa act tgg tac ttc atg gtg      288
Cys Thr Ala Ser Arg Thr Val Asp Ser Glu Thr Trp Tyr Phe Met Val
                               85                               90                               95

aat gtc aca gat gcc atc tca tcc gga gat gat gag gat gac acc gat      336
Asn Val Thr Asp Ala Ile Ser Ser Gly Asp Asp Glu Asp Asp Thr Asp
                               100                              105                              110

ggg gcg gaa gat ttt gtc agt gag aac agt aac aac aag aga gca cca      384
Gly Ala Glu Asp Phe Val Ser Glu Asn Ser Asn Asn Lys Arg Ala Pro
                               115                              120                              125

tac tgg acc aac aca gaa aag atg gaa aag cgg ctc cat gct gtg cct      432
Tyr Trp Thr Asn Thr Glu Lys Met Glu Lys Arg Leu His Ala Val Pro
                               130                              135                              140

gcg gcc aac act gtc aag ttt cgc tgc cca gcc ggg ggg aac cca atg      480
Ala Ala Asn Thr Val Lys Phe Arg Cys Pro Ala Gly Gly Asn Pro Met
145                              150                              155                              160

cca acc atg cgg tgg ctg aaa aac ggg aag gag ttt aag cag gag cat      528
Pro Thr Met Arg Trp Leu Lys Asn Gly Lys Glu Phe Lys Gln Glu His
                               165                              170                              175

cgc att gga ggc tac aag gta cga aac cag cac tgg agc ctc att atg      576
Arg Ile Gly Gly Tyr Lys Val Arg Asn Gln His Trp Ser Leu Ile Met
                               180                              185                              190

gaa agt gtg gtc cca tct gac aag gga aat tat acc tgt gtg gtg gag      624
Glu Ser Val Val Pro Ser Asp Lys Gly Asn Tyr Thr Cys Val Val Glu
                               195                              200                              205

aat gaa tac ggg tcc atc aat cac acg tac cac ctg gat gtt gtg gag      672
Asn Glu Tyr Gly Ser Ile Asn His Thr Tyr His Leu Asp Val Val Glu
                               210                              215                              220

cga tcg cct cac cgg ccc atc ctc caa gcc gga ctg ccg gca aat gcc      720
Arg Ser Pro His Arg Pro Ile Leu Gln Ala Gly Leu Pro Ala Asn Ala
225                              230                              235                              240

tcc aca gtg gtc gga gga gac gta gag ttt gtc tgc aag gtt tac agt      768
Ser Thr Val Val Gly Gly Asp Val Glu Phe Val Cys Lys Val Tyr Ser
                               245                              250                              255

```

88

PCT/IB20 7 / 004354

FR2006-084 PCT.ST25.txt

|                                                                 |      |
|-----------------------------------------------------------------|------|
| gat gcc cag ccc cac atc cag tgg atc aag cac gtg gaa aag aac ggc | 816  |
| Asp Ala Gln Pro His Ile Gln Trp Ile Lys His Val Glu Lys Asn Gly |      |
| 260 265 270                                                     |      |
| agt aaa tac ggg ccc gac ggg ctg ccc tac ctc aag gtt ctc aag gcc | 864  |
| Ser Lys Tyr Gly Pro Asp Gly Leu Pro Tyr Leu Lys Val Leu Lys Ala |      |
| 275 280 285                                                     |      |
| gcc ggt gtt aac acc acg gac aaa gag att gag gtt ctc tat att cgg | 912  |
| Ala Gly Val Asn Thr Thr Asp Lys Glu Ile Glu Val Leu Tyr Ile Arg |      |
| 290 295 300                                                     |      |
| aat gta act ttt gag gac gct ggg gaa tat acg tgc ttg gcg ggt aat | 960  |
| Asn Val Thr Phe Glu Asp Ala Gly Glu Tyr Thr Cys Leu Ala Gly Asn |      |
| 305 310 315 320                                                 |      |
| tct att ggg ata tcc ttt cac tct gca tgg ttg aca gtt ctg cca gcg | 1008 |
| Ser Ile Gly Ile Ser Phe His Ser Ala Trp Leu Thr Val Leu Pro Ala |      |
| 325 330 335                                                     |      |
| cct gga aga gaa aag gag att aca gct tcc cca gac tac ctg         | 1050 |
| Pro Gly Arg Glu Lys Glu Ile Thr Ala Ser Pro Asp Tyr Leu         |      |
| 340 345 350                                                     |      |

<210> 4  
<211> 350  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens  
  
<400> 4

Leu Val Glu Asp Thr Thr Leu Glu Pro Glu Glu Pro Pro Thr Lys Tyr  
1 5 10 15

Gln Ile Ser Gln Pro Glu Val Tyr Val Ala Ala Pro Gly Glu Ser Leu  
20 25 30

Glu Val Arg Cys Leu Leu Lys Asp Ala Ala Val Ile Ser Trp Thr Lys  
35 40 45

Asp Gly Val His Leu Gly Pro Asn Asn Arg Thr Val Leu Ile Gly Glu  
50 55 60

Tyr Leu Gln Ile Lys Gly Ala Thr Pro Arg Asp Ser Gly Leu Tyr Ala  
65 70 75 80

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

Asn Val Thr Asp Ala Ile Ser Ser Gly Asp Asp Glu Asp Asp Thr Asp  
100 105 110

Gly Ala Glu Asp Phe Val Ser Glu Asn Ser Asn Asn Lys Arg Ala Pro  
115 120 125

Tyr Trp Thr Asn Thr Glu Lys Met Glu Lys Arg Leu His Ala Val Pro  
130 135 140

87

FR2006-084 PCT.ST25.txt

Ala Ala Asn Thr Val Lys Phe Arg Cys Pro Ala Gly Gly Asn Pro Met  
145 150 155 160

Pro Thr Met Arg Trp Leu Lys Asn Gly Lys Glu Phe Lys Gln Glu His  
165 170 175

Arg Ile Gly Gly Tyr Lys Val Arg Asn Gln His Trp Ser Leu Ile Met  
180 185 190

Glu Ser Val Val Pro Ser Asp Lys Gly Asn Tyr Thr Cys Val Val Glu  
195 200 205

Asn Glu Tyr Gly Ser Ile Asn His Thr Tyr His Leu Asp Val Val Glu  
210 215 220

Arg Ser Pro His Arg Pro Ile Leu Gln Ala Gly Leu Pro Ala Asn Ala  
225 230 235 240

Ser Thr Val Val Gly Gly Asp Val Glu Phe Val Cys Lys Val Tyr Ser  
245 250 255

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

Ser Lys Tyr Gly Pro Asp Gly Leu Pro Tyr Leu Lys Val Leu Lys Ala  
275 280 285

Ala Gly Val Asn Thr Thr Asp Lys Glu Ile Glu Val Leu Tyr Ile Arg  
290 295 300

Asn Val Thr Phe Glu Asp Ala Gly Glu Tyr Thr Cys Leu Ala Gly Asn  
305 310 315 320

Ser Ile Gly Ile Ser Phe His Ser Ala Trp Leu Thr Val Leu Pro Ala  
325 330 335

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

<210> 5  
<211> 696  
<212> DNA  
<213> Homo sapiens

<220>  
<221> CDS  
<222> (1)..(696)

<400> 5  
gag ccc aaa tct tgt gac aaa act cac aca tgc cca ccg tgc cca gca  
Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala  
1 5 10 15

FR2006-084 PCT.ST25.txt

|                                                                 |     |
|-----------------------------------------------------------------|-----|
| cct gaa ctc ctg ggg gga ccg tca gtc ttc ctc ttc ccc cca aaa ccc | 96  |
| Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro |     |
| 20 25 30                                                        |     |
| aag gac acc ctc atg atc tcc cgg acc cct gag gtc aca tgc gtg gtg | 144 |
| Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val |     |
| 35 40 45                                                        |     |
| gtg gac gtg agc cac gaa gac cct gag gtc aag ttc aac tgg tac gtg | 192 |
| Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val |     |
| 50 55 60                                                        |     |
| gac ggc gtg gag gtg cat aat gcc aag aca aag ccc cgg gag gag cag | 240 |
| Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln |     |
| 65 70 80                                                        |     |
| tac aac agc acg tac cgt gtg gtc agc gtc ctc acc gtc ctg cac cag | 288 |
| Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln |     |
| 85 90 95                                                        |     |
| gac tgg ctg aat ggc aag gag tac aag tgc aag gtc tcc aac aaa gcc | 336 |
| Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala |     |
| 100 105 110                                                     |     |
| ctc cca gcc ccc atc gag aaa acc atc tcc aaa gcc aaa ggg cag ccc | 384 |
| Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro |     |
| 115 120 125                                                     |     |
| cga gaa cca cag gtg tac acc ctg ccc cca tcc cgg gat gag ctg acc | 432 |
| Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr |     |
| 130 135 140                                                     |     |
| aag aac cag gtc agc ctg acc tgc ctg gtc aaa ggc ttc tat ccc agc | 480 |
| Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser |     |
| 145 150 155 160                                                 |     |
| gac atc gcc gtg gag tgg gag agc aat ggg cag ccg gag aac aac tac | 528 |
| Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr |     |
| 165 170 175                                                     |     |
| aag acc acg cct ccc gtg ctg gac tcc gac ggc tcc ttc ttc ctc tac | 576 |
| Lys Thr Thr Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr     |     |
| 180 185 190                                                     |     |
| agc aag ctc acc gtg gac aag agc agg tgg cag cag ggg aac gtc ttc | 624 |
| Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe |     |
| 195 200 205                                                     |     |
| tca tgc tcc gtg atg cat gag gct ctg cac aac cac tac acg cag aag | 672 |
| Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys |     |
| 210 215 220                                                     |     |
| agc ctc tcc ctg tct ccg ggt tga                                 | 696 |
| Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly                                     |     |
| 225 230                                                         |     |

<210> 6  
 <211> 231  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

<400> 6

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

89

FR2006-084 PCT.ST25.txt

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly  
225 230

<210> 7  
<211> 60  
<212> DNA  
<213> Homo sapiens

<220>  
<221> CDS  
<222> (1)..(60)

<400> 7  
atg tac agg atg caa ctc ctg tct tgc att gca cta agt ctt gca ctt  
Page 10

90

PCT/IB20 7 / 0 0 4 3 5 4

FR2006-084 PCT.ST25.txt

|                    |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|--------------------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Met                | Tyr | Arg | Met | Gln | Leu | Leu | Ser | Cys | Ile | Ala | Leu | Ser | Leu | Ala | Leu |     |
| 1                  |     |     |     | 5   |     |     |     |     | 10  |     |     |     |     | 15  |     |     |
| gtc acg aat tca    |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     | 60  |
| Val Thr Asn Ser    |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
| 20                 |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
| <210> 8            |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
| <211> 20           |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
| <212> PRT          |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
| <213> Homo sapiens |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
| <400> 8            |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
| Met                | Tyr | Arg | Met | Gln | Leu | Leu | Ser | Cys | Ile | Ala | Leu | Ser | Leu | Ala | Leu |     |
| 1                  |     |     |     | 5   |     |     |     |     | 10  |     |     |     |     | 15  |     |     |
| Val Thr Asn Ser    |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
| 20                 |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
| <210> 9            |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
| <211> 1197         |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
| <212> DNA          |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
| <213> Homo sapiens |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
| <220>              |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
| <221> CDS          |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
| <222> (1)..(1197)  |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
| <400> 9            |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
| atg                | agg | ctt | cgg | gag | ccg | ctc | ctg | agc | ggc | agc | gcc | gcg | atg | cca | ggc | 48  |
| Met                | Arg | Leu | Arg | Glu | Pro | Leu | Leu | Ser | Gly | Ser | Ala | Ala | Met | Pro | Gly |     |
| 1                  |     |     |     | 5   |     |     |     |     | 10  |     |     |     |     | 15  |     |     |
| gcg                | tcc | cta | cag | cgg | gcc | tgc | cgc | ctg | ctc | gtg | gcc | gtc | tgc | gct | ctg | 96  |
| Ala                | Ser | Leu | Gln | Arg | Ala | Cys | Arg | Leu | Leu | Val | Ala | Val | Cys | Ala | Leu |     |
|                    |     |     | 20  |     |     |     |     | 25  |     |     |     |     | 30  |     |     |     |
| cac                | ctt | ggc | gtc | acc | ctc | gtt | tac | tac | ctg | gct | ggc | cgc | gac | ctg | agc | 144 |
| His                | Leu | Gly | Val | Thr | Leu | Val | Tyr | Tyr | Leu | Ala | Gly | Arg | Asp | Leu | Ser |     |
|                    |     | 35  |     |     |     |     | 40  |     |     |     |     | 45  |     |     |     |     |
| cgc                | ctg | ccc | caa | ctg | gtc | gga | gtc | tcc | aca | ccg | ctg | cag | ggc | ggc | tcg | 192 |
| Arg                | Leu | Pro | Gln | Leu | Val | Gly | Val | Ser | Thr | Pro | Leu | Gln | Gly | Gly | Ser |     |
|                    | 50  |     |     |     |     | 55  |     |     |     |     | 60  |     |     |     |     |     |
| aac                | agt | gcc | gcc | gcc | atc | ggg | cag | tcc | tcc | ggg | gag | ctc | cgg | acc | gga | 240 |
| Asn                | Ser | Ala | Ala | Ala | Ile | Gly | Gln | Ser | Ser | Gly | Glu | Leu | Arg | Thr | Gly |     |
| 65                 |     |     |     |     | 70  |     |     |     |     | 75  |     |     |     |     | 80  |     |
| ggg                | gcc | cgg | ccg | ccg | cct | cct | cta | ggc | gcc | tcc | tcc | cag | ccg | cgc | ccg | 288 |
| Gly                | Ala | Arg | Pro | Pro | Pro | Pro | Leu | Gly | Ala | Ser | Ser | Gln | Pro | Arg | Pro |     |
|                    |     |     |     | 85  |     |     |     |     | 90  |     |     |     |     | 95  |     |     |
| ggt                | ggc | gac | tcc | agc | cca | gtc | gtg | gat | tct | ggc | cct | ggc | ccc | gct | agc | 336 |
| Gly                | Gly | Asp | Ser | Ser | Pro | Val | Val | Asp | Ser | Gly | Pro | Gly | Pro | Ala | Ser |     |
|                    |     |     | 100 |     |     |     |     | 105 |     |     |     |     | 110 |     |     |     |
| aac                | ttg | acc | tcg | gtc | cca | gtg | ccc | cac | acc | acc | gca | ctg | tcg | ctg | ccc | 384 |
| Asn                | Leu | Thr | Ser | Val | Pro | Val | Pro | His | Thr | Thr | Ala | Leu | Ser | Leu | Pro |     |
|                    |     | 115 |     |     |     |     | 120 |     |     |     |     | 125 |     |     |     |     |
| gcc                | tgc | cct | gag | gag | tcc | ccg | ctg | ctt | gtg | ggc | ccc | atg | ctg | att | gag | 432 |
| Ala                | Cys | Pro | Glu | Glu | Ser | Pro | Leu | Leu | Val | Gly | Pro | Met | Leu | Ile | Glu |     |

91

PCT/IB20 7 / 004354

FR2006-084 PCT.ST25.txt

|                                                                 |     |     |      |
|-----------------------------------------------------------------|-----|-----|------|
| 130                                                             | 135 | 140 |      |
| ttt aac atg cct gtg gac ctg gag ctc gtg gca aag cag aac cca aat |     |     | 480  |
| Phe Asn Met Pro Val Asp Leu Glu Leu Val Ala Lys Gln Asn Pro Asn |     |     |      |
| 145                                                             | 150 | 155 | 160  |
| gtg aag atg ggc ggc cgc tat gcc ccc agg gac tgc gtc tct cct cac |     |     | 528  |
| Val Lys Met Gly Gly Arg Tyr Ala Pro Arg Asp Cys Val Ser Pro His |     |     |      |
|                                                                 | 165 | 170 | 175  |
| aag gtg gcc atc atc att cca ttc cgc aac cgg cag gag cac ctc aag |     |     | 576  |
| Lys Val Ala Ile Ile Ile Pro Phe Arg Asn Arg Gln Glu His Leu Lys |     |     |      |
|                                                                 | 180 | 185 | 190  |
| tac tgg cta tat tat ttg cat cca gtc ctg cag cgc cag cag ctg gac |     |     | 624  |
| Tyr Trp Leu Tyr Tyr Leu His Pro Val Leu Gln Arg Gln Gln Leu Asp |     |     |      |
|                                                                 | 195 | 200 | 205  |
| tat ggc atc tat gtt atc aac cag gcg gga gac act ata ttc aat cgt |     |     | 672  |
| Tyr Gly Ile Tyr Val Ile Asn Gln Ala Gly Asp Thr Ile Phe Asn Arg |     |     |      |
|                                                                 | 210 | 215 | 220  |
| gct aag ctc ctc aat gtt ggc ttt caa gaa gcc ttg aag gac tat gac |     |     | 720  |
| Ala Lys Leu Leu Asn Val Gly Phe Gln Glu Ala Leu Lys Asp Tyr Asp |     |     |      |
|                                                                 | 225 | 230 | 235  |
| tac acc tgc ttt gtg ttt agt gac gtg gac ctc att cca atg aat gac |     |     | 768  |
| Tyr Thr Cys Phe Val Phe Ser Asp Val Asp Leu Ile Pro Met Asn Asp |     |     |      |
|                                                                 | 245 | 250 | 255  |
| cat aat gcg tac agg tgt ttt tca cag cca cgg cac att tcc gtt gca |     |     | 816  |
| His Asn Ala Tyr Arg Cys Phe Ser Gln Pro Arg His Ile Ser Val Ala |     |     |      |
|                                                                 | 260 | 265 | 270  |
| atg gat aag ttt gga ttc agc cta cct tat gtt cag tat ttt gga ggt |     |     | 864  |
| Met Asp Lys Phe Gly Phe Ser Leu Pro Tyr Val Gln Tyr Phe Gly Gly |     |     |      |
|                                                                 | 275 | 280 | 285  |
| gtc tct gct cta agt aaa caa cag ttt cta acc atc aat gga ttt cct |     |     | 912  |
| Val Ser Ala Leu Ser Lys Gln Gln Phe Leu Thr Ile Asn Gly Phe Pro |     |     |      |
|                                                                 | 290 | 295 | 300  |
| aat aat tat tgg ggc tgg gga gga gaa gat gat gac att ttt aac aga |     |     | 960  |
| Asn Asn Tyr Trp Gly Trp Gly Gly Glu Asp Asp Ile Phe Asn Arg     |     |     |      |
|                                                                 | 305 | 310 | 315  |
| tta gtt ttt aga ggc atg tct ata tct cgc cca aat gct gtg gtc ggg |     |     | 1008 |
| Leu Val Phe Arg Gly Met Ser Ile Ser Arg Pro Asn Ala Val Val Gly |     |     |      |
|                                                                 | 325 | 330 | 335  |
| agg tgt cgc atg atc cgc cac tca aga gac aag aaa aat gaa ccc aat |     |     | 1056 |
| Arg Cys Arg Met Ile Arg His Ser Arg Asp Lys Lys Asn Glu Pro Asn |     |     |      |
|                                                                 | 340 | 345 | 350  |
| cct cag agg ttt gac cga att gca cac aca aag gag aca atg ctc tct |     |     | 1104 |
| Pro Gln Arg Phe Asp Arg Ile Ala His Thr Lys Glu Thr Met Leu Ser |     |     |      |
|                                                                 | 355 | 360 | 365  |
| gat ggt ttg aac tca ctc acc tac cag gtg ctg gat gta cag aga tac |     |     | 1152 |
| Asp Gly Leu Asn Ser Leu Thr Tyr Gln Val Leu Asp Val Gln Arg Tyr |     |     |      |
|                                                                 | 370 | 375 | 380  |
| cca ttg tat acc caa atc aca gtg gac atc ggg aca ccg agc tag     |     |     | 1197 |
| Pro Leu Tyr Thr Gln Ile Thr Val Asp Ile Gly Thr Pro Ser         |     |     |      |
|                                                                 | 385 | 390 | 395  |

<210> 10

92

PCT/IB20 7 / 0 0 4 3 5 4

FR2006-084 PCT.ST25.txt

<211> 398  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 10

Met Arg Leu Arg Glu Pro Leu Leu Ser Gly Ser Ala Ala Met Pro Gly  
1 5 10 15

Ala Ser Leu Gln Arg Ala Cys Arg Leu Leu Val Ala Val Cys Ala Leu  
20 25 30

His Leu Gly Val Thr Leu Val Tyr Tyr Leu Ala Gly Arg Asp Leu Ser  
35 40 45

Arg Leu Pro Gln Leu Val Gly Val Ser Thr Pro Leu Gln Gly Gly Ser  
50 55 60

Asn Ser Ala Ala Ala Ile Gly Gln Ser Ser Gly Glu Leu Arg Thr Gly  
65 70 75 80

Gly Ala Arg Pro Pro Pro Pro Leu Gly Ala Ser Ser Gln Pro Arg Pro  
85 90 95

Gly Gly Asp Ser Ser Pro Val Val Asp Ser Gly Pro Gly Pro Ala Ser  
100 105 110

Asn Leu Thr Ser Val Pro Val Pro His Thr Thr Ala Leu Ser Leu Pro  
115 120 125

Ala Cys Pro Glu Glu Ser Pro Leu Leu Val Gly Pro Met Leu Ile Glu  
130 135 140

Phe Asn Met Pro Val Asp Leu Glu Leu Val Ala Lys Gln Asn Pro Asn  
145 150 155 160

Val Lys Met Gly Gly Arg Tyr Ala Pro Arg Asp Cys Val Ser Pro His  
165 170 175

Lys Val Ala Ile Ile Ile Pro Phe Arg Asn Arg Gln Glu His Leu Lys  
180 185 190

Tyr Trp Leu Tyr Tyr Leu His Pro Val Leu Gln Arg Gln Gln Leu Asp  
195 200 205

Tyr Gly Ile Tyr Val Ile Asn Gln Ala Gly Asp Thr Ile Phe Asn Arg  
210 215 220

Ala Lys Leu Leu Asn Val Gly Phe Gln Glu Ala Leu Lys Asp Tyr Asp  
225 230 235 240

Tyr Thr Cys Phe Val Phe Ser Asp Val Asp Leu Ile Pro Met Asn Asp  
245 250 255

93

FR2006-084 PCT.ST25.txt

His Asn Ala Tyr Arg Cys Phe Ser Gln Pro Arg His Ile Ser Val Ala  
260 265 270

Met Asp Lys Phe Gly Phe Ser Leu Pro Tyr Val Gln Tyr Phe Gly Gly  
275 280 285

Val Ser Ala Leu Ser Lys Gln Gln Phe Leu Thr Ile Asn Gly Phe Pro  
290 295 300

Asn Asn Tyr Trp Gly Trp Gly Gly Glu Asp Asp Asp Ile Phe Asn Arg  
305 310 315 320

Leu Val Phe Arg Gly Met Ser Ile Ser Arg Pro Asn Ala Val Val Gly  
325 330 335

Arg Cys Arg Met Ile Arg His Ser Arg Asp Lys Lys Asn Glu Pro Asn  
340 345 350

Pro Gln Arg Phe Asp Arg Ile Ala His Thr Lys Glu Thr Met Leu Ser  
355 360 365

Asp Gly Leu Asn Ser Leu Thr Tyr Gln Val Leu Asp Val Gln Arg Tyr  
370 375 380

Pro Leu Tyr Thr Gln Ile Thr Val Asp Ile Gly Thr Pro Ser  
385 390 395

<210> 11  
<211> 1128  
<212> DNA  
<213> Homo sapiens

<220>  
<221> CDS  
<222> (1)..(1128)

<400> 11  
atg gga ctc ttg gta ttt gtg cgc aat ctg ctg cta gcc ctc tgc ctc 48  
Met Gly Leu Leu Val Phe Val Arg Asn Leu Leu Leu Ala Leu Cys Leu  
1 5 10 15

ttt ctg gta ctg gga ttt ttg tat tat tct gcg tgg aag cta cac tta 96  
Phe Leu Val Leu Gly Phe Leu Tyr Tyr Ser Ala Trp Lys Leu His Leu  
20 25 30

ctc cag tgg gag gag gac tcc aat tca gtg gtt ctt tcc ttt gac tcc 144  
Leu Gln Trp Glu Glu Asp Ser Asn Ser Val Val Leu Ser Phe Asp Ser  
35 40 45

gct gga caa aca cta ggc tca gag tat gat cgg ttg ggc ttc ctc ctg 192  
Ala Gly Gln Thr Leu Gly Ser Glu Tyr Asp Arg Leu Gly Phe Leu Leu  
50 55 60

aat ctg gac tct aaa ctg cct gct gaa tta gcc acc aag tac gca aac 240  
Asn Leu Asp Ser Lys Leu Pro Ala Glu Leu Ala Thr Lys Tyr Ala Asn  
65 70 75 80

94

PCT/IB20 7 / 0 0 4 3 5 4

## FR2006-084 PCT.ST25.txt

|                                                                 |      |
|-----------------------------------------------------------------|------|
| ttt tca gag gga gct tgc aag cct ggc tat gct tca gcc ttg atg acg | 288  |
| Phe Ser Glu Gly Ala Cys Lys Pro Gly Tyr Ala Ser Ala Leu Met Thr |      |
|                                                                 | 85   |
| gcc atc ttc ccc cgg ttc tcc aag cca gca ccc atg ttc ctg gat gac | 336  |
| Ala Ile Phe Pro Arg Phe Ser Lys Pro Ala Pro Met Phe Leu Asp Asp |      |
|                                                                 | 100  |
| tcc ttt cgc aag tgg gct aga atc cgg gag ttc gtg ccg cct ttt ggg | 384  |
| Ser Phe Arg Lys Trp Ala Arg Ile Arg Glu Phe Val Pro Pro Phe Gly |      |
|                                                                 | 115  |
| atc aaa ggt caa gac aat ctg atc aaa gcc atc ttg tca gtc acc aaa | 432  |
| Ile Lys Gly Gln Asp Asn Leu Ile Lys Ala Ile Leu Ser Val Thr Lys |      |
|                                                                 | 130  |
| gag tac cgc ctg acc cct gcc ttg gac agc ctc cgc tgc cgc cgc tgc | 480  |
| Glu Tyr Arg Leu Thr Pro Ala Leu Asp Ser Leu Arg Cys Arg Arg Cys |      |
|                                                                 | 145  |
| atc atc gtg ggc aat gga ggc gtt ctt gcc aac aag tct ctg ggg tca | 528  |
| Ile Ile Val Gly Asn Gly Gly Val Leu Ala Asn Lys Ser Leu Gly Ser |      |
|                                                                 | 165  |
| cga att gac gac tat gac att gtg gtg aga ctg aat tca gca cca gtg | 576  |
| Arg Ile Asp Asp Tyr Asp Ile Val Val Arg Leu Asn Ser Ala Pro Val |      |
|                                                                 | 180  |
| aaa ggc ttt gag aag gac gtg ggc agc aaa acg aca ctg cgc atc acc | 624  |
| Lys Gly Phe Glu Lys Asp Val Gly Ser Lys Thr Thr Leu Arg Ile Thr |      |
|                                                                 | 195  |
| tac ccc gag ggc gcc atg cag cgg cct gag cag tac gag cgc gat tct | 672  |
| Tyr Pro Glu Gly Ala Met Gln Arg Pro Glu Gln Tyr Glu Arg Asp Ser |      |
|                                                                 | 210  |
| ctc ttt gtc ctc gcc ggc ttc aag tgg cag gac ttt aag tgg ttg aaa | 720  |
| Leu Phe Val Leu Ala Gly Phe Lys Trp Gln Asp Phe Lys Trp Leu Lys |      |
|                                                                 | 225  |
| tac atc gtc tac aag gag aga gtg agt gca tcg gat ggc ttc tgg aaa | 768  |
| Tyr Ile Val Tyr Lys Glu Arg Val Ser Ala Ser Asp Gly Phe Trp Lys |      |
|                                                                 | 245  |
| tct gtg gcc act cga gtg ccc aag gag ccc cct gag att cga atc ctc | 816  |
| Ser Val Ala Thr Arg Val Pro Lys Glu Pro Pro Glu Ile Arg Ile Leu |      |
|                                                                 | 260  |
| aac cca tat ttc atc cag gag gcc gcc ttc acc ctc att ggc ctg ccc | 864  |
| Asn Pro Tyr Phe Ile Gln Glu Ala Ala Phe Thr Leu Ile Gly Leu Pro |      |
|                                                                 | 275  |
| ttc aac aat ggc ctc atg ggc cgg ggg aac atc cct acc ctt ggc agt | 912  |
| Phe Asn Asn Gly Leu Met Gly Arg Gly Asn Ile Pro Thr Leu Gly Ser |      |
|                                                                 | 290  |
| gtg gca gtg acc atg gca cta cac ggc tgt gac gag gtg gca gtc gca | 960  |
| Val Ala Val Thr Met Ala Leu His Gly Cys Asp Glu Val Ala Val Ala |      |
|                                                                 | 305  |
| gga ttt ggc tat gac atg agc aca ccc aac gca ccc ctg cac tac tat | 1008 |
| Gly Phe Gly Tyr Asp Met Ser Thr Pro Asn Ala Pro Leu His Tyr Tyr |      |
|                                                                 | 325  |
| gag acc gtt cgc atg gca gcc atc aaa gag tcc tgg acg cac aat atc | 1056 |
| Glu Thr Val Arg Met Ala Ala Ile Lys Glu Ser Trp Thr His Asn Ile |      |
|                                                                 | 340  |

95

FR2006-084 PCT.ST25.txt

cag cga gag aaa gag ttt ctg cgg aag ctg gtg aaa gct cgc gtc atc 1104  
Gln Arg Glu Lys Glu Phe Leu Arg Lys Leu Val Lys Ala Arg Val Ile  
355 360 365

act gat cta agc agt ggc atc tga 1128  
Thr Asp Leu Ser Ser Gly Ile  
370 375

<210> 12  
<211> 375  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 12

Met Gly Leu Leu Val Phe Val Arg Asn Leu Leu Leu Ala Leu Cys Leu  
1 5 10 15

Phe Leu Val Leu Gly Phe Leu Tyr Tyr Ser Ala Trp Lys Leu His Leu  
20 25 30

Leu Gln Trp Glu Glu Asp Ser Asn Ser Val Val Leu Ser Phe Asp Ser  
35 40 45

Ala Gly Gln Thr Leu Gly Ser Glu Tyr Asp Arg Leu Gly Phe Leu Leu  
50 55 60

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

Phe Ser Glu Gly Ala Cys Lys Pro Gly Tyr Ala Ser Ala Leu Met Thr  
85 90 95

Ala Ile Phe Pro Arg Phe Ser Lys Pro Ala Pro Met Phe Leu Asp Asp  
100 105 110

Ser Phe Arg Lys Trp Ala Arg Ile Arg Glu Phe Val Pro Pro Phe Gly  
115 120 125

Ile Lys Gly Gln Asp Asn Leu Ile Lys Ala Ile Leu Ser Val Thr Lys  
130 135 140

Glu Tyr Arg Leu Thr Pro Ala Leu Asp Ser Leu Arg Cys Arg Arg Cys  
145 150 155 160

Ile Ile Val Gly Asn Gly Gly Val Leu Ala Asn Lys Ser Leu Gly Ser  
165 170 175

Arg Ile Asp Asp Tyr Asp Ile Val Val Arg Leu Asn Ser Ala Pro Val  
180 185 190

Lys Gly Phe Glu Lys Asp Val Gly Ser Lys Thr Thr Leu Arg Ile Thr  
195 200 205

98

rCT/IB20 7 / 0 0 4 3 5 4

FR2006-084 PCT.ST25.txt

Tyr Pro Glu Gly Ala Met Gln Arg Pro Glu Gln Tyr Glu Arg Asp Ser  
210 215 220

Leu Phe Val Leu Ala Gly Phe Lys Trp Gln Asp Phe Lys Trp Leu Lys  
225 230 235 240

Tyr Ile Val Tyr Lys Glu Arg Val Ser Ala Ser Asp Gly Phe Trp Lys  
245 250 255

Ser Val Ala Thr Arg Val Pro Lys Glu Pro Pro Glu Ile Arg Ile Leu  
260 265 270

Asn Pro Tyr Phe Ile Gln Glu Ala Ala Phe Thr Leu Ile Gly Leu Pro  
275 280 285

Phe Asn Asn Gly Leu Met Gly Arg Gly Asn Ile Pro Thr Leu Gly Ser  
290 295 300

Val Ala Val Thr Met Ala Leu His Gly Cys Asp Glu Val Ala Val Ala  
305 310 315 320

Gly Phe Gly Tyr Asp Met Ser Thr Pro Asn Ala Pro Leu His Tyr Tyr  
325 330 335

Glu Thr Val Arg Met Ala Ala Ile Lys Glu Ser Trp Thr His Asn Ile  
340 345 350

Gln Arg Glu Lys Glu Phe Leu Arg Lys Leu Val Lys Ala Arg Val Ile  
355 360 365

Thr Asp Leu Ser Ser Gly Ile  
370 375

<210> 13  
<211> 1722  
<212> DNA  
<213> Homo sapiens

<220>  
<221> CDS  
<222> (1)..(1722)

<400> 13  
tta gtt gag gat acc aca tta gag cca gaa gag cca cca act aaa tac 48  
Leu Val Glu Asp Thr Thr Leu Glu Pro Glu Glu Pro Pro Thr Lys Tyr  
1 5 10 15

caa atc tct caa cca gaa gtg tac gtg gct gca cca ggg gag tcg cta 96  
Gln Ile Ser Gln Pro Glu Val Tyr Val Ala Ala Pro Gly Glu Ser Leu  
20 25 30

gag gtg cgc tgc ctg ttg aaa gat gcc gcc gtg atc agt tgg act aag 144  
Glu Val Arg Cys Leu Leu Lys Asp Ala Ala Val Ile Ser Trp Thr Lys  
35 40 45

97

FR2006-084 PCT.ST25.txt

|                                                                 |     |
|-----------------------------------------------------------------|-----|
| gat ggg gtg cac ttg ggg ccc aac aat agg aca gtg ctt att ggg gag | 192 |
| Asp Gly Val His Leu Gly Pro Asn Asn Arg Thr Val Leu Ile Gly Glu |     |
| 50 55 60                                                        |     |
| tac ttg cag ata aag ggc gcc acg cct aga gac tcc ggc ctc tat gct | 240 |
| Tyr Leu Gln Ile Lys Gly Ala Thr Pro Arg Asp Ser Gly Leu Tyr Ala |     |
| 65 70 75 80                                                     |     |
| tgt act gcc agt agg act gta gac agt gaa act tgg tac ttc atg gtg | 288 |
| Cys Thr Ala Ser Arg Thr Val Asp Ser Glu Thr Trp Tyr Phe Met Val |     |
| 85 90 95                                                        |     |
| aat gtc aca gat gcc atc tca tcc gga gat gat gag gat gac acc gat | 336 |
| Asn Val Thr Asp Ala Ile Ser Ser Gly Asp Asp Glu Asp Asp Thr Asp |     |
| 100 105 110                                                     |     |
| ggg ggc gaa gat ttt gtc agt gag aac agt aac aac aag aga gca cca | 384 |
| Gly Ala Glu Asp Phe Val Ser Glu Asn Ser Asn Asn Lys Arg Ala Pro |     |
| 115 120 125                                                     |     |
| tac tgg acc aac aca gaa aag atg gaa aag cgg ctc cat gct gtg cct | 432 |
| Tyr Trp Thr Asn Thr Glu Lys Met Glu Lys Arg Leu His Ala Val Pro |     |
| 130 135 140                                                     |     |
| gcg gcc aac act gtc aag ttt cgc tgc cca gcc ggg ggg aac cca atg | 480 |
| Ala Ala Asn Thr Val Lys Phe Arg Cys Pro Ala Gly Gly Asn Pro Met |     |
| 145 150 155 160                                                 |     |
| cca acc atg cgg tgg ctg aaa aac ggg aag gag ttt aag cag gag cat | 528 |
| Pro Thr Met Arg Trp Leu Lys Asn Gly Lys Glu Phe Lys Gln Glu His |     |
| 165 170 175                                                     |     |
| cgc att gga ggc tac aag gta cga aac cag cac tgg agc ctc att atg | 576 |
| Arg Ile Gly Gly Tyr Lys Val Arg Asn Gln His Trp Ser Leu Ile Met |     |
| 180 185 190                                                     |     |
| gaa agt gtg gtc cca tct gac aag gga aat tat acc tgt gtg gtg gag | 624 |
| Glu Ser Val Val Pro Ser Asp Lys Gly Asn Tyr Thr Cys Val Val Glu |     |
| 195 200 205                                                     |     |
| aat gaa tac ggg tcc atc aat cac acg tac cac ctg gat gtt gtg gag | 672 |
| Asn Glu Tyr Gly Ser Ile Asn His Thr Tyr His Leu Asp Val Val Glu |     |
| 210 215 220                                                     |     |
| cga tcg cct cac cgg ccc atc ctc caa gcc gga ctg ccg gca aat gcc | 720 |
| Arg Ser Pro His Arg Pro Ile Leu Gln Ala Gly Leu Pro Ala Asn Ala |     |
| 225 230 235 240                                                 |     |
| tcc aca gtg gtc gga gga gac gta gag ttt gtc tgc aag gtt tac agt | 768 |
| Ser Thr Val Val Gly Gly Asp Val Glu Phe Val Cys Lys Val Tyr Ser |     |
| 245 250 255                                                     |     |
| gat gcc cag ccc cac atc cag tgg atc aag cac gtg gaa aag aac ggc | 816 |
| Asp Ala Gln Pro His Ile Gln Trp Ile Lys His Val Glu Lys Asn Gly |     |
| 260 265 270                                                     |     |
| agt aaa tac ggg ccc gac ggg ctg ccc tac ctc aag gtt ctc aag gcc | 864 |
| Ser Lys Tyr Gly Pro Asp Gly Leu Pro Tyr Leu Lys Val Leu Lys Ala |     |
| 275 280 285                                                     |     |
| gcc ggt gtt aac acc acg gac aaa gag att gag gtt ctc tat att cgg | 912 |
| Ala Gly Val Asn Thr Thr Asp Lys Glu Ile Glu Val Leu Tyr Ile Arg |     |
| 290 295 300                                                     |     |
| aat gta act ttt gag gac gct ggg gaa tat acg tgc ttg gcg ggt aat | 960 |
| Asn Val Thr Phe Glu Asp Ala Gly Glu Tyr Thr Cys Leu Ala Gly Asn |     |
| 305 310 315 320                                                 |     |

98

PCT/IB20 7 / 0 0 4 3 5 4

FR2006-084 PCT.ST25.txt

|                                                                 |      |
|-----------------------------------------------------------------|------|
| tct att ggg ata tcc ttt cac tct gca tgg ttg aca gtt ctg cca gcg | 1008 |
| Ser Ile Gly Ile Ser Phe His Ser Ala Trp Leu Thr Val Leu Pro Ala |      |
| 325 330 335                                                     |      |
| cct gga aga gaa aag gag att aca gct tcc cca gac aaa act cac aca | 1056 |
| Pro Gly Arg Glu Lys Glu Ile Thr Ala Ser Pro Asp Lys Thr His Thr |      |
| 340 345 350                                                     |      |
| tgc cca ccg tgc cca gca cct gaa ctc ctg ggg gga ccg tca gtc ttc | 1104 |
| Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe |      |
| 355 360 365                                                     |      |
| ctc ttc ccc cca aaa ccc aag gac acc ctc atg atc tcc cgg acc cct | 1152 |
| Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro |      |
| 370 375 380                                                     |      |
| gag gtc aca tgc gtg gtg gtg gcc gtg agc cac gaa gac cct gag gtc | 1200 |
| Glu Val Thr Cys Val Val Val Ala Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val |      |
| 385 390 400                                                     |      |
| aag ttc aac tgg tac gtg gac ggc gtg gag gtg cat aat gcc aag aca | 1248 |
| Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr |      |
| 405 410 415                                                     |      |
| aag ccg cgg gag gag cag tac aac agc acg tac cgt gtg gtc agc gtc | 1296 |
| Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val |      |
| 420 425 430                                                     |      |
| ctc acc gtc ctg cac cag gac tgg ctg aat ggc aag gag tac aag tgc | 1344 |
| Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys |      |
| 435 440 445                                                     |      |
| aag gtc tcc aac aaa gcc ctc cca gcc ccc atc gag aaa acc atc tcc | 1392 |
| Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser |      |
| 450 455 460                                                     |      |
| aaa gcc aaa ggg cag ccc cga gaa cca cag gtg tac acc ctg ccc cca | 1440 |
| Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro |      |
| 465 470 480                                                     |      |
| tcc ccg gat gag ctg acc aag aac cag gtc agc ctg acc tgc ctg gtc | 1488 |
| Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val |      |
| 485 490 495                                                     |      |
| aaa ggc ttc tat ccc agc gac atc gcc gtg gag tgg gag agc aat ggg | 1536 |
| Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly |      |
| 500 505 510                                                     |      |
| cag ccg gag aac aac tac aag acc acg cct ccc gtg ctg gac tcc gac | 1584 |
| Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp |      |
| 515 520 525                                                     |      |
| ggc tcc ttc ttc ctc tac agc aag ctc acc gtg gac aag agc agg tgg | 1632 |
| Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp |      |
| 530 535 540                                                     |      |
| cag cag ggg aac gtc ttc tca tgc tcc gtg atg cat gag gct ctg cac | 1680 |
| Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His |      |
| 545 550 555 560                                                 |      |
| aac cac tac acg cag aag agc ctc tcc ctg tct ccg ggt tga         | 1722 |
| Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly             |      |
| 565 570                                                         |      |

<210> 14  
<211> 573  
<212> PRT

99

FR2006-084 PCT.ST25.txt

<213> Homo sapiens

<400> 14

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

100

FR2006-084 PCT.ST25.txt  
Asp Ala Gln Pro His Ile Gln Trp Ile Lys His Val Glu Lys Asn Gly  
260 265 270  
Ser Lys Tyr Gly Pro Asp Gly Leu Pro Tyr Leu Lys Val Leu Lys Ala  
275 280 285  
Ala Gly Val Asn Thr Thr Asp Lys Glu Ile Glu Val Leu Tyr Ile Arg  
290 295 300  
Asn Val Thr Phe Glu Asp Ala Gly Glu Tyr Thr Cys Leu Ala Gly Asn  
305 310 315 320  
Ser Ile Gly Ile Ser Phe His Ser Ala Trp Leu Thr Val Leu Pro Ala  
325 330 335  
Pro Gly Arg Glu Lys Glu Ile Thr Ala Ser Pro Asp Lys Thr His Thr  
340 345 350  
Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe  
355 360 365  
Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro  
370 375 380  
Glu Val Thr Cys Val Val Val Ala Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val  
385 390 395 400  
Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr  
405 410 415  
Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val  
420 425 430  
Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys  
435 440 445  
Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser  
450 455 460  
Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro  
465 470 475 480  
Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val  
485 490 495  
Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly  
500 505 510  
Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp  
515 520 525

101

PCT/IB20 7 / 0 0 4 3 5 4

FR2006-084 PCT.ST25.txt  
Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp  
530 535 540  
Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His  
545 550 555 560  
Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly  
565 570

## FUSIONES Fc CON RECEPTOR PARA FGF SOLUBLE MODIFICADAS, CON ACTIVIDAD BIOLÓGICA MEJORADA

### Campo de la invención e introducción

La invención se refiere a fusiones Fc con receptor para FGF soluble  
 5 modificadas que comprenden una fusión de un fragmento o dominio solubles del  
 receptor para FGF con una región Fc de una inmunoglobulina, que tienen actividad  
 biológica mejorada, a composiciones que las contienen, y a método para producir tales  
 moléculas de fusión Fc con receptor para FGF soluble modificadas. En particular, las  
 fusiones Fc con receptor para FGF soluble modificadas tienen actividad  
 10 antiangiogénica mejorada y actividades citotóxicas mediadas por células dependientes  
 de anticuerpos antitumorales, concretamente ADCC (siglas inglesas de citotoxicidad  
 celular dependiente de anticuerpos) y/o CDC (citotoxicidad dependiente de  
 complemento), y por tanto son útiles en el tratamiento de cáncer, tumores  
 metastásicos, y para reducir el crecimiento tumoral en un sujeto. La invención se  
 15 refiere además a métodos para inhibir el crecimiento tumoral y a métodos para tratar o  
 prevenir situaciones patológicas que incluyen, pero sin quedar limitadas a las mismas,  
 cáncer de mama, melanoma, leucemia, metástasis cerebrales, cáncer renal,  
 melanoma primario, cáncer de colon primario, cáncer de vejiga primario, hemangioma  
 infantil, cáncer de ovario, cáncer de próstata, y cáncer de pulmón.

### 20 Antecedentes y relevancia de la invención

La angiogénesis, es decir, la formación de nuevos vasos sanguíneos a partir de  
 los preexistentes, implica una compleja coordinación de proliferación de células  
 endoteliales, migración, degradación de la membrana basal, y organización de los  
 nuevos vasos (Ji y otros, 1998, *FASEB J.* **12**:1731-1738). La liberación local  
 25 incontrolada de factores de crecimiento angiogénico y/o las alteraciones de la  
 producción de inhibidores angiogénicos naturales, con la consecuente alteración del  
 equilibrio angiogénico (Hanahan y otros, 1996, *Cell.* **86**: 353-64) son responsables de  
 la proliferación incontrolada de células endoteliales que tiene lugar durante la  
 neovascularización tumoral y en enfermedades dependientes de angiogénesis  
 30 (Folkman, 1995, *Nat. Med.* **1**:27-31).

Se han identificado numerosos inductores naturales de angiogénesis, entre  
 ellos miembros de la familia del factor de crecimiento endotelial vascular (siglas  
 inglesas VEGF), angiopoyetinas, factores  $\alpha$  y  $\beta$  de crecimiento transformante (TGF- $\alpha$  y  
 TGF- $\beta$ ), factores de crecimiento derivados de plaquetas (PDGF), factor  $\alpha$  de necrosis

tumoral (TNF-  $\alpha$ ), interleucinas, quimiocinas, y los miembros de la familia del factor de crecimiento fibroblástico (FGF). Estos potentes factores angiogénicos son a menudo sobreexpresados por tejidos tumorales. (Presta, 2005, *Cytokine & Growth Factors Reviews*. **16**: 159-178; Grose, 2005, *Cytokine & Growth Factors Reviews*. **16**: 179-186).

De hecho, los FGFs, y más especialmente el FGF2, están sobreexpresados en numerosos cánceres humanos, entre ellos el melanoma (Halaban, 1996, *Semin Oncol*. **23**:673-81; Hanada, 2001, *Cancer Res*. **61**: 5511-5516), leucemia (Krejci y otros, 2001 *Leukemia*, **15**:228-37, Bieker y otros, 2003, *Cancer Res*. **63**: 7241-7246), cáncer renal (Hanada, 2001, *Cancer Res*. **61**: 5511-5516), cáncer de colon (Tassi, 2006, *Cancer Res*. **66**:1191-1198), cáncer de ovario (Whitworth y otros, 2005, *Clin Cancer Res*. **11**:4282-4288, Gan y otros, 2006, *Pharm Res*. **23**:1324-31), cancer de próstata (Aigner y otros, 2002 *Oncogene*, **21**:5733-42; Kwabi-Addo y otros, 2004, *Endocr Relat Cancer*. **11**:709-24) y cáncer de pulmón (Takanami y otros, 1996, *Pathol Res Pract*. **192**:1113-20; Volm y otros, 1997, *Anticancer Res*. **17**:99-103; Brattstrom y otros, 1998, *Anticancer Res*. **18**: 1123-1127). Además, la sobreexpresión de FGF2 puede correlacionarse con una quimiorresistencia en algunos cánceres, entre ellos cánceres de vejiga, de mama, de cabeza y cuello (Gan y otros, 2006, *Pharm Res*. **23**:1324-31). En cuanto a los miembros de la familia FGF, y puesto que los FGFs secretados por células tumorales presentan afinidades hacia las cadenas laterales de glicosaminoglicano de los proteoglicanos de la superficie celular y de la matriz, muy probablemente estos FGFs secretados son secuestrados por células tumorales próximas, formando depósitos de FGF. Esta particularidad hace que el apuntar hacia el FGF sea una buena estrategia para dirigir a una molécula activa que necesita una molécula diana expresada de manera estable y fácilmente accesible.

En la actualidad se emplean diversos productos basados en anticuerpos como fármacos terapéuticos, y se han aprobado recientemente varios anticuerpos monoclonales (abreviatura inglesa mAbs) en diversas áreas terapéuticas tales como oncología, inflamación, enfermedades infecciosas y enfermedades cardiovasculares. Estos mAbs inducen la muerte de células tumorales a través de múltiples mecanismos, que incluyen el reclutamiento del sistema inmunológico (Harris, 2004, *Lancet Oncol*, **5**: 292-302). La región Fc de los mAbs es responsable de estas funciones de efector, en las que interviene el sistema inmunológico, y que incluyen dos mecanismos principales: citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpos (siglas inglesas ADCC) y citotoxicidad dependiente del complemento (CDC). La ADCC se produce cuando un mAb se fija primeramente a través de su sitio fijador de antígeno a

su diana en células tumorales, y después la porción Fc es reconocida por receptores para Fc (FcR) específico en células efectoras (es decir linfocitos citolíticos naturales, neutrófilos, macrófagos, ...) que atacan la célula diana. La CDC es un proceso en el cual se activa una cascada de diferentes proteínas del complemento cuando un mAb se fija a C1q, lo que conduce a la formación de C3b en la superficie de células tumorales revestidas de anticuerpo cercanas al lugar de la activación del complemento. La presencia de C3b controla la formación del complejo de ataque a membrana

C5-C9 que puede insertarse en la membrana para lisar células tumorales (Sharkey, 2007, *CA Cancer J Clin*, **56**: 226-243). La capacidad de los mAbs para estimular la ADCC depende de su isotipo. Los anticuerpos IgG1 e IgG3 se unen fuertemente a FcRs, mientras que los anticuerpos IgG4 e IgG2 se unen débilmente. La capacidad del mAb para la CDC depende también del isotipo del mAb. La IgG3, y en menor grado la IgG1, son los isotipos más eficaces para estimular la cascada del complemento clásica. Los mAbs IgG2 son menos eficaces en la activación de la cascada del complemento, mientras que la IgG4 no tiene capacidad para ello (Strome, 2007, *The Oncologist*, **12**:1084-1095).

El empleo de una proteína de fusión que, al igual que los anticuerpos, puede tener una doble funcionalidad, con una parte de fijación que manifiesta una orientación selectiva específica y una parte efectora capaz de inducir la lisis de células diana a través del reclutamiento del sistema inmunitario, constituye un aspecto de estas estrategias terapéuticas. Además, para ser útil en terapia, esta molécula precisaría tener propiedades farmacocinéticas (abreviadamente PK) ventajosas. La porción Fc puede incrementar, de manera detectable, la semivida sérica de la fusión Fc con receptor para FGF soluble modificada, pero aún se sigue necesitando una proteína de fusión con una semivida sérica mayor. Por último, si esta proteína de fusión va a ser empleada en calidad de fármaco, es necesario producirla de manera fiable, eficaz, y con una productividad adecuada.

Existe, por tanto, la necesidad de una proteína de fusión con actividades de ADCC y/o CDC que esté dirigida hacia FGF, para el tratamiento de cáncer, tumores metastásicos y para reducir el crecimiento tumoral en un sujeto, con características PK mejoradas, y que pueda ser producida eficazmente.

Los solicitantes han descubierto ahora que proteínas de fusión solubles entre una parte de receptor para FGF soluble (porción fijadora o de selección de objetivo) y una parte Fc (porción con función efectora) (sFGFR-Fc) que han sido modificadas con

el fin de conseguir un perfil particular de glicanos, tienen de hecho actividades biológicas sustancialmente mejoradas, entre ellas actividades ADCC y/o actividades GDC, y por tanto pueden ser empleadas como fármacos antiangiogénicos y antitumorales eficaces para el tratamiento del crecimiento celular incontrolado o  
5 cáncer. Estas proteínas de fusión solubles modificadas tienen propiedades PK ventajosas a causa de su tasa de sialilación, y pueden ser producidas con una productividad adecuada y una agregación mínima a causa de su perfil de glicosilación.

#### Sumario de la invención

La presente invención está dirigida, por tanto, a una fusión Fc con receptor  
10 para FGF soluble modificada que comprende una fusión de un fragmento o dominio solubles de un receptor para FGF con una región Fc de una inmunoglobulina, en donde al menos el 5º sitio de N-glicosilación de la porción de receptor para FGF está ocupado, y en donde como máximo 45% de los N-glicanos de la porción de receptor para FGF no tienen grupo sialilo. Además, según otra realización preferida de la  
15 invención, el 3er, 4º, 6º y 7º sitios de N-glicosilación de la porción de receptor para FGF están ocupados. Preferiblemente, todos los sitios de N-glicosilación están ocupados. En otra realización preferida, el número medio de ácidos siálicos por N-glicano en la porción de receptor para FGF de las fusiones de la invención es al menos 0,9; incluso más preferiblemente es al menos 1,2. Cada molécula de N-glicano  
20 de la fusión Fc con receptor para FGF soluble modificada de acuerdo con la presente invención comprende 3 restos de manosa, por término medio de 1,5 a 3,0 restos de galactosa, de 3,5 a 5 restos de N-acetilglucosamina, y de 0,6 a 1 restos de fucosa.

La presente invención está dirigida también a fusiones Fc con receptor para FGF soluble modificadas que comprenden una fusión de un fragmento o dominio  
25 soluble de un receptor para FGF con una región Fc de una inmunoglobulina, en donde todos los sitios de N-glicosilación están ocupados, y en donde como máximo 45% de los N-glicanos de la porción de receptor para FGF no tienen grupo sialilo, y en donde el N-glicano de la región Fc está fucosilado en 60 - 100%.

En una realización, el fragmento o dominio soluble del receptor para FGF es el  
30 dominio soluble o extracelular del receptor 1 para FGF (sFGFR1) o del receptor 2 para FGF (sFGFR2).

En otra realización, el fragmento o dominio soluble del receptor para FGF es el dominio soluble o extracelular del isotipo o variante IIIc del receptor 1 para FGF (sFGFR1(IIIc)) o del isotipo IIIc del receptor 2 para FGF (sFGFR2(IIIc)).

De acuerdo con una realización preferida, la fusión Fc con receptor para FGF soluble modificada está codificada por un polinucleótido que tiene la secuencia nucleotídica expuesta en la SEQ ID NO: 1, o bien un polinucleótido que tiene una identidad de al menos 80% con la secuencia nucleotídica de SEQ ID NO: 1. En otra  
 5 realización preferida, la fusión Fc con receptor para FGF soluble modificada, de la invención, tiene la secuencia aminoacídica expuesta en la SEQ ID NO : 2, o una secuencia que tiene una identidad de al menos 95%, 97%, 98%, o 99% con la secuencia expuesta en SEQ ID NO: 2.

La fusión Fc con receptor para FGF soluble, modificada, de la invención, tiene  
 10 actividad de ADCC y/o CDC, y es útil por tanto para el tratamiento de enfermedades tales como el cáncer.

La presente invención se refiere también a composiciones farmacéuticas que comprenden tales fusiones Fc con receptor para FGF soluble modificadas.

La presente invención se refiere además a la combinación de la fusión Fc con  
 15 receptor para FGF soluble modificada, con un agente quimioterapéutico o un agente bioterapéutico con propiedades antitumorales o antiangiogénicas.

Otro objeto de la presente invención es un método para tratar cáncer, o un método para prevenir o reducir el crecimiento y volumen tumorales y los tumores metastásicos, que comprende administrar a un sujeto la fusión Fc con receptor para  
 20 FGF soluble modificada de la presente invención, en una cantidad terapéuticamente eficaz.

**Breve descripción de las figuras**

Las **Figuras 1A y 1B** muestran mapas de los vectores de expresión para SIAT6 (ST3GAL3) y B4GT1(B4GALT1), respectivamente.

25 Las **Figuras 2A y 2B** muestran las secuencias de ácido nucleico (SEQ ID No. 9) y de aminoácidos (SEQ ID No. 10) de B4GT1(B4GALT1) para expresión desde pXL4551

Las **Figuras 3A y 3B** muestran las secuencias de ácido nucleico (SEQ ID No. 11) y de aminoácidos (SEQ ID No. 12) de SIAT6 (ST3GAL3) para expresión desde  
 30 pXL4544

La **Figura 4A** corresponde a la secuencia de ácido nucleico de sFGFR2-Fc para expresión desde pXL4410, pXL4429 ó pXL4636 (SEQ ID N° 1), la **Figura 4B** corresponde a la secuencia de aminoácidos de sFGFR2-Fc (los sitios de

107

N-glicosilación se indican en negrita) codificada por pXL4410, pXL4429 ó pXL4636 (SEQ ID N° 2), la **Figura 4C** corresponde a la secuencia de aminoácidos de sFGFR2 (SEQ ID N° 4), la **Figura 4D** corresponde a la secuencia de aminoácidos de Fc (SEQ ID N° 6), la **Figura 4E** corresponde a la secuencia de aminoácidos del enlazador, y la **Figura 4F** corresponde a la secuencia de aminoácidos del péptido señal (SEQ ID N° 8). Es el péptido señal descrito para interleucina-2. Se ha observado que la fusión de este péptido aguas arriba de la secuencia representada por SEQ ID No.2 conduce a una proteína secretada con una secuencia aminoacídica N-terminal homogénea.

La **Figura 5** es una representación esquemática de la estrategia usada para construir pXL4636, que codifica sFGFR2-Fc y glutamina-sintetasa

Las **Figuras 6A y 6B** muestran mapas de los vectores de expresión pXL4429 para sFGFR2-Fc y DHFR, y pXL4417 que codifica el gen de resistencia a la neomicina

La **Figura 7** es un gráfico que muestra la correlación entre el número medio de ácidos siálicos por N-glicano de sFGFR2 y el aclaramiento de sFGFR2-Fc en la sangre - proporción óptima > 1,2; proporción preferida > 0,9.

La **Figura 8** muestra la SDS-PAGE (en condiciones no reductoras) de 1 µg de sFGFR2-Fc incubada en ausencia (-) o en presencia (+) de PNGase F. M: marcadores de peso molecular

La **Figura 9** muestra la posición de N-glicanos y la numeración en el dímero sFGFR2-Fc. La numeración comienza desde la secuencia aminoacídica N-terminal de FGFR2 (FGFR2\_HUMAN ) de manera tal que la posición N1 corresponde a Asn83, N2 corresponde a Asn123, N3 corresponde a Asn228, N4 corresponde a Asn241, N5 corresponde a Asn 265, N6 corresponde a Asn 297, N7 corresponde a Asn318, N8 corresponde a Asn331. La posición N297 corresponde a la posición Asn en la Fc (IgG1) humana.

La **Figura 10** es un gráfico que muestra la cinética de la desaparición de la proteína sFGFR2-Fc (cuadrados) en la sangre con el transcurso del tiempo, hasta las 72 horas.

La **Figura 11** muestra las cantidades recuperadas de proteína sFGFR2-Fc en plasma e hígado, expresadas en % de la dosis inyectada.

La **Figura 12** es un gráfico del análisis del volumen del tumor A549 tras el tratamiento, hasta el 40° día (100 µg por ratón y por administración: triángulos; 300 µg por ratón y por administración: cuadrados; 500 µg por ratón y por administración: círculos llenos; testigo de PBS: círculos huecos).

La **Figura 13** es un gráfico del análisis del peso del tumor A549 tras el tratamiento, en el 40º día.

La **Figura 14** es un gráfico del análisis del volumen del tumor H460 tras el tratamiento, hasta el 22º día (grupo tratado: círculos llenos; grupo testigo con PBS: círculos huecos).

La **Figura 15** es un gráfico del análisis del peso del tumor H460 tras el tratamiento, en el 22º día.

La **Figura 16** es un gráfico de la evaluación de la actividad ADCC *in vitro* de sFGFR2-Fc sobre células tumorales H460 y A549.

La **Figura 17** muestra gráficos del análisis del volumen del tumor A549 cuando se implanta en tres estirpes de ratón: SCID (**Figura 17A**), NOD/SCID (**Figura 17B**), y SCID/bg (**Figura 17C**), hasta el día 41º (sFGFR2-Fc 100 µg por ratón y por administración: rombos; testigo de PBS: círculos huecos).

La **Figura 18** muestra gráficos del análisis del volumen del tumor H460 cuando se implanta en tres estirpes de ratón: SCID (**Figura 18A**), NOD/SCID (**Figura 18B**), y SCID/bg (**Figura 18C**), hasta el día 22º (sFGFR2-Fc 100 µg por ratón y por administración: rombos; testigo de PBS: círculos huecos).

La **Figura 19A** muestra un mapa del plásmido que codifica sFGFR2-Fc (A265 en Fc), y la **Figura 19B** muestra la secuencia proteica de sFGFR2-Fc (A265 en Fc) (SEQ ID No. 14). La posición 392 es la posición de la mutación en el dominio Fc (Asp265Ala), y está representada con negrita.

La **Figura 20** es un gráfico que muestra el análisis del volumen de tumor H460 cuando se implanta en estirpes de ratones "desnudos" (desprovistos de timo) hasta el día 23º (círculos huecos: testigo de PBS: rombos; sFGFR2-Fc 500 µg por ratón y por administración; cuadrados huecos: sFGFR2-Fc (A265Fc) 500 µg por ratón y por administración); \*\*:  $p < 0,01$  frente al testigo Anova & Newman-Keuls después del test).

### Descripción detallada

A lo largo de esta memoria descriptiva, los solicitantes hacen referencia a artículos de revistas, documentos de patente, referencias publicadas, páginas de Internet, información de secuencias disponible en bases de datos, y otras fuentes de información. Un especialista en la técnica puede emplear todo el contenido de cualquiera de las fuentes de información citadas para crear y emplear aspectos de esta invención. Todas y cada una de las fuentes de información citadas son específicamente incorporadas, en su totalidad y por referencia, en la presente

memoria. En este documento se pueden incluir partes de estas fuentes, según se haya permitido o se requiera. Sin embargo, el significado de cualquier término o frase específicamente definido o explicado en esta memoria descriptiva no debe ser modificado por el contenido de ninguna de las fuentes. La descripción y los ejemplos  
5 que siguen son meramente ilustrativos del alcance de esta invención y del contenido de esta memoria descriptiva. Un especialista en la técnica puede diseñar y construir numerosas modificaciones de los ejemplos que figuran a continuación, sin salirse del alcance de esta invención.

La presente invención se refiere a proteínas de fusión solubles que  
10 comprenden dominios de receptores para FGF. La invención abarca en general fragmentos, dominios, y especialmente dominios solubles o extracelulares, de receptor para FGF. El dominio extracelular del receptor para FGF está unido a un copartícipe en la fusión apropiado, por ejemplo una unidad Fc de inmunoglobulina. Por tanto, en el sentido más amplio, las fusiones con receptor para FGF soluble modificadas, de la  
15 invención, pueden consistir en proteínas, fragmentos, dominios, dominios extracelulares, dominios solubles, y cualquiera de éstos, de receptor para FGF (FGFR), unidos a un copartícipe en la fusión, en especial un copartícipe de fusión consistente en una región Fc.

El solicitante ha hallado que una fusión Fc con receptor para FGF soluble,  
20 modificada, que comprende una fusión de un dominio soluble de un receptor para FGF con una región Fc de una inmunoglobulina, en donde como máximo 45% de los N-glicanos no tienen grupo sialilo, tiene propiedades ventajosas. Las ventajas del patrón de sialilación de la fusión Fc con receptor para FGF soluble modificada, de la invención, incluyen un mejor perfil farmacocinético y una resistencia mejorada a la  
25 escisión *in vivo*.

Típicamente, los N-glicanos se unen cotraduccionalmente a través de restos de asparagina (Asn) específicos. La secuencia de consenso Asn-X-Ser/Thr (en donde X es cualquier aminoácido excepto Pro) es esencial pero no suficiente, ya que la estructura secundaria local puede determinar la adición (Jefferis y otros, 2006, *Nature*  
30 *Biotechnology* **24**:1241). Se cree que varios factores son responsables de los sitios de N-glicosilación desocupados (Jones y otros, 2005, *Biochimica et Biophysica Acta* **1726**: 121) ofrece una discusión detallada de secuencias de péptidos señal. Existen varios sitios de N-glicosilación dentro de los receptores para FGF solubles de la invención. Por ejemplo, hay 8 sitios de N-glicosilación en el dominio extracelular de  
35 FGFR2IIIc (véase la Figura 9). Los N-glicanos contienen un núcleo oligosacárido

conservado unido a Asn. Este núcleo está compuesto por tres restos monosacáridos de manosa (Man) y dos de N-acetilglucosamina (GlcNAcs). Normalmente, las GlcNAcs adicionales están unidos de manera  $\beta 1,2$  a la  $\alpha 6$  Man o a la  $\alpha 3$  Man, mientras que pueden estar presentes o ausentes el ácido N-acetilneuramínico (NeuAc $\alpha 2,6$ ), la galactosa (Gal $\beta 1,4$ ), la fucosa (Fuc $\alpha 1,6$ ) y la GlcNAc ( $\beta 1,4$ ) bisecante (Jefferis y otros, 2006, *Nature Biotechnology* **24**:1241).

El solicitante ha demostrado que la presencia de un N-glicano en el 5º sitio de N-glicosilación desde el extremo N de la porción FGFR confiere propiedades ventajosas en cuanto a productividad y baja agregación, como se demuestra en los Ejemplos Experimentales. En particular, en ausencia de glicosilación en este sitio particular, la productividad desciende dramáticamente, mientras que aumenta la agregación. Además, se ha hallado que la presencia de este N-glicano es necesaria para la fijación a FGF.

La presente invención está dirigida, por tanto, a una fusión Fc con receptor para FGF soluble modificada que comprende una fusión de un dominio soluble de un receptor para FGF con una región Fc de una inmunoglobulina, en donde al menos el 5º sitio de N-glicosilación de la porción de receptor para FGF está ocupado, y como máximo 45% de los N-glicanos de dicha porción de receptor para FGF no tienen grupo sialilo.

Según otra realización de la invención, el 3º, 4º, 6º y 7º sitios de N-glicosilación de la porción de receptor para FGF están ocupados. Cuando están glicosilados al menos 7 de los sitios de N-glicosilación de la porción de receptor para FGF, la fusión de la invención presenta propiedades aún mejores en cuanto a productividad y baja agregación. Así, en otro aspecto, la invención está dirigida a una fusión de un fragmento o dominio solubles de un receptor para FGF con una región Fc de una inmunoglobulina, en donde al menos 7 sitios de N-glicosilación están ocupados, y en donde como máximo 45% de los N-glicanos de la fusión Fc con receptor para FGF no tienen grupo sialilo. En una realización específica de la invención están ocupados todos los sitios de N-glicosilación.

En otro aspecto, en la fusión Fc con receptor para FGF soluble modificada, de la invención, el número medio de ácidos siálicos por N-glicano de la porción de receptor para FGF es 0,9, es decir, dicho número puede ser 0,9 o cualquier otro por encima de 0,9. En una realización preferida, la fusión Fc con receptor para FGF soluble modificada, de la invención, tiene un número medio de al menos 1,2 ácidos siálicos por N-glicano. El solicitante ha hallado que esta proporción asegura una

111

concentración maximizada de la fusión con receptor FGF soluble de la invención en la sangre, que sería comparable a la concentración en sangre óptima encontrada para las moléculas Fc.

La presente invención está dirigida además a una fusión Fc con receptor para FGF soluble modificada que comprende una fusión de un fragmento o dominio solubles de un receptor para FGF con una región Fc de una inmunoglobulina, en donde todos los sitios de N-glicosilación están ocupados, y en donde como máximo 45% de los N-glicanos de la porción de receptor para FGF no tienen grupo sialilo y en donde los N-glicanos de la región Fc no están fucosilados. En otra realización, la fusión Fc con receptor para FGF soluble modificada, de la invención, está parcialmente fucosilada, por ejemplo fucosilada en un 0 - 60%. En otra realización más, la fusión Fc con receptor para FGF soluble modificada, de la invención, está completamente fucosilada. En una realización preferida, la fusión Fc con receptor para FGF soluble modificada, de la invención, está fucosilada en un 60 - 100%. En otra realización preferida, cada molécula de N-glicano de la fusión Fc con receptor para FGF soluble modificada, de acuerdo con la presente invención, comprende además 3 restos de manosa y, por término medio, de 1,5 a 3,0 restos de galactosa, de 3,5 a 5 restos de N-acetilglucosamina por molécula de glicano, y de 0,6 a 1 restos de fucosa.

De acuerdo con la invención, la fusión Fc con receptor para FGF soluble modificada, se une a ligando FGF con elevada afinidad. Por ejemplo, dicha fusión se une a FGF2 con un valor de  $K_D$ , medido mediante Biacore™, que está comprendido entre 1 y 5 nM. En una realización preferida de la invención, el valor de  $K_D$  de dicha fusión hacia FGF2, medido mediante Biacore™, está en torno a 1,5 nM.

Tales fusiones modificadas, como las arriba descritas, son útiles como inhibidores potentes y terapéuticamente eficaces del crecimiento tumoral. De hecho, el solicitante ha demostrado que las fusiones Fc con receptor para FGF soluble modificadas, de la invención, son capaces de inhibir el crecimiento tumoral *in vivo*. Además, dichas fusiones Fc con receptor para FGF soluble modificadas, de la invención, son capaces de desencadenar respuestas ADCC y/o CDC, tanto *in vitro* como *in vivo*. Como moléculas que intervienen eficazmente en ADCC y/o CDC, estos compuestos son especialmente útiles para tratar tumores cancerosos que sobreexpresan FGF.

Las secuencias de FGFR empleadas para los compuestos de FGFR, longitud completa o fragmentos de un FGFR, secuencias de FGFR sintéticas, dominios, extracelulares, dominios solubles, o fusiones de éstos, pueden ser elegidas entre

cualesquiera secuencias disponibles o conocidas. El FGFR pertenece a la familia de receptores de tirosina-cinasa, y a la familia del supergén de las inmunoglobulinas (Ig). En las formas transmembranarias del receptor, el dominio de tirosina-cinasa es intracelular y los dominios semejantes a Ig son extracelulares. Tanto la forma transmembranaria como la forma secretada se unen a FGF. Existen al menos cuatro genes que codifican FGFRs que tienen una estructura común de dos o tres bucles similares a inmunoglobulina (Ig) extracelulares (Igl-IgIII) y un dominio de tirosina-cinasa intracelular. También se conocen productos de escisión alternativa, procedentes de exones que codifican la región extracelular, y que dan lugar a múltiples formas de receptor. El tercer bucle semejante a Ig conduce al menos a tres variantes de receptor, y por escisión alternativa de dos exones (IIIb y IIIc) que codifican la segunda mitad del bucle, se producen dos formas transmembranarias. Por ejemplo, se emplea un sitio de poliadenilación selectiva que precede a los exones IIIb y IIIc para producir una forma soluble de FGFR1 (IIIa). En seres humanos y en ratones, la variante de escisión IgIIIa de FGFR1 codifica una proteína que aparentemente carece de dominio transmembranario hidrófobo y que, por tanto, puede ser una forma secretada o soluble del receptor. Los compuestos de FGFR pueden utilizar también secuencias de FGFR1 (locus de proteína en NCBI, NP\_075598); de FGFR2 (locus de proteína en NCBI, NP\_000132); de FGFR3 (locus de proteína en NCBI, P22607); y de FGFR4 (locus de proteína en NCBI, NP\_002002) (Kiefer y otros, 1991, *Growth Factors* 5:115-127).

También se han discutido formas solubles de receptores para FGF, que comprenden los dominios extracelulares, en las patentes de EE.UU. números 5,288,855 y 6,656,728; en los documentos WO 91/00916, WO 92/00999, WO 00/46380, WO 2005/016966, WO 2005/113295, WO 2006/113277, WO 2007/014123, y en la patente europea 529 076. Los fragmentos, dominios, o dominios solubles o extracelulares de FGFR, tal como se emplean en la invención, pueden incluir el fragmento de un FGFR que sea extracelular en su forma nativa o que consista en toda la forma naturalmente secretada, o parte de la misma. Además, las secuencias de FGFR empleadas en esta invención pueden ser las específicamente descritas o enumeradas, y secuencias que tengan una identidad de secuencia aminoacídica de aproximadamente 98%, 97%, 96%, 95%, 94%, 93%, 92%, 91%, o 90% a lo largo de toda la secuencia polipeptídica descrita o dibujada, o que tengan una identidad de secuencia de ácido nucleico de aproximadamente 95%, 90%, 85%, 80%, o 75% a lo largo de la región codificadora del polipéptido respecto a ácidos nucleicos que codifiquen las secuencias de FGFR de la invención. El fragmento o dominio podría incluir también aminoácidos adicionales u otras regiones del FGFR

siempre que estos aminoácidos o regiones adicionales no supriman o reduzcan de manera significativa la capacidad del compuesto de FGFR para ser empleado tal como se describe en esta invención. Un polipéptido o proteína de fusión que consista esencialmente en un dominio o fragmento de FGFR puede contener otros aminoácidos  
5 siempre que se conserven la capacidad de ser expresado en una célula de mamífero y la de unirse a FGF, y además, opcionalmente, siempre que se conserve la capacidad de reducir el crecimiento celular o de reducir la vascularización.

En una realización, el fragmento o dominio soluble del receptor para FGF es el dominio soluble o extracelular del receptor 1 para FGF (sFGFR1) o del receptor 2 para  
10 FGF (sFGFR2).

Los fragmentos de FGFR1 y de FGFR2 seleccionados pueden tener una o más de las siguientes mutaciones: una delección N-terminal de 1-7 aminoácidos; o sustitución en el extremo N; una delección de la secuencia del bucle 1; una delección de la secuencia de la caja ácida. Se pueden preparar polinucleótidos que codifican  
15 mutantes de secuencia aminoacídica, por medio de diversos métodos conocidos en la técnica, entre ellos, pero sin quedar limitados a éstos, mutagénesis en la que participan oligonucleótidos (o de localización dirigida), mutagénesis por PCR, y mutagénesis de cassette de un mutante, o una versión no mutante de la molécula de interés, preparados con anterioridad (véase, por ejemplo, Kunkel, 1985, *Proc Natl Acad Sci USA* 82:488).  
20

En otra realización, el fragmento o dominio soluble del receptor para FGF es el dominio soluble o extracelular del isotipo IIIc del receptor 1 para FGF (sFGFR1(IIIc)) y del isotipo IIIc del receptor 2 para FGF (sFGFR2(IIIc)).

Las realizaciones preferidas incluyen el fragmento o dominio solubles del isotipo o variante IIIc del receptor para FGF 2 codificados por un polinucleótido que  
25 tiene la secuencia de la SEQ ID NO: 3, y/o que tiene la secuencia aminoacídica de la SEQ ID NO: 4 o bien una secuencia con una identidad de al menos 95%, 97%, 98%, o 99% con la SEQ ID NO: 4.

De acuerdo con esta última realización, la fusión Fc con receptor para FGF soluble modificada (sFGFR2-Fc), de la presente invención, tiene ventajosamente una  
30 elevada afinidad hacia su ligando natural FGF2 o un elevado valor de  $K_D$  en el orden nanomolar, comprendido entre 1 y 5 nM, y más exactamente en torno a 1,5 nM.

Los ejemplos específicos de dominios de inmunoglobulina incluyen, pero sin quedar limitados a éstos: la región Fc de una molécula de inmunoglobulina; la región

124

bisagra de una molécula de inmunoglobulina; la región CH<sub>1</sub> de una molécula de inmunoglobulina; la región CH<sub>2</sub> de una molécula de inmunoglobulina; la región CH<sub>3</sub> de una molécula de inmunoglobulina; la región CH<sub>4</sub> de una molécula de inmunoglobulina; y la cadena ligera de una molécula de inmunoglobulina; así como variantes humanizadas de cualquiera de éstas. Las secuencias de estas regiones están disponibles también para un especialista en la técnica (véase, por ejemplo, Huck y otros, 1986, *Nucleic Acids Res.* **14**:1779).

Tal como se emplea en la memoria descriptiva y en las reivindicaciones, la expresión "región Fc de inmunoglobulina o Fc" significa la porción carboxílicamente terminal de una región constante de la cadena pesada de inmunoglobulina. Las regiones Fc son particularmente importantes para determinar las funciones biológicas de la inmunoglobulina, y estas funciones biológicas son denominadas funciones de efector. Como se sabe en la técnica, las cadenas pesadas de las subclases de inmunoglobulina comprenden cuatro o cinco dominios: la IgM y la IgE tienen cinco dominios de cadena pesada, y la IgA, IgD e IgG tienen cuatro dominios de cadena pesada. La región Fc de la IgA, IgD e IgG es un dímero de los dominios bisagra-CH<sub>2</sub>--CH<sub>3</sub>, y en la IgM y en la IgE es un dímero de los dominios bisagra-CH<sub>2</sub>--CH<sub>3</sub>--CH<sub>4</sub>. Además, el dominio CH<sub>3</sub> de la IgM y la IgE es estructuralmente equivalente al dominio CH<sub>2</sub> de la IgG, y el dominio CH<sub>4</sub> de la IgM y la IgE es el homólogo del dominio CH<sub>3</sub> de la IgG (véase, compilado por W. E. Paul, 1993, *Fundamental Immunology*, Raven Press, New York, New York). Cualquiera de las regiones Fc conocidas sería útil como región Fc en las fusiones Fc con receptor para FGF soluble modificadas, de la invención.

En una realización, el gen que codifica la región Fc de la IgG humana (Fc<sub>γ</sub>) se obtiene mediante transcripción inversa y PCR, utilizando ARN preparado a partir de leucocitos humanos y cebadores 5' y 3' apropiados. Los fragmentos de ADN resultantes contienen secuencias completas de los dominios bisagra, CH<sub>2</sub>, y CH<sub>3</sub> de la IgG, y se pueden emplear como plantilla para generar variantes en las cuales estén sustituidos ciertos aminoácidos, como es conocido en la técnica. Se puede incorporar en el proceso PCR un cebador que codifique un enlazador peptídico, que incluya un sitio para enzima de restricción adicional. Los fragmentos de ADN resultantes son insertados en un vector soporte, y son confirmados al determinar su secuencia de ADN.

Se emplea preferiblemente la región Fc de la inmunoglobulina gamma-1, que incluye al menos parte de la región bisagra, de la región CH<sub>1</sub>, de la región CH<sub>2</sub>, y de la

región CH<sub>3</sub>. Además, la región Fc de la inmunoglobulina gamma-1 puede ser una Fc que ha sufrido delección en CH<sub>1</sub> o bien una Fc que ha sufrido delección de CH<sub>2</sub>, e incluye una parte de una región bisagra y una región CH<sub>3</sub> en la cual han sufrido delección la región CH<sub>1</sub> y/o la región CH<sub>2</sub>. Gillies y otros (1990, Hum. Antibod. Hybridomas, 1:47)  
5 han descrito una Fc con delección de CH<sub>2</sub>.

Muy preferiblemente, la región Fc de IgG1 comprende la secuencia codificada por un polinucleótido que tiene la secuencia de la SEQ ID NO: 5, y/o la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 6 o bien una secuencia con una identidad de al menos 95% con la SEQ ID NO: 6. No obstante, también regiones Fc de las otras  
10 clases de inmunoglobulinas: IgA, IgD, IgE e IgM serían útiles como región Fc.

Se pueden preparar, además, constructos por delección de estas regiones Fc en los cuales han sufrido delección uno o más de los dominios constantes. Un especialista ordinario en la técnica podría preparar tales constructos por delección empleando técnicas de biología molecular bien conocidas. Además, la región Fc empleada puede  
15 ser una que tenga una identidad de aminoácidos de aproximadamente 99%, o aproximadamente 98%, o aproximadamente 95%, o aproximadamente 90%, o aproximadamente 85%, o aproximadamente 80%, o aproximadamente 75% respecto a la mostrada en la SEQ ID NO:6.

Son mutaciones específicas respecto a la SEQ ID NO: 6 que pueden ser  
20 seleccionadas y empleadas individualmente o en cualquier combinación: una delección o sustitución de una de las Cys dentro de los 20 primeros aminoácidos desde el extremo N; una delección de Cys en la posición 5 de la SEQ ID NO: 6; o una sustitución de Cys en la posición 5. La secuencia de región Fc elegida puede incrementar de manera detectable la semivida de la fusión Fc con receptor para FGF soluble  
25 modificada, en el suero.

La fusión Fc con receptor para FGF soluble modificada, de la invención, puede comprender una región bisagra, o bien se puede emplear una región de espaciador entre la parte de receptor soluble y la región Fc (Ashkenazi y otros, 1997, *Current Opinion in Immunology*, 9:195-200). Los ejemplos incluyen un enlazador peptídico  
30 flexible con una longitud de aproximadamente 20 aminoácidos o menos. Más preferiblemente, el enlazador peptídico puede tener una longitud de al menos tres aminoácidos, y/o un enlazador peptídico que comprenda dos o más de los siguientes aminoácidos: glicina, serina, alanina, y treonina. En una realización preferida, el enlazador peptídico no incluye un sitio de escisión por proteasa. El enlazador más  
35 preferido es SAL (Ser-Ala-Leu).

118

La presente invención se refiere también a la construcción de polinucleótidos que codifican la fusión Fc con receptor para FGF soluble modificada, de acuerdo con la presente invención, así como un vector capaz de expresar la fusión con receptor para FGF soluble modificada, cuando es introducido en una célula anfitrión apropiada.

5 Según la realización preferida, el polinucleótido que codifica la fusión Fc con receptor para FGF soluble modificada tiene la secuencia de SEQ ID NO: 1, o bien una secuencia que comparte una identidad de al menos 80% con la SEQ ID NO: 1. Tal como se emplea en la presente memoria, se entiende que el término "vector" significa cualquier ácido nucleico que comprende una secuencia nucleotídica de interés y es

10 capaz de ser incorporado a una célula anfitrión y expresar opcionalmente una proteína o polipéptido codificados. Los vectores incluyen ácidos nucleicos lineales, plásmidos, fagémidos, cósmidos y similares, todos ellos dentro de los conocimientos de una persona especialista en la técnica. También se incorporan específicamente dentro del alcance de la invención polinucleótidos que codifiquen el FGFR o el compuesto de

15 fusión de la invención, así como vectores que contengan estos ácidos nucleicos y células anfitriones en las cuales se han introducido estos vectores.

Muy preferiblemente, las moléculas de fusión de la invención están codificadas por ADN que comprende un dominio extracelular de un FGFR fusionado en el extremo C a la región Fc $\gamma$ 1 del gen  $\gamma$ 1 de la inmunoglobulina humana. La región Fc $\gamma$ 1 del gen

20  $\gamma$ 1 de la inmunoglobulina incluye al menos una porción del dominio bisagra y del dominio CH<sub>3</sub>, o bien al menos una porción del dominio bisagra, del dominio CH<sub>2</sub> y del dominio CH<sub>3</sub>. El ADN que codifique las moléculas polipeptídicas quiméricas de acuerdo con la presente invención puede encontrarse en su configuración genómica o bien en su configuración de cADN. Se pueden utilizar péptidos señal para iniciar de

25 manera eficaz el transporte de una proteína a través de la membrana del retículo endoplásmico. Las secuencias señal han sido bien caracterizadas en la técnica, y se sabe que contienen típicamente de 16 a 30 restos de aminoácido, aunque son posibles otros tamaños. von Heijne (1986, *Nucleic Acids Res.*, **14**:4683) ofrece una discusión detallada de secuencias de péptidos señal. Según una realización preferida,

30 el péptido señal se toma del péptido señal de interleucina-2 (SEQ ID No. 8), como es conocido en la técnica. El solicitante ha observado que fusionar este péptido a un dominio extracelular de un FGFR conduce a una proteína secretada que tiene una secuencia aminoacídica N-terminal homogénea, lo que no ocurre cuando se emplea el péptido señal de FGFR endógeno.

35 Mediante tecnología de ADN recombinante, como es conocido en la técnica, se puede construir un vector de expresión que contenga las secuencias codificadoras de

W7

la fusión Fc con receptor para FGF soluble modificada, de la invención, puestas bajo el control de secuencias reguladoras transcripcionales y traduccionales apropiadas. Se introduce dicho vector de expresión en una célula anfitrión mediante cualquier técnica conocida por los especialistas en la técnica. A continuación se cultiva la célula  
5 resultante, que contiene el vector, para producir una fusión Fc con receptor para FGF soluble modificada, o fragmento de la misma, empleando cualquier técnica conocida por los especialistas en la técnica.

De acuerdo con la invención, para expresar las moléculas de fusión Fc con receptor para FGF soluble modificadas se pueden emplear diversos sistemas de  
10 expresión. En un aspecto, tales sistemas de expresión representan vehículos mediante los que se pueden producir, y posteriormente purificar, las secuencias codificadoras de interés, pero también representan células que pueden, cuando han sido temporalmente transfectadas con las secuencias nucleotídicas apropiadas, expresar *in situ* una molécula de fusión Fc con receptor para FGF soluble modificada,  
15 de la invención. Habitualmente se emplean células de mamífero para la expresión de una molécula de fusión Fc con receptor para FGF soluble modificada, recombinante, en especial para la expresión de la molécula de fusión Fc con receptor para FGF soluble modificada recombinante completa. Por ejemplo, células de mamífero tales como HEK293 ó CHO, en conjunción con un vector que contenga la señal de  
20 expresión, por ejemplo uno que sea portador de el elemento promotor del gen temprano intermedio principal del citomegalovirus humano, son un sistema eficaz para expresar las fusiones Fc con receptor para FGF soluble, modificadas, de la invención (Foecking y otros, 1986, *Gene* 45:101; Cockett y otros, 1990, *Bio/Technology* 8:2).

Además, se elige una célula anfitrión que module la expresión de las  
25 secuencias insertadas, o que modifique y elabore el producto génico de la forma específica deseada. Tales modificaciones (por ejemplo la glicosilación) y la elaboración de los productos de proteína pueden ser importantes para la función de de la proteína. Las diferentes células hospedadoras tienen características y mecanismos específicos para el procesamiento post-traducciona l y la modificación de proteínas y  
30 productos génicos. Se eligen líneas celulares o sistemas anfitrión apropiados, a fin de asegurar la modificación y elaboración correctas de la fusión Fc con receptor FGF soluble modificada, expresada, de interés. Por tanto, se pueden emplear células anfitrión eucarióticas que poseen la maquinaria celular necesaria para el adecuado procesamiento del transcripto primario, la glicosilación del producto génico. Tales  
35 células anfitrión, de mamífero, incluyen, pero sin quedar limitadas a éstas, células CHO, COS, HEK293, 3T3 o células de mieloma. La célula anfitrión puede ser co-

transfectada con dos o más vectores de expresión, entre ellos el vector que expresa la proteína de la invención. Por ejemplo, se puede transfectar una célula anfitrión con un primer vector que codifique un polipéptido de fusión Fc con receptor para FGF soluble, modificada, tal como se ha descrito antes, y un segundo vector que codifique un polipéptido de glicosiltransferasa. De manera alternativa, el segundo vector podría expresar un ARN interferente pequeño contra una glicosiltransferasa.

Con vistas a una producción continuada y con alto rendimiento de proteínas recombinantes se prefiere la expresión estable. En una realización de la invención, se pueden crear mediante ingeniería líneas celulares que expresen de manera estable la molécula de fusión Fc con receptor para FGF soluble, modificada. En lugar de emplear vectores de expresión que contienen orígenes víricos de replicación, se transforman células anfitrión con ADN bajo el control de los elementos reguladores de expresión apropiados, que incluyen promotores, intensificadores, terminadores de transcripción, sitios de poliadenilación, y otras secuencias adecuadas conocidas para los especialistas en la técnica, y un marcador seleccionable. Después de la introducción del ADN extraño, se pueden dejar que las células creadas mediante ingeniería crezcan durante uno o dos días en un medio enriquecido, y trasladarlas después a un medio selectivo. El marcador seleccionable dentro del plásmido recombinantes confiere resistencia a la selección, y permite que las células integren de manera estable el plásmido dentro de un cromosoma, y que se expandan para originar una línea celular.

De acuerdo con la invención se pueden emplear diversos sistemas de selección, que incluyen, pero sin quedar limitados a éstos, los genes de timidina-cinasa del virus del herpes simple (Wigler y otros, 1977, *Cell* **11**:223), de hipoxantina-guanina--fosforribosiltransferasa (Szybalska y otros, 1992, *Proc Natl Acad Sci USA* **48**:202), de selección por glutamato-sintasa en presencia de sulfoximida de metionina (*Adv Drug Del Rev*, 2006, **58**: 671, y la página web o bibliografía de Lonza Group Ltd.) y de adenina-fosforribosiltransferasa (Lowy y otros, 1980, *Cell* **22**:817) en células tk, hgprt o aprt, respectivamente. También se puede emplear la resistencia a antimetabolitos como base para la selección de los siguientes genes: dhfr, que confiere resistencia a metotrexato (Wigler y otros, 1980, *Proc Natl Acad Sci USA* **77**:357); gpt, que confiere resistencia al ácido micofenólico (Mulligan y otros, 1981, *Proc Natl Acad Sci USA* **78**:2072); neo, que confiere resistencia al aminoglicósido G-418 (Wu y otros, 1991, *Biotherapy* **3**:87); e hygro, que confiere resistencia a la higromicina (Santerre y otros, 1984, *Gene* **30**:147). Para seleccionar el clon recombinante deseado se pueden aplicar rutinariamente métodos conocidos en la técnica de la tecnología del ADN recombinante, y tales métodos se encuentran

descritos, por ejemplo, en el texto compilado por Ausubel y otros, *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons (1993). Mediante la amplificación del vector se pueden incrementar los niveles de expresión de una molécula de fusión Fc con receptor para FGF soluble modificada. Cuando un marcador del sistema vector que  
 5 expresa una fusión Fc con receptor para FGF soluble modificada es amplificable, un aumento del nivel de inhibidor presente en el cultivo incrementará el número de copias del gen marcador. Puesto que la región amplificada está asociada con el gen que codifica la fusión Fc con receptor para FGF soluble modificada, de la invención, también aumentará la producción de dicha fusión Fc con receptor para FGF soluble  
 10 modificada (Crouse y otros, 1983, *Mol Cell Biol* 3:257).

Los especialistas en la técnica conocen varios factores que influyen en el nivel de glicosilación de una glicoproteína. Por ejemplo, se pueden emplear células anfitrión de mamífero modificadas, para alterar el perfil de glicosilación de la fusión Fc con receptor para FGF soluble modificada, aumentando o disminuyendo la expresión de la  
 15 glicosiltransferasa. Tales células anfitrión de mamífero modificadas incluyen, pero sin quedar limitadas a éstas: CHO, COS, HEK293, PER.C6, 3T3, YB2/0 y células de mieloma (Stanley y otros, 1986, *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 249:533; Mori y otros, 2006, *Biotechnology and Bioengineering* 94:68; Chitlaru y otros, 1998, *Biochem. J.* 336:647; Umana y otros, 1999 *Nature Biotechnology* 17:176). También es  
 20 conocido para los especialistas en la técnica que los factores del bioproceso afectan a la biosíntesis de los oligosacáridos de proteína (Goochee y otros, 1994, *Curr Opin Biotechnol.* 5:546). El efecto de las condiciones del cultivo de células, tales como la concentración de glucosa o de iones amonio, el pH, suero, y los efectos de otros factores del bioproceso, tales como el ritmo de crecimiento celular y el tiempo de  
 25 cultivo, influyen en la glicosilación enlazada a N (*Biotechnol. Bioeng.* 39:327 (1993); *Biotechnol. Bioeng.* 68:370 (2000); *Bio/technology* 11:720 (1993); *Cytotechnology* 17:13 (1995); *Biochem J.* 272:333 (1990)). También se sabe que, además de por las células anfitrión y por los factores del bioproceso, la elaboración de oligosacáridos se ve influida por el entorno local en cada sitio de N-glicosilación pendiente. Las  
 30 diferencias entre un sitio y otro pueden ser considerables, como se ha observado con t-PA, o pueden implicar diferencias más sutiles en la ramificación y el procesamiento terminal, tal como se ha observado para los tres sitios de N-glicosilación de EPO (Goochee y otros, 1991, *Bio/Technology* 9: 1347).

Después de haber sido producida, una fusión Fc con receptor para FGF soluble  
 35 modificada, de la invención, puede ser purificada mediante cualquier método conocido en la técnica para la purificación de una molécula inmunoglobulínica, por ejemplo

mediante cromatografía (por ejemplo de intercambio iónico, de afinidad, en particular mediante afinidad de proteína A hacia Fc, etc.), centrifugación, solubilidad diferencial, o mediante cualquier otra técnica estándar para la purificación de proteínas.

La identificación cuantitativa de ácido siálico (restos de ácido N-acetilneuramínico), el análisis de la composición de carbohidratos y el mapeo cuantitativo de oligosacáridos en los N-glicanos de las proteínas de fusión Fc con receptor para FGF soluble modificadas purificadas, se pueden llevar a cabo esencialmente de la manera que se ha descrito con anterioridad (Saddic y otros, *Methods Mol. Biol.* 194:23-36 (2002) y Anumula y otros, *Glycobiology* 8:685-694 (1998)).

Se pueden producir proteínas de fusión que incorporen dominios de receptor para FGF soluble, mediante métodos familiares para los especialistas de la técnica, y utilizados para cualquier otra fusión de mamífero, expresable o biológicamente activa, *mutatis mutandis*. Por ejemplo, se pueden adoptar métodos publicados para combinar las regiones Fc de IgG con los dominios de citocinas y receptores solubles, a fin de diseñar y producir los compuestos de FGFR de la invención (véase, por ejemplo, Capon y otros, *Nature*, 337:525-531 (1989); Chamow y otros, *Trends Biotechnol.*, 14:52-60 (1996); y los documentos U.S. 5,116,964, 5,349,053 y 5,541,087). Otros ejemplos de proteínas de fusión receptor-Ig que se pueden adoptar incluyen las de los documentos US 5,726,044; 5,707,632; y 5,750,375. Dado que los dominios extracelulares de receptor para FGF comparten un grado significativo de homología con la familia génica de las inmunoglobulinas, y que el dominio extracelular de FGFR contiene segmentos similares a Ig, se prefiere especialmente el empleo de regiones Fc. En un ejemplo, la fusión es una proteína homodimérica unida a través de restos de cisteína a la región bisagra de Fc de IgG, dando como resultado una molécula con características similares a las de una molécula de IgG. Una de las ventajas de emplear una región Fc consiste en una semivida prolongada en el sistema circulatorio. Además, las modificaciones de glicosilación de las proteínas de fusión Fc con receptor para FGF soluble modificadas, de la invención, conducen a propiedades farmacocinéticas mejoradas, ya que las fusiones de la invención presentan perfiles farmacocinéticos *in vivo* comparables a la IgG humana de un isotipo similar.

Otra realización de la presente invención provee un método para preparar una proteína de fusión con FGFR soluble modificada que comprende un fragmento o dominio de FGFR, un enlazador peptídico flexible, y una variante de Fc de IgG humana, comprendiendo dicho método: (a) generar una línea celular derivada de

CHO; (b) cultivar la línea celular en condiciones tales que se exprese la proteína de fusión recombinante; y (c) purificar la proteína expresada del paso (b). Preferiblemente, en este caso el enlazador peptídico flexible que comprende al menos aproximadamente 3 aminoácidos entre el receptor para FGF soluble y la variante de Fc de IgG humana, comprende dos o más aminoácidos elegidos entre el grupo consistente en glicina, serina, alanina y treonina. En realizaciones adicionales y relacionadas, no está presente el péptido enlazador, o bien tiene una longitud de un sólo aminoácido. En una realización preferida, el enlazador peptídico no incluye un sitio de escisión por proteasa. El enlazador más preferido es SAL (Ser-Ala-Leu).

10 Preferiblemente, la proteína de fusión con receptor para FGF soluble modificada se produce en células CHO en un modo de suspensión, tal como se describirá en los Ejemplos de la presente memoria.

Tal como se mostrará en los Ejemplos de la presente memoria, las fusiones Fc con receptor para FGF soluble modificadas, de la presente invención, presentan actividad antitumoral, al menos a través de la inducción de respuestas de ADCC y/o CDC, y son útiles, por tanto, en el tratamiento de tumores metastásicos y enfermedades tales como el cáncer. Así, un aspecto de la invención está dirigido a una fusión Fc con receptor para FGF soluble modificada, tal como se ha descrito más arriba, con actividades de ADCC y/o CDC.

20 Son de especial interés las fusiones Fc con receptor para FGF soluble modificadas con capacidad mejorada para mediar funciones efectoras citotóxicas celulares tales como ADCC. Tales proteínas pueden obtenerse haciendo sustituciones sencillas o múltiples en la región Fc de la molécula, alterando así su interacción con los receptores Fc. Los métodos para diseñar tales mutantes pueden encontrarse por ejemplo en Lazar et al. (2006, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 103(11): 4005-4010) y Okazaki et al. (2004, J. Mol. Biol. 336(5):1239-49). Véase también WO 03/074679, WO 2004/029207, WO 2004/099249, WO2006/047350, WO 2006/019447, WO 2006/105338, WO 2007/041635. También es posible usar líneas celulares específicamente diseñadas para la producción de fusiones Fc con receptor para FGF soluble modificadas mejoradas. En particular, estas líneas tienen regulación alterada de la ruta de glicosilación, dando como resultado fusiones Fc con receptor para FGF soluble modificadas que están débilmente fucosiladas, incluso totalmente defucosiladas. Tales líneas celulares y métodos para diseñarlas se describen en, por ejemplo, Shinkawa et al. (2003, J. Biol. Chem. 278(5): 3466-3473), Ferrara et al. (2006, J. Biol. Chem. 281(8): 5032-5036; 2006, Biotechnol. Bioeng. 93(5): 851-61), EP

1331266, EP 1498490, EP 1498491, EP 1676910, EP 1792987, y WO 99/54342.

Son un aspecto de la invención métodos para inhibir el crecimiento tumoral en un sujeto, y métodos para el tratamiento o prevención de metástasis en un sujeto, que comprenden administrar una cantidad eficaz de dichas fusiones Fc con receptor para FGF soluble modificadas, tal como se ha descrito más arriba. Por tanto, la invención se refiere también a la fusión Fc con receptor para FGF soluble modificada, tal como se ha descrito más arriba, en calidad de medicamento. La presente invención se refiere también al empleo de la fusión Fc con receptor para FGF soluble modificada, tal como se ha descrito más arriba, para preparar un medicamento para el tratamiento o inhibición del crecimiento tumoral en un sujeto.

Otro aspecto de la invención se refiere a composiciones farmacéuticas de la fusión Fc con receptor para FGF soluble modificada, de la invención. Las composiciones farmacéuticas de la invención comprenden típicamente la fusión Fc con receptor para FGF soluble modificada, de la invención, y un vehículo farmacéuticamente aceptable. Tal como se emplea en la presente memoria, la expresión "vehículo farmacéuticamente aceptable" incluye cualquiera y todos los disolventes, agentes tamponadores, soluciones salinas, medios de dispersión, revestimientos, agentes antibacterianos y antifúngicos, agentes isotónicos y retardantes de la absorción y similares, que sean fisiológicamente compatibles. Se puede elegir el tipo de vehículo basándose en la ruta de administración deseada. En diversas realizaciones, el vehículo es adecuado para la administración por vía intravenosa, intraperitoneal, subcutánea, intramuscular, tópica, transdérmica u oral. Los vehículos farmacéuticamente aceptables incluyen disoluciones o dispersiones acuosas estériles, y polvos estériles para preparar extemporáneamente disoluciones o dispersiones inyectables estériles. En la técnica es bien conocido el uso de medios y agentes para sustancias farmacéuticamente activas. Tal como se detallará más adelante, también se pueden incorporar a las composiciones compuestos activos adicionales, tales como agentes anticancerosos o antiangiogénicos; en particular, el compuesto activo adicional puede ser un agente antiangiogénico, un agente quimioterapéutico, o un agente de bajo peso molecular. Se puede preparar una composición farmacéutica típica para infusión intravenosa que contenga 250 ml de disolución de Ringer estéril y 100 mg de la combinación. Los métodos concretos para preparar compuestos administrables por vía parenteral serán conocidos o evidentes para los especialistas en la técnica, y están descritos más detalladamente, por ejemplo, en el texto Remington's Pharmaceutical Science, 17ª edición, Mack Publishing Company, Easton, Pa. (1985), y en las ediciones 18ª y 19ª del mismo, que

quedan incorporadas en la presente memoria por referencia.

También se puede preparar la fusión Fc con receptor para FGF soluble modificada, de la invención, con vehículos y formulaciones de liberación controlada, entre ellos implantes y sistemas de suministro microencapsulados. Se pueden emplear  
5 polímeros biodegradables y biocompatibles, por ejemplo etileno-acetato de vinilo, polianhídridos, poli(ácido glicólico), colágeno, poliortoésteres, poli(ácido láctico), y copolímeros polilácticos y poliglicólicos (PLG). Generalmente, los especialistas en la técnica conocen muchos métodos para preparar tales formulaciones.

Preferiblemente, la fusión Fc con receptor para FGF soluble modificada está  
10 formulada dentro de la composición en una cantidad eficaz. La expresión "una cantidad eficaz" se refiere a una cantidad eficaz, a las dosis y durante los períodos de tiempo necesarios, para conseguir el resultado deseado, por ejemplo una modulación de las actividades de FGF y/o de FGFR, y la inducción de respuestas de ADCC y/o CDC. La expresión "una cantidad terapéuticamente eficaz" significa una cantidad  
15 suficiente para influir en el curso terapéutico de una enfermedad particular. También es una cantidad terapéuticamente eficaz aquella con la cual cualesquiera efectos tóxicos o perjudiciales del agente se ven contrapesados por los efectos terapéuticamente beneficiosos.

Para las aplicaciones terapéuticas, se administran las fusiones Fc con receptor  
20 para FGF soluble modificadas, de la invención, a un mamífero, preferiblemente un ser humano, en una forma de dosificación farmacéuticamente aceptable tal como las que se han discutido antes, entre ellas las que se pueden administrar a un ser humano por vía intravenosa como una embolada o por infusión continua a lo largo de un período de tiempo, por vía intramuscular, intraperitoneal, intracerebroespinal, subcutánea,  
25 intraarticular, intrasinovial, intratecal, oral, tópica, o por inhalación. Las fusiones Fc con receptor para FGF soluble modificadas se administran también, convenientemente, por vía intratumoral, peritumoral, intralesional, o perilesional, para producir efectos terapéuticos tanto locales como sistémicos. Se espera que la ruta intraperitoneal sea particularmente útil, por ejemplo, en el tratamiento de tumores ováricos.

30 Se pueden ajustar las posologías para proporcionar la respuesta óptima. Por ejemplo, se puede administrar una única embolada, se pueden administrar varias dosis divididas a lo largo del tiempo, o bien se puede disminuir o aumentar la dosis proporcionalmente. Se pueden administrar las composiciones de la invención a un sujeto para provocar actividad de crecimiento celular en un sujeto. Se pretende que el  
35 término "sujeto", tal como se emplea en la presente memoria, incluya organismos

vivos en los cuales exista un crecimiento celular dependiente de FGF, e incluye específicamente mamíferos, por ejemplo conejos, perros, gatos, ratones, ratas, monos, especies transgénicas de los mismos, y seres humanos.

Las fusiones Fc con receptor para FGF soluble modificadas y las  
5 composiciones farmacéuticas de la invención son útiles en el tratamiento o prevención de diversos cánceres, entre ellos (pero sin quedar limitados a éstos) los siguientes: carcinomas, que incluyen el carcinoma de vejiga, de mama, de colon, de cabeza y cuello, de riñón, que incluyen el carcinoma de células renales, de hígado, de pulmón, de ovario, de páncreas, de estómago, de cuello uterino, de tiroides, y de piel, que  
10 incluyen el carcinoma espinocelular; tumores hematopoyéticos del linaje linfóide, entre ellos leucemia, leucemia linfocítica aguda, leucemia linfoblástica aguda, linfoma de células B, linfoma de células T, linfoma de Burkitt; tumores hematopoyéticos del linaje mieloide, entre ellos leucemias mielogénicas agudas y crónicas y leucemia promielocítica; tumores de origen mesenquimatoso, entre ellos fibrosarcoma y  
15 rabdomiosarcoma; otros tumores, entre ellos melanoma, seminoma, teratocarcinoma, neuroblastoma y glioma; tumores de los sistema nerviosos central y periférico, entre ellos astrocitoma, neuroblastoma, glioma, y schwannoma; tumores de origen mesenquimatoso, entre ellos fibrosarcoma, rabdomiosarcoma, y osteosarcoma; y otros tumores, entre ellos melanoma, xerodermia pigmentosa, queratoactantoma, seminoma, cáncer folicular de tiroides y teratocarcinoma, y otros cánceres aún por  
20 determinar que estén causados por la sobreexpresión de FGF. En una realización preferida, la fusión Fc con receptor para FGF soluble modificada, de la invención, se emplea para tratar melanoma, leucemia, cáncer renal, cáncer de colon, cáncer de ovario, cáncer de próstata, cáncer de pulmón, cáncer de vejiga, cáncer de mama, o  
25 cáncer de cabeza y cuello.

Por tanto, la presente invención se refiere al empleo de la fusión Fc con receptor para FGF soluble modificada, tal como se ha descrito más arriba, para preparar un medicamento para el tratamiento o inhibición de enfermedades relacionadas con cáncer en un sujeto. Es un aspecto u objeto de la presente invención  
30 el proporcionar un método para tratar enfermedades y procesos que resultan de la proliferación celular cancerosa, y una composición para tratar o reprimir el crecimiento de un cáncer. Otro aspecto más de la invención es proveer composiciones y métodos útiles para la terapia génica destinada a la modulación de cáncer. En particular, el método de la presente invención se puede emplear para el tratamiento de melanoma,  
35 leucemia, cáncer renal, cáncer de colon, cáncer de ovario, cáncer de próstata, cáncer de pulmón, cáncer de vejiga, cáncer de mama, o cáncer de cabeza y cuello.

Se puede mejorar la eficacia de la fusión Fc con receptor para FGF soluble modificada, en la prevención o tratamiento de enfermedades, administrando dicha fusión en serie o en combinación con otro agente que sea eficaz para estos propósitos, por ejemplo factor de necrosis tumoral (siglas inglesas TNF), un  
5 antagonista capaz de inhibir o de neutralizar la actividad angiogénica del factor de crecimiento fibroblástico (FGF) ácido o básico, del factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), factor de crecimiento hepatocítico (HGF), un antagonista capaz de inhibir o de neutralizar las actividades coagulantes del factor tisular, de la proteína C, o de la proteína S (véase el documento WO 91/01753), un antagonista tal como un  
10 anticuerpo capaz de fijarse al receptor HER2 (véase el documento US 5,772,997), o uno o varios agentes terapéuticos convencionales tales como, por ejemplo, agentes alquilantes, antagonistas del ácido fólico, anti-metabolitos del metabolismo de los ácidos nucleicos, antibióticos, análogos de pirimidina, 5-fluorouracilo, cisplatino, nucleósidos de purina, aminas, aminoácidos, nucleósidos de triazol, o corticosteroides.

15 En otro aspecto de la invención, se combina la administración con la administración de una cantidad terapéuticamente eficaz de un agente quimioterapéutico, por ejemplo Taxol (paclitaxel) o Taxotere (docetaxel).

Los agentes quimioterapéuticos incluyen, sin limitación ninguna, agentes antimicrotúbulos tales como diterpenoides y alcaloides de la vinca; complejos de  
20 coordinación con platino; agentes alquilantes tales como mostazas nitrogenadas, oxazafosforinas, sulfonatos de alquilo, nitrosoureas, y triazenos; agentes antibióticos tales como antraciclinas, actinomicinas y bleomicinas; inhibidores de la topoisomerasa II tales como epipodofilotoxinas; antimetabolitos tales como análogos de purina y de pirimidina y compuestos antifolato; inhibidores de la topoisomerasa I  
25 tales como camptotecinas; hormonas y análogos hormonales; inhibidores de la ruta de transducción de señal; inhibidores de angiogénesis de tipo distinto al de receptor de tirosina-cinasa; agentes inmunoterapéuticos; agentes proapoptóticos; e inhibidores de la señalización del ciclo celular. Además, se pueden combinar los métodos de la invención con otro tratamiento anticanceroso, agente antiangiogénico, o agente  
30 quimioterapéutico o terapia de radiación. Un ejemplo preferido es el docetaxel (Taxotere). Otros ejemplos incluyen gemcitabina, cisplatino, diterpenoides y alcaloides de la vinca, paclitaxel, vinblastina, vincristina y vinorelbina, carboplatino, ciclofosfamida, melfalano, y clorambucilo, busulfano, carmustina, dacarbazina, ciclofosfamida, melfalano, clorambucilo, busulfano, carmustina, dacarbazina, agentes  
35 antineoplásicos que incluyen, pero sin quedar limitados a éstos, actinomicinas tales como dactinomicina, antraciclinas tales como daunorrubicina y doxorrubicina,

bleomicinas, epipodofilotoxinas, etopósido y tenipósido; agentes antineoplásicos antimetabolitos, 5-fluorouracilo, metotrexato, citarabina, mercaptopurina, tioguanina, camptotecinas, irinotecano HCl, y topotecano HCl.

También se pueden elegir diversos agentes quimioterapéuticos o polipéptidos anticancerosos. Fuentes de información tales como [www.clinicaltrials.gov](http://www.clinicaltrials.gov), [www.ncbi.nlm.nih](http://www.ncbi.nlm.nih), y [www.drugs.com](http://www.drugs.com) incluyen referencias a polipéptidos y agentes que se pueden elegir.

Estos otros agentes, por ejemplo agentes antiangiogénicos o agentes quimioterapéuticos, pueden estar presentes en la composición que se está administrando o bien pueden ser administrados por separado. En un aspecto de la invención, la administración se lleva a cabo con el otro principio activo, sea de manera simultánea, separada o secuencial en el tiempo. Cuando la administración se lleva a cabo de manera simultánea, los dos principios activos pueden estar combinados en una única composición farmacéutica que comprende las dos composiciones, por ejemplo un comprimido o una cápsula de gelatina. Por otro lado, los dos principios activos pueden encontrarse, sean o no administrados de manera simultánea, en composiciones farmacéuticas separadas. Para ello, la combinación puede adoptar la forma de un "kit" o conjunto que comprenda, por un lado la fusión Fc con receptor para FGF soluble modificada tal como se ha descrito antes, y por otro lado el segundo principio activo, estando en compartimientos separados la fusión Fc con receptor para FGF soluble modificada tal como se ha descrito antes y el segundo principio activo, y estando destinados a ser administrados de manera simultánea, separada, o secuencial en el tiempo.

La combinación de acuerdo con la presente invención se puede administrar en especial para la terapia antitumoral en combinación con quimioterapia, terapia con proteínas (es decir, la que emplea un agente terapéutico tal como un anticuerpo o una proteína recombinante), terapia génica, radioterapia, inmunoterapia, intervención quirúrgica, o una combinación de las mismas. Es igualmente posible una terapia prolongada en forma de terapia complementaria en el contexto de otras estrategias de tratamiento, como se ha descrito más arriba.

Los ejemplos que siguen son meramente ilustrativos del alcance de esta invención y del contenido de esta memoria descriptiva. Un especialista en la técnica puede diseñar y construir numerosas modificaciones de los ejemplos que figuran a continuación, sin salirse del alcance de esta invención.

## Ejemplos

### Ejemplo 1: Producción en HEK293 de sFGFR2-Fc con elevado contenido de ácido siálico y bajo aclaramiento en sangre.

Se obtuvieron cDNAs que codificaban  $\alpha$ -1,4-galactosiltransferasa (B4GT1) humana (SEQ ID No. 9) o bien  $\beta$ -2,3-sialiltransferasa (SIAT6) humana (SEQ ID No. 11) de una colección de clones (Invitrogen) y se clonaron en el vector de expresión para mamífero pXL4214, desde el cual la expresión es activada por el promotor CMV. También se empleó el mismo vector de expresión para clonar la proteína de fusión sFGFR2-Fc y generar pXL4410. En las Figuras 1 y 5 se presenta el mapa del plásmido pXL4551 que codifica B4GT1, del plásmido pXL4544 que codifica SIAT6, y del plásmido pXL4410 que codifica la fusión FGFR2IIIc-Fc soluble modificada (aquí denominada sFGFR2-Fc), así como la secuencia de ácido nucleico y la correspondiente secuencia aminoacídica de B4GT1 (Figura 2), SIAT6 (Figura 3) y sFGFR2-Fc (Figuras 4 A y B). Se produjo sFGFR2-Fc en células HEK293 EBNA adherentes (Invitrogen) mediante infección transitoria de uno a tres plásmidos de expresión que codifican sFGFR2-Fc, B4GT1 ó SIAT6, acomplexados con JET PEI (Q-Biogen). La relación de plásmidos era 90/5/5 para pXL4410/pXL4544/pXL4551. Se tuvo que optimizar la relación de plásmidos para asegurar la productividad y calidad óptimas del polipéptido sFGFR2-Fc. Se cosecharon las proteínas secretadas a los ocho días de la transfección, y se centrifugaron. Se purificaron las proteínas mediante cromatografía de afinidad sobre Protein G Sepharose (Amersham Biosciences) eluyéndolas de la columna con glicina/HCl 100 mM, pH 2,7. Se formularon las proteínas sFGFR2-Fc en PBS, y se filtraron a través de 0,22  $\mu$ m. La concentración de proteína se determinó mediante el ensayo microBC Assay (Interchim).

La identificación cuantitativa de ácido siálico, el análisis de la composición de hidratos de carbono, y la determinación cuantitativa del mapa de oligosacáridos de los N-glicanos en las proteínas sFGFR2-Fc purificadas, se realizaron esencialmente de la manera ya descrita (Saddic y otros, 2002, *Methods Mol. Biol.* **194**:23-36 y Anumula y otros, 1998, *Glycobiology* **8**:685-694). Primeramente se liberaron los restos de ácido siálico tras una hidrólisis suave de sFGFR2-Fc, se marcaron fluorescentemente con ortofenilendiamina, y se separaron mediante HPLC en fase invertida. Los picos individuales se detectaron mediante detección por fluorescencia (excitación a 230 nm; emisión a 425 nm), se identificaron y se cuantificaron por comparación con patrones de ácido N-acetilneuramínico y ácido N-glicolilneuramínico. Como segundo paso se determinó la composición de hidratos de carbono tras la hidrólisis ácida de muestras de sFGFR2-Fc para liberar los monosacáridos individuales. Después de hidrólisis se

derivatizaron con ácido antranílico los monosacáridos (neutros y aminoazúcares) y luego se separaron mediante HPLC en fase invertida y se detectaron mediante detección por fluorescencia (excitación a 360 nm; emisión a 425 nm). Los picos individuales se identificaron y se cuantificaron por comparación con patrones de monosacáridos. Como tercer paso, se liberaron enzimáticamente los oligosacáridos con PNGasa F, y se marcaron fluorescentemente con ácido antranílico antes de ser separados en función de su número de restos de ácido siálico mediante HPLC de intercambio aniónico en fase normal a través de una columna Asahipak-NH2P (Phenomenex). Los glicanos marcados se detectaron y se cuantificaron mediante detección por fluorescencia (excitación a 360 nm; emisión a 425 nm). Se calculó el número medio de ácidos siálicos por N-glicano en el dominio FGFR2, basándose en el número total de moles de N-glicano por mol de FGFR2-Fc y en el número de moles de N-glicano por mol de Fc obtenido tras la liberación del Fc por la papaína.

Se inyectaron las proteínas sFGFR2-Fc purificadas en la cola de ratones Swiss Nude (Charles River). Para cada lote de proteína se utilizaron tres ratones. Se extrajo sangre 6 horas después de la inyección de 500 µg de sFGFR2-Fc, se separó el plasma, y se determinó la concentración de FGFR2-Fc mediante ELISA, utilizando el método de "emparedado" con un anticuerpo monoclonal anti-FGFR2 humano (R&D Systems) y un anticuerpo policlonal conjugado anti-IgG-HRP humana (Pierce) (2 análisis a 2 diluciones, en triplicado). En los experimentos testigo se pretrataron los ratones con fetuína y asiolofetuína una hora antes de la inyección de sFGFR2-Fc.

La Tabla 1 resume las condiciones de producción de los diferentes lotes de sFGFR2-Fc, el perfil de N-glicanos y la composición de monosacáridos de cada lote, así como la concentración plasmática de sFGFR2-Fc 6 horas después de la inyección intravenosa en ratones.

Tabla 1 - Contenido de N-glicanos y farmacocinética de FGFR2-Fc producida en HEK293

| Proteína expresada en HEK293EBNA                                                                                 | sFGFR2-Fc | sFGFR2-Fc + SIAT6 | sFGFR2-Fc + SIAT6 & B4GT1 |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|-------------------|---------------------------|
| % de especies sialiladas de sFGFR2-Fc:                                                                           |           |                   |                           |
| 1 - no sialilada                                                                                                 | 69%       | 46%               | 34%                       |
| 2 - monosialilada                                                                                                | 23%       | 19%               | 22%                       |
| 2 - disialilada                                                                                                  | 6%        | 26%               | 35%                       |
| 3 - trisialilada                                                                                                 | 1,5%      | 10%               | 10%                       |
| Contenido de ácido siálico:                                                                                      |           |                   |                           |
| 1 - pmoles de ácido N-acetilneuramínico por pmol de sFGFR2-Fc                                                    | 3,4       | 6,4               | 6,8                       |
| 2 - Número medio de ácidos siálicos por N-glicano de sFGFR2                                                      | 0,4       |                   | 1                         |
| Composición de monosacáridos de N-glicanos de sFGFR2-Fc por 3 manosas                                            |           |                   |                           |
| 1 - Glucosamina (número por 3 manosas)                                                                           | 4,3       | 4,1               | 4,1                       |
| 2 - Galactosa (número por 3 manosas)                                                                             | 1,5       | 1,4               | 1,6                       |
| Número de fucosas en N-glicanos de Fc por 3 manosas                                                              | 0,73      | 0,61              | 0,63                      |
| Aclaramiento sanguíneo                                                                                           |           |                   |                           |
| [sFGFR2-Fc] en plasma 6 horas después de inyección i.v. (ng/mL)                                                  | 258       |                   | 20000                     |
| [sFGFR2-Fc] en plasma 6 horas después inyección i.v. (ng/mL) cuando se pretrataron los ratones con fetuína       | 229       | no realizado      | no realizado              |
| [sFGFR2-Fc] en plasma 6 horas después inyección i.v. (ng/mL) cuando se pretrataron los ratones con asialofetuína | 19276     | no realizado      | no realizado              |

El patrón de sialilación mejorado de las proteínas de fusión sFGFR2-Fc producidas en HEK293EBNA se demostró mediante la co-expresión transitoria de la proteína de fusión con  $\alpha$ -1,4-galactosiltransferasa humana o  $\beta$ -2,3-sialiltransferasa humana. Esta considerable mejora del estado de sialilación quedó evidenciado por la  
5 reducción del porcentaje de glicanos no-sialilados a la mitad, el incremento del contenido total de ácido siálico por mol de proteína al doble, y un incremento de 2,5 veces en el número medio de ácidos siálicos por N-glicano. Hay que señalar que el contenido de monosacáridos no se vio afectado (véase la Tabla 1).

Este incremento de 2,5 veces en N-glicanos sialilados está directamente  
10 correlacionado con los parámetros farmacocinéticos significativamente mejorados de sFGFR2-Fc. En particular, se ha medido un incremento de 100 veces en la presencia de sFGFR2-Fc en el plasma 6 horas después de la inyección i.v. en ratones.

También se mejoró la farmacocinética en un factor de 100 veces cuando se pretrataron los ratones con asialofetuína, en comparación con el pretratamiento con  
15 fetuína. Se sabe que la asialofetuína, pero no la fetuína, se fija al receptor de asialoglicoproteína (ASGPR) hepático (Webster y otros, 2003, *Xenobiotica* 33:945)

En conjunto, estos resultados indican que la fijación específica a receptor de asialoglicoproteína a través de restos de galactosa terminales del N-glicano expuestos es responsable del aclaramiento de sFGFR2-Fc, mientras que la presencia de un  
20 ácido siálico por N-glicano en la sFGFR2-Fc disminuyó de manera significativa este aclaramiento.

**Ejemplo 2: Discriminación rápida de clones CHO estables que expresan proteína sFGFR2-Fc con un número medio de restos de ácido siálico por N-glicano de FGFR2 superior a 1,2, para una farmacocinética óptima**

Se generó el plásmido de expresión para mamífero pXL4636, para expresión  
25 estable de sFGFR2-Fc en células CHO, a partir del plásmido pEE14.4 que codifica el marcador de selección de glutamina-sintetasa (Lonza) y el plásmido pXL4410 que contiene la secuencia de cADN que codifica sFGFR2-Fc, Figura 5. Se introdujo el plásmido pXL4636 en células CHO K1 por nucleofección, utilizando el "kit" para líneas  
30 celulares Nucleofactor (AMAXA) de acuerdo con las recomendaciones del proveedor. Se transfirieron las células transfectadas a medio selectivo y, después de la multiplicación celular, se eligieron los siete semiclones CHO/GS mejores productores (SC nºs 9, 11, 26, 58, 112, 118, 170) en cuanto a contenido de ácido siálico en las moléculas de sFGFR2-Fc purificada. Se seleccionaron para la clonación y producción  
35 a mayor escala los dos semiclones con el mayor contenido de ácido siálico (SC nº 11 y

nº 118); en particular, el clon originado por SC nº 118 se denominó también GC111.

Aunque las moléculas sFGFR2-Fc producidas a partir de todos los semiclones tenían un alto contenido de ácido siálico, no condujeron a la misma farmacocinética. Se observó, lo cual es interesante, que de dos semiclones (SC nº11 y nº 118), la sFGFR2-Fc con el mayor contenido de ácido siálico condujo a la mayor concentración de sFGFR2-Fc en sangre 6 horas después de la inyección i.v. en ratones, tal como se describe en la Tabla 2 y, de los dos clones (SC nº 9 y nº 170), la sFGFR2-Fc con el contenido menor de ácido siálico presentó la concentración más baja de sFGFR2-Fc en sangre 6 horas después de la inyección i.v. en ratones.

10 Tabla 2- Clones CHO estables que expresan proteína sFGFR2-Fc con una proporción de restos de ácido siálico por N-glicano de sFGFR2 superior a 1,2, para una farmacocinética óptima

| sFGFR2-Fc purificada<br>procedente del semiclon<br>CHO-GS nº                                                                                               | SC<br>nº 9 | SC nº<br>11 | SC<br>nº<br>26 | SC<br>nº 58 | SC<br>nº<br>112 | SC nº<br>118 | SC nº<br>170 |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------|-------------|----------------|-------------|-----------------|--------------|--------------|
| % de especies sialiladas de<br>sFGFR2-Fc                                                                                                                   |            |             |                |             |                 |              |              |
| 1 - no sialilada                                                                                                                                           | 50         | 42          | 48             | 48          | 45              | 43           | 53           |
| 2 - monosialilada                                                                                                                                          | 28         | 30          | 30             | 30          | 30              | 30           | 28           |
| 3 - disialilada                                                                                                                                            | 14         | 18          | 14             | 15          | 16              | 17           | 13           |
| 4 - trisialilada                                                                                                                                           | 8          | 10          | 7              | 8           | 9               | 10           | 6            |
| Número medio de ácidos siá-<br>licos por N-glicano de sFGFR2                                                                                               | 1,07       | 1,45        |                |             |                 | 1,29         | 0,98         |
| [sFGFR2-Fc]/<br>[sFGFR2-Fc]max<br><br>[sFGFR2-Fc] hallado en plasma<br>6 horas después de inyección<br>i.v.<br><br>[sFGFR2-Fc]max hallado para<br>SC nº 11 | 55%        | 100%        |                |             |                 | 81%          | 45%          |

La discriminación rápida de clones basada en alto grado de sialilación de N-glicanos de sFGFR2-Fc es predictiva de parámetros farmacocinéticos óptimos de sFGFR2-Fc.

**Ejemplo 3: Correlación entre el número medio de ácidos siálicos por N-glicano de sFGFR2-Fc y el aclaramiento de sFGFR2-Fc en sangre**

En otro experimento similar al experimento descrito en el Ejemplo 2, se generaron clones CHO/DHFR estables que expresaban sFGFR2-Fc, empleando el sistema de selección y amplificación DHFR con los plásmidos adecuados de expresión para mamíferos pXL4429 y pXL4417 (Figura 6). También se evaluaron estos clones CHO-DHFR en cuanto a contenido de ácido siálico por molécula de sFGFR2-Fc, y se determinó el aclaramiento de la sFGFR2-Fc producida por estos clones.

Se calculó el número medio de ácidos siálicos por N-glicano en el dominio FGFR2, basándose en el número total de moles de N-glicano por mol de FGFR2-Fc y en el número de moles de N-glicano por mol de Fc obtenidos tras la liberación del Fc por la papaína. Los resultados que se presentan en la Figura 7 demuestran que una proporción de restos de ácido siálico por N-glicano de FGFR2 superior a 1,2 aseguró una concentración óptima de sFGFR2-en la sangre, en comparación con la concentración óptima en sangre hallada para moléculas Fc. Sólo los clones seleccionados alcanzaron esta proporción óptima.

Por tanto, la discriminación de los clones en base a la proporción de restos de ácido siálico por N-glicano de FGFR2 permite a un especialista predecir un bajo aclaramiento de sFGFR2-Fc en sangre.

**Ejemplo 4: Secuencia de aminoácidos de la proteína de fusión sFGFR2-Fc**

La proteína sFGFR2-Fc codificada por los plásmidos pXL4410, pXL4636 ó pXL4429 (Figuras 5 y 6) es una proteína de fusión de la secuencia de FGFR2 soluble humana con el fragmento Fc derivado de la secuencia de IgG1 humana.

La secuencia del polinucleótido que codifica sFGFR2-Fc está expuesta en SEQ ID NO: 1 y en la Figura 4 A. Análogamente, la secuencia de aminoácidos completa de la proteína sFGFR2-Fc está expuesta en SEQ ID NO: 2 en la Figura 4B. Los aminoácidos de las posiciones 1 a 350 corresponden al isotipo FGFR2IIIc (véase la Figura 4 C SEQ ID; N°: 4) y son los aminoácidos de las posiciones 27 a 376 descritos en SwissProt (FGFR2\_HUMAN). Los aminoácidos de las posiciones 354 a 584 son aminoácidos de IgG1 desde la posición 99 hasta la 329, tal como se describe en SwissProt (IGHG1\_HUMAN) (véase la Figura 4 D y la SEQ ID NO: 6. Los aminoácidos de las posiciones 351 a 353 son aminoácidos de un enlazador sintético: SAL (Ser Ala

Leu) (véase la Figura 4 E).

**Ejemplo 5: Contenido definido de N-glicanos de sFGFR2-Fc producida en el clon CHO estable GC111**

Se han optimizado las condiciones para producir sFGFR2-Fc de manera tal que la proporción de restos de ácido siálico por N-glicano de sFGFR2 sea superior a 1,2. Este ejemplo indica las condiciones en que se puede lograr este objetivo.

Se inoculó un biorreactor Celligen de 5 litros (New Brunswick) lleno con 4,4 L de medio para CD-CHO exento de proteína, suplementado con MSX 100  $\mu$ M y suplementos 1X GS, con una densidad de células inicial de  $3,5 \times 10^5$  células de clon GC111 por mL, y se cultivaron a 37°C. Se empleó aireación por borboteo, utilizando una mezcla de oxígeno, nitrógeno, aire y dióxido de carbono u oxígeno puro, y se mantuvo el oxígeno disuelto al 30% de la saturación con aire. Se mantuvo el pH en 7,2 mediante la adición de dióxido de carbono y la inyección de bicarbonato sódico 1 M en el medio de cultivo. La velocidad de agitación empleada fue 110 r.p.m., empleando una hélice Cell Lift. Se aportaba continuamente solución de alimentación (450 g de glucosa/L) a fin de mantener el nivel de la glucosa en el objetivo de 2-3 g/L. Se inició la alimentación el 5º día, cuando la concentración residual de glucosa había llegado a 2,5 g/L. La aportación continua de nutriente se basó en el crecimiento celular y consumo de glucosa previstos, con una tasa de alimentación de nutriente igual a la tasa de consumo de glucosa. La concentración de glutamato se mantuvo en 1-3 mmol/L mediante adición en pulsos, después de un control externo diario. Se controló en el cultivo celular el recuento de células, la viabilidad y los metabolitos (glucosa, lactato, glutamina, amoníaco y glutamato), así como la concentración de producto durante la fase de producción. Se detuvo el cultivo cuando la viabilidad celular disminuyó hasta el 55%, y se recogió la cosecha del cultivo.

Se clarificó la cosecha del cultivo celular, y se purificó la sFGFR2-Fc mediante cromatografía de afinidad (ProsepVA, Millipore) y dos pasos de cromatografía de intercambio iónico, y después se sometió a filtración esterilizante y se conservó en disolución salina tamponada con fosfato antes de los análisis adicionales y el ensayo *in vivo*.

La masa molecular aparente de la sFGFR2-Fc obtenida en un análisis SDS-PAGE en condiciones no reductoras era 180 kDa. Este dato contrastaba con la masa molecular teórica de 130 kDa calculada en base a la secuencia de aminoácidos del homodímero de sFGFR2-Fc. Esta gran diferencia entre las masas moleculares aparente y calculada se atribuyó a la presencia adicional de aproximadamente 30% de

N-glicanos (véase la Tabla 3). De hecho, tras la digestión de la sFGFR2-Fc con péptido-N-glicosidasa F (PNGase F, Roche), seguida de análisis mediante SDS-PAGE en condiciones no reductoras, la masa molecular de la sFGFR2-Fc desglicosilada se encontraba en torno a 160 kDa (Figura 7).

5            La composición de hidratos de carbono y el perfil de N-glicanos de sFGFR2-Fc se analizaron de la manera que se ha descrito en el Ejemplo 1, y se presentan en la Tabla 3.

Tabla 3: Composición de hidratos de carbono y perfil de N-glicanos de sFGFR2-Fc producida en condiciones óptimas

|                                                                       |           |
|-----------------------------------------------------------------------|-----------|
| Proteína expresada por el clon CHO-GS estable GC111                   | sFGFR2-Fc |
| % de especies sialiladas de sFGFR2-Fc:                                |           |
| 1 - no sialilada                                                      | 30%       |
| 2 - monosialilada                                                     | 34%       |
| 3 - disialilada                                                       | 23%       |
| 4 - trisialilada                                                      | 13%       |
| Número medio de ácidos siálicos por N-glicano de sFGFR2               | 1,34      |
| Composición de monosacáridos de N-glicanos de sFGFR2-Fc por 3 manosas |           |
| 1 - Glucosamina (número por 3 manosas)                                | 4,9       |
| 2 - Galactosa (número por 3 manosas)                                  | 2,7       |
| 3 - Fucosa (número por 3 manosas)                                     | 0,96      |
| Composición de fucosa de N-glicanos de Fc por 3 manosas               | 1,1       |

10           Comparando estos resultados con los de la Tabla 2, la sFGFR2-Fc producida por el clon GC111 en las condiciones óptimas tenía más N-glicano sialilado que la sFGFR2-Fc producida por el semiclón SC nº 118, progenitor del clon GC111, en condiciones normales. Por ejemplo, el porcentaje de especies no sialiladas disminuyó del 43% al 30%.

15           Basándose en el número total de moles de N-glicano por mol de FGFR2-Fc y en el número de moles de N-glicano por mol de Fc obtenido tras la liberación del Fc por la papaína, se determinó que había siete N-glicanos por FGFR2. Por tanto, la mayoría de los sitios del dominio de FGFR2 están casi totalmente ocupados.

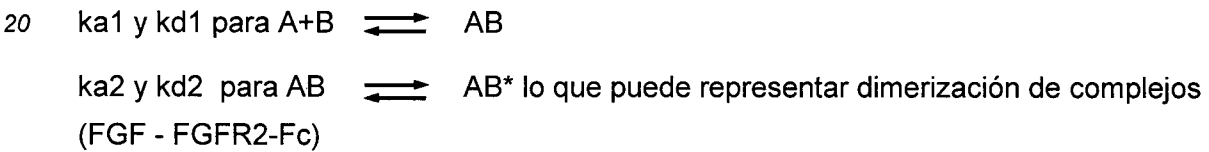
**Ejemplo 6: Sitios de N-glicosilación importantes para la afinidad hacia FGF y la productividad**

La proteína de fusión sFGFR2-Fc tiene ocho sitios de N-glicosilación en el dominio FGFR2, y uno en el dominio Fc (véanse la Figura 8 y la Tabla 5 para encontrar la definición de las posiciones de N-glicano N1 hasta N8). Se produjeron las proteínas 4493 y 4565, dos variantes de sFGFR2-Fc que ya no tienen dominio 1 similar a Ig. La 4493 presentó características similares a la FGFR2-Fc de tipo nativo derivada de pXL4636 en términos de productividad y fijación a FGF-2 o heparina. Por el contrario, la 4565, en la cual habían mutado todos los sitios de glicosilación del dominio sFGFR2 (sustitución N a Q) no pudo ser caracterizada a causa de la disminución de la productividad del mutante en más de 50 veces (véase la Tabla 4).

Tabla 4. Características fisicoquímicas de variantes de sFGFR2-Fc

| ID de la proteína | Sitios de N-glicosilación en el dominio FGFR2 | Resto de aminoácido en el sitio de N-glicosilación | Producción (mg/L) | Fijación a FGF-2**<br><br>K <sub>D</sub> (10 <sup>-9</sup> M) | Fijación a heparina<br><br>[NaCl] para elución desde heparina (mM) |
|-------------------|-----------------------------------------------|----------------------------------------------------|-------------------|---------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------|
| 4410              | 8 (N1 hasta N8)                               | N                                                  | 75                | 1,39                                                          | 370                                                                |
| 4493              | 6 (N3 hasta N8)                               | N                                                  | 67                | 1,19                                                          | 442                                                                |
| 4565              | 6 (N3 hasta N8)                               | Q                                                  | < 1               | ND                                                            | ND                                                                 |

\*\* la fijación a FGF-2 se determinó en un instrumento BIAcore™ utilizando un modelo de "reacción en dos estados con cambio de conformación" tal como ha sido descrito por Gamsjaeger y otros, Biochem. J., 7 de abril de 2005 / BJ20050156. En pocas palabras, se llevó a cabo la integración a lo largo de todo el sensograma salvo en las zonas de "efecto estérico". El intervalo de concentraciones se había elegido entre 1 y 8 nM. El método de cinéticas ka/kd simultáneas permitió medir dos ka y dos kd suponiendo las siguientes ecuaciones:



136

La constante de disociación  $K_D$  se calculó con la fórmula siguiente:

$$\frac{1}{(ka_1 / kd_1) \times (1 + ka_2 / kd_2)}$$

De acuerdo con los dos modelos competidores publicados (el modelo simétrico de dos extremos de Mohammadi y el modelo asimétrico de Pellegrini), los sitios N3 a N7 podrían interaccionar potencialmente con los restos de aminoácido de FGF1 o bien de FGFR2c, y/o interaccionar con heparina, mientras que es improbable que el sitio N8 esté implicado en interacciones en todas las estructuras cristalinas (Pellegrini y otros, 2000, *Nature* **407**: 1029; Ibrahimi y otros, 2005, *Mol. Cell. Biol.* **25**: 671).

Basándose en la información precedente, era relevante estudiar los sitios de N-glicosilación en las posiciones N3 hasta N7, sustituyendo la Asn correspondiente por Gln, y manteniendo inalterada la posición N8, para permitir una productividad significativa. Se evaluó estadísticamente la influencia posicional de los N-glicanos sobre las características fisicoquímicas de sFGFR2-Fc, con un experimento factorial fraccional de dos niveles. Se eligieron cinco variables (ocupación de los sitios de glicosilación en las posiciones N3 hasta N7) y se estudiaron 16 constructos independientes. El diseño experimental  $2^{5-1}$  fraccionado y el análisis de los datos se llevaron a cabo de la manera que ya ha sido descrita (Statistics for Experimenters, compilado por G. Box, Willey, 1978).

**Diseño factorial fraccionado**

Se diseñaron las variantes de N-glicosilación específicas respecto del sitio basándose en 4493 y en el diseño factorial a dos niveles con cinco variables (N3 hasta N7) que podían estar en un nivel más (N) o en un nivel menos (Q). El diseño era fraccional, con 16 constructos ( $2^{5-1}$ , es decir, diseño de resolución en V), que permitía la identificación de los efectos principales y de las interacciones entre 2 factores, pero confundía las interacciones entre 2 factores con las interacciones entre 3 factores.

Los 16 constructos plásmidos se obtuvieron mediante PCR secuencial y clonación, para generar la sustitución de N por Q en las posiciones N3, N4, N5, N6 o N7, pero manteniendo inalteradas la posición N8 y el sitio de glicosilación del dominio Fc. Estas variantes de proteína sólo diferían de la 4493 en las mutaciones bi- o tetrapuntuales que se indican en la Tabla 5.

107

Tabla 5. Matriz de diseño

| Posición de Asn en la Figura 9 | Constructo | Estado de la posición de N-glicosilación |     |     |     |     |     |            |
|--------------------------------|------------|------------------------------------------|-----|-----|-----|-----|-----|------------|
|                                |            | N3                                       | N4  | N5  | N6  | N7  | N8  | N 297 (Fc) |
| Posición de Asn en FGFR2_HUMAN |            | 228                                      | 241 | 265 | 297 | 318 | 331 |            |
|                                | 4572       | -                                        | -   | -   | -   | +   | +   | +          |
|                                | 4570       | +                                        | -   | -   | -   | -   | +   | +          |
|                                | 4577       | -                                        | +   | -   | -   | -   | +   | +          |
|                                | 4571       | +                                        | +   | -   | -   | +   | +   | +          |
|                                | 4587       | -                                        | -   | +   | -   | -   | +   | +          |
|                                | 4585       | +                                        | -   | +   | -   | +   | +   | +          |
|                                | 4586       | -                                        | +   | +   | -   | +   | +   | +          |
|                                | 4573       | +                                        | +   | +   | -   | -   | +   | +          |
|                                | 4574       | -                                        | -   | -   | +   | -   | +   | +          |
|                                | 4575       | +                                        | -   | -   | +   | +   | +   | +          |
|                                | 4588       | -                                        | +   | -   | +   | +   | +   | +          |
|                                | 4576       | +                                        | +   | -   | +   | -   | +   | +          |
|                                | 4579       | -                                        | -   | +   | +   | +   | +   | +          |
|                                | 4569       | +                                        | -   | +   | +   | -   | +   | +          |
|                                | 4578       | -                                        | +   | +   | +   | -   | +   | +          |
|                                | 4493       | +                                        | +   | +   | +   | +   | +   | +          |

Se ensayaron los 16 constructos diseñados en cuanto a producción a pequeña escala. Dos variantes (4572 y 4574) eran productores muy escasos (en torno a 2 mg/L). Los 14 constructos restantes fueron producidos a escala de litro, y se purificaron en paralelo en condiciones habituales, con una razonable recuperación de producto. Después se analizaron mediante SDS-PAGE, filtración en gel, BIAcore™. Los resultados se analizaron con el diseño estadístico experimental factorial

fraccionado 2<sup>5-1</sup> de resolución.

**Productividad**

La N-glicosilación en N3, N4, N5, N6, N7 tuvo una contribución positiva a la productividad. Se produjo un efecto cuantitativo similar para todas las posiciones estudiadas (es decir, N3, N4, N5, N6 y N7) y no hubo efecto significativo de interacciones entre dos factores.

Tabla 6. Productividad

| Constructo | Riqueza (en mg/L) de la producción a escala de 1 litro | Respuesta (mg/L) | Variable |
|------------|--------------------------------------------------------|------------------|----------|
| 4572       | 0                                                      | 28               | Media    |
| 4570       | 13                                                     | 17               | N3       |
| 4577       | 9                                                      | 14               | N4       |
| 4571       | 34                                                     | 20               | N5       |
| 4587       | 5                                                      | 13               | N6       |
| 4585       | 40                                                     | 13               | N7       |
| 4586       | 42                                                     | -8               | N3-N4    |
| 4573       | 32                                                     | 3                | N3-N5    |
| 4574       | 0                                                      | 1                | N3-N6    |
| 4575       | 30                                                     | -2               | N3-N7    |
| 4588       | 37                                                     | -2               | N4-N5    |
| 4576       | 27                                                     | -1               | N4-N6    |
| 4579       | 30                                                     | 6                | N4-N7    |
| 4569       | 54                                                     | 4                | N5-N6    |
| 4578       | 37                                                     | 0                | N5-N7    |
| 4493       | 67                                                     | -1               | N6-N7    |

Agregación

Se analizaron mediante filtración en gel (Superdex 2000) las proteínas purificadas, para cuantificar el porcentaje de de especies de alto peso molecular (siglas inglesas HMW; %) en preparaciones purificadas. El valor más alto (peor caso) de 80,2% de HMW se obtuvo con 4587, y se empleó en el análisis mediante diseño experimental para los dos constructos (4572 y 4574) que no se pudieron producir (también se utilizó para comparar el porcentaje medio de los valores de HMW obtenidos en los 14 constructos, que condujo a una conclusión similar). La N-glicosilación en la posición N5, y en menor grado en la posición N6, no favorecieron la aparición de especies HMW. La interacción N5-N6 ejerció un efecto similar sobre la agregación.

Tabla 7. Formación de agregados

| Constructo | HMW (%) | Respuesta (%) | Variable |
|------------|---------|---------------|----------|
| 4572       | 80      | 57            | Media    |
| 4570       | 73,0    | -12           | N3       |
| 4577       | 71,6    | -5            | N4       |
| 4571       | 72,1    | -33           | N5       |
| 4587       | 80,2    | -18           | N6       |
| 4585       | 47,5    | -7            | N7       |
| 4586       | 47,7    | 6             | N3-N4    |
| 4573       | 57,5    | -8            | N3-N5    |
| 4574       | 80      | -5            | N3-N6    |
| 4575       | 69,6    | 2             | N3-N7    |
| 4588       | 71,8    | -2            | N4-N5    |
| 4576       | 72,9    | 3             | N4-N6    |
| 4579       | 35,2    | -4            | N4-N7    |
| 4569       | 12,0    | -18           | N5-N6    |
| 4578       | 39,4    | -6            | N5-N7    |
| 4493       | 3,6     | 1             | N6-N7    |

Fijación a FGF-2

Se determinó para cada constructo, por medio de BIAcore™, la afinidad de fijación a FGF-2. Para los constructos que presentaban una afinidad medible se determinaron valores de la constante de disociación ( $K_D$ ) entre 0,49 y 2,31 nM. En los constructos que no se fijaban a FGF-2, o que no se pudieron producir, se empleó para el análisis del diseño experimental un valor de 10 nM. La N-glicosilación en la posición N5, y en menor grado en las posiciones N6 y N3, tuvo un efecto positivo sobre la fijación a FGF-2. Las interacciones N3-N5 y N5-N6 tuvieron un efecto positivo significativo sobre la fijación, mientras que las interacciones N3-N6 y N4-N7 tuvieron un efecto negativo sobre la fijación.

Tabla 8. Fijación a FGF-2

| Constructo | $K_D$ (nM) | Respuesta (nM) | Variable |
|------------|------------|----------------|----------|
| 4572       | 10         | 6,8            | Media    |
| 4570       | 10         | -2,2           | N3       |
| 4577       | 10         | -0,5           | N4       |
| 4571       | 10         | -6,5           | N5       |
| 4587       | 10         | -2,3           | N6       |
| 4585       | 2,7        | 0,5            | N7       |
| 4586       | 10         | 0,0            | N3-N4    |
| 4573       | 0,49       | -2,2           | N3-N5    |
| 4574       | 10         | 2,0            | N3-N6    |
| 4575       | 10         | 0,1            | N3-N7    |
| 4588       | 10         | -0,5           | N4-N5    |
| 4576       | 10         | 0,1            | N4-N6    |
| 4579       | 2,31       | 2,0            | N4-N7    |
| 4569       | 0,99       | -2,3           | N5-N6    |
| 4578       | 0,66       | 0,5            | N5-N7    |
| 4493       | 1,19       | 0,0            | N6-N7    |

Este diseño experimental 2<sup>5-1</sup> de resolución en V reveló que la N-glicosilación tenía una contribución positiva sobre la productividad, en las posiciones N3, N4, N5, N6, N7; tenía un impacto positivo sobre la fijación a FGF-2, en las posiciones N5 >> N6 y N3; y dificultó la aparición de moléculas de alto peso molecular en todas las posiciones, especialmente N5 > N6.

Por tanto, la ocupación con N-glicano es obligatoria en la posición N5, y recomendada en las posiciones N3, N4, N6 y N7 (posiciones 265, 228, 241, 297 y 318, respectivamente, en FGFR2\_HUMAN (Swissprot).

**Ejemplo 7: Farmacocinética de la proteína de fusión sFGFR2-Fc**

En el Ejemplo 7, sFGFR2-Fc es la proteína de fusión correspondiente a la secuencia de aminoácidos SEQ ID N° 2, con un promedio de 1,3 ácidos siálicos por N-glicano de sFGFR2. A tres ratones por cada punto temporal se les inyectaron en la vena caudal 500 µg de la proteína de fusión. Se extrajo sangre en diversos puntos temporales tras la inyección el producto, y la Figura 10 muestra la concentración de proteína en el plasma y en el hígado. La Figura 11 muestra las cantidades recuperadas de proteína en plasma e hígado, en los primeros puntos temporales, expresadas en porcentaje de la dosis inyectada.

Los parámetros farmacocinéticos se calcularon empleando análisis no compartimental. La semivida de eliminación se calculó con los 6 últimos puntos de datos que proporcionaban el mejor ajuste de la fase terminal logarítmico-lineal (Tabla 9).

Tabla 9

| Parámetro | Unidades   | sFGFR2-Fc |
|-----------|------------|-----------|
| t½        | hora       | 70,1      |
| Tlast     | hora       | 72,0      |
| Clast     | µg/mL      | 27,6      |
| AUClast   | hora*µg/mL | 3138      |
| Clobs     | mL/hora/kg | 4,2       |
| Vss       | mL/kg      | 406       |

|         |                                                                                                 |
|---------|-------------------------------------------------------------------------------------------------|
| AUClast | Area bajo la curva desde el momento de la administración hasta la última concentración medible. |
| Cl obs  | Aclaramiento corporal total para la administración extravascular                                |
| Clast   | Concentración correspondiente a Tlast                                                           |
| t1/2    | Semivida terminal                                                                               |
| Tlast   | Tiempo de la última concentración medible (distinta de cero).                                   |
| Vss     | una estimación del volumen de distribución en el estado estacionario                            |

Tras la administración intravenosa, sFGFR2-Fc mostró un perfil farmacocinético favorable con una prolongada semivida de eliminación (casi 3 días) y un aclaramiento corporal total reducido. El volumen de distribución era limitado e inferior al volumen de agua corporal total, lo que sugiere una distribución tisular limitada. A las 72 horas, la concentración plasmática de sFGFR2-Fc se mantiene en un nivel de concentración muy alto, y el aclaramiento también es bueno.

Los parámetros farmacocinéticos de sFGFR2-Fc son perfectamente compatibles con el empleo de esta proteína de fusión como agente terapéutico. En efecto, y tal como se ha demostrado en los Ejemplos, la concentración plasmática tras la inyección intravenosa en ratones es sustancialmente elevada, y el aclaramiento permanece muy bajo a las 72 horas tras la inyección. Es importante que la cinética de escisión de sFGFR2-Fc in vivo es también muy baja, ya que la sFGFR2-Fc fue escindida sólo parcialmente (40% tras 18 horas) y la concentración de la molécula de longitud completa permanecía inalterada hasta las 72 horas. Por tanto, la molécula de fusión tal como se presenta en la SEQ ID NO: 2 y un promedio de 1,3 ácidos siálicos por N-glicano de sFGFR2, ha demostrado un perfil farmacocinético favorable, con una larga semivida de eliminación (casi 3 días) y un aclaramiento corporal total satisfactorio.

**Ejemplo 8: Eficacia de la proteína de fusión sFGFR2-Fc en el modelo de tumor subcutáneo A549**

En este Ejemplo, sFGFR2-Fc es la proteína de fusión correspondiente a la secuencia de aminoácidos SEQ ID N° 2, con un promedio de 1,3 ácidos siálicos por N-glicano de sFGFR2.

**Modelo de tumor subcutáneo A549**

Se ha identificado la línea celular A549 como una línea celular tumoral para evaluar la eficacia de sFGFR2-Fc. El solicitante ha demostrado *in vitro* que esta línea celular expresa FGF2 y también que la sFGFR2-Fc puede detener la proliferación autocrina de estas células. El solicitante estableció un modelo tumoral A549 subcutáneo en ratones "desnudos" Balb/c. Además, el tumor *in vivo* expresa FGF2.

En este experimento se evaluó la eficacia de la molécula sFGFR2-Fc en el modelo de crecimiento tumoral A549. Se inyectaron subcutáneamente los productos dos veces por semana. Se evaluaron distintas dosis, en concreto 25, 15, y 5 mg/kg de sFGFR2-Fc.

Tras el análisis global del volumen tumoral, la evolución de los tres grupos tratados con sFGFR2-Fc fue estadísticamente diferente a la evolución tumoral del grupo tratado con PBS. sFGFR2-Fc es eficaz contra el crecimiento tumoral en este modelo, a la dosis de 5 mg/kg dos veces por semana.

**Diseño experimental**

Se inyectaron subcutáneamente  $5 \cdot 10^6$  células A549 en 200  $\mu$ l a ratones "desnudos" Balb/c en el día 0. El mismo día, después de la inyección de células, se distribuyeron aleatoriamente los ratones en bloques de cuatro animales, dentro de cuatro grupos basados en el peso corporal. Los tratamientos comenzaron tras la aleatorización el día después de la inyección de células. Cada uno de los grupos recibió subcutáneamente 500, 300 o 100  $\mu$ g por ratón y administración, lo cual correspondía a, respectivamente, 25, 15 y 5 mg/kg, dos veces por semana: lunes y viernes, durante 39 días.

**Resultados**

**Análisis del volumen tumoral**

Tal como se muestra en la Figura 12, se analizó el volumen del tumor hasta el 40º día. Los grupos de 100  $\mu$ g (triángulos), 300  $\mu$ g (cuadrados) y 500  $\mu$ g por ratón y por administración (círculos llenos) eran estadísticamente diferentes del grupo de PBS (círculos huecos). Se concluyó que sFGFR2-Fc redujo el crecimiento tumoral a las dosis de 25, 15 y 5 mg/kg.

### **Peso del tumor en el 40° día**

Tal como se muestra en la Figura 13, al final del experimento se extirparon los tumores y se pesaron. Los grupos de 100 µg, 300 µg y 500 µg por ratón y por administración eran estadísticamente diferentes del grupo con PBS. Se concluyó que la sFGFR2-Fc de acuerdo con la presente invención redujo el peso del tumor a las dosis de 25, 15 y 5 mg/kg.

La evolución del crecimiento tumoral en los grupos sFGFR2-Fc\_100, sFGFR2-Fc\_300 y sFGFR2-Fc\_500 fue estadísticamente diferente de la evolución en el grupo tratado con PBS. La proteína de fusión sFGFR2-Fc de acuerdo con la presente invención (secuencia de aminoácidos SEQ ID N° 2 con un promedio de 1,3 ácidos siálicos por N-glicano de sFGFR2, puede disminuir sustancialmente el crecimiento tumoral a la dosis de 5 mg/kg.

### **Ejemplo 9: Eficacia de la proteína de fusión sFGFR2-Fc en el modelo de tumor subcutáneo H460**

En el Ejemplo 9, sFGFR2-Fc es la proteína de fusión correspondiente a la secuencia de aminoácidos SEQ ID N° 2, con un promedio de 1,6 ácidos siálicos por N-glicano de sFGFR2.

### **Modelo de tumor subcutáneo H460**

Se ha identificado la línea celular H460 como una línea celular tumoral para evaluar la eficacia de sFGFR2-Fc. Se ha demostrado *in vitro* que esta línea celular expresa FGF2. En este experimento se evaluó la eficacia de sFGFR2-Fc sobre el crecimiento tumoral. Se inyectaron subcutáneamente los productos, dos veces por semana, a la dosis de 25 mg/kg. Después del análisis global de la evolución del volumen tumoral, sFGFR2-Fc redujo el crecimiento del tumor.

### **Diseño experimental**

Se inyectaron subcutáneamente  $5 \cdot 10^6$  células H460, en 200 µl, en el ijar derecho de ratones "desnudos" Balb/c en el día 0. Tras la inyección de células, el mismo día de la inoculación con células (día 0) se distribuyó aleatoriamente a los ratones en función del peso corporal medido, y se les ubicó en los grupos de tratamiento.

El tratamiento se administró dos veces por semana, mediante inyecciones subcutáneas (200 µl) durante 3 semanas consecutivas (lunes y viernes). La primera administración se realizó el día 1° después de la inoculación de células, a fin de

maximizar la exposición de las células al tratamiento.

## Resultados

### Análisis del volumen tumoral

La Figura 14 muestra el análisis del volumen del tumor hasta el día 22°. Se  
5 concluyó que sFGFR2-Fc había reducido sustancialmente el crecimiento del tumor.

### Análisis del peso tumoral

La Figura 15 muestra el análisis del peso del tumor en el día 22°. Se concluyó  
que sFGFR2-Fc había reducido sustancialmente el peso del tumor.

La evolución del crecimiento tumoral del grupo con sFGFR2-Fc fue  
10 estadísticamente diferente de la evolución del grupo tratado con PBS. Se concluye  
claramente que la proteína de fusión de acuerdo con la presente invención (secuencia  
de aminoácidos SEQ ID N° 2 con un promedio de 1,6 ácidos siálicos por N-glicano de  
sFGFR2) puede disminuir sustancialmente el crecimiento tumoral de H460 a la dosis  
de 25 mg/kg.

### 15 Ejemplo 10: Evaluación de la actividad ADCC in vitro de la proteína de fusión sFGFR2-Fc sobre las líneas celulares A549 y H460

En este Ejemplo, sFGFR2-Fc es la proteína de fusión correspondiente a la  
secuencia de aminoácidos SEQ ID N° 2, con un promedio de ácidos siálicos por  
N-glicano de sFGFR2 superior a 1,6. Se ha evaluado en los dos modelos de células  
20 tumorales elegidos, H460 y A549, la capacidad de sFGFR2-Fc para inducir una  
actividad ADCC in vitro (véanse los Ejemplos 8 y 9).

### Diseño experimental

Se incubaron células tumorales (A549 y H460, 1 millón/mL) en PBS con 2% de  
BSA durante 30 minutos, a 4°C, con 500 ng/mL de FGF2 (R&D Systems) y 2 µg/mL de  
25 sFGFR2-Fc o IgG1 humana (Sigma) como testigo. Se diluyeron las células tumorales  
en RPMI con 1% de FBS, y se incubaron en placas de 96 pocillos a razón de  
5000 células por pocillo. Se añadieron NK purificadas, en una proporción NK/células  
tumorales de 20/1 y 6/1. Se incubaron las placas durante 4 horas a 37°C, se  
centrifugaron después, y se valoró la lactatodeshidrogenasa en el sobrenadante (con  
30 un "kit" de ROCHE). Se consiguió 100% de lisis mediante el empleo de Triton X100 al  
0,2%. Se calculó la ADCC específica inducida por sFGFR2-Fc siguiendo las  
instrucciones del fabricante.

## Resultados

Los resultados expuestos en la Figura 16 muestran una lisis de células tumorales por la acción de linfocitos citolíticos naturales (en inglés NK) en presencia de sFGFR2-Fc, tanto sobre células tumorales A549 como sobre células tumorales H460, cercana a 25% en las condiciones 20/1 (NK/células tumorales), lo que indica que sFGFR2-Fc puede inducir efectos ADCC sobre estas células tumorales.

### Ejemplo 11: Evaluación de actividades ADCC y CDC in vivo de la proteína de fusión sFGFR2-Fc en el modelo de tumor subcutáneo A549

En este Ejemplo, sFGFR2-Fc es la proteína de fusión correspondiente a la secuencia de aminoácidos SEQ ID N° 2, con un promedio de ácidos siálicos por N-glicano de sFGFR2 superior a 1,6.

#### Modelo de tumor subcutáneo A549

Se identificó la línea celular A549 como una línea celular tumoral para evaluar la eficacia de sFGFR2-Fc, ya que estas células expresaban in vivo altos niveles de FGF2, y eran sensibles in vitro a ADCC inducida por sFGFR2-Fc.

#### Estirpes de ratón

Se eligieron tres estirpes diferentes de ratón (ratones SCID, NOD/SCID y SCID/bg) para evaluar la capacidad de sFGFR2-Fc para inducir in vivo actividades de ADCC y/o CDC. Los ratones SCID conservan las funciones NK y de complemento, y pueden desarrollar respuestas de ADCC y CDC, y fueron elegidos como testigo positivo. Los ratones NOD/SCID no tienen función NK ni la capacidad de estimular la actividad del complemento, y son incapaces de desarrollar actividades de ADCC ni de CDC. Los ratones SCID/bg no tienen función NK, y son incapaces de desarrollar actividad ADCC.

En este experimento se evaluó la eficacia de la molécula sFGFR2-Fc sobre tumores A549 implantados subcutáneamente en tres estirpes de ratón diferentes. Durante toda la duración del estudio se inyectó subcutáneamente sFGFR2-Fc, dos veces por semana y a una dosis de 5 mg/kg.

#### Diseño experimental

Se implantó subcutáneamente A549 en ratones SCID, NOD/SCID y SCID/bg, tal como se ha descrito más arriba (véase el Ejemplo 8). Se administraron los tratamientos dos veces por semana mediante inyecciones subcutáneas, durante 6 semanas consecutivas. Durante la duración del estudio se midieron dos veces por

semana el peso corporal y el volumen del tumor.

## Resultados

Tal como se muestra en la Figura 17, se analizó el volumen del tumor hasta el 41º día en los tres experimentos. En los ratones SCID, el grupo tratado con sFGFR2-Fc a la dosis de 5 mg/kg (rombos) fue estadísticamente diferente del grupo testigo (círculos huecos) y mostró una inhibición tumoral de 39% (calculada como  $100 - (\text{volumen en el grupo tratado} / \text{volumen en el grupo testigo} \times 100)$ ). En los ratones NOD/SCID, sFGFR2-Fc a la dosis de 5 mg/kg no mostró actividad. En los ratones SCID/bg, sFGFR2-Fc a la dosis de 5 mg/kg recuperó parcialmente su actividad (inhibición del tumor = 18%). De acuerdo con estos resultados, en la eficacia de sFGFR2-Fc estuvieron implicados mecanismos de CDC y ADCC.

### Ejemplo 12: Evaluación de actividades ADCC y CDC in vivo de la proteína de fusión sFGFR2-Fc en el modelo de tumor subcutáneo H460

En este Ejemplo, sFGFR2-Fc es la proteína de fusión correspondiente a la secuencia de aminoácidos SEQ ID N° 2, con un promedio de ácidos siálicos por N-glicano de sFGFR2 superior a 1,6.

#### Modelo de tumor subcutáneo H460

Se identificó la línea celular H460 como una línea celular tumoral para evaluar la eficacia de sFGFR2-Fc, ya que estas células expresaban in vivo altos niveles de FGF2, y eran sensibles in vitro a ADCC inducida por sFGFR2-Fc.

#### Estirpes de ratón

Tal como se ha descrito más arriba en el Ejemplo 11, se eligieron tres estirpes de ratón con diferentes funciones inmunitarias (ratones SCID, NOD/SCID y SCID/bg) para evaluar la capacidad de sFGFR2-Fc para inducir in vivo actividades ADCC y/o CDC en H460.

En este experimento se evaluó la eficacia de la molécula sFGFR2-Fc sobre tumores H460 implantados subcutáneamente en las tres estirpes diferentes de ratón. Durante toda la duración del estudio se inyectó subcutáneamente sFGFR2-Fc, dos veces por semana y a una dosis de 25 mg/kg.

#### Diseño experimental

Se implantó subcutáneamente H460 en ratones SCID, NOD/SCID y SCID/bg, tal como se ha descrito más arriba (véase el Ejemplo 9). Se administraron los tratamientos dos veces por semana mediante inyecciones subcutáneas, durante

3 semanas consecutivas. Durante la duración del estudio se midieron dos veces por semana el peso corporal y el volumen del tumor.

Resultados

Tal como se muestra en la Figura 18, se analizó el volumen del tumor hasta el 22º día en los tres experimentos. En ratones SCID, el grupo tratado con sFGFR2-Fc a la dosis de 25 mg/kg (rombos) fue estadísticamente diferente del grupo testigo (círculos huecos), y mostró una inhibición tumoral de 29%. En los ratones NOD/SCID, sFGFR2-Fc a la dosis de 5 mg/kg presentó una pérdida de actividad, con una inhibición tumoral de 14%. En los ratones SCID/bg, sFGFR2-Fc a la dosis de 5 mg/kg recuperó toda su actividad (inhibición del tumor = 32%). En estos estudios, análogamente a lo observado en el modelo de tumor A549 (véase el Ejemplo 11), en la eficacia de sFGFR2-Fc estuvieron implicados mecanismos de CDC y ADCC.

Ejemplo 13: Evaluación de la eficacia in vivo de sFGFR2-Fc en comparación con sFGFR2-Fc (A265 Fc) en el modelo de tumor subcutáneo H460

Shields y otros han descrito una mutación puntual Asp265Ala en el dominio Fc de IgG1 humana (denominada A265 Fc) que confiere una fijación reducida a todos los receptores FcγR y muy baja citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (2001 J. Biol. Chem 276:6591). Se introdujo esta mutación puntual en el dominio Fc de la secuencia de ADN codificadora de sFGFR2-Fc, del plásmido pXL4547 (Figura 19), dando como resultado la secuencia de polinucleótido representada por la SEQ ID No. 13. Se generaron clones CHO/DHFR estables que expresaban csFGFR2-Fc (A265 Fc) (SEQ ID NO. 14) empleando el sistema de selección y amplificación DHFR con los plásmidos para expresión en mamíferos apropiados, pXL4547 y pXL4417, tal como se ha descrito en el Ejemplo 3. Después se produjo la proteína sFGFR2-Fc (A265 Fc) y se purificó para estudios in vivo. Se verificó que su contenido de glicanos era similar al contenido de glicanos hallado en la sFGFR2-Fc producida en los Ejemplos 3 ó 5.

| Proteína expresada por CHO-DHFR estables | sFGFR2-Fc (A265 Fc) |
|------------------------------------------|---------------------|
| % de especies sialiladas de sFGFR2-Fc:   |                     |
| 1 - no sialilada                         | 40%                 |
| 2 - monosialilada                        | 28%                 |
| 3 - disialilada                          | 22%                 |
| 4 - trisialilada                         | 10%                 |

|                                                                       |      |
|-----------------------------------------------------------------------|------|
| Composición de monosacáridos de N-glicanos de sFGFR2-Fc por 3 manosas |      |
| 1 - Glucosamina (número por 3 manosas)                                | 4,35 |
| 2 - Galactosa (número por 3 manosas)                                  | 2,74 |
| 3 - Fucosa (número por 3 manosas)                                     | 0,89 |

**Modelo de tumor subcutáneo H460**

Se ha identificado la línea celular H460 como una línea celular tumoral para evaluar la eficacia de sFGFR2-Fc. Estas células expresaban un alto nivel de FGF2 in vivo, y eran sensibles a ADCC inducida in vitro por sFGFR2-Fc.

5            En este experimento se evaluó la eficacia de la molécula sFGFR2-Fc y de la molécula de sFGFR2-Fc modificada (A265 Fc) sobre el tumor H460 implantado subcutáneamente en ratones "desnudos".

**Diseño experimental**

10           Se implantó subcutáneamente H460 en ratones "desnudos" Balb/C tal como se ha descrito más arriba (véase el Ejemplo 9). Durante toda la duración del estudio se administraron los tratamientos dos veces por semana. Durante la duración del estudio se midieron dos veces por semana el peso corporal y el volumen del tumor.

**Resultados**

15           Tal como se muestra en la Figura 20, se analizó el volumen del tumor hasta el día 23°. El grupo tratado con sFGFR2-Fc a la dosis de 25 mg/kg (rombos) fue estadísticamente diferente del grupo testigo (círculos huecos), y mostró una inhibición tumoral de 50%. La sFGFR2-Fc modificada (A265 Fc), a la dosis de 25 mg/kg, presentó una pérdida de actividad, con una inhibición tumoral de sólo 25% (NS). La mutación dentro del Fc de sFGFR2-Fc (A265 Fc) provocó una disminución de la  
20           actividad.

             Puesto que se ha demostrado que esta modificación disminuye la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos, el Ejemplo 13 proporciona una prueba indirecta de que sFGFR2-Fc actúa *in vivo* a través de un mecanismo que implica ADCC.

### REIVINDICACIONES

1. Una fusión Fc con receptor para FGF soluble modificada que comprende una fusión de un fragmento o dominio solubles de un receptor para FGF con una región Fc de una inmunoglobulina, en donde al menos el 5º sitio de N-glicosilación de la porción de receptor para FGF está ocupado, y como máximo 45% de los N-glicanos de dicha porción de receptor para FGF no tienen grupo sialilo.  
5
2. La fusión Fc con receptor para FGF soluble modificada, según la reivindicación 1, en la cual, además, el 3<sup>er</sup>, 4º, 6º y 7º sitios de N-glicosilación de la porción de receptor para FGF están ocupados.
- 10 3. La fusión Fc con receptor para FGF soluble modificada, según la reivindicación 2, en la cual al menos 7 sitios de N-glicosilación de la porción de receptor para FGF están ocupados.
4. La fusión Fc con receptor para FGF soluble modificada, según la reivindicación 3, en la cual todos los sitios de N-glicosilación de la porción de receptor para FGF están ocupados.  
15
5. La fusión Fc con receptor para FGF soluble modificada, según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en la cual el número medio de ácidos siálicos por N-glicano de la porción de receptor para FGF es 0,9 o superior.
6. La fusión Fc con receptor para FGF soluble modificada, según la reivindicación 5, en la cual el número medio de ácidos siálicos por N-glicano de la porción de receptor para FGF es 1,2 o superior.  
20
7. La fusión Fc con receptor para FGF soluble modificada, según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en la cual el valor  $K_D$  de dicha fusión hacia FGF2, medido mediante Biacore<sup>TM</sup>, está comprendido entre 1 y 5 nM.
- 25 8. La fusión Fc con receptor para FGF soluble modificada, según la reivindicación 7, en la cual el valor  $K_D$  de dicha fusión hacia FGF2, medido mediante Biacore<sup>TM</sup>, está en torno a 1,5 nM.
9. La fusión Fc con receptor para FGF soluble modificada, según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en la cual dicha fusión posee actividades de ADCC y/o CDC.  
30
10. La fusión Fc con receptor para FGF soluble modificada, según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en la cual los N-glicanos de dicha fusión están fucosilados en un 60 - 100%.

11. La fusión Fc con receptor para FGF soluble modificada, según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en la cual dicha fusión Fc con receptor para FGF soluble modificada comprende 3 restos de manosa, una media de 1,5 a 3,0 restos de galactosa, una media de 3,5 a 5 restos de N-acetilglucosamina, y una media de 0,6 a 1  
5 restos de fucosa por molécula de glicano.

12. La fusión Fc con receptor para FGF soluble modificada, según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en la cual los N-glicanos de dicha fusión están fucosilados en un 0 - 60%.

13. La fusión Fc con receptor para FGF soluble modificada, según cualquiera  
10 de las reivindicaciones precedentes, en la cual el receptor para FGF se elige entre receptor para FGF 1 (FGFR1) o receptor para FGF 2 (FGFR2).

14. La fusión Fc con receptor para FGF soluble modificada, según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en la cual el receptor para FGF se elige entre isotipo IIIc de receptor 1 para FGF e isotipo IIIc de receptor 2 para FGF.

15 15. La fusión Fc con receptor para FGF soluble modificada, según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en la cual el dominio soluble de receptor para FGF tiene una secuencia como se expone en SEQ ID NO: 4, o bien una secuencia que tiene una identidad de al menos 95% con la SEQ ID NO: 4.

20 16. La fusión Fc con receptor para FGF soluble modificada, según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en la cual la porción Fc tiene una secuencia como se expone en SEQ ID NO: 6, o bien una secuencia que tiene una identidad de al menos 95% con la SEQ ID NO: 6.

25 17. La fusión Fc con receptor para FGF soluble modificada, según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en la cual dicha fusión Fc con receptor para FGF soluble modificada comprende además una secuencia enlazadora de al menos 3 restos de aminoácido.

18. La fusión Fc con receptor para FGF soluble modificada, según la reivindicación 17, en la cual la secuencia enlazadora es SAL (Ser-Ala-Leu).

30 19. La fusión Fc con receptor para FGF soluble modificada, según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en la cual la fusión Fc con receptor para FGF soluble modificada tiene una secuencia polipeptídica como se expone en SEQ ID NO: 2, o bien una secuencia que tiene una identidad de al menos 95% con la SEQ ID NO: 2.

20. La fusión Fc con receptor para FGF soluble modificada, según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en la cual la fusión Fc con receptor para FGF soluble modificada comprende además el péptido señal de SEQ ID NO: 8.

21. Un polinucleótido que codifica la fusión con receptor para FGF modificada,  
5 según cualquiera de las reivindicaciones precedentes.

22. El polinucleótido según la reivindicación 21, en el cual dicho polinucleótido comprende una secuencia nucleotídica que tiene una identidad de al menos 80 % con la secuencia nucleotídica de SEQ ID NO: 1.

23. Un vector que comprende un polinucleótido según cualquiera de las  
10 reivindicaciones 21 y 22.

24. Una célula que comprende un vector según la reivindicación 23.

25. La fusión Fc con receptor para FGF soluble modificada, según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 20, en calidad de medicamento.

26. Una composición farmacéutica que comprende una fusión con receptor  
15 para FGF modificada, según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 20.

27. La composición farmacéutica según la reivindicación 26, en la cual dicha composición contiene un agente terapéutico adicional.

28. La composición farmacéutica según la reivindicación 27, en la cual dicho agente terapéutico adicional es un agente anti-angiogénico o un agente  
20 quimioterapéutico.

29. La composición farmacéutica según la reivindicación 28, en la cual dicho agente antiangiogénico es un factor de necrosis tumoral, o un antagonista de un factor de crecimiento fibroblástico (FGF) ácido o básico, factor de crecimiento hepatocítico (HGF), factor tisular (TF), proteína C, proteína S, factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), o receptor HER2.  
25

30. La composición farmacéutica según la reivindicación 28, en la cual dicho agente quimioterapéutico se elige entre el grupo de: agentes antimicrotúbulos; complejos de coordinación con platino; agentes alquilantes; agentes antibióticos; inhibidores de topoisomerasa II; antimetabolitos; inhibidores de topoisomerasa I; hormonas y análogos de hormonas; inhibidores de la ruta de transducción de señal; inhibidores de angiogénesis de tipo distinto al de receptor de tirosina-cinasa; agentes inmunoterapéuticos; agentes pro-apoptóticos; e inhibidores de la señalización del ciclo celular.  
30

31. La composición farmacéutica según la reivindicación 28, en la cual dicho agente quimioterapéutico se selecciona entre el grupo de Taxol y Taxotere.
32. El uso de una fusión Fc con receptor para FGF soluble modificada, según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 20, para preparar un medicamento para  
5   tratar cáncer.
33. El uso según la reivindicación 32, que comprende el uso de un agente terapéutico adicional en la fabricación de la misma composición o composiciones diferentes.
34. El uso según la reivindicación 33, en el cual dicho agente terapéutico  
10   adicional es un agente anti-angiogénico o un agente quimioterapéutico.
35. El uso según la reivindicación 34, en el cual dicho agente antiangiogénico es un factor de necrosis tumoral, o un antagonista de un factor de crecimiento fibroblástico (FGF) ácido o básico, factor de crecimiento hepatocítico (HGF), factor tisular (TF), proteína C, proteína S, factor de crecimiento derivado de plaquetas  
15   (PDGF), o receptor HER2.
36. El uso según la reivindicación 34, en el cual dicho agente quimioterapéutico se elige entre el grupo de: agentes antimicrotúbulos; complejos de coordinación con platino; agentes alquilantes; agentes antibióticos; inhibidores de topoisomerasa II; antimetabolitos; inhibidores de topoisomerasa I; hormonas y análogos de hormonas;  
20   inhibidores de la ruta de transducción de señal; inhibidores de angiogénesis de tipo distinto al de receptor de tirosina-cinasa; agentes inmunoterapéuticos; agentes pro-apoptóticos; e inhibidores de la señalización del ciclo celular.
37. El uso según la reivindicación 34, en el cual dicho agente quimioterapéutico se elige entre el grupo de Taxol y Taxotere.
38. El uso según la reivindicación 32, en el cual dicho cáncer se elige entre el  
25   grupo de carcinoma, que incluye el carcinoma de vejiga, de mama, de colon, de cabeza y cuello, de riñón, que incluyen el carcinoma de células renales, de hígado, de pulmón, de ovario, de páncreas, de estómago, de cuello uterino, de tiroides, y de piel; que incluye el carcinoma espinocelular; tumores hematopoyéticos del linaje linfoide,  
30   entre ellos leucemia, leucemia linfocítica aguda, leucemia linfoblástica aguda, linfoma de células B, linfoma de células T, linfoma de Burkitt; tumores hematopoyéticos del linaje mieloide, entre ellos leucemias mielogénicas agudas y crónicas y leucemia promielocítica; tumores de origen mesenquimatoso, entre ellos fibrosarcoma y rabdomyosarcoma; otros tumores, entre ellos melanoma, seminoma, teratocarcinoma,

neuroblastoma y glioma; tumores de los sistema nerviosos central y periférico, entre ellos astrocitoma, neuroblastoma, glioma, y schwannoma; tumores de origen mesenquimatoso, entre ellos fibrosarcoma, rabdomiosarcoma, y osteosarcoma; y otros tumores, entre ellos melanoma, xerodermia pigmentosa, queratoactantoma, 5 seminoma, cáncer folicular de tiroides y teratocarcinoma.

39. El uso según la reivindicación 38, en el cual dicho cáncer se elige entre el grupo de melanoma, leucemia, cáncer renal, cáncer de colon, cáncer de ovario, cáncer de próstata, cáncer de pulmón, cáncer de vejiga, cáncer de mama, y cáncer de cabeza y cuello.

SS

## Resumen

La invención se refiere a fusiones Fc con receptor para FGF soluble, modificadas, que comprenden una fusión de un fragmento o dominio solubles de la parte de receptor para FGF (porción que establece el objetivo o fijadora) con una región Fc de una parte de inmunoglobulina (porción con función efectora), que tienen actividad biológica mejorada, que incluye actividades de ADCC/CDC, a composiciones que las contienen, y a método de producir dichas moléculas de fusión Fc con receptor para FGF soluble modificadas.

10

15

20

25

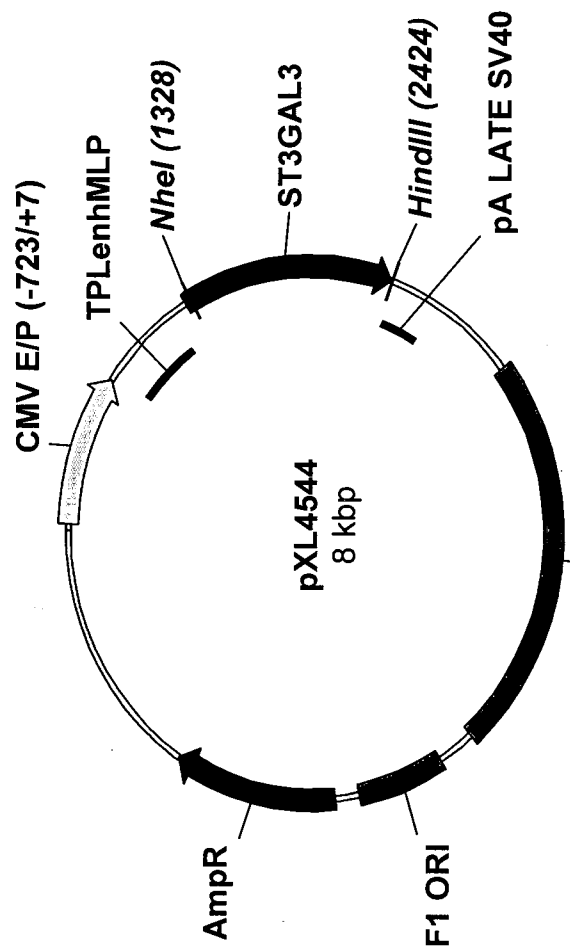


Fig. 1A

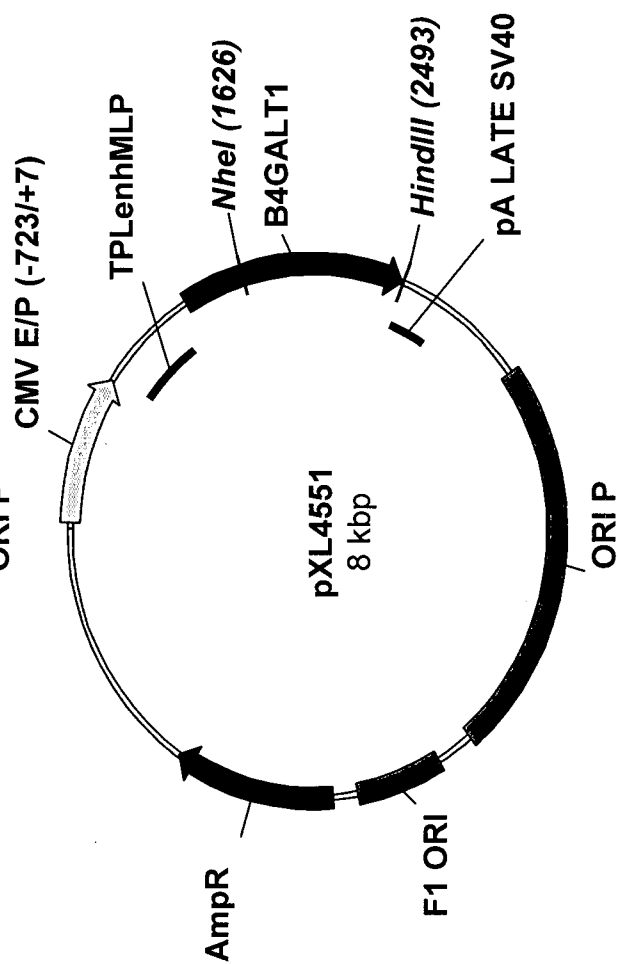


Fig. 1B

Fig. 2A

|      |                                                                                        |
|------|----------------------------------------------------------------------------------------|
| 1281 | ATGAGG CTTCTGGGAGC CGTCTCTGAG CGGACGGCC GCGATGCCAG GCGGTCCCT ACAGGGGCC                 |
| 1361 | TACTCC GAAGCCCTCG GCGAGGACTC GCCGTGCGG CGTACGGTC GCGCAGGA TGTCGCCGG                    |
| 1441 | TGCGCCCTGC TCGTGGCCGT CTGCGCTCTG CACCTTGGG TCACCTCGT TTACTACCTG GCTGGCCGG ACCTGAGCCG   |
| 1521 | ACGGCGGACG AGCACGGCA GACGGAGAC GTGGAACGC AGTGGAGCA AATGATGAC CGACCGCGC TGGACTCGGC      |
| 1601 | CCTGCCCAA CTGGTCGGAG TCTCCACACC GCTGCAGGC GGCTCGAACA GTCCCGCGC CATCGGCAG TCCTCGGGG     |
| 1681 | GGACGGGGTT GACCAGCCTC AGAGGTGTGG CACGCTCCG CCGAGCTTGT CACGGCGCG GTAGCCGTC AGAGGCCCC    |
| 1761 | AGCTCCGGAC CGGAGGGCG CGCGCCCGC CTCCTCTAG CCCTCTCC CAGCCGGCC GTAGTGGCGA CTCAGCCCA       |
| 1841 | TCGAGCCCTG GCCTCCCGG CCGCGGGCG GAGGATCC GCGGAGAGG CTCGGCGCG GCCACCGCT GAGTCCGGT        |
| 1921 | GTGCTGGATT CTGGCCCTGG CCGCGTAGC AACTTGACT CCGTCCAGT GCCCACACC ACCGCTGT CGCTGCCCG       |
| 2001 | CAGCACCTAA GACCGGACC GGGCGATCG TTGAAGTGA GCCAGGTCA CCGGTGTGG TGGCGTACA GCGACGGCG       |
| 2081 | CTGCCCTGAG GAGTCCCGC TGCTTGTGG CCCATGCTG ATTGAGTTA ACATGCTGT GGACCTGGAG CTCGTGGCAA     |
| 2161 | GACGGGACTC CTCAGGGCG AGAACACC GGGTACGAC TAACTCAAAT TGTACGACA CCTGGACCTC GAGACCGTT      |
| 2241 | AGCAGAACCC AAATGTGAAG ATGGCGGCC GCTATGCCCC CAGGACTGC GTCTCTCTC ACAAGTGGC CATCATCAT     |
| 2321 | TCGTCTTGGG TTTACACTTC TACCGCGCG CGATACGGG GTCCCTGAG CAGAGAGAG TGTCCACCG GTAGTAGTAA     |
| 2401 | CCATTCCGCA ACCGGCAGGA GCACCTCAAG TACTGGCTAT ATTATTGCA YCCAGTCTG CAGCGCAGC AGCTGGACTA   |
| 2481 | GGTAAGGCGT TGGCCGTCTT CGTGGAGTTC ATGACCGATA TAATAACGT RGTCCAGAC GTCCGGTCTG TCGACCTGAT  |
|      | TGGCATCTAT GTTATCAACC AGCGGGAGA CACTATATTC AATCGTCTAA AGTCTCTCA TGTGGCTTT CAAGAAGCCT   |
|      | ACCGTAGATA CAATAGTTGG TCCGCCCTCT GTGATATAAG TTAGCAGCAT TCGAGGAGT ACAACGAAA GTTCTTCGGA  |
|      | TGAAGGACTA TGACTACACC TGCTTTGTGT TTAGTGACGT GGACCTCAT CCAATGAATG ACCATAATGC GTACAGGTGT |
|      | ACTTCCTGAT ACTGATGTGG ACGAAACACA AATCACTGA CTTGGAGTAA GGTACTTAC TGGTATTACG CATGTCACAC  |
|      | TTTTACAGC CACGGCACAT TTCCGTTGCA ATGATAAGT TTGATTCAG CCTACCTAT GTTCAATATT TTGGAGGTGT    |
|      | AAAAGTGTG GTGCCGTGTA AAGCAACGT TACCTATTCA AACCTAAGTC GGATGGATA CAAGTCATAA AACCTCCACA   |
|      | CTCTGCTCTA AGTAAACAC AGTTTCTAAC CATCAATGGA TTTCTTAATA ATTATTGGG CTGGGAGGA GAAGATGATG   |
|      | GAGACGAGAT TCATTTGTTG TCAAAGATTG GTAGTTACCT AAAGGATTAT TAATAACCC GACCCCTCT CTCTACTAC   |
|      | ACATTTTAA CAGATTAGTT TTTAGAGCA TGTCTATATC TCGCCCAAAT GCTGTGTCTG GGAGGTCTG CATGATCCGC   |
|      | TGTAAAAAT GTCTAATCAA AAATCTCCGT ACAGATAFAG AGCGGTTTA CGACACAGC CCTCCACAG GTACTAGGCG    |
|      | CACCTAAGAG ACAAGAAAA TGAACCCAAT CCTCAGAGT TTGACCGAAT TGCACACACA AAGGACACA TGCTCTCTGA   |
|      | GTGAGTTCTC TGTCTTTTT ACTTGGGTTA GGAGTCTCCA AACTGGCTTA ACGTGTGTGT TTCCTCTGTT ACGAGAGACT |
|      | TGGTTTGAAC TCACTCACCT ACCAGGTGCT GGATGTACAG AGATACCCAT TGTATACCA AATCAGAGTG GACATCGGGA |
|      | ACCAAACTTG AGTGAGTGA TGGTCCACGA CCTACATGTC TCTATGGGTA ACATATGGGT TTAGTGTAC CTGTAGCCCT  |
|      | CACCGAGCTA G                                                                           |
|      | GTGGCTCGAT C                                                                           |

Fig. 2B

|     |                                                         |
|-----|---------------------------------------------------------|
| 1   | MRLREPLLSG SAAMPGASLQ RACRLLVAVC ALHLGVTLVY YLAGRDL SRL |
| 51  | PQLVGVSTPL QGGSNSAAAI QSSGELRTG GARPPPPLGA SSQPRPGGDS   |
| 101 | SPVDSGPGP ASNLTSVPV HTTALSLPAC PEESPLLVGP MLIEFNMPVD    |
| 151 | LELVAKQNPV VKMGGRYAPR DCVSPHKVAI IIPFRNQEHL KYWLYYLHP   |
| 201 | VLQRQQLDYG IYVINQAGDT IFNRAKLLNV GFQEALKDYD YTCFVFSDDV  |
| 251 | LIPMNDHNAY RCFSQPRHIS VAMDKFGFSL PYVQYFGGVS ALSKQQLFTI  |
| 301 | NGFPNNYWG GGEDDDIFNR LVFRGMSISR PNAVVGRCRM IRHSRDKKNE   |
| 351 | PNPQRFDRIA HTKETMLSDG LNSLTYQVLD VQRYPLYTQI TVDIGTPS    |

157

Fig. 3A

1281 ATGGGA CTCTTGGTAT TTGTGCGCAA TCTGCTGCTA GCCCTCTGCC TCTTCTGGT ACTGGGATTT  
 1361 TACCCT GAGAACCATTA AACACGCGTT AGACGACGAT CGGGAGACGG AGAAAGACCA TGACCCCTAAA  
 1441 TTGTATTATT CTGCGTGGAA GCTACACTTA CTCCAGTGGG AGGAGACTC CAATTCACTG GTTCTTTCCCT TTGACTCCGC  
 1521 AACATAATAA GACGCACCTT CGATGTGAAT GAGGTCACCC TCCTCCTGAG GTTAAGTCAC CAAGAAAGGA AACTGAGGCG  
 1601 TGGACAAACA CTAGGCTCAG AGTATGATCG GTTGGGCTTC CTCTGAATC TGGACTCTAA ACTGCCTGCT GAATTAGCCA  
 1681 ACCTGTTTGT GATCCGAGTC TCATACTAGC CAACCCGAAG GAGGACTTAG ACCTGAGATT TGACGGACGA CTTAATCGGT  
 1761 CCAAGTACGC AAACCTTTCA GAGGAGCTT GCAAGCCTGG CTATGCTTCA GCCTTGATGA CGGCCATCTT CCCCCTGTTT  
 1841 GGTTCATGCG TTTGAAAAGT CTCCCTCGAA CGTTCGACC GATACGAAGT CGGAACCTACT GCGGTAGAA GGGGGCCAAG  
 1921 TCCAAGCCAG CACCCATGTT CCTGGATGAC TCCTTTCGCA AGTGGGCTAG AATCCGGGAG TTCTGTGCGC CTTTGGGAT  
 2001 AGGTTCCGTC GTGGGTACAA GGACCTACTG AGGAAAGCGT TCACCCGATC TTAGGCCCTC AAGCACGGCG GAAAACCTA  
 2081 CAAAGGTCAA GACAATCTGA TCAAAGCCAT CTTGTCACTG ACCGCTGAC CCCTGCCCTG GACAGCCTCC  
 2161 GTTTCAGTT CTGTTAGACT AGTTTCGTA GAACAGTCAG TGGTTTCTCA TGGCGGACTG GGGACGGAAC CTGTGCGAGG  
 2241 GCTGCCGCG CTGCATCATC GTGGGCAATG GAGGCTTCT TGGCAACAAG TCTCTGGGT TCTCTTAAC TGTGATACTG  
 2321 CGACGGCGC GACGTAGTAG CACCGTTAC CTCCGCAAGA ACGTTGTTT AGAGACCCCA AGACACTGC GCATCACCTA  
 2401 ATTGTGTTGA GACTGAATTC AGCACAGTG AAAGGCTTTG AGAAGACGT GGGCAGCAA ACGACACTGC CGTAGTGGAT  
 TAACACCACT CTGACTTAAG TCGTGGTCAC TTTCCGAAAC TCTTCTCTCT TGTCTCGC CCGCTTCAAG TGGCAGGACT  
 CCCCAGGGC GCCATGCAG GGCCTGAGCA GTACGAGCG CATCTCTCT CTAAGAGAGA AACAGGAGCG GCCGAAGTTC ACCGTCTGA  
 GGGCTCCC GGTACGTCG CCGACTCGT CATGCTCCG GTATCGGAT TGCATCGGAT GGCTTCTGGA AATCTGTGG CACTCGAGTG  
 TTAAGTGGTT GAAATACATC CAGATGTTCC TCTCTCACT ACGTAGCCTA CCGAAGACCT TTAGACACCG GTGAGCTCAC  
 AATTACCAA CTTTATGTAG CAGATGTTCC AACCCATATT TCATCCAGGA GGCCGCCCTT ACCCTCAITG GCCTGCCCTT  
 CCCAAGGAG CCCCTGAGAT TCGAATCCTC AGCTTAGGAG TTGGGTATAA AGTAGTCTT CCGGCGGAAG TGGAGTAAAC CGGACGGGAA  
 GGGTCTCTCG GGGACTCTA AGCTTAGGAG CCGGGAACAT CCCTACCTT GGCAGTGTGG CAGTGACCAT GGCACCTAC GGTGTGACG  
 CAACAATGGC CTCATGGGCC CCCCCTTGT GGGATGGGA CCGTCACACC GTCACTGGTA CCGTGTGACG CCGACACTGC  
 GTTGTACCG GAGTACCCG CCGGATGGGA CCGTCACTACT ATGAGACCGT TCGCATGGCA TACTCTGGCA AGGTACCGT  
 AGGTGGCAGT CGCAGGATTT GGCTATGACA CCGATACTGT ACTCGTGTGG GTTGGTGGG AAGAGTTCT GCGGAAGCTC GGTCTATCAC  
 TCCACCGTCA GCGTCTTAA CCGATACTGT GCACAATATC CAGCGAGAGA AAGAGTTCT GTGGAAGCTC GGTCTATCAC  
 GCCATCAAAG AGTCTGGAC CAGCGAGAGA AAGAGTTCT GTGGAAGCTC GGTCTATCAC  
 CCGTAGTTTC TCAGGACCTG CGTGTATAG GTCGCTCTCT TTCTCAAAGA CGCCTTCGAG CGCAGTAGTG  
 TGATCTAAGC AGTGGCATCT GA  
 ACTAGATTCTG TCACCGTAGA CT

3/23

Fig. 3B

1 MGLLVFVRNL LLALCLFLVL GFLYYSAWKL HLLQWEEDSN SVVLSFDSAG  
 51 QTLGSEYDRL GFLNLDL SKL PAELATKYAN FSEGACKPGY ASALMTAIFP  
 101 RFSPAPMFL DDSFRKWARI REFVPPFGIK GDNLKAIL SVTKEYRLTP  
 151 ALDSLRCRR IIVNGGVLA NKSLGSRIDD YDIVRLNSA PVKGFEDVVG  
 201 SKTTLRITYP EGAMQRPQY ERDSLFLVLG FKWDKFLWK YIVYKERVSA  
 251 SDGFWKSVAT RVPKEPPEIR ILNPYFIOEA AFTLIGLPFN NGLMGRGNIP  
 301 TLGSVAVTMA LHGDEVAVA GFGYDMSTPN APLHYIYETVR MAAIKESWTH  
 351 NIOREKEFLR KLVKARVITD LSSGI

158



Fig. 4B

|     |            |            |            |             |            |
|-----|------------|------------|------------|-------------|------------|
| 1   | LVEDTTLEPE | EPPTKYQISQ | PEVYVAAPGE | SLEVRCLLKD  | AAVISWTKDG |
| 51  | VHLGPNRRTV | LIGEYLQIKG | ATPRDSGLYA | CTASRTVDSE  | TWYFMVNVTD |
| 101 | AISSGDDDD  | TDGAEDFVSE | NSNNKRAPIW | TNTEKMEKRL  | HAVPAANTVK |
| 151 | FRCPAGGNPM | PTMRWLKNGK | EFKQEHRIIG | YKVRNQHWSL  | IMESVVPSDK |
| 201 | GNVTCVENE  | YGSINHTYHL | DVVERSPHRP | ILQAGLPANA  | STVVGGDVEF |
| 251 | VCKVYSDAQP | HIQWIKHVEK | NGSKYGPDGL | PYLKVLKAAG  | VNTTDKEIEV |
| 301 | LYIRNVTFED | AGEYTCLAGN | SIGISFHSAW | LTVLPAAPGRE | KEITASPDYL |
| 351 | SALEPKSCDK | THTCPPCPAP | ELGGPSVFL  | FPKPKDTLM   | ISRTPEVTCV |
| 401 | VVDVSHEDPE | VKFNWYVDGV | EVHNAKTKPR | EEQYNSTYRV  | VSVLTVLHQD |
| 451 | WLNKEYKCK  | VSNKALPAPI | EKTISKAKGQ | PREPQVYTLP  | PSRDELTKNQ |
| 501 | VSLTCLVKGF | YPSDIAVEWE | SNGQPENNYK | TTPPVLDSDG  | SFFLYSKLTV |
| 551 | DKSRWQQGNV | FSCSVMHEAL | HNHYTQKSLS | LSPG        |            |

Fig. 4C

|     |            |            |            |             |            |
|-----|------------|------------|------------|-------------|------------|
| 1   | LVEDTTLEPE | EPPTKYQISQ | PEVYVAAPGE | SLEVRCLLKD  | AAVISWTKDG |
| 51  | VHLGPNRRTV | LIGEYLQIKG | ATPRDSGLYA | CTASRTVDSE  | TWYFMVNVTD |
| 101 | AISSGDDDD  | TDGAEDFVSE | NSNNKRAPIW | TNTEKMEKRL  | HAVPAANTVK |
| 151 | FRCPAGGNPM | PTMRWLKNGK | EFKQEHRIIG | YKVRNQHWSL  | IMESVVPSDK |
| 201 | GNVTCVENE  | YGSINHTYHL | DVVERSPHRP | ILQAGLPANA  | STVVGGDVEF |
| 251 | VCKVYSDAQP | HIQWIKHVEK | NGSKYGPDGL | PYLKVLKAAG  | VNTTDKEIEV |
| 301 | LYIRNVTFED | AGEYTCLAGN | SIGISFHSAW | LTVLPAAPGRE | KEITASPDYL |

Fig. 4D

|     |            |            |            |            |            |
|-----|------------|------------|------------|------------|------------|
| 1   | EPKSCDKTHT | CPPCPAPELL | GGPSVFLFPP | KPKDTLMISR | TPEVTCVVVD |
| 51  | VSHEDPEVKF | NWYVDGVEVH | NAKTKPREEQ | YNSTYRVVSV | LTVLHQDWLN |
| 101 | GKEYKCKVSN | KALPAPIEKT | ISKAKGQPRE | PQVYTLPPSR | DELTKNQVSL |
| 151 | TCLVKGFYPS | DIAVEWESNG | QPENNYKTTT | PVLDSGDSFF | LYSKLTVDKS |
| 201 | RWQQGNVFSC | SVMHEALHNH | YTQKSLSLSP | G          |            |

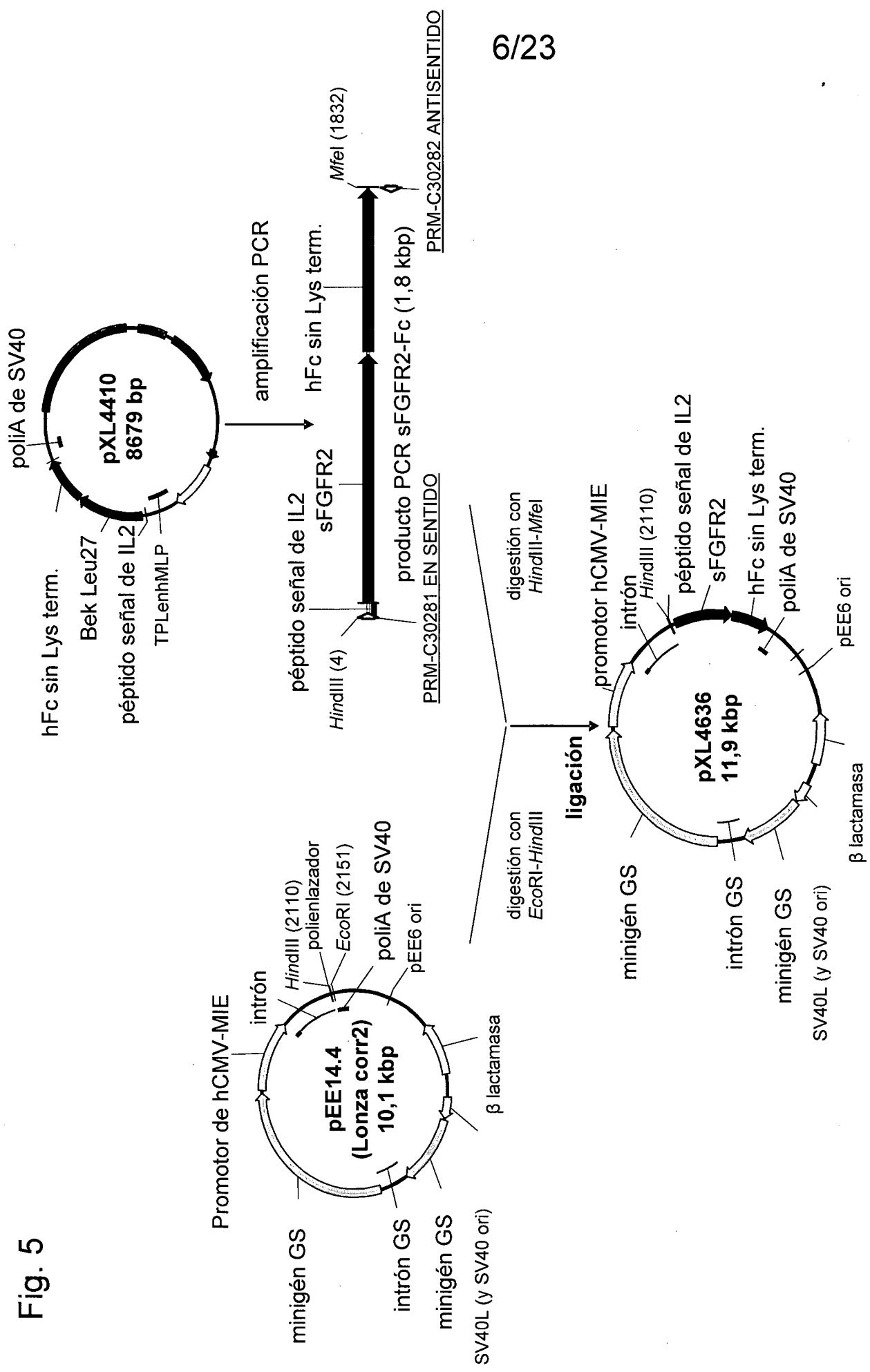
Fig. 4E

|   |     |
|---|-----|
| 1 | SAL |
|---|-----|

Fig. 4F

|   |           |            |
|---|-----------|------------|
| 1 | MYRMLLSCL | ALSLALVTNS |
|---|-----------|------------|

Fig. 5



6/23

181

7/23

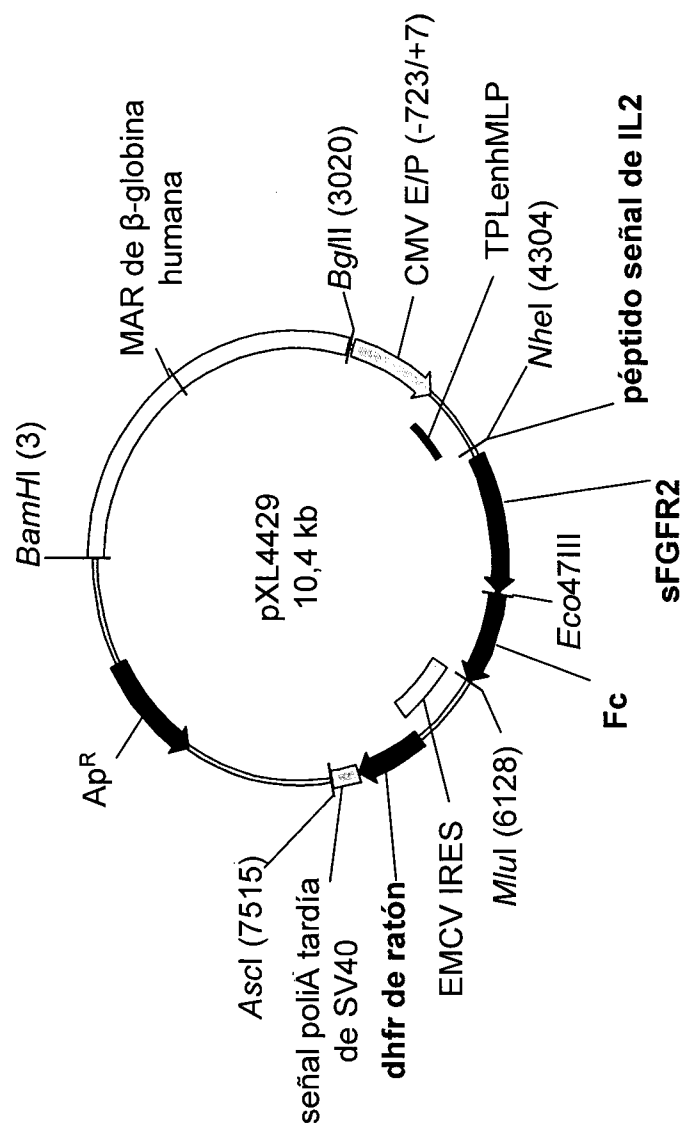


Fig. 6A

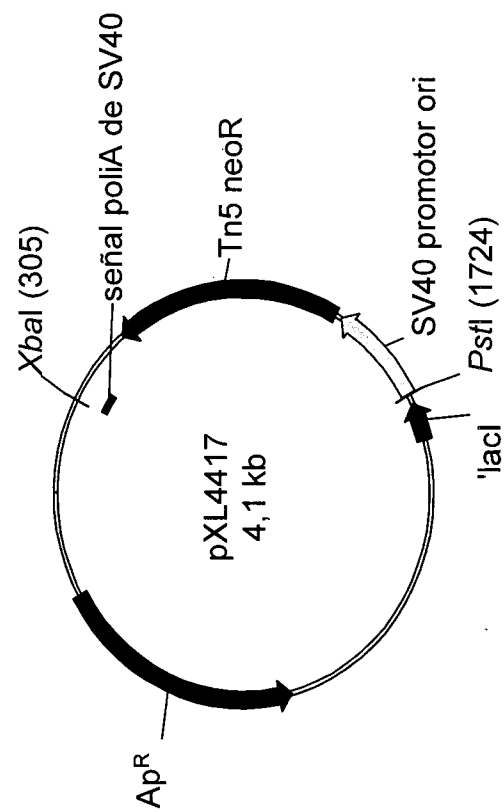
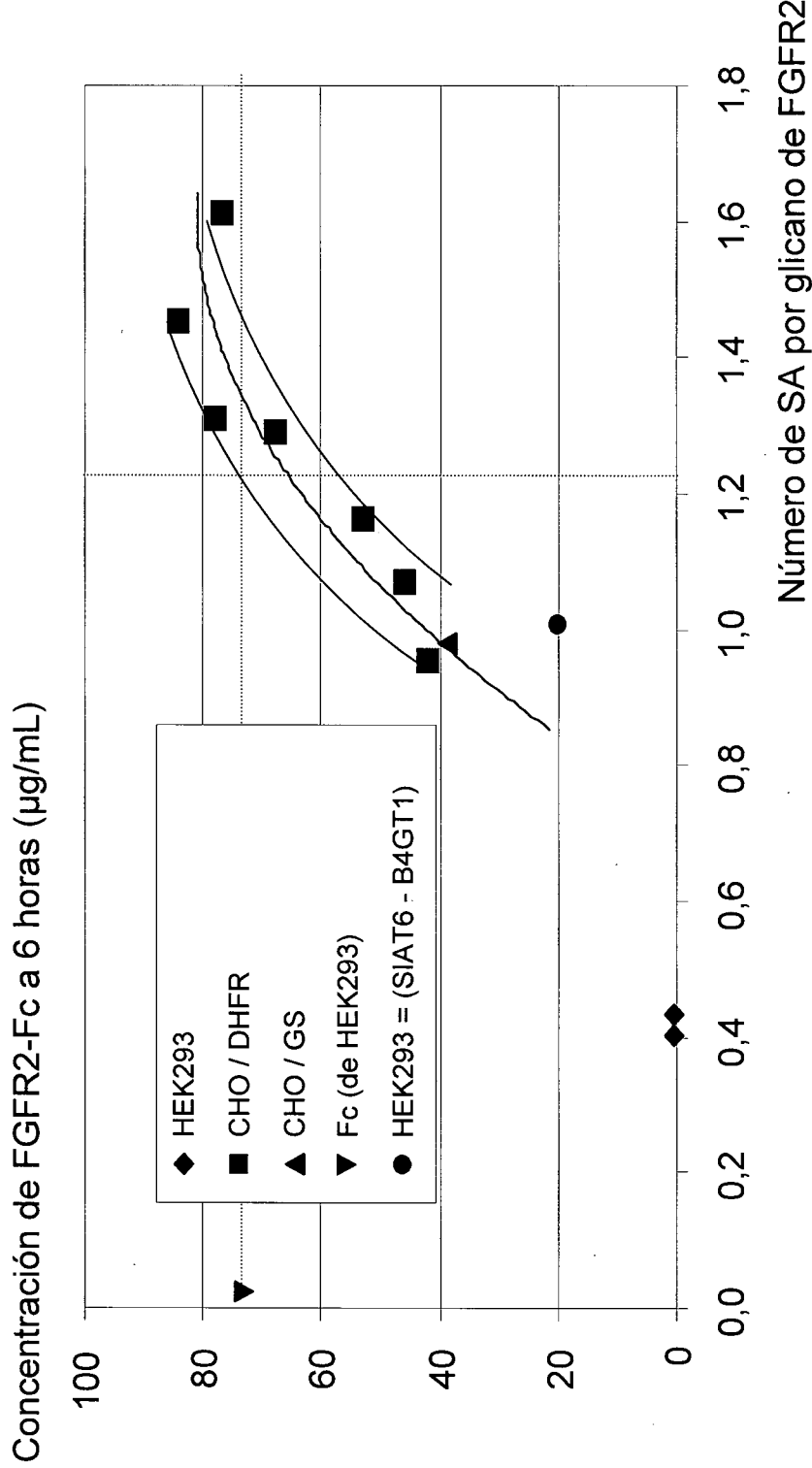


Fig. 6B

Fig. 7



9/23

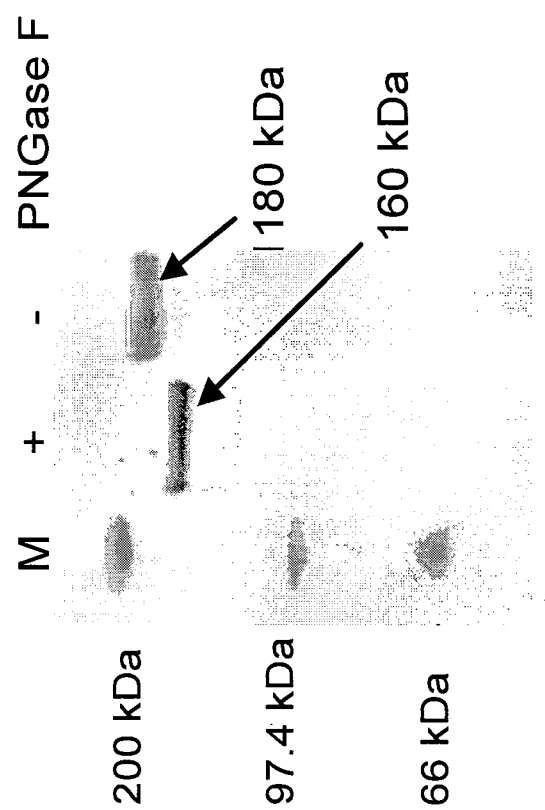


Fig. 8

10/23

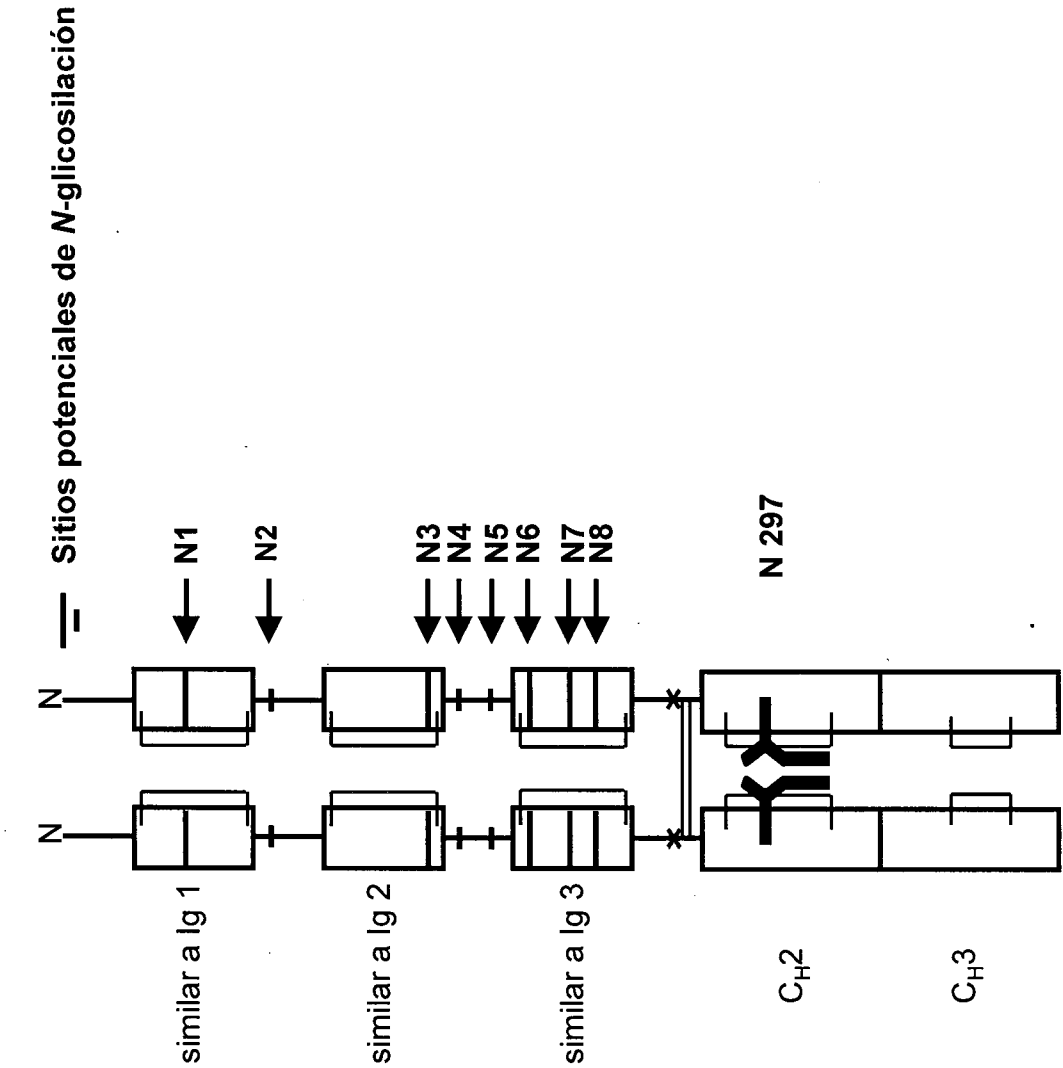
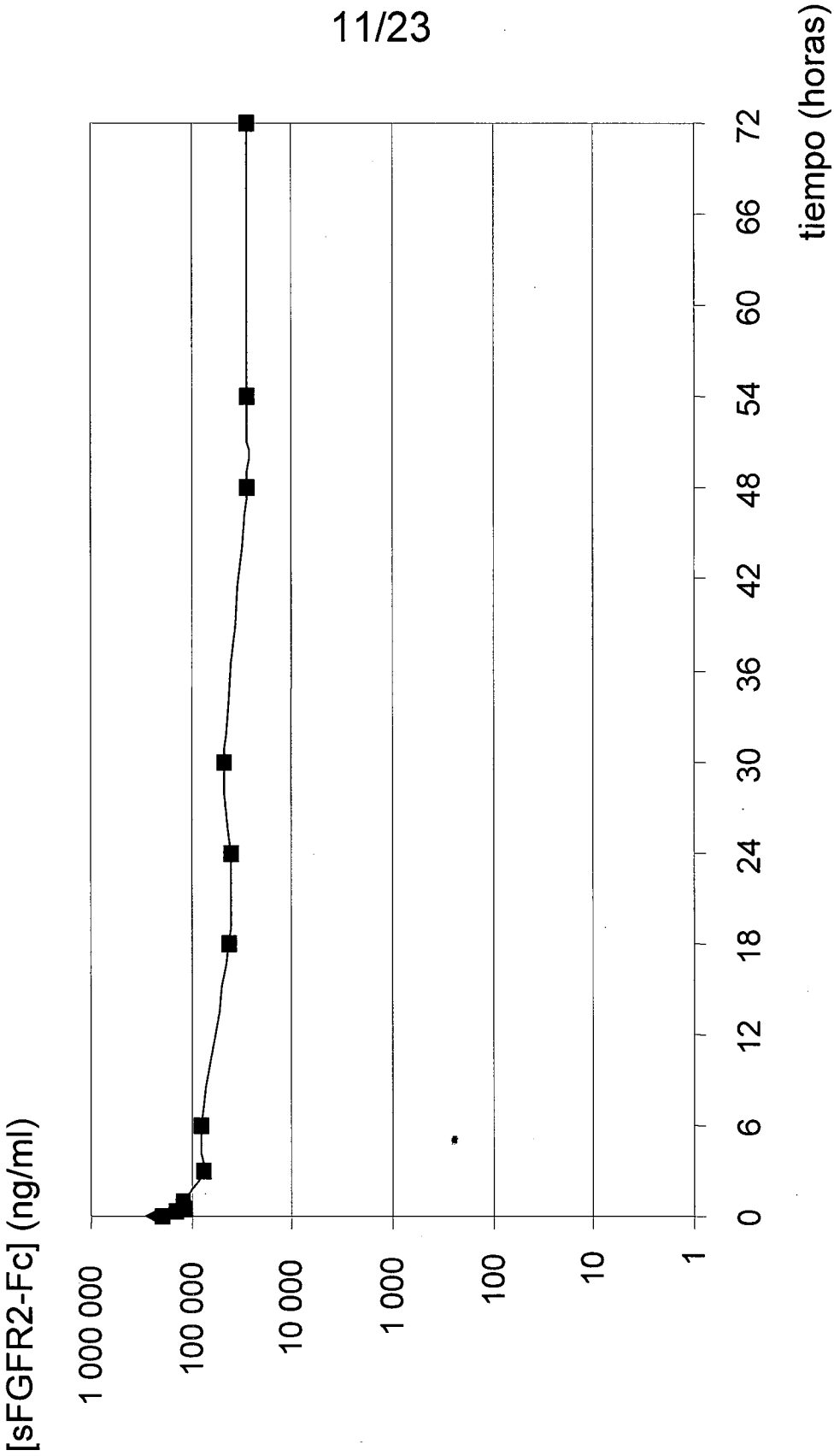
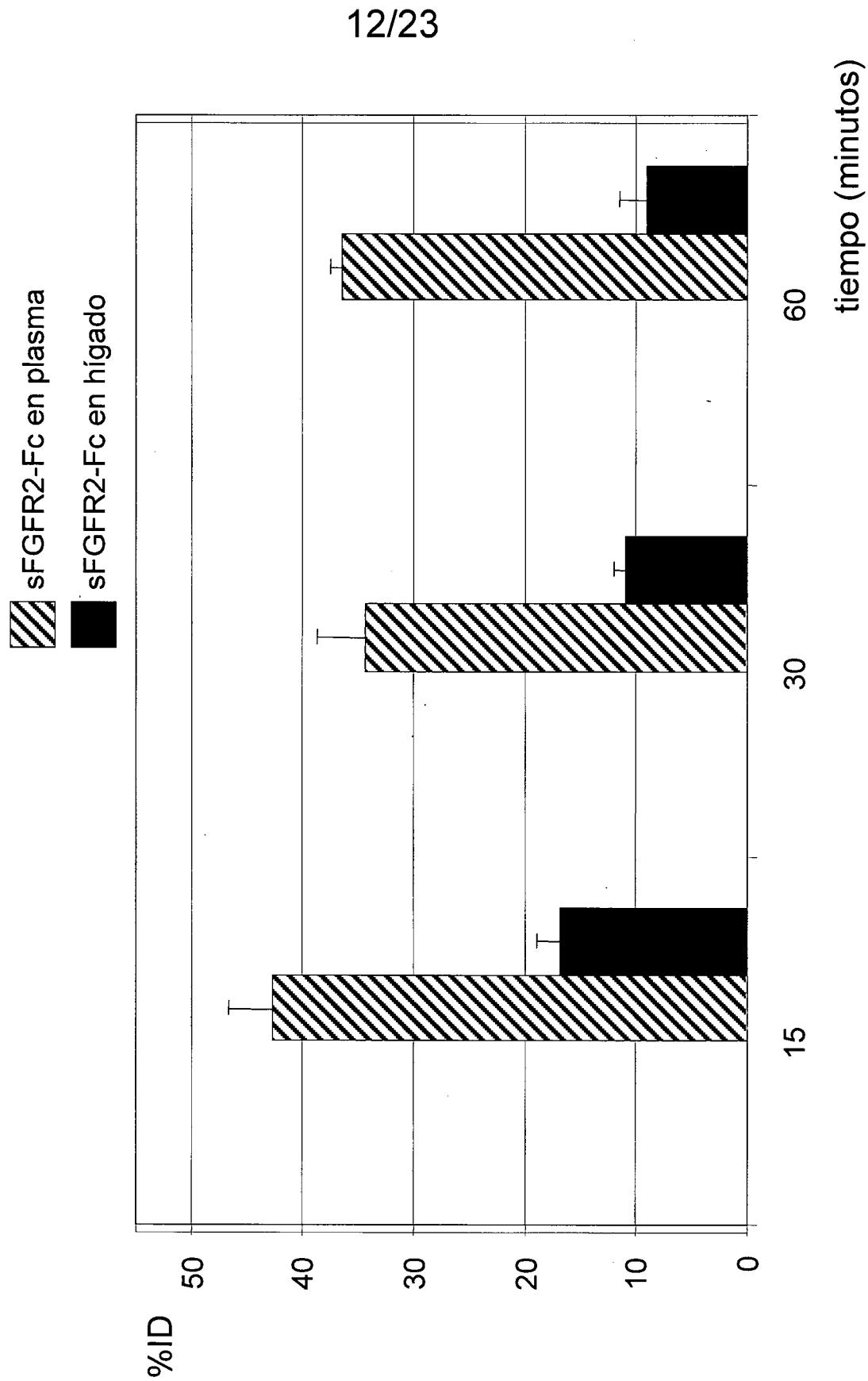


Fig. 10



166

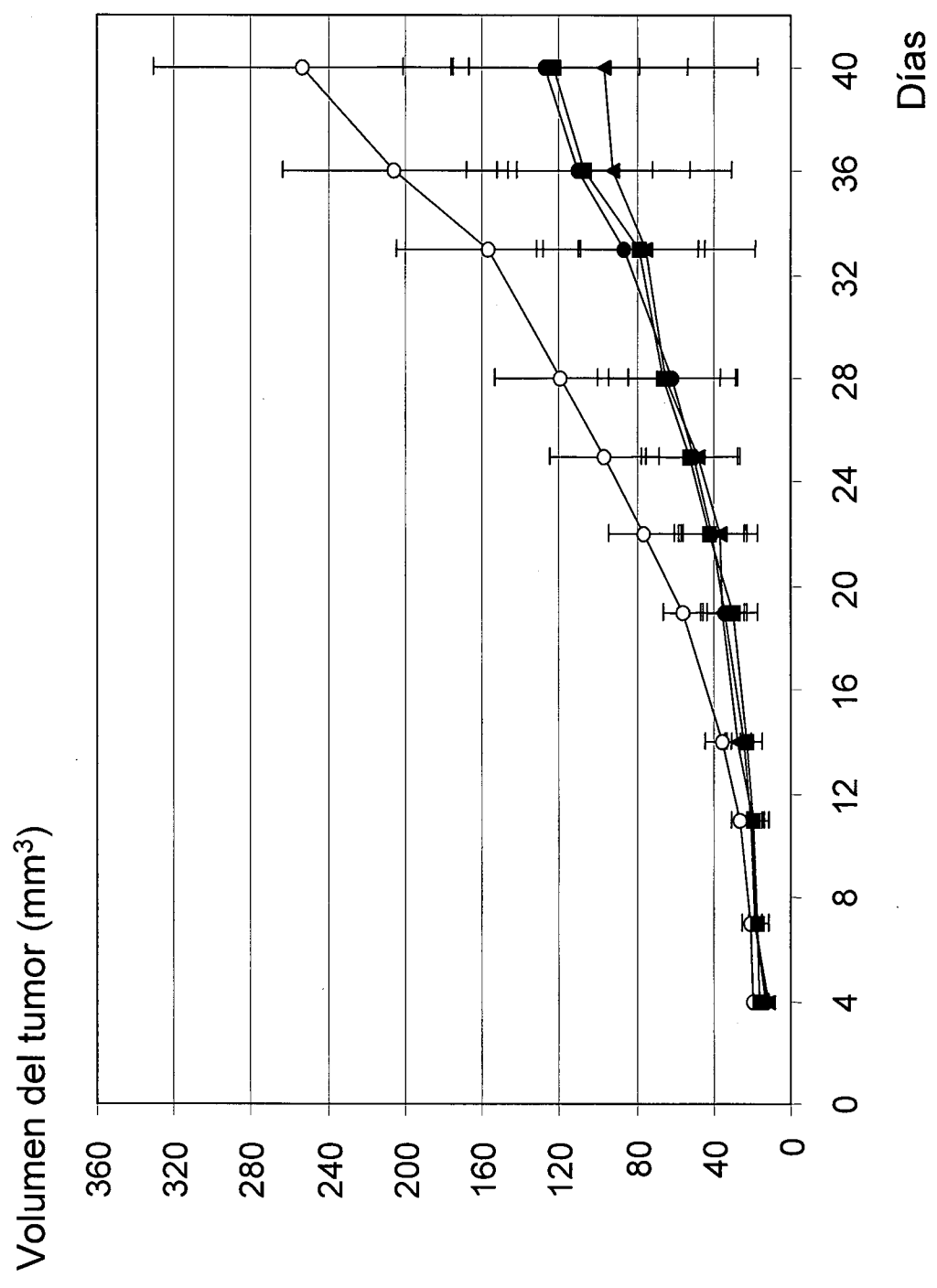
Fig. 11



767

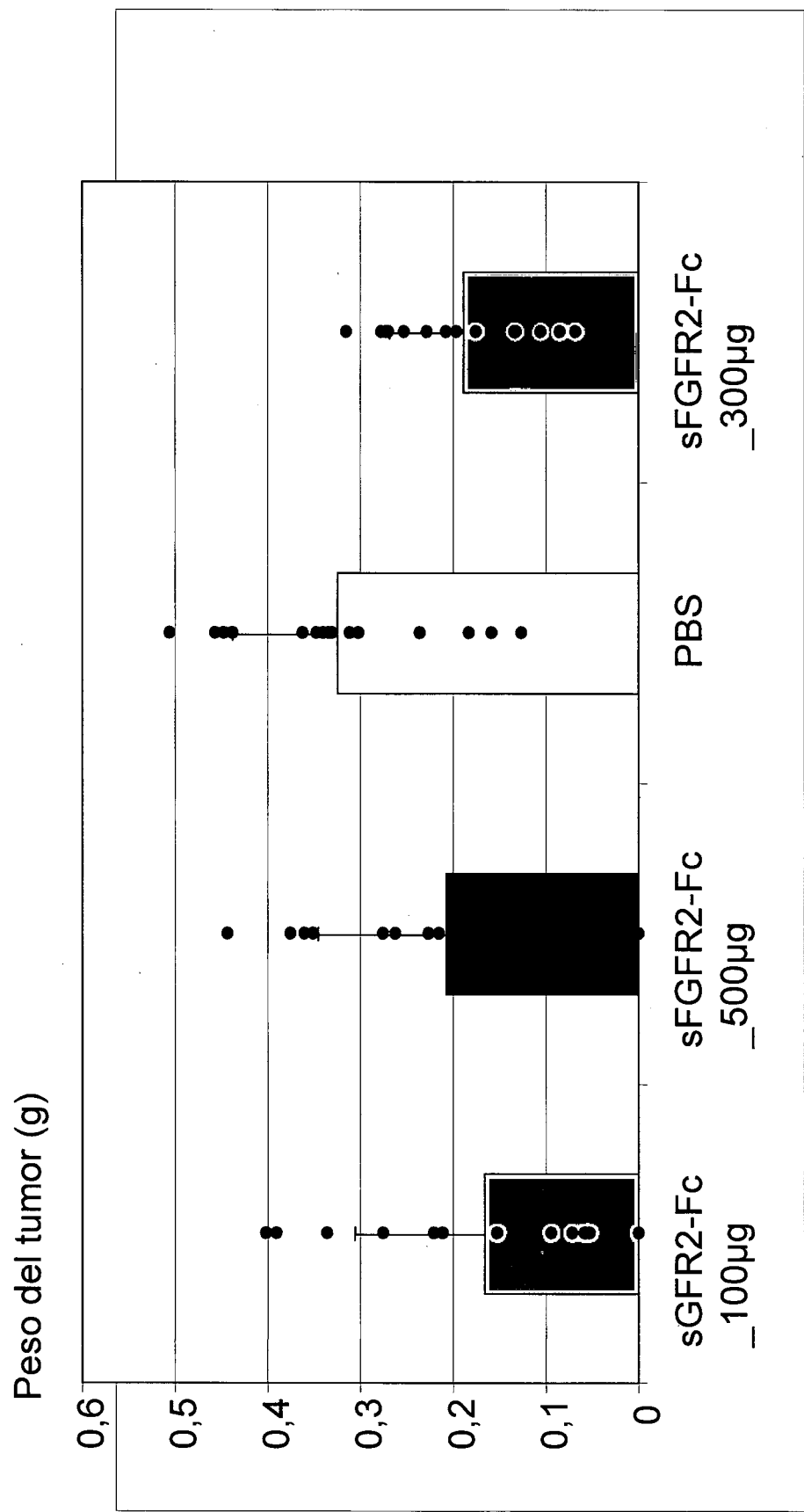
13/23

Fig. 12



14/23

Fig. 13



FO

15/23

Fig. 14

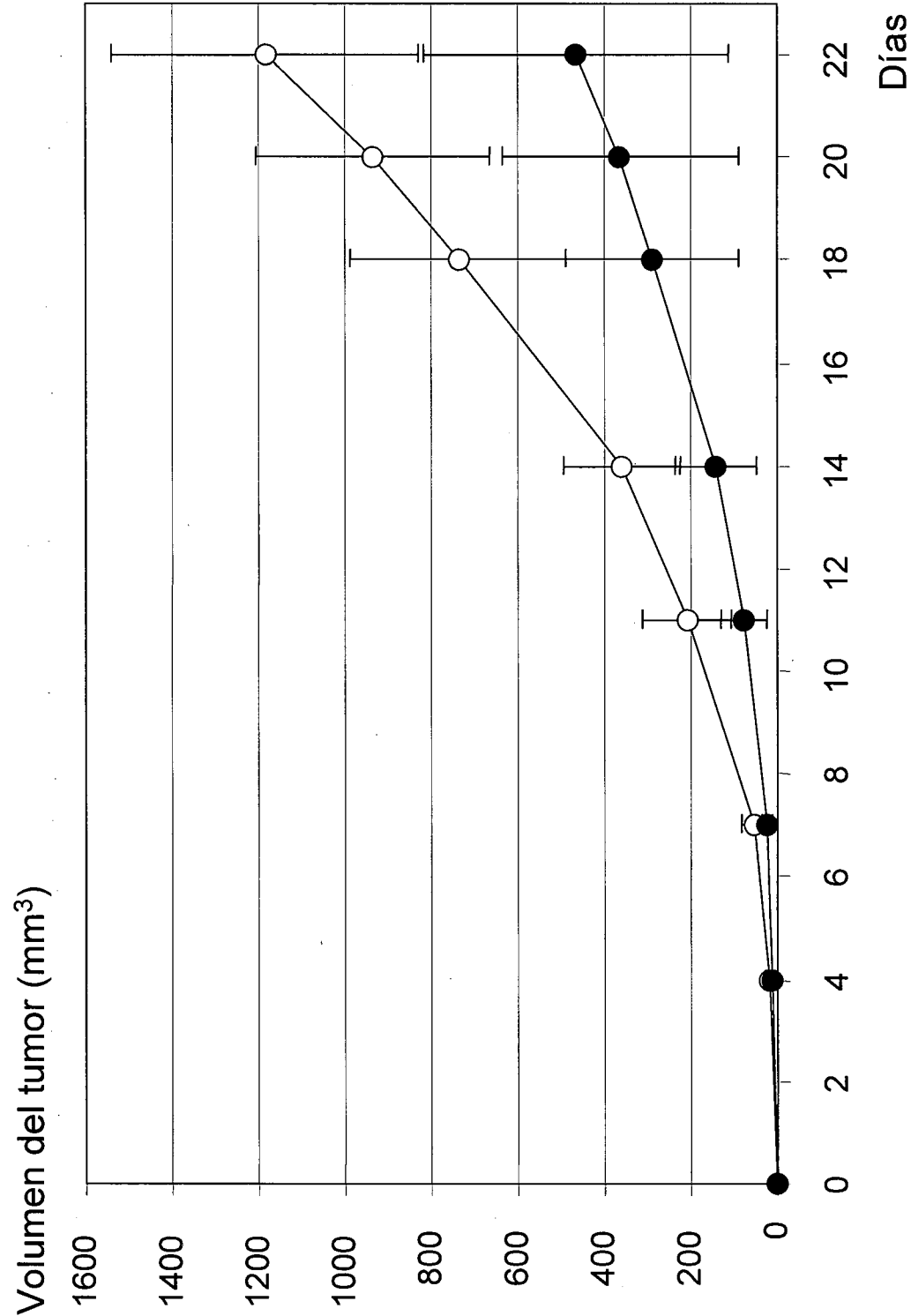
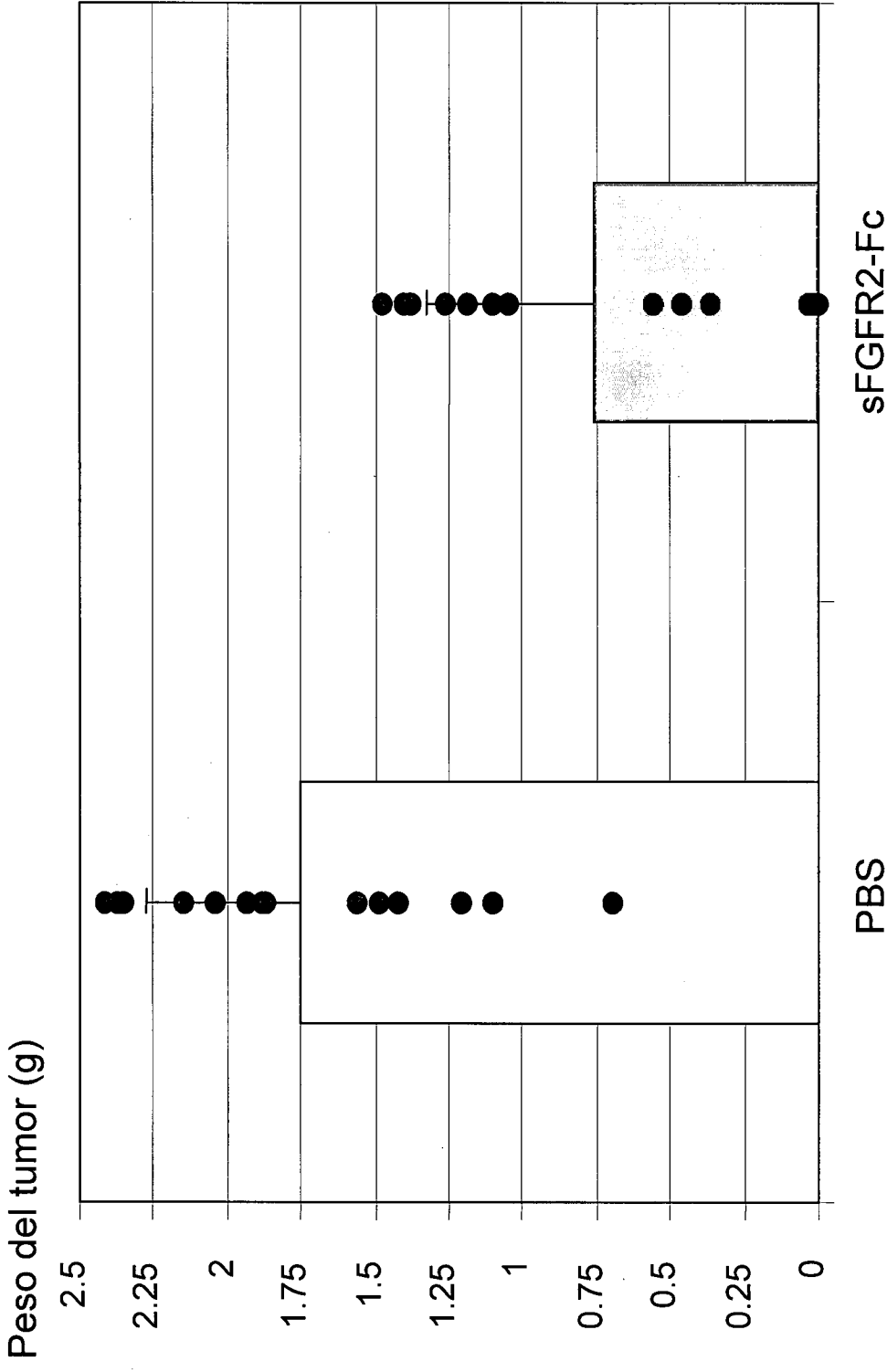


Fig. 15



17/23

Fig. 16

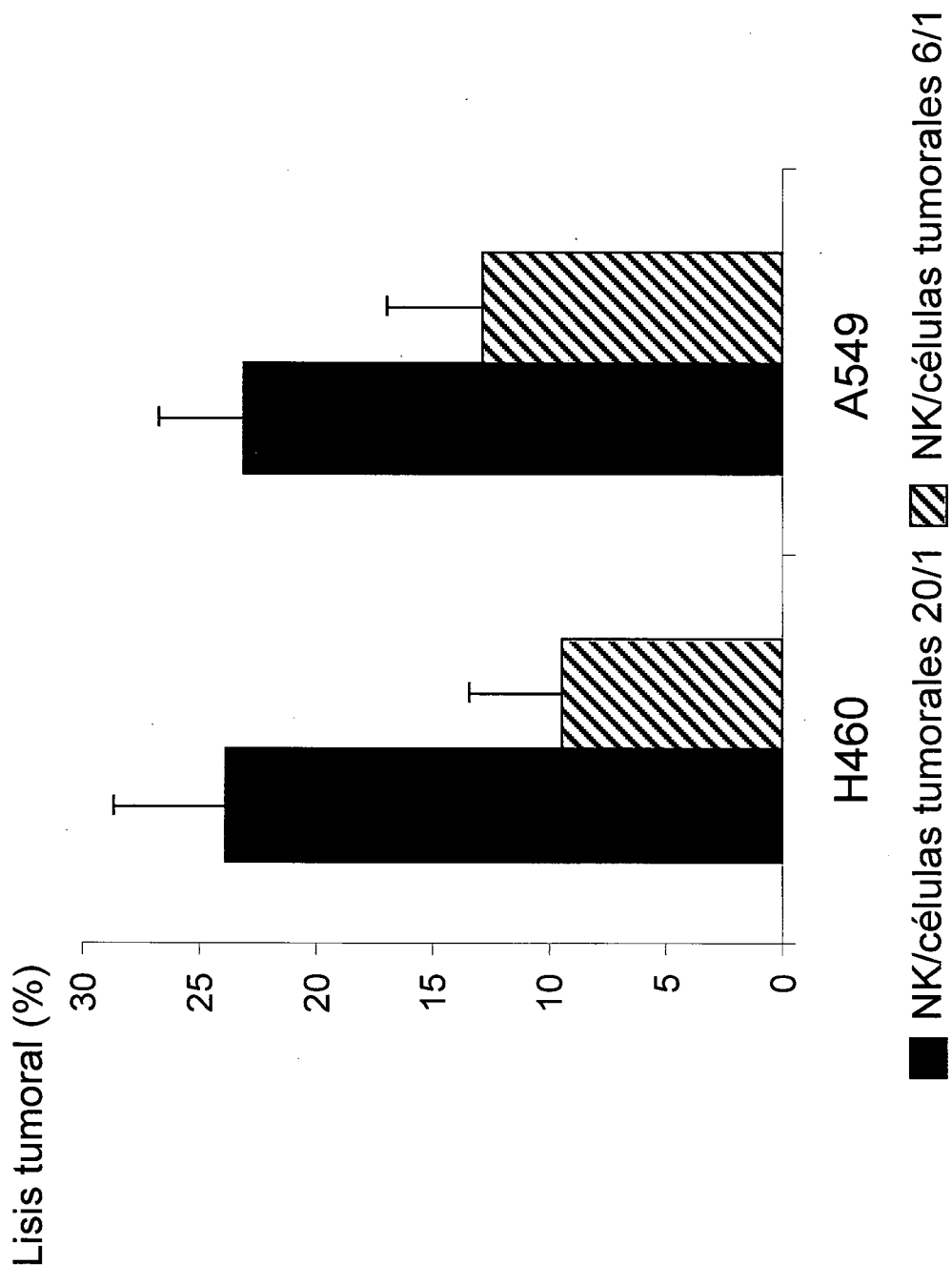


Fig. 17A

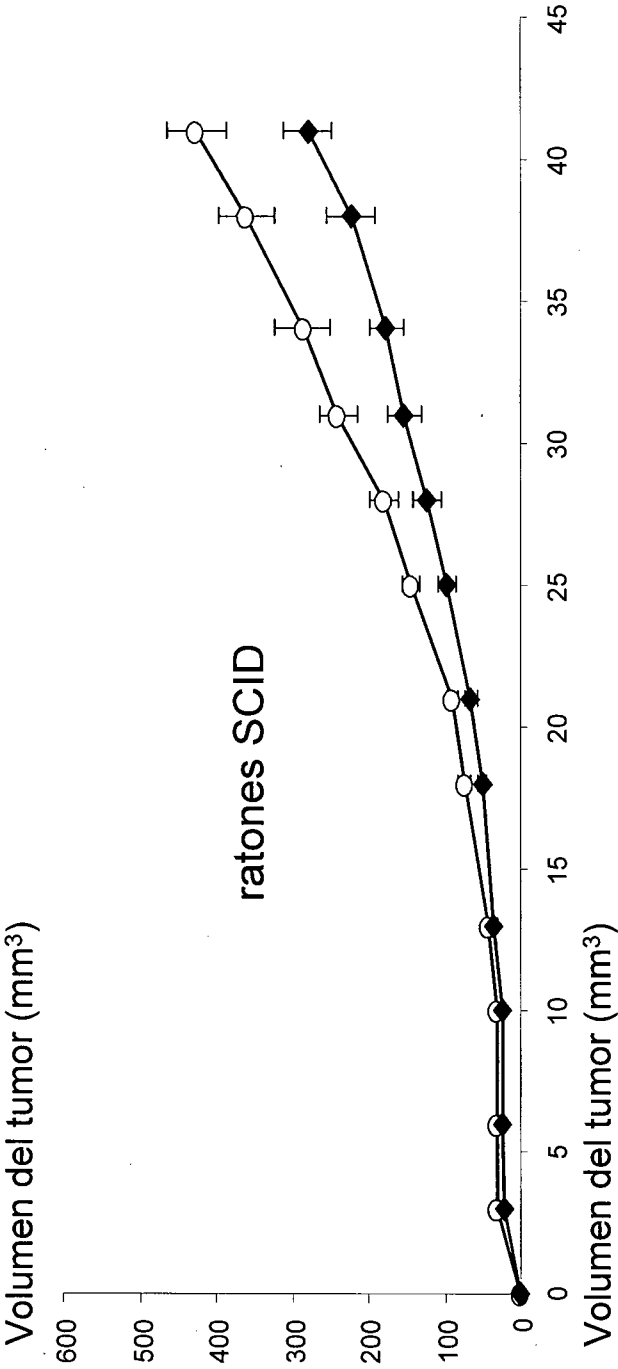
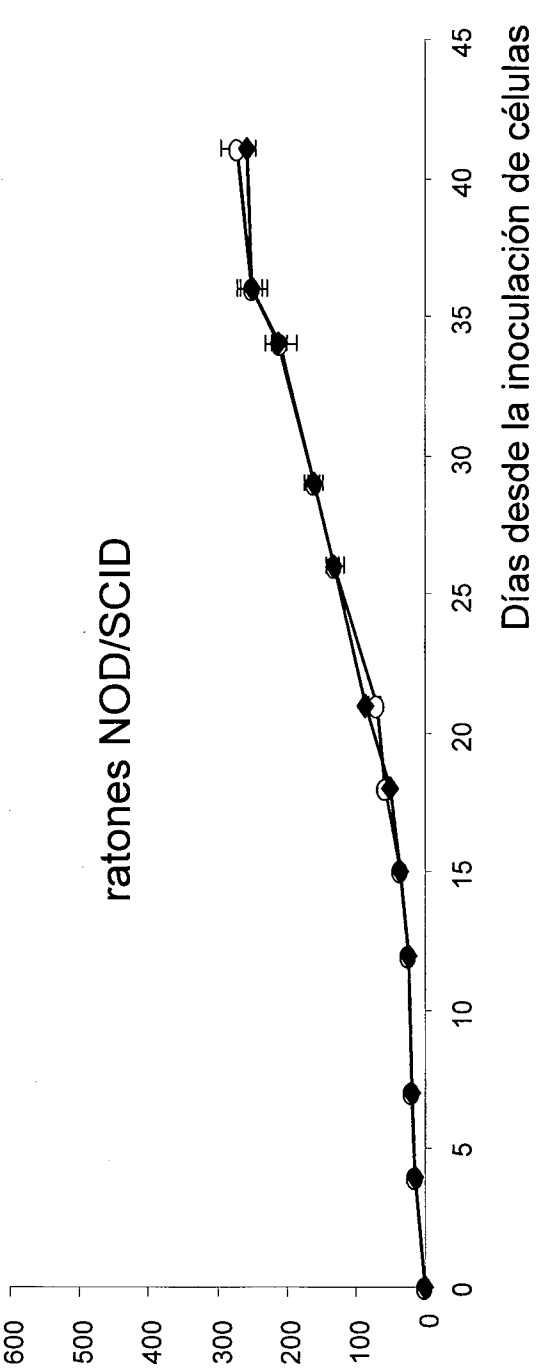


Fig. 17B



174

19/23

Fig. 17C

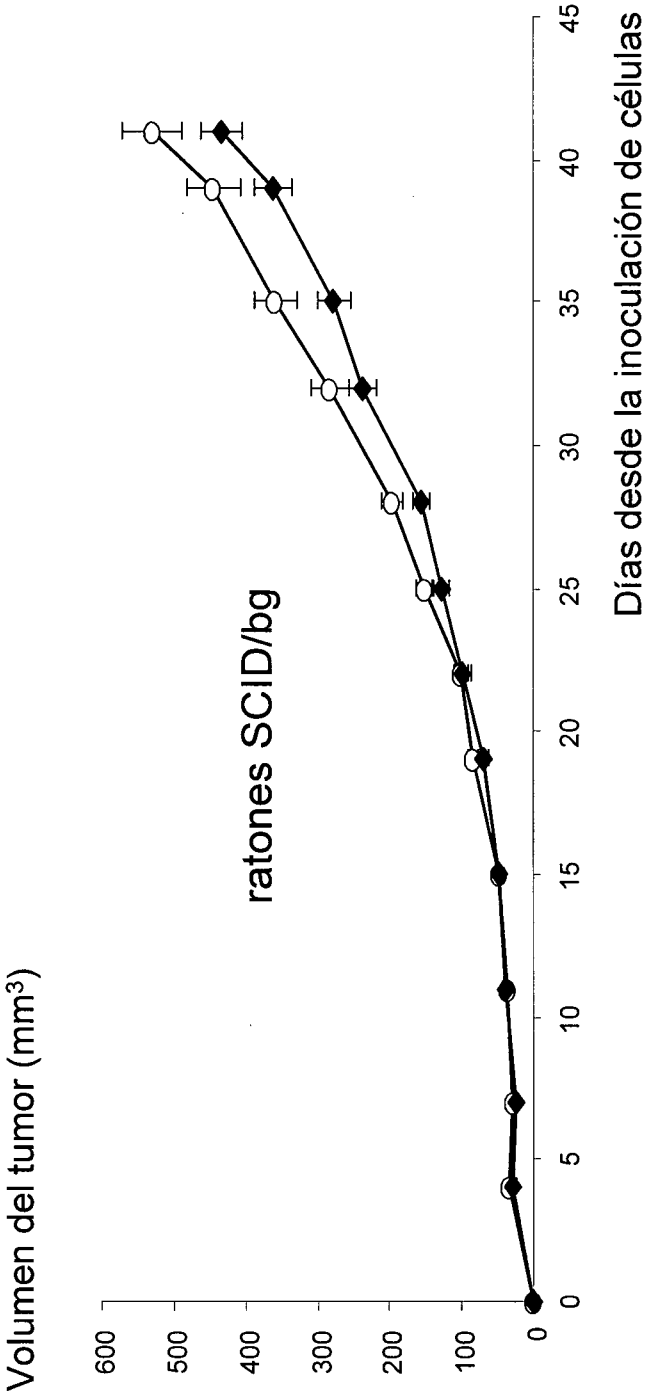


Fig. 18A Volumen del tumor (mm<sup>3</sup>)

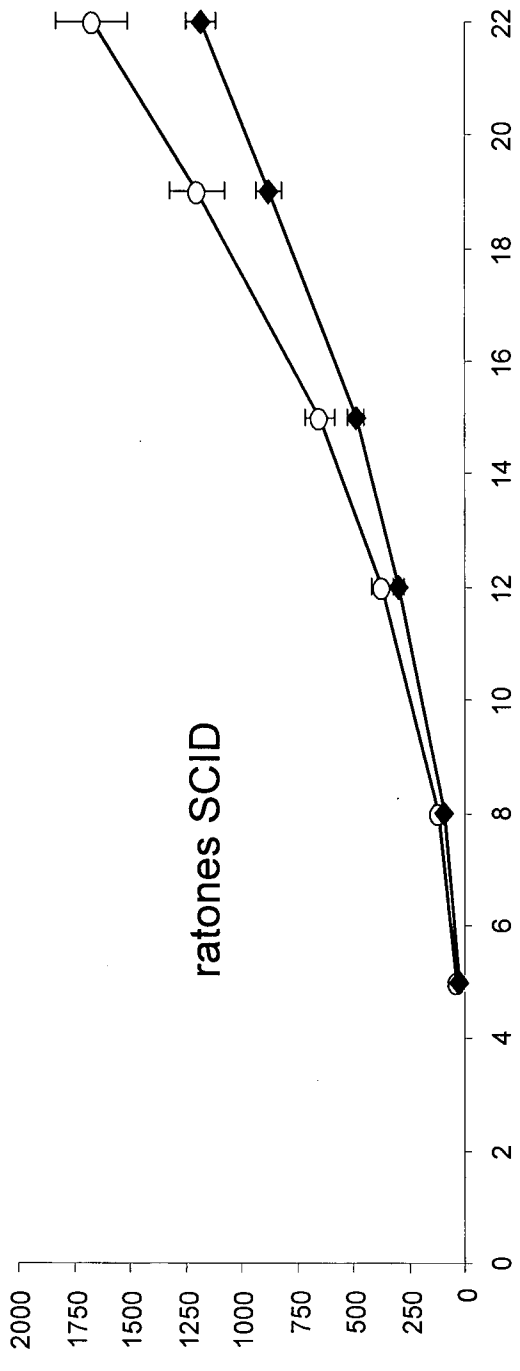
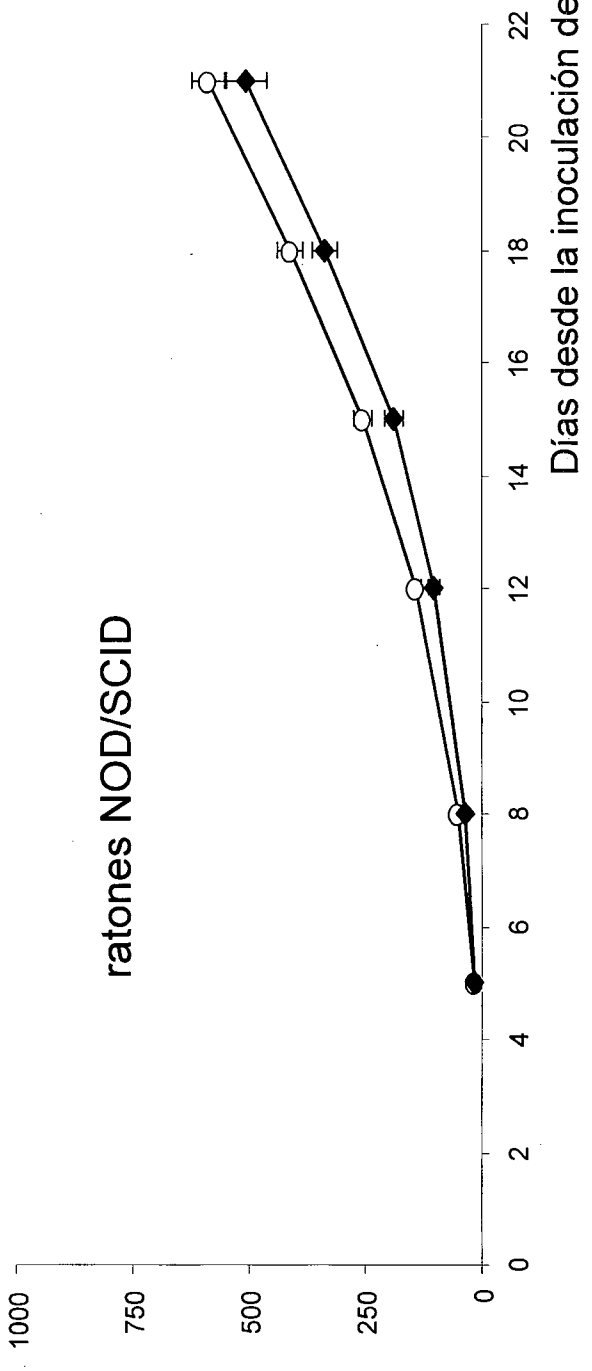
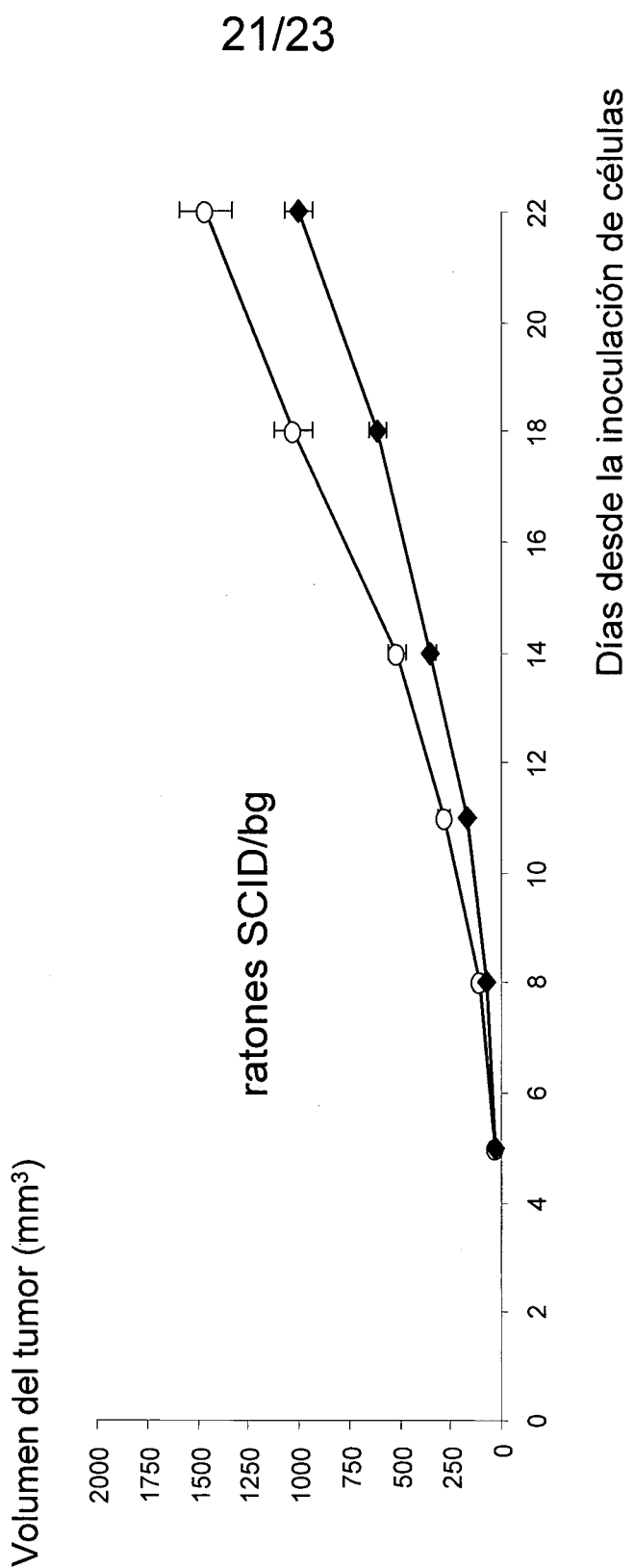


Fig. 18B Volumen del tumor (mm<sup>3</sup>)



115

Fig. 18C



136

Fig. 19A

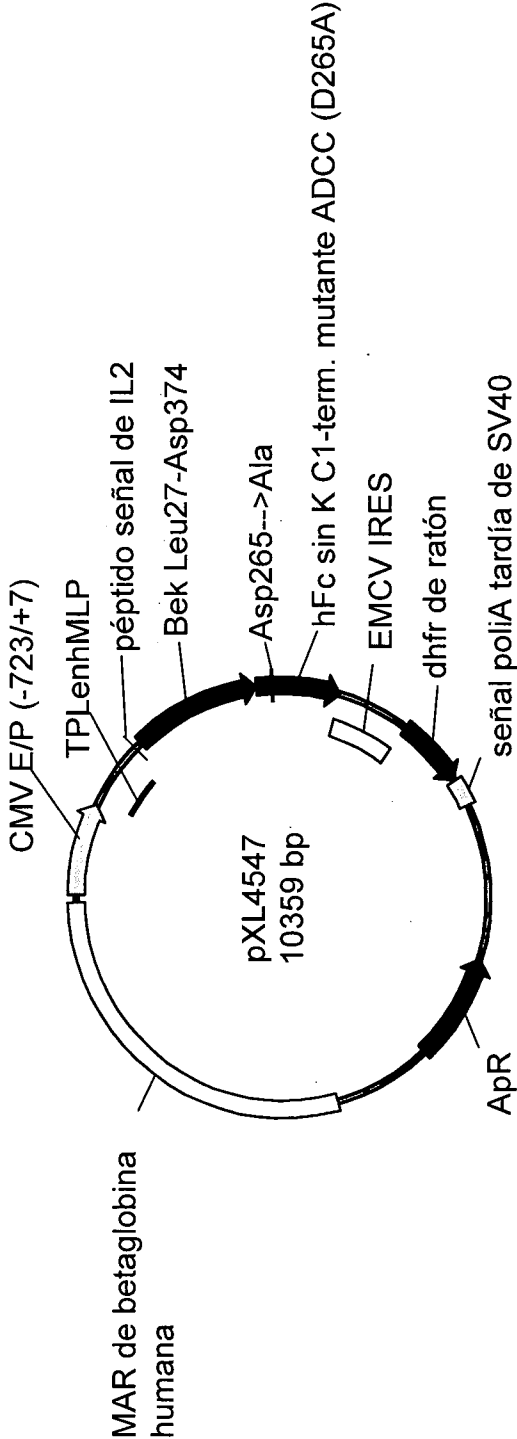
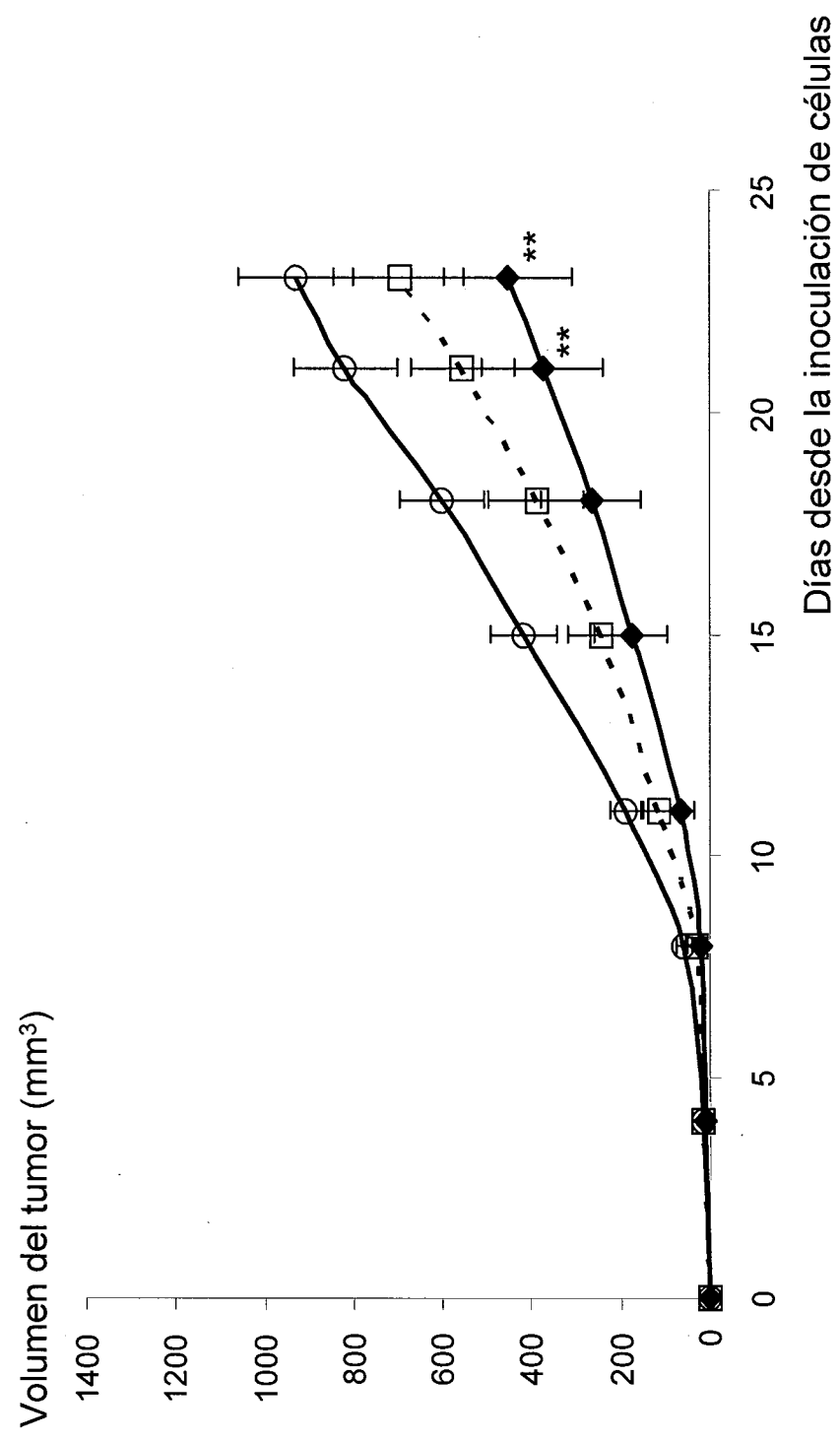


Fig. 19B

|     |            |              |             |            |             |
|-----|------------|--------------|-------------|------------|-------------|
| 1   | LVEDTTLEPE | EPPTKYQISQ   | PEVYVAAPGE  | SLEVRCLLKD | AAVISWTKDG  |
| 51  | VHLGPNNR   | TVLIGEYLQIKG | ATPRDSGLYA  | CTASRTVDSE | TWYFMVNVTD  |
| 101 | AISSGDEDD  | TDGAEDFVSE   | NSNNKRAPYW  | TNTEKMEKRL | HAVPAANTVK  |
| 151 | FRCPAGGNPM | PTMRWLKNGK   | EFKQEHRRIGG | YKVRNQHWSL | IMESVVPSPDK |
| 201 | GNYTCWVENE | YGSINHTYHL   | DVVERSPHRP  | ILQAGLPANA | STVVGGDVEF  |
| 251 | VCKVYSDAQ  | P HIQWIKHVEK | NGSKYGPDGL  | PYLKVLKAAG | VNTTDKEIEV  |
| 301 | LYIRNVTFED | AGEYTCLAGN   | SIGISFHSW   | LTVLPAAGRE | KEITASPDKT  |
| 351 | HTCPPCPAPE | LLGGPSVFLF   | PPKPKDTLMI  | SRTPEVTCVV | VAVSHEDPEV  |
| 401 | KFNWYVDGVE | VHNAKTKPRE   | EQXNSTYRVV  | SVLTVLHQDW | LNGKEYKCKV  |
| 451 | SNKALPAPIE | KTISKAKGQP   | REPOVYTLPP  | SRDELTKNQV | SLTCLVKGFY  |
| 501 | PSDIAVEWES | NGQPENNYKT   | TPPVLDSDGS  | FFLYSKLTVD | KSRWQQGNVF  |
| 551 | SCSVMEHALH | NHYTQKSLSL   | SPG         |            |             |

Fig. 20



179

TRADUCCION SECUENCIAS COLO 15828 841 002 6  
FR2006-084 PCT.ST25.txt  
LISTA DE SECUENCIAS

<110> CENTELION  
<120> FUSIONES FC CON RECEPTOR PARA FGF SOLUBLE MODIFICADAS, CON ACTIVIDAD BIOLOGICA MEJORADA  
<130> FR2006-084 PCT  
<150> EP 06291824.8  
<151> 2006-11-28  
<150> EP 07290042.6  
<151> 2007-01-11  
<160> 14  
<170> PatentIn versión 3.3  
<210> 1  
<211> 1755  
<212> DNA  
<213> Homo sapiens

<220>  
<221> CDS  
<222> (1)..(1755)

<400> 1  
tta gtt gag gat acc aca tta gag cca gaa gag cca cca act aaa tac 48  
Leu Val Glu Asp Thr Thr Leu Glu Pro Glu Glu Pro Pro Thr Lys Tyr  
1 5 10 15  
caa atc tct caa cca gaa gtg tac gtg gct gca cca ggg gag tcg cta 96  
Gln Ile Ser Gln Pro Glu Val Tyr Val Ala Ala Pro Gly Glu Ser Leu  
20 25 30  
gag gtg cgc tgc ctg ttg aaa gat gcc gcc gtg atc agt tgg act aag 144  
Glu Val Arg Cys Leu Leu Lys Asp Ala Ala Val Ile Ser Trp Thr Lys  
35 40 45  
gat ggg gtg cac ttg ggg ccc aac aat agg aca gtg ctt att ggg gag 192  
Asp Gly Val His Leu Gly Pro Asn Asn Arg Thr Val Leu Ile Gly Glu  
50 55 60  
tac ttg cag ata aag ggc gcc acg cct aga gac tcc ggc ctc tat gct 240  
Tyr Leu Gln Ile Lys Gly Ala Thr Pro Arg Asp Ser Gly Leu Tyr Ala  
65 70 75 80  
tgt act gcc agt agg act gta gac agt gaa act tgg tac ttc atg gtg 288  
Cys Thr Ala Ser Arg Thr Val Asp Ser Glu Thr Trp Tyr Phe Met Val  
85 90 95  
aat gtc aca gat gcc atc tca tcc gga gat gat gag gat gac acc gat 336  
Asn Val Thr Asp Ala Ile Ser Ser Gly Asp Asp Glu Asp Asp Thr Asp  
100 105 110  
ggt gcg gaa gat ttt gtc agt gag aac agt aac aac aag aga gca cca 384  
Gly Ala Glu Asp Phe Val Ser Glu Asn Ser Asn Asn Lys Arg Ala Pro  
115 120 125  
tac tgg acc aac aca gaa aag atg gaa aag cgg ctc cat gct gtg cct 432  
Tyr Trp Thr Asn Thr Glu Lys Met Glu Lys Arg Leu His Ala Val Pro  
130 135 140  
gcg gcc aac act gtc aag ttt cgc tgc cca gcc ggg ggg aac cca atg 480  
Ala Ala Asn Thr Val Lys Phe Arg Cys Pro Ala Gly Gly Asn Pro Met  
145 150 155 160  
cca acc atg cgg tgg ctg aaa aac ggg aag gag ttt aag cag gag cat 528  
Pro Thr Met Arg Trp Leu Lys Asn Gly Lys Glu Phe Lys Gln Glu His  
165 170 175

180

TRADUCCION SECUENCIAS COLO 15828 841 002 6

|                                                                                                                                                       |      |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------|
| cgc att gga ggc tac aag gta cga aac cag cac tgg agc ctc att atg<br>Arg Ile Gly Gly Tyr Lys Val Arg Asn Gln His Trp Ser Leu Ile Met<br>180 185 190     | 576  |
| gaa agt gtg gtc cca tct gac aag gga aat tat acc tgt gtg gtg gag<br>Glu Ser Val Val Pro Ser Asp Lys Gly Asn Tyr Thr Cys Val Val Glu<br>195 200 205     | 624  |
| aat gaa tac ggg tcc atc aat cac acg tac cac ctg gat gtt gtg gag<br>Asn Glu Tyr Gly Ser Ile Asn His Thr Tyr His Leu Asp Val Val Glu<br>210 215 220     | 672  |
| cga tcg cct cac cgg ccc atc ctc caa gcc gga ctg ccg gca aat gcc<br>Arg Ser Pro His Arg Pro Ile Leu Gln Ala Gly Leu Pro Ala Asn Ala<br>225 230 235 240 | 720  |
| tcc aca gtg gtc gga gga gac gta gag ttt gtc tgc aag gtt tac agt<br>Ser Thr Val Val Gly Gly Asp Val Glu Phe Val Cys Lys Val Tyr Ser<br>245 250 255     | 768  |
| gat gcc cag ccc cac atc cag tgg atc aag cac gtg gaa aag aac ggc<br>Asp Ala Gln Pro His Ile Gln Trp Ile Lys His Val Glu Lys Asn Gly<br>260 265 270     | 816  |
| agt aaa tac ggg ccc gac ggg ctg ccc tac ctc aag gtt ctc aag gcc<br>Ser Lys Tyr Gly Pro Asp Gly Leu Pro Tyr Leu Lys Val Leu Lys Ala<br>275 280 285     | 864  |
| gcc ggt gtt aac acc acg gac aaa gag att gag gtt ctc tat att cgg<br>Ala Gly Val Asn Thr Thr Asp Lys Glu Ile Glu Val Leu Tyr Ile Arg<br>290 295 300     | 912  |
| aat gta act ttt gag gac gct ggg gaa tat acg tgc ttg gcg ggt aat<br>Asn Val Thr Phe Glu Asp Ala Gly Glu Tyr Thr Cys Leu Ala Gly Asn<br>305 310 315 320 | 960  |
| tct att ggg ata tcc ttt cac tct gca tgg ttg aca gtt ctg cca gcg<br>Ser Ile Gly Ile Ser Phe His Ser Ala Trp Leu Thr Val Leu Pro Ala<br>325 330 335     | 1008 |
| cct gga aga gaa aag gag att aca gct tcc cca gac tac ctg tca gcg<br>Pro Gly Arg Glu Lys Glu Ile Thr Ala Ser Pro Asp Tyr Leu Ser Ala<br>340 345 350     | 1056 |
| cta gag ccc aaa tct tgt gac aaa act cac aca tgc cca ccg tgc cca<br>Leu Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro<br>355 360 365     | 1104 |
| gca cct gaa ctc ctg ggg gga ccg tca gtc ttc ctc ttc ccc cca aaa<br>Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys<br>370 375 380     | 1152 |
| ccc aag gac acc ctc atg atc tcc cgg acc cct gag gtc aca tgc gtg<br>Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val<br>385 390 395 400 | 1200 |
| gtg gtg gac gtg agc cac gaa gac cct gag gtc aag ttc aac tgg tac<br>Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr<br>405 410 415     | 1248 |
| gtg gac ggc gtg gag gtg cat aat gcc aag aca aag ccg cgg gag gag<br>Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu<br>420 425 430     | 1296 |
| cag tac aac agc acg tac cgt gtg gtc agc gtc ctc acc gtc ctg cac<br>Gln Tyr Asn Ser Thr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His<br>435 440 445         | 1344 |
| cag gac tgg ctg aat ggc aag gag tac aag tgc aag gtc tcc aac aaa<br>Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys<br>450 455 460     | 1392 |
| gcc ctc cca gcc ccc atc gag aaa acc atc tcc aaa gcc aaa ggg cag<br>Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln<br>465 470 475 480 | 1440 |

181

TRADUCCION SECUENCIAS COLO 15828 841 002 6  
470 475 480

|     |                                                                 |      |
|-----|-----------------------------------------------------------------|------|
| 465 | ccc cga gaa cca cag gtg tac acc ctg ccc cca tcc cgg gat gag ctg | 1488 |
|     | Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu |      |
|     | 485 490 495                                                     |      |
|     | acc aag aac cag gtc agc ctg acc tgc ctg gtc aaa ggc ttc tat ccc | 1536 |
|     | Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro |      |
|     | 500 505 510                                                     |      |
|     | agc gac atc gcc gtg gag tgg gag agc aat ggg cag ccg gag aac aac | 1584 |
|     | Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn |      |
|     | 515 520 525                                                     |      |
|     | tac aag acc acg cct ccc gtg ctg gac tcc gac ggc tcc ttc ttc ctc | 1632 |
|     | Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu |      |
|     | 530 535 540                                                     |      |
|     | tac agc aag ctc acc gtg gac aag agc agg tgg cag cag ggc aac gtc | 1680 |
|     | Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val |      |
|     | 545 550 555 560                                                 |      |
|     | ttc tca tgc tcc gtg atg cat gag gct ctg cac aac cac tac acg cag | 1728 |
|     | Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln |      |
|     | 565 570 575                                                     |      |
|     | aag agc ctc tcc ctg tct ccg ggt tga                             | 1755 |
|     | Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly                                 |      |
|     | 580                                                             |      |

<210> 2  
<211> 584  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 2

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

|     |                            |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |       |     |     |     |
|-----|----------------------------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-------|-----|-----|-----|
| 145 | TRADUCCION SECUENCIAS COLO |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     | 15828 | 841 | 002 | 6   |
|     | 150                        |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     | 155   |     |     | 160 |
| Pro | Thr                        | Met | Arg | Trp | Leu | Lys | Asn | Gly | Lys | Glu | Phe | Lys | Gln | Glu | His |       |     |     |     |
|     |                            |     |     | 165 |     |     |     |     | 170 |     |     |     |     | 175 |     |       |     |     |     |
| Arg | Ile                        | Gly | Gly | Tyr | Lys | Val | Arg | Asn | Gln | His | Trp | Ser | Leu | Ile | Met |       |     |     |     |
|     |                            |     | 180 |     |     |     |     | 185 |     |     |     |     | 190 |     |     |       |     |     |     |
| Glu | Ser                        | Val | Val | Pro | Ser | Asp | Lys | Gly | Asn | Tyr | Thr | Cys | Val | Val | Glu |       |     |     |     |
|     |                            | 195 |     |     |     |     | 200 |     |     |     |     | 205 |     |     |     |       |     |     |     |
| Asn | Glu                        | Tyr | Gly | Ser | Ile | Asn | His | Thr | Tyr | His | Leu | Asp | Val | Val | Glu |       |     |     |     |
|     | 210                        |     |     |     |     | 215 |     |     |     |     | 220 |     |     |     |     |       |     |     |     |
| Arg | Ser                        | Pro | His | Arg | Pro | Ile | Leu | Gln | Ala | Gly | Leu | Pro | Ala | Asn | Ala |       |     |     |     |
| 225 |                            |     |     |     | 230 |     |     |     |     | 235 |     |     |     |     | 240 |       |     |     |     |
| Ser | Thr                        | Val | Val | Gly | Gly | Asp | Val | Glu | Phe | Val | Cys | Lys | Val | Tyr | Ser |       |     |     |     |
|     |                            |     |     | 245 |     |     |     |     | 250 |     |     |     |     | 255 |     |       |     |     |     |
| Asp | Ala                        | Gln | Pro | His | Ile | Gln | Trp | Ile | Lys | His | Val | Glu | Lys | Asn | Gly |       |     |     |     |
|     |                            |     | 260 |     |     |     |     | 265 |     |     |     |     | 270 |     |     |       |     |     |     |
| Ser | Lys                        | Tyr | Gly | Pro | Asp | Gly | Leu | Pro | Tyr | Leu | Lys | Val | Leu | Lys | Ala |       |     |     |     |
|     |                            | 275 |     |     |     |     | 280 |     |     |     |     | 285 |     |     |     |       |     |     |     |
| Ala | Gly                        | Val | Asn | Thr | Thr | Asp | Lys | Glu | Ile | Glu | Val | Leu | Tyr | Ile | Arg |       |     |     |     |
|     | 290                        |     |     |     |     | 295 |     |     |     |     | 300 |     |     |     |     |       |     |     |     |
| Asn | Val                        | Thr | Phe | Glu | Asp | Ala | Gly | Glu | Tyr | Thr | Cys | Leu | Ala | Gly | Asn |       |     |     |     |
| 305 |                            |     |     |     | 310 |     |     |     |     | 315 |     |     |     |     | 320 |       |     |     |     |
| Ser | Ile                        | Gly | Ile | Ser | Phe | His | Ser | Ala | Trp | Leu | Thr | Val | Leu | Pro | Ala |       |     |     |     |
|     |                            |     |     | 325 |     |     |     |     | 330 |     |     |     |     | 335 |     |       |     |     |     |
| Pro | Gly                        | Arg | Glu | Lys | Glu | Ile | Thr | Ala | Ser | Pro | Asp | Tyr | Leu | Ser | Ala |       |     |     |     |
|     |                            |     | 340 |     |     |     |     | 345 |     |     |     |     | 350 |     |     |       |     |     |     |
| Leu | Glu                        | Pro | Lys | Ser | Cys | Asp | Lys | Thr | His | Thr | Cys | Pro | Pro | Cys | Pro |       |     |     |     |
|     |                            | 355 |     |     |     |     | 360 |     |     |     |     | 365 |     |     |     |       |     |     |     |
| Ala | Pro                        | Glu | Leu | Leu | Gly | Gly | Pro | Ser | Val | Phe | Leu | Phe | Pro | Pro | Lys |       |     |     |     |
|     | 370                        |     |     |     |     | 375 |     |     |     |     | 380 |     |     |     |     |       |     |     |     |
| Pro | Lys                        | Asp | Thr | Leu | Met | Ile | Ser | Arg | Thr | Pro | Glu | Val | Thr | Cys | Val |       |     |     |     |
| 385 |                            |     |     |     | 390 |     |     |     |     | 395 |     |     |     |     | 400 |       |     |     |     |
| Val | Val                        | Asp | Val | Ser | His | Glu | Asp | Pro | Glu | Val | Lys | Phe | Asn | Trp | Tyr |       |     |     |     |
|     |                            |     |     | 405 |     |     |     |     | 410 |     |     |     |     | 415 |     |       |     |     |     |
| Val | Asp                        | Gly | Val | Glu | Val | His | Asn | Ala | Lys | Thr | Lys | Pro | Arg | Glu | Glu |       |     |     |     |
|     |                            |     | 420 |     |     |     |     | 425 |     |     |     |     | 430 |     |     |       |     |     |     |
| Gln | Tyr                        | Asn | Ser | Thr | Tyr | Arg | Val | Val | Ser | Val | Leu | Thr | Val | Leu | His |       |     |     |     |
|     |                            | 435 |     |     |     |     | 440 |     |     |     |     | 445 |     |     |     |       |     |     |     |

183

TRADUCCION SECUENCIAS COLO 15828 841 002 6  
 Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys  
 450 455 460

Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln  
 465 470 475 480

Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu  
 485 490 495

Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro  
 500 505 510

Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn  
 515 520 525

Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu  
 530 535 540

Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val  
 545 550 555 560

Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln  
 565 570 575

Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly  
 580

<210> 3  
 <211> 1050  
 <212> DNA  
 <213> Homo sapiens

<220>  
 <221> CDS  
 <222> (1)..(1050)

|                                                                 |     |
|-----------------------------------------------------------------|-----|
| <400> 3                                                         |     |
| tta gtt gag gat acc aca tta gag cca gaa gag cca cca act aaa tac | 48  |
| Leu Val Glu Asp Thr Thr Leu Glu Pro Glu Glu Pro Pro Thr Lys Tyr |     |
| 1 5 10 15                                                       |     |
| caa atc tct caa cca gaa gtg tac gtg gct gca cca ggg gag tcg cta | 96  |
| Gln Ile Ser Gln Pro Glu Val Tyr Val Ala Ala Pro Gly Glu Ser Leu |     |
| 20 25 30                                                        |     |
| gag gtg cgc tgc ctg ttg aaa gat gcc gcc gtg atc agt tgg act aag | 144 |
| Glu Val Arg Cys Leu Leu Lys Asp Ala Ala Val Ile Ser Trp Thr Lys |     |
| 35 40 45                                                        |     |
| gat ggg gtg cac ttg ggg ccc aac aat agg aca gtg ctt att ggg gag | 192 |
| Asp Gly Val His Leu Gly Pro Asn Asn Arg Thr Val Leu Ile Gly Glu |     |
| 50 55 60                                                        |     |
| tac ttg cag ata aag ggc gcc acg cct aga gac tcc ggc ctc tat gct | 240 |
| Tyr Leu Gln Ile Lys Gly Ala Thr Pro Arg Asp Ser Gly Leu Tyr Ala |     |
| 65 70 75 80                                                     |     |
| tgt act gcc agt agg act gta gac agt gaa act tgg tac ttc atg gtg | 288 |
| Cys Thr Ala Ser Arg Thr Val Asp Ser Glu Thr Trp Tyr Phe Met Val |     |
| 85 90 95                                                        |     |
| aat gtc aca gat gcc atc tca tcc gga gat gat gag gat gac acc gat | 336 |
| Asn Val Thr Asp Ala Ile Ser Ser Gly Asp Asp Glu Asp Thr Asp     |     |
| 100 105 110                                                     |     |

184

| TRADUCCION SECUENCIAS COLO 15828 841 002 6                      |                                                                 |     |     |     |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |      |
|-----------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------|-----|-----|-----|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|------|
| ggt gcg gaa gat ttt gtc agt gag aac agt aac aac aag aga gca cca | Gly Ala Glu Asp Phe Val Ser Glu Asn Ser Asn Asn Lys Arg Ala Pro | 115 | 120 | 125 |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  | 384  |
| tac tgg acc aac aca gaa aag atg gaa aag cgg ctc cat gct gtg cct | Tyr Trp Thr Asn Thr Glu Lys Met Glu Lys Arg Leu His Ala Val Pro | 130 | 135 | 140 |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  | 432  |
| gcg gcc aac act gtc aag ttt cgc tgc cca gcc ggg ggg aac cca atg | Ala Ala Asn Thr Val Lys Phe Arg Cys Pro Ala Gly Gly Asn Pro Met | 145 | 150 | 155 |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  | 480  |
| cca acc atg cgg tgg ctg aaa aac ggg aag gag ttt aag cag gag cat | Pro Thr Met Arg Trp Leu Lys Asn Gly Lys Glu Phe Lys Gln Glu His | 165 | 170 |     |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  | 528  |
| cgc att gga ggc tac aag gta cga aac cag cac tgg agc ctc att atg | Arg Ile Gly Gly Tyr Lys Val Arg Asn Gln His Trp Ser Leu Ile Met | 180 | 185 |     |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  | 576  |
| gaa agt gtg gtc cca tct gac aag gga aat tat acc tgt gtg gtg gag | Glu Ser Val Val Pro Ser Asp Lys Gly Asn Tyr Thr Cys Val Val Glu | 195 | 200 |     |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  | 624  |
| aat gaa tac ggg tcc atc aat cac acg tac cac ctg gat gtt gtg gag | Asn Glu Tyr Gly Ser Ile Asn His Thr Tyr His Leu Asp Val Val Glu | 210 | 215 |     |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  | 672  |
| cga tcg cct cac cgg ccc atc ctc caa gcc gga ctg ccg gca aat gcc | Arg Ser Pro His Arg Pro Ile Leu Gln Ala Gly Leu Pro Ala Asn Ala | 225 | 230 | 235 |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  | 720  |
| tcc aca gtg gtc gga gga gac gta gag ttt gtc tgc aag gtt tac agt | Ser Thr Val Val Gly Gly Asp Val Glu Phe Val Cys Lys Val Tyr Ser | 245 | 250 |     |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  | 768  |
| gat gcc cag ccc cac atc cag tgg atc aag cac gtg gaa aag aac ggc | Asp Ala Gln Pro His Ile Gln Trp Ile Lys His Val Glu Lys Asn Gly | 260 | 265 |     |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  | 816  |
| agt aaa tac ggg ccc gac ggg ctg ccc tac ctc aag gtt ctc aag gcc | Ser Lys Tyr Gly Pro Asp Gly Leu Pro Tyr Leu Lys Val Leu Lys Ala | 275 | 280 |     |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  | 864  |
| gcc ggt gtt aac acc acg gac aaa gag att gag gtt ctc tat att cgg | Ala Gly Val Asn Thr Thr Asp Lys Glu Ile Glu Val Leu Tyr Ile Arg | 290 | 295 | 300 |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  | 912  |
| aat gta act ttt gag gac gct ggg gaa tat acg tgc ttg gcg ggt aat | Asn Val Thr Phe Glu Asp Ala Gly Glu Tyr Thr Cys Leu Ala Gly Asn | 305 | 310 | 315 |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  | 960  |
| tct att ggg ata tcc ttt cac tct gca tgg ttg aca gtt ctg cca gcg | Ser Ile Gly Ile Ser Phe His Ser Ala Trp Leu Thr Val Leu Pro Ala | 325 | 330 | 335 |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  | 1008 |
| cct gga aga gaa aag gag att aca gct tcc cca gac tac ctg         | Pro Gly Arg Glu Lys Glu Ile Thr Ala Ser Pro Asp Tyr Leu         | 340 | 345 | 350 |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  | 1050 |
| <210> 4                                                         |                                                                 |     |     |     |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |      |
| <211> 350                                                       |                                                                 |     |     |     |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |      |
| <212> PRT                                                       |                                                                 |     |     |     |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |      |
| <213> Homo sapiens                                              |                                                                 |     |     |     |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |      |
| <400> 4                                                         |                                                                 |     |     |     |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |      |
| Leu Val Glu Asp Thr Thr Leu Glu Pro Glu Glu Pro Pro Thr Lys Tyr | 1 5 10 15                                                       |     |     |     |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |      |
| Gln Ile Ser Gln Pro Glu Val Tyr Val Ala Ala Pro Gly Glu Ser Leu | 20 25 30                                                        |     |     |     |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |      |

185

TRADUCCION SECUENCIAS COLO 15828 841 002 6

Glu Val Arg Cys Leu Leu Lys Asp Ala Ala Val Ile Ser Trp Thr Lys  
35 40 45

Asp Gly Val His Leu Gly Pro Asn Asn Arg Thr Val Leu Ile Gly Glu  
50 55 60

Tyr Leu Gln Ile Lys Gly Ala Thr Pro Arg Asp Ser Gly Leu Tyr Ala  
65 70 75 80

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

Asn Val Thr Asp Ala Ile Ser Ser Gly Asp Asp Glu Asp Asp Thr Asp  
100 105 110

Gly Ala Glu Asp Phe Val Ser Glu Asn Ser Asn Asn Lys Arg Ala Pro  
115 120 125

Tyr Trp Thr Asn Thr Glu Lys Met Glu Lys Arg Leu His Ala Val Pro  
130 135 140

Ala Ala Asn Thr Val Lys Phe Arg Cys Pro Ala Gly Gly Asn Pro Met  
145 150 155 160

Pro Thr Met Arg Trp Leu Lys Asn Gly Lys Glu Phe Lys Gln Glu His  
165 170 175

Arg Ile Gly Gly Tyr Lys Val Arg Asn Gln His Trp Ser Leu Ile Met  
180 185 190

Glu Ser Val Val Pro Ser Asp Lys Gly Asn Tyr Thr Cys Val Val Glu  
195 200 205

Asn Glu Tyr Gly Ser Ile Asn His Thr Tyr His Leu Asp Val Val Glu  
210 215 220

Arg Ser Pro His Arg Pro Ile Leu Gln Ala Gly Leu Pro Ala Asn Ala  
225 230 235 240

Ser Thr Val Val Gly Gly Asp Val Glu Phe Val Cys Lys Val Tyr Ser  
245 250 255

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

Ser Lys Tyr Gly Pro Asp Gly Leu Pro Tyr Leu Lys Val Leu Lys Ala  
275 280 285

Ala Gly Val Asn Thr Thr Asp Lys Glu Ile Glu Val Leu Tyr Ile Arg  
290 295 300

Asn Val Thr Phe Glu Asp Ala Gly Glu Tyr Thr Cys Leu Ala Gly Asn  
305 310 315 320

Ser Ile Gly Ile Ser Phe His Ser Ala Trp Leu Thr Val Leu Pro Ala  
325 330 335

TRADUCCION SECUENCIAS COLO 15828 841 002 6

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

```
<210> 5
<211> 696
<212> DNA
<213> Homo sapiens
```

```
<220>
<221> CDS
<222> (1)..(696)
```

[illegible]

187

TRADUCCION SECUENCIAS COLO 15828 841 002 6  
230

225

<210> 6  
<211> 231  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 6

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly  
225 230

<210> 7  
<211> 60  
<212> DNA  
<213> Homo sapiens

188

TRADUCCION SECUENCIAS COLO 15828 841 002 6

<220>  
<221> CDS  
<222> (1)..(60)

<400> 7  
atg tac agg atg caa ctc ctg tct tgc att gca cta agt ctt gca ctt 48  
Met Tyr Arg Met Gln Leu Leu Ser Cys Ile Ala Leu Ser Leu Ala Leu  
1 5 10 15  
  
gtc acg aat tca 60  
Val Thr Asn Ser  
20

<210> 8  
<211> 20  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 8  
Met Tyr Arg Met Gln Leu Leu Ser Cys Ile Ala Leu Ser Leu Ala Leu  
1 5 10 15  
  
Val Thr Asn Ser  
20

<210> 9  
<211> 1197  
<212> DNA  
<213> Homo sapiens

<220>  
<221> CDS  
<222> (1)..(1197)

<400> 9  
atg agg ctt cgg gag ccg ctc ctg agc ggc agc gcc gcg atg cca ggc 48  
Met Arg Leu Arg Glu Pro Leu Leu Ser Gly Ser Ala Ala Met Pro Gly  
1 5 10 15  
  
gcg tcc cta cag cgg gcc tgc cgc ctg ctc gtg gcc gtc tgc gct ctg 96  
Ala Ser Leu Gln Arg Ala Cys Arg Leu Leu Val Ala Val Cys Ala Leu  
20 25 30  
  
cac ctt ggc gtc acc ctc gtt tac tac ctg gct ggc cgc gac ctg agc 144  
His Leu Gly Val Thr Leu Val Tyr Tyr Leu Ala Gly Arg Asp Leu Ser  
35 40 45  
  
cgc ctg ccc caa ctg gtc gga gtc tcc aca ccg ctg cag ggc ggc tcg 192  
Arg Leu Pro Gln Leu Val Gly Val Ser Thr Pro Leu Gln Gly Gly Ser  
50 55 60  
  
aac agt gcc gcc gcc atc ggg cag tcc tcc ggg gag ctc cgg acc gga 240  
Asn Ser Ala Ala Ala Ile Gly Gln Ser Ser Gly Glu Leu Arg Thr Gly  
65 70 75 80  
  
ggg gcc cgg ccg ccg cct cct cta ggc gcc tcc tcc cag ccg cgc ccg 288  
Gly Ala Arg Pro Pro Pro Pro Leu Gly Ala Ser Ser Gln Pro Arg Pro  
85 90 95  
  
ggt ggc gac tcc agc cca gtc gtg gat tct ggc cct ggc ccc gct agc 336  
Gly Gly Asp Ser Ser Pro Val Val Asp Ser Gly Pro Gly Pro Ala Ser  
100 105 110  
  
aac ttg acc tcg gtc cca gtg ccc cac acc acc gca ctg tcg ctg ccc 384  
Asn Leu Thr Ser Val Pro Val Pro His Thr Thr Ala Leu Ser Leu Pro  
115 120 125  
  
gcc tgc cct gag gag tcc ccg ctg ctt gtg ggc ccc atg ctg att gag 432  
Ala Cys Pro Glu Glu Ser Pro Leu Leu Val Gly Pro Met Leu Ile Glu  
Página 10

TRADUCCION SECUENCIAS COLO 15828 841 002 6  
135 140

|                   |                   |                   |                   |                   |                   |                   |                   |                   |                   |                   |                   |                   |                   |                   |                   |      |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|------|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|
| 130               | 135               |                   |                   |                   |                   |                   |                   |                   |                   |                   |                   |                   |                   |                   |                   | 140  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| ttt<br>Phe<br>145 | aac<br>Asn        | atg<br>Met        | cct<br>Pro        | gtg<br>Val        | gac<br>Asp<br>150 | ctg<br>Leu        | gag<br>Glu        | ctc<br>Leu        | gtg<br>Val        | gca<br>Ala<br>155 | aag<br>Lys        | cag<br>Gln        | aac<br>Asn        | cca<br>Pro        | aat<br>Asn<br>160 | 480  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| gtg<br>Val        | aag<br>Lys        | atg<br>Met        | ggc<br>Gly        | ggc<br>Gly<br>165 | cgc<br>Arg        | tat<br>Tyr        | gcc<br>Ala        | ccc<br>Pro        | agg<br>Arg<br>170 | gac<br>Asp        | tgc<br>Cys        | gtc<br>Val        | tct<br>Ser        | cct<br>Pro<br>175 | cac<br>His        | 528  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| aag<br>Lys        | gtg<br>Val        | gcc<br>Ala        | atc<br>Ile<br>180 | atc<br>Ile        | att<br>Ile        | cca<br>Pro        | ttc<br>Phe        | cgc<br>Arg<br>185 | aac<br>Asn        | cgg<br>Arg        | cag<br>Gln        | gag<br>Glu        | cac<br>His<br>190 | ctc<br>Leu        | aag<br>Lys        | 576  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| tac<br>Tyr        | tgg<br>Trp        | cta<br>Leu<br>195 | tat<br>Tyr        | tat<br>Tyr        | ttg<br>Leu        | cat<br>His        | cca<br>Pro<br>200 | gtc<br>Val        | ctg<br>Leu        | cag<br>Gln        | cgc<br>Arg        | cag<br>Gln<br>205 | cag<br>Gln        | ctg<br>Leu        | gac<br>Asp        | 624  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| tat<br>Tyr        | ggc<br>Gly<br>210 | atc<br>Ile        | tat<br>Tyr        | gtt<br>Val        | atc<br>Ile        | aac<br>Asn<br>215 | cag<br>Gln        | gcg<br>Ala        | gga<br>Gly        | gac<br>Asp        | act<br>Thr<br>220 | ata<br>Ile        | ttc<br>Phe        | aat<br>Asn        | cgt<br>Arg        | 672  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| gct<br>Ala<br>225 | aag<br>Lys        | ctc<br>Leu        | ctc<br>Leu        | aat<br>Asn        | gtt<br>Val<br>230 | ggc<br>Gly        | ttt<br>Phe        | caa<br>Gln        | gaa<br>Glu        | gcc<br>Ala<br>235 | ttg<br>Leu        | aag<br>Lys        | gac<br>Asp        | tat<br>Tyr        | gac<br>Asp<br>240 | 720  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| tac<br>Tyr        | acc<br>Thr        | tgc<br>Cys        | ttt<br>Phe        | gtg<br>Val<br>245 | ttt<br>Phe        | agt<br>Ser        | gac<br>Asp        | gtg<br>Val        | gac<br>Asp<br>250 | ctc<br>Leu        | att<br>Ile        | cca<br>Pro        | atg<br>Met        | aat<br>Asn<br>255 | gac<br>Asp        | 768  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| cat<br>His        | aat<br>Asn        | gcg<br>Ala        | tac<br>Tyr<br>260 | agg<br>Arg        | tgt<br>Cys        | ttt<br>Phe        | tca<br>Ser        | cag<br>Gln<br>265 | cca<br>Pro        | cgg<br>Arg        | cac<br>His        | att<br>Ile        | tcc<br>Ser<br>270 | gtt<br>Val        | gca<br>Ala        | 816  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| atg<br>Met        | gat<br>Asp        | aag<br>Lys<br>275 | ttt<br>Phe        | gga<br>Gly        | ttc<br>Phe        | agc<br>Ser        | cta<br>Leu<br>280 | cct<br>Pro        | tat<br>Tyr        | gtt<br>Val        | cag<br>Gln        | tat<br>Tyr<br>285 | ttt<br>Phe        | gga<br>Gly        | ggt<br>Gly        | 864  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| gtc<br>Val        | tct<br>Ser<br>290 | gct<br>Ala        | cta<br>Leu        | agt<br>Ser        | aaa<br>Lys        | caa<br>Gln<br>295 | cag<br>Gln        | ttt<br>Phe        | cta<br>Leu        | acc<br>Thr        | atc<br>Ile<br>300 | aat<br>Asn        | gga<br>Gly        | ttt<br>Phe        | cct<br>Pro        | 912  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| aat<br>Asn<br>305 | aat<br>Asn        | tat<br>Tyr        | tgg<br>Trp        | ggc<br>Gly        | tgg<br>Trp<br>310 | gga<br>Gly        | gga<br>Gly        | gaa<br>Glu        | gat<br>Asp        | gat<br>Asp<br>315 | gac<br>Asp        | att<br>Ile        | ttt<br>Phe        | aac<br>Asn        | aga<br>Arg<br>320 | 960  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| tta<br>Leu        | gtt<br>Val        | ttt<br>Phe        | aga<br>Arg        | ggc<br>Gly<br>325 | atg<br>Met        | tct<br>Ser        | ata<br>Ile        | tct<br>Ser        | cgc<br>Arg<br>330 | cca<br>Pro        | aat<br>Asn        | gct<br>Ala        | gtg<br>Val        | gtc<br>Val<br>335 | ggg<br>Gly        | 1008 |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| agg<br>Arg        | tgt<br>Cys        | cgc<br>Arg        | atg<br>Met<br>340 | atc<br>Ile        | cgc<br>Arg        | cac<br>His        | tca<br>Ser        | aga<br>Arg<br>345 | gac<br>Asp        | aag<br>Lys        | aaa<br>Lys        | aat<br>Asn        | gaa<br>Glu<br>350 | ccc<br>Pro        | aat<br>Asn        | 1056 |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| cct<br>Pro        | cag<br>Gln        | agg<br>Arg<br>355 | ttt<br>Phe        | gac<br>Asp        | cga<br>Arg        | att<br>Ile        | gca<br>Ala<br>360 | cac<br>His        | aca<br>Thr        | aag<br>Lys        | gag<br>Glu        | aca<br>Thr<br>365 | atg<br>Met        | ctc<br>Leu        | tct<br>Ser        | 1104 |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| gat<br>Asp        | ggt<br>Gly<br>370 | ttg<br>Leu        | aac<br>Asn        | tca<br>Ser        | ctc<br>Leu        | acc<br>Thr<br>375 | tac<br>Tyr        | cag<br>Gln        | gtg<br>Val        | ctg<br>Leu        | gat<br>Asp<br>380 | gta<br>Val        | cag<br>Gln        | aga<br>Arg        | tac<br>Tyr        | 1152 |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| cca<br>Pro<br>385 | ttg<br>Leu        | tat<br>Tyr        | acc<br>Thr        | caa<br>Gln        | atc<br>Ile<br>390 | aca<br>Thr        | gtg<br>Val        | gac<br>Asp        | atc<br>Ile        | ggg<br>Gly<br>395 | aca<br>Thr        | ccg<br>Pro        | agc<br>Ser        | tag               |                   | 1197 |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |

<210> 10  
<211> 398  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens  
  
<400> 10

190

TRADUCCION SECUENCIAS COLO 15828 841 002 6

1 5 10 15

Ala Ser Leu Gln Arg Ala Cys Arg Leu Leu Val Ala Val Cys Ala Leu  
20 25 30

His Leu Gly Val Thr Leu Val Tyr Tyr Leu Ala Gly Arg Asp Leu Ser  
35 40 45

Arg Leu Pro Gln Leu Val Gly Val Ser Thr Pro Leu Gln Gly Gly Ser  
50 55 60

Asn Ser Ala Ala Ala Ile Gly Gln Ser Ser Gly Glu Leu Arg Thr Gly  
65 70 75 80

Gly Ala Arg Pro Pro Pro Pro Leu Gly Ala Ser Ser Gln Pro Arg Pro  
85 90 95

Gly Gly Asp Ser Ser Pro Val Val Asp Ser Gly Pro Gly Pro Ala Ser  
100 105 110

Asn Leu Thr Ser Val Pro Val Pro His Thr Thr Ala Leu Ser Leu Pro  
115 120 125

Ala Cys Pro Glu Glu Ser Pro Leu Leu Val Gly Pro Met Leu Ile Glu  
130 135 140

Phe Asn Met Pro Val Asp Leu Glu Leu Val Ala Lys Gln Asn Pro Asn  
145 150 155 160

Val Lys Met Gly Gly Arg Tyr Ala Pro Arg Asp Cys Val Ser Pro His  
165 170 175

Lys Val Ala Ile Ile Ile Pro Phe Arg Asn Arg Gln Glu His Leu Lys  
180 185 190

Tyr Trp Leu Tyr Tyr Leu His Pro Val Leu Gln Arg Gln Gln Leu Asp  
195 200 205

Tyr Gly Ile Tyr Val Ile Asn Gln Ala Gly Asp Thr Ile Phe Asn Arg  
210 215 220

Ala Lys Leu Leu Asn Val Gly Phe Gln Glu Ala Leu Lys Asp Tyr Asp  
225 230 235 240

Tyr Thr Cys Phe Val Phe Ser Asp Val Asp Leu Ile Pro Met Asn Asp  
245 250 255

His Asn Ala Tyr Arg Cys Phe Ser Gln Pro Arg His Ile Ser Val Ala  
260 265 270

Met Asp Lys Phe Gly Phe Ser Leu Pro Tyr Val Gln Tyr Phe Gly Gly  
275 280 285

Val Ser Ala Leu Ser Lys Gln Gln Phe Leu Thr Ile Asn Gly Phe Pro  
290 295 300

191

TRADUCCION SECUENCIAS COLO 15828 841 002 6

Asn Asn Tyr Trp Gly Trp Gly Gly Glu Asp Asp Asp Ile Phe Asn Arg  
305 310 315 320

Leu Val Phe Arg Gly Met Ser Ile Ser Arg Pro Asn Ala Val Val Gly  
325 330 335

Arg Cys Arg Met Ile Arg His Ser Arg Asp Lys Lys Asn Glu Pro Asn  
340 345 350

Pro Gln Arg Phe Asp Arg Ile Ala His Thr Lys Glu Thr Met Leu Ser  
355 360 365

Asp Gly Leu Asn Ser Leu Thr Tyr Gln Val Leu Asp Val Gln Arg Tyr  
370 375 380

Pro Leu Tyr Thr Gln Ile Thr Val Asp Ile Gly Thr Pro Ser  
385 390 395

<210> 11  
<211> 1128  
<212> DNA  
<213> Homo sapiens

<220>  
<221> CDS  
<222> (1)..(1128)

|                                                                 |     |
|-----------------------------------------------------------------|-----|
| <400> 11                                                        |     |
| atg gga ctc ttg gta ttt gtg cgc aat ctg ctg cta gcc ctc tgc ctc | 48  |
| Met Gly Leu Leu Val Phe Val Arg Asn Leu Leu Leu Ala Leu Cys Leu |     |
| 1 5 10 15                                                       |     |
| ttt ctg gta ctg gga ttt ttg tat tat tct gcg tgg aag cta cac tta | 96  |
| Phe Leu Val Leu Gly Phe Leu Tyr Tyr Ser Ala Trp Lys Leu His Leu |     |
| 20 25 30                                                        |     |
| ctc cag tgg gag gag gac tcc aat tca gtg gtt ctt tcc ttt gac tcc | 144 |
| Leu Gln Trp Glu Glu Asp Ser Asn Ser Val Val Leu Ser Phe Asp Ser |     |
| 35 40 45                                                        |     |
| gct gga caa aca cta ggc tca gag tat gat cgg ttg ggc ttc ctc ctg | 192 |
| Ala Gly Gln Thr Leu Gly Ser Glu Tyr Asp Arg Leu Gly Phe Leu Leu |     |
| 50 55 60                                                        |     |
| aat ctg gac tct aaa ctg cct gct gaa tta gcc acc aag tac gca aac | 240 |
| Asn Leu Asp Ser Lys Leu Pro Ala Glu Leu Ala Thr Lys Tyr Ala Asn |     |
| 65 70 75 80                                                     |     |
| ttt tca gag gga gct tgc aag cct ggc tat gct tca gcc ttg atg acg | 288 |
| Phe Ser Glu Gly Ala Cys Lys Pro Gly Tyr Ala Ser Ala Leu Met Thr |     |
| 85 90 95                                                        |     |
| gcc atc ttc ccc cgg ttc tcc aag cca gca ccc atg ttc ctg gat gac | 336 |
| Ala Ile Phe Pro Arg Phe Ser Lys Pro Ala Pro Met Phe Leu Asp Asp |     |
| 100 105 110                                                     |     |
| tcc ttt cgc aag tgg gct aga atc cgg gag ttc gtg ccg cct ttt ggg | 384 |
| Ser Phe Arg Lys Trp Ala Arg Ile Arg Glu Phe Val Pro Pro Phe Gly |     |
| 115 120 125                                                     |     |
| atc aaa ggt caa gac aat ctg atc aaa gcc atc ttg tca gtc acc aaa | 432 |
| Ile Lys Gly Gln Asp Asn Leu Ile Lys Ala Ile Leu Ser Val Thr Lys |     |
| 130 135 140                                                     |     |
| gag tac cgc ctg acc cct gcc ttg gac agc ctc cgc tgc cgc cgc tgc | 480 |
| Glu Tyr Arg Leu Thr Pro Ala Leu Asp Ser Leu Arg Cys Arg Arg Cys |     |
| 145 150 155 160                                                 |     |

| TRADUCCION SECUENCIAS COLO 15828 841 002 6 |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |      |
|--------------------------------------------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|------|
| atc                                        | atc | gtg | ggc | aat | gga | ggc | gtt | ctt | gcc | aac | aag | tct | ctg | ggg | tca | 528  |
| Ile                                        | Ile | Val | Gly | Asn | Gly | Gly | Val | Leu | Ala | Asn | Lys | Ser | Leu | Gly | Ser |      |
|                                            |     |     |     | 165 |     |     |     |     | 170 |     |     |     |     | 175 |     |      |
| cga                                        | att | gac | gac | tat | gac | att | gtg | gtg | aga | ctg | aat | tca | gca | cca | gtg | 576  |
| Arg                                        | Ile | Asp | Asp | Tyr | Asp | Ile | Val | Val | Arg | Leu | Asn | Ser | Ala | Pro | Val |      |
|                                            |     |     |     | 180 |     |     |     | 185 |     |     |     |     |     | 190 |     |      |
| aaa                                        | ggc | ttt | gag | aag | gac | gtg | ggc | agc | aaa | acg | aca | ctg | cgc | atc | acc | 624  |
| Lys                                        | Gly | Phe | Glu | Lys | Asp | Val | Gly | Ser | Lys | Thr | Thr | Leu | Arg | Ile | Thr |      |
|                                            |     | 195 |     |     |     |     | 200 |     |     |     |     | 205 |     |     |     |      |
| tac                                        | ccc | gag | ggc | gcc | atg | cag | cgg | cct | gag | cag | tac | gag | cgc | gat | tct | 672  |
| Tyr                                        | Pro | Glu | Gly | Ala | Met | Gln | Arg | Pro | Glu | Gln | Tyr | Glu | Arg | Asp | Ser |      |
|                                            |     | 210 |     |     |     | 215 |     |     |     |     | 220 |     |     |     |     |      |
| ctc                                        | ttt | gtc | ctc | gcc | ggc | ttc | aag | tgg | cag | gac | ttt | aag | tgg | ttg | aaa | 720  |
| Leu                                        | Phe | Val | Leu | Ala | Gly | Phe | Lys | Trp | Gln | Asp | Phe | Lys | Trp | Leu | Lys |      |
|                                            |     |     |     |     | 230 |     |     |     |     | 235 |     |     |     |     | 240 |      |
| tac                                        | atc | gtc | tac | aag | gag | aga | gtg | agt | gca | tcg | gat | ggc | ttc | tgg | aaa | 768  |
| Tyr                                        | Ile | Val | Tyr | Lys | Glu | Arg | Val | Ser | Ala | Ser | Asp | Gly | Phe | Trp | Lys |      |
|                                            |     |     |     | 245 |     |     |     |     | 250 |     |     |     |     | 255 |     |      |
| tct                                        | gtg | gcc | act | cga | gtg | ccc | aag | gag | ccc | cct | gag | att | cga | atc | ctc | 816  |
| Ser                                        | Val | Ala | Thr | Arg | Val | Pro | Lys | Glu | Pro | Pro | Glu | Ile | Arg | Ile | Leu |      |
|                                            |     |     |     | 260 |     |     |     | 265 |     |     |     |     | 270 |     |     |      |
| aac                                        | cca | tat | ttc | atc | cag | gag | gcc | gcc | ttc | acc | ctc | att | ggc | ctg | ccc | 864  |
| Asn                                        | Pro | Tyr | Phe | Ile | Gln | Glu | Ala | Ala | Phe | Thr | Leu | Ile | Gly | Leu | Pro |      |
|                                            |     | 275 |     |     |     |     | 280 |     |     |     |     | 285 |     |     |     |      |
| ttc                                        | aac | aat | ggc | ctc | atg | ggc | cgg | ggg | aac | atc | cct | acc | ctt | ggc | agt | 912  |
| Phe                                        | Asn | Asn | Gly | Leu | Met | Gly | Arg | Gly | Asn | Ile | Pro | Thr | Leu | Gly | Ser |      |
|                                            |     | 290 |     |     |     | 295 |     |     |     |     | 300 |     |     |     |     |      |
| gtg                                        | gca | gtg | acc | atg | gca | cta | cac | ggc | tgt | gac | gag | gtg | gca | gtc | gca | 960  |
| Val                                        | Ala | Val | Thr | Met | Ala | Leu | His | Gly | Cys | Asp | Glu | Val | Ala | Val | Ala |      |
|                                            |     | 305 |     |     | 310 |     |     |     |     | 315 |     |     |     |     | 320 |      |
| gga                                        | ttt | ggc | tat | gac | atg | agc | aca | ccc | aac | gca | ccc | ctg | cac | tac | tat | 1008 |
| Gly                                        | Phe | Gly | Tyr | Asp | Met | Ser | Thr | Pro | Asn | Ala | Pro | Leu | His | Tyr | Tyr |      |
|                                            |     |     |     | 325 |     |     |     |     | 330 |     |     |     |     | 335 |     |      |
| gag                                        | acc | gtt | cgc | atg | gca | gcc | atc | aaa | gag | tcc | tgg | acg | cac | aat | atc | 1056 |
| Glu                                        | Thr | Val | Arg | Met | Ala | Ala | Ile | Lys | Glu | Ser | Trp | Thr | His | Asn | Ile |      |
|                                            |     |     |     | 340 |     |     |     | 345 |     |     |     |     | 350 |     |     |      |
| cag                                        | cga | gag | aaa | gag | ttt | ctg | cgg | aag | ctg | gtg | aaa | gct | cgc | gtc | atc | 1104 |
| Gln                                        | Arg | Glu | Lys | Glu | Phe | Leu | Arg | Lys | Leu | Val | Lys | Ala | Arg | Val | Ile |      |
|                                            |     | 355 |     |     |     |     | 360 |     |     |     |     | 365 |     |     |     |      |
| act                                        | gat | cta | agc | agt | ggc | atc | tga |     |     |     |     |     |     |     |     | 1128 |
| Thr                                        | Asp | Leu | Ser | Ser | Gly | Ile |     |     |     |     |     |     |     |     |     |      |
|                                            |     | 370 |     |     |     | 375 |     |     |     |     |     |     |     |     |     |      |

<210> 12  
 <211> 375  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens  
 <400> 12

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

TRADUCCION SECUENCIAS COLO 15828 841 002 6

Ala Gly Gln Thr Leu Gly Ser Glu Tyr Asp Arg Leu Gly Phe Leu Leu  
50 55 60

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

Phe Ser Glu Gly Ala Cys Lys Pro Gly Tyr Ala Ser Ala Leu Met Thr  
85 90 95

Ala Ile Phe Pro Arg Phe Ser Lys Pro Ala Pro Met Phe Leu Asp Asp  
100 105 110

Ser Phe Arg Lys Trp Ala Arg Ile Arg Glu Phe Val Pro Pro Phe Gly  
115 120 125

Ile Lys Gly Gln Asp Asn Leu Ile Lys Ala Ile Leu Ser Val Thr Lys  
130 135 140

Glu Tyr Arg Leu Thr Pro Ala Leu Asp Ser Leu Arg Cys Arg Arg Cys  
145 150 155 160

Ile Ile Val Gly Asn Gly Gly Val Leu Ala Asn Lys Ser Leu Gly Ser  
165 170 175

Arg Ile Asp Asp Tyr Asp Ile Val Val Arg Leu Asn Ser Ala Pro Val  
180 185 190

Lys Gly Phe Glu Lys Asp Val Gly Ser Lys Thr Thr Leu Arg Ile Thr  
195 200 205

Tyr Pro Glu Gly Ala Met Gln Arg Pro Glu Gln Tyr Glu Arg Asp Ser  
210 215 220

Leu Phe Val Leu Ala Gly Phe Lys Trp Gln Asp Phe Lys Trp Leu Lys  
225 230 235 240

Tyr Ile Val Tyr Lys Glu Arg Val Ser Ala Ser Asp Gly Phe Trp Lys  
245 250 255

Ser Val Ala Thr Arg Val Pro Lys Glu Pro Pro Glu Ile Arg Ile Leu  
260 265 270

Asn Pro Tyr Phe Ile Gln Glu Ala Ala Phe Thr Leu Ile Gly Leu Pro  
275 280 285

Phe Asn Asn Gly Leu Met Gly Arg Gly Asn Ile Pro Thr Leu Gly Ser  
290 295 300

Val Ala Val Thr Met Ala Leu His Gly Cys Asp Glu Val Ala Val Ala  
305 310 315 320

Gly Phe Gly Tyr Asp Met Ser Thr Pro Asn Ala Pro Leu His Tyr Tyr  
325 330 335

Glu Thr Val Arg Met Ala Ala Ile Lys Glu Ser Trp Thr His Asn Ile  
340 345 350

TRADUCCION SECUENCIAS COLO 15828 841 002 6

Gln Arg Glu Lys Glu Phe Leu Arg Lys Leu Val Lys Ala Arg Val Ile  
355 360 365

Thr Asp Leu Ser Ser Gly Ile  
370 375

|       |              |
|-------|--------------|
| <210> | 13           |
| <211> | 1722         |
| <212> | DNA          |
| <213> | Homo sapiens |

<220>  
<221> CDS  
<222> (1) .. (1722)

|       |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|-------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| <400> | 13  |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
| tta   | ggt | gag | gat | acc | aca | tta | gag | cca | gaa | gag | cca | cca | act | aaa | tac | 48  |
| Leu   | Val | Glu | Asp | Thr | Thr | Leu | Glu | Pro | Glu | Glu | Pro | Pro | Thr | Lys | Tyr |     |
| 1     |     |     |     | 5   |     |     |     |     | 10  |     |     |     |     | 15  |     |     |
| caa   | atc | tct | caa | cca | gaa | gtg | tac | gtg | gct | gca | cca | ggg | gag | tcg | cta | 96  |
| Gln   | Ile | Ser | Gln | Pro | Glu | Val | Tyr | Val | Ala | Ala | Pro | Gly | Glu | Ser | Leu |     |
|       |     |     | 20  |     |     |     |     | 25  |     |     |     |     | 30  |     |     |     |
| gag   | gtg | cgc | tgc | ctg | ttg | aaa | gat | gcc | gcc | gtg | atc | agt | tgg | act | aag | 144 |
| Glu   | Val | Arg | Cys | Leu | Leu | Lys | Asp | Ala | Ala | Val | Ile | Ser | Trp | Thr | Lys |     |
|       |     | 35  |     |     |     |     | 40  |     |     |     |     | 45  |     |     |     |     |
| gat   | ggg | gtg | cac | ttg | ggg | ccc | aac | aat | agg | aca | gtg | ctt | att | ggg | gag | 192 |
| Asp   | Gly | Val | His | Leu | Gly | Pro | Asn | Asn | Arg | Thr | Val | Leu | Ile | Gly | Glu |     |
|       | 50  |     |     |     |     | 55  |     |     |     |     | 60  |     |     |     |     |     |
| tac   | ttg | cag | ata | aag | ggc | gcc | acg | cct | aga | gac | tcc | ggc | ctc | tat | gct | 240 |
| Tyr   | Leu | Gln | Ile | Lys | Gly | Ala | Thr | Pro | Arg | Asp | Ser | Gly | Leu | Tyr | Ala |     |
| 65    |     |     |     |     | 70  |     |     |     |     | 75  |     |     |     |     | 80  |     |
| tgt   | act | gcc | agt | agg | act | gta | gac | agt | gaa | act | tgg | tac | ttc | atg | gtg | 288 |
| Cys   | Thr | Ala | Ser | Arg | Thr | Val | Asp | Ser | Glu | Thr | Trp | Tyr | Phe | Met | Val |     |
|       |     |     |     | 85  |     |     |     |     | 90  |     |     |     |     | 95  |     |     |
| aat   | gtc | aca | gat | gcc | atc | tca | tcc | gga | gat | gat | gag | gat | gac | acc | gat | 336 |
| Asn   | Val | Thr | Asp | Ala | Ile | Ser | Ser | Gly | Asp | Asp | Glu | Asp | Asp | Thr | Asp |     |
|       |     |     | 100 |     |     |     |     | 105 |     |     |     |     | 110 |     |     |     |
| ggt   | gcg | gaa | gat | ttt | gtc | agt | gag | aac | agt | aac | aac | aag | aga | gca | cca | 384 |
| Gly   | Ala | Glu | Asp | Phe | Val | Ser | Glu | Asn | Ser | Asn | Asn | Lys | Arg | Ala | Pro |     |
|       |     | 115 |     |     |     |     | 120 |     |     |     |     | 125 |     |     |     |     |
| tac   | tgg | acc | aac | aca | gaa | aag | atg | gaa | aag | cgg | ctc | cat | gct | gtg | cct | 432 |
| Tyr   | Trp | Thr | Asn | Thr | Glu | Lys | Met | Glu | Lys | Arg | Leu | His | Ala | Val | Pro |     |
|       | 130 |     |     |     |     | 135 |     |     |     |     | 140 |     |     |     |     |     |
| gcg   | gcc | aac | act | gtc | aag | ttt | cgc | tgc | cca | gcc | ggg | ggg | aac | cca | atg | 480 |
| Ala   | Ala | Asn | Thr | Val | Lys | Phe | Arg | Cys | Pro | Ala | Gly | Gly | Asn | Pro | Met |     |
| 145   |     |     |     |     | 150 |     |     |     |     | 155 |     |     |     |     | 160 |     |
| cca   | acc | atg | cgg | tgg | ctg | aaa | aac | ggg | aag | gag | ttt | aag | cag | gag | cat | 528 |
| Pro   | Thr | Met | Arg | Trp | Leu | Lys | Asn | Gly | Lys | Glu | Phe | Lys | Gln | Glu | His |     |
|       |     |     |     | 165 |     |     |     |     | 170 |     |     |     |     | 175 |     |     |
| cgc   | att | gga | ggc | tac | aag | gta | cga | aac | cag | cac | tgg | agc | ctc | att | atg | 576 |
| Arg   | Ile | Gly | Gly | Tyr | Lys | Val | Arg | Asn | Gln | His | Trp | Ser | Leu | Ile | Met |     |
|       |     |     | 180 |     |     |     |     | 185 |     |     |     |     | 190 |     |     |     |
| gaa   | agt | gtg | gtc | cca | tct | gac | aag | gga | aat | tat | acc | tgt | gtg | gtg | gag | 624 |
| Glu   | Ser | Val | Val | Pro | Ser | Asp | Lys | Gly | Asn | Tyr | Thr | Cys | Val | Val | Glu |     |
|       |     | 195 |     |     |     |     | 200 |     |     |     |     | 205 |     |     |     |     |
| aat   | gaa | tac | ggg | tcc | atc | aat | cac | acg | tac | cac | ctg | gat |     |     |     |     |

195

TRADUCCION SECUENCIAS COLO 15828 841 002 6

| 210               | 215               | 220               |                   |
|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|
| cga<br>Arg<br>225 | tcg<br>Ser        | cct<br>Pro        | cac<br>His        |
| cgg<br>Arg        | ccc<br>Pro<br>230 | atc<br>Ile        | ctc<br>Leu        |
| caa<br>Gln        | gcc<br>Ala        | gga<br>Gly<br>235 | ctg<br>Leu        |
| ccg<br>Pro        | gca<br>Ala        | aat<br>Asn        | gcc<br>Ala<br>240 |
| 720               |                   |                   |                   |
| tcc<br>Ser        | aca<br>Thr        | gtg<br>Val        | gtc<br>Val        |
| gga<br>Gly<br>245 | gga<br>Gly        | gac<br>Asp        | gta<br>Val        |
| gag<br>Glu        | ttt<br>Phe<br>250 | gtc<br>Val        | tgc<br>Cys        |
| aag<br>Lys        | ggt<br>Val        | tac<br>Tyr<br>255 | agt<br>Ser        |
| 768               |                   |                   |                   |
| gat<br>Asp        | gcc<br>Ala        | cag<br>Gln        | ccc<br>Pro<br>260 |
| cac<br>His        | atc<br>Ile        | cag<br>Gln        | tgg<br>Trp        |
| atc<br>Ile<br>265 | aag<br>Lys        | cac<br>His        | gtg<br>Val        |
| gaa<br>Glu        | aag<br>Lys<br>270 | aac<br>Asn        | ggc<br>Gly        |
| 816               |                   |                   |                   |
| agt<br>Ser        | aaa<br>Lys        | tac<br>Tyr<br>275 | ggg<br>Gly        |
| ccc<br>Pro        | gac<br>Asp        | ggg<br>Gly        | ctg<br>Leu<br>280 |
| ccc<br>Pro        | tac<br>Tyr        | ctc<br>Leu        | aag<br>Lys        |
| ggt<br>Val<br>285 | ctc<br>Leu        | aag<br>Lys        | gcc<br>Ala        |
| 864               |                   |                   |                   |
| gcc<br>Ala        | ggt<br>Gly<br>290 | gtt<br>Val        | aac<br>Asn        |
| acc<br>Thr        | acg<br>Thr        | gac<br>Asp<br>295 | aaa<br>Lys        |
| gag<br>Glu        | att<br>Ile        | gag<br>Glu        | gtt<br>Val<br>300 |
| ctc<br>Leu        | tat<br>Tyr        | att<br>Ile        | cgg<br>Arg        |
| 912               |                   |                   |                   |
| aat<br>Asn<br>305 | gta<br>Val        | act<br>Thr        | ttt<br>Phe        |
| gag<br>Glu        | gac<br>Asp<br>310 | gct<br>Ala        | ggg<br>Gly        |
| gaa<br>Glu        | tat<br>Tyr<br>315 | acg<br>Thr        | tgc<br>Cys        |
| ttg<br>Leu        | gcg<br>Ala        | ggt<br>Gly        | aat<br>Asn<br>320 |
| 960               |                   |                   |                   |
| tct<br>Ser        | att<br>Ile        | ggg<br>Gly        | ata<br>Ile        |
| tcc<br>Ser<br>325 | ttt<br>Phe        | cac<br>His        | tct<br>Ser        |
| gca<br>Ala        | tgg<br>Trp<br>330 | ttg<br>Leu        | aca<br>Thr        |
| gac<br>Asp        | aaa<br>Lys        | act<br>Thr<br>350 | cac<br>His        |
| aca<br>Thr        | 1008              |                   |                   |
| cct<br>Pro        | gga<br>Gly        | aga<br>Arg        | gaa<br>Glu<br>340 |
| aag<br>Lys        | gag<br>Glu        | att<br>Ile        | aca<br>Thr<br>345 |
| tcc<br>Ser        | cca<br>Pro        | gac<br>Asp        | aaa<br>Lys        |
| act<br>Thr<br>350 | cac<br>His        | aca<br>Thr        | 1056              |
| tgc<br>Cys        | cca<br>Pro        | ccg<br>Pro<br>355 | tgc<br>Cys        |
| cca<br>Pro        | gca<br>Ala        | cct<br>Pro        | gaa<br>Glu<br>360 |
| ctc<br>Leu        | ctg<br>Leu        | ggg<br>Gly        | gga<br>Gly<br>365 |
| ccg<br>Pro<br>365 | tca<br>Ser        | gtc<br>Val        | ttc<br>Phe        |
| 1104              |                   |                   |                   |
| ctc<br>Leu<br>370 | ttc<br>Phe        | ccc<br>Pro        | cca<br>Pro        |
| aaa<br>Lys        | ccc<br>Pro        | aag<br>Lys<br>375 | gac<br>Asp        |
| acc<br>Thr        | ctc<br>Leu        | atg<br>Met        | atc<br>Ile<br>380 |
| 1152              |                   |                   |                   |
| gag<br>Glu<br>385 | gtc<br>Val        | aca<br>Thr        | tgc<br>Cys        |
| gtg<br>Val<br>390 | gtg<br>Val        | gtg<br>Val        | gcc<br>Ala        |
| gtg<br>Val        | gac<br>Asp        | agg<br>Ser        | cac<br>His<br>395 |
| gaa<br>Glu        | gac<br>Asp        | cct<br>Pro        | gag<br>Glu<br>400 |
| gtc<br>Val<br>400 | 1200              |                   |                   |
| aag<br>Lys        | ttc<br>Phe        | aac<br>Asn        | tgg<br>Trp<br>405 |
| tac<br>Tyr<br>405 | gtg<br>Val        | gac<br>Asp        | ggc<br>Gly        |
| gtg<br>Val        | gag<br>Glu<br>410 | gtg<br>Val        | cat<br>His        |
| aat<br>Asn        | gcc<br>Ala        | aag<br>Lys<br>415 | aca<br>Thr        |
| 1248              |                   |                   |                   |
| aag<br>Lys        | ccg<br>Pro        | cgg<br>Arg        | gag<br>Glu<br>420 |
| gag<br>Glu        | cag<br>Gln        | tac<br>Tyr        | aac<br>Asn<br>425 |
| agc<br>Ser        | acg<br>Thr        | tac<br>Tyr        | cgt<br>Arg        |
| gtg<br>Val<br>430 | gtc<br>Val        | agc<br>Ser        | gtc<br>Val        |
| 1296              |                   |                   |                   |
| ctc<br>Leu        | acc<br>Thr        | gtc<br>Val<br>435 | ctg<br>Leu        |
| cac<br>His        | cag<br>Gln        | gac<br>Asp        | tgg<br>Trp<br>440 |
| ctg<br>Leu        | aat<br>Asn        | ggc<br>Gly        | aag<br>Lys<br>445 |
| tac<br>Tyr        | aag<br>Lys        | gag<br>Glu        | tac<br>Tyr        |
| aag<br>Lys        | gtc<br>Val        | agc<br>Ser        | gtc<br>Val        |
| 1344              |                   |                   |                   |
| aag<br>Lys        | gtc<br>Val<br>450 | tcc<br>Ser        | aac<br>Asn        |
| aaa<br>Lys        | gcc<br>Ala        | ccc<br>Pro        | atc<br>Ile        |
| gag<br>Glu<br>460 | aaa<br>Lys        | acc<br>Thr        | atc<br>Ile        |
| tcc<br>Ser        | ccc<br>Pro        | atc<br>Ile        | tcc<br>Ser        |
| 1392              |                   |                   |                   |
| aaa<br>Lys<br>465 | gcc<br>Ala        | aaa<br>Lys        | ggg<br>Gly        |
| cag<br>Gln        | ccc<br>Pro<br>470 | cga<br>Arg        | gaa<br>Glu        |
| cca<br>Pro        | cag<br>Gln        | gtg<br>Val<br>475 | tac<br>Tyr        |
| acc<br>Thr        | ctg<br>Leu        | ccc<br>Pro        | cca<br>Pro<br>480 |
| 1440              |                   |                   |                   |
| tcc<br>Ser        | cgg<br>Arg        | gat<br>Asp        | gag<br>Glu<br>485 |
| acc<br>Thr        | aag<br>Lys        | aac<br>Asn        | cag<br>Gln        |
| gtc<br>Val<br>490 | agc<br>Ser        | ctg<br>Leu        | acc<br>Thr        |
| tgc<br>Cys        | ctg<br>Leu        | gtc<br>Val<br>495 | gtc<br>Val        |
| 1488              |                   |                   |                   |
| aaa<br>Lys        | ggc<br>Gly        | ttc<br>Phe        | tat<br>Tyr<br>500 |
| ccc<br>Pro        | agc<br>Ser        | gac<br>Asp        | atc<br>Ile        |
| gcc<br>Ala<br>505 | gtg<br>Val        | gag<br>Glu        | tgg<br>Trp        |
| gag<br>Glu        | agg<br>Ser<br>510 | aat<br>Asn        | ggg<br>Gly        |
| 1536              |                   |                   |                   |
| cag<br>Arg        | ccg<br>Pro        | gag<br>Glu        | aac<br>Asn        |
| aac<br>Asn        | tac<br>Tyr        | aag<br>Lys        | acc<br>Thr        |
| acg<br>Thr        | cct<br>Pro        | ccc<br>Pro        | gtg<br>Val        |
| ctg<br>Leu        | gac<br>Asp        | tcc<br>Ser        | gac<br>Asp        |
| 1584              |                   |                   |                   |

196

TRADUCCION SECUENCIAS COLO 15828 841 002 6  
Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp  
515 520 525

ggc tcc ttc ttc ctc tac agc aag ctc acc gtg gac aag agc agg tgg 1632  
Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp  
530 535 540

cag cag ggg aac gtc ttc tca tgc tcc gtg atg cat gag gct ctg cac 1680  
Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His  
545 550 555 560

aac cac tac acg cag aag agc ctc tcc ctg tct ccg ggt tga 1722  
Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly  
565 570

<210> 14  
<211> 573  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens  
  
<400> 14

Leu Val Glu Asp Thr Thr Leu Glu Pro Glu Glu Pro Pro Thr Lys Tyr  
1 5 10 15

Gln Ile Ser Gln Pro Glu Val Tyr Val Ala Ala Pro Gly Glu Ser Leu  
20 25 30

Glu Val Arg Cys Leu Leu Lys Asp Ala Ala Val Ile Ser Trp Thr Lys  
35 40 45

Asp Gly Val His Leu Gly Pro Asn Asn Arg Thr Val Leu Ile Gly Glu  
50 55 60

Tyr Leu Gln Ile Lys Gly Ala Thr Pro Arg Asp Ser Gly Leu Tyr Ala  
65 70 75 80

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

Asn Val Thr Asp Ala Ile Ser Ser Gly Asp Asp Glu Asp Asp Thr Asp  
100 105 110

Gly Ala Glu Asp Phe Val Ser Glu Asn Ser Asn Asn Lys Arg Ala Pro  
115 120 125

Tyr Trp Thr Asn Thr Glu Lys Met Glu Lys Arg Leu His Ala Val Pro  
130 135 140

Ala Ala Asn Thr Val Lys Phe Arg Cys Pro Ala Gly Gly Asn Pro Met  
145 150 155 160

Pro Thr Met Arg Trp Leu Lys Asn Gly Lys Glu Phe Lys Gln Glu His  
165 170 175

Arg Ile Gly Gly Tyr Lys Val Arg Asn Gln His Trp Ser Leu Ile Met  
180 185 190

Glu Ser Val Val Pro Ser Asp Lys Gly Asn Tyr Thr Cys Val Val Glu  
195 200 205

197

TRADUCCION SECUENCIAS COLO 15828 841 002 6

Asn Glu Tyr Gly Ser Ile Asn His Thr Tyr His Leu Asp Val Val Glu  
210 215 220

Arg Ser Pro His Arg Pro Ile Leu Gln Ala Gly Leu Pro Ala Asn Ala  
225 230 235 240

Ser Thr Val Val Gly Gly Asp Val Glu Phe Val Cys Lys Val Tyr Ser  
245 250 255

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

Ser Lys Tyr Gly Pro Asp Gly Leu Pro Tyr Leu Lys Val Leu Lys Ala  
275 280 285

Ala Gly Val Asn Thr Thr Asp Lys Glu Ile Glu Val Leu Tyr Ile Arg  
290 295 300

Asn Val Thr Phe Glu Asp Ala Gly Glu Tyr Thr Cys Leu Ala Gly Asn  
305 310 315 320

Ser Ile Gly Ile Ser Phe His Ser Ala Trp Leu Thr Val Leu Pro Ala  
325 330 335

Pro Gly Arg Glu Lys Glu Ile Thr Ala Ser Pro Asp Lys Thr His Thr  
340 345 350

Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe  
355 360 365

Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro  
370 375 380

Glu Val Thr Cys Val Val Val Ala Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val  
385 390 395 400

Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr  
405 410 415

Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val  
420 425 430

Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys  
435 440 445

Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser  
450 455 460

Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro  
465 470 475 480

Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val  
485 490 495

Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly  
500 505 510

198

TRADUCCION SECUENCIAS COLO 15828 841 002 6

Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp  
515 520 525

Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp  
530 535 540

Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His  
545 550 555 560

Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly  
565 570

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No  
PCT/IB2007/004354

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

INV. C07K14/47 C12N15/62 C07K14/71 A61K47/48 A61K38/17

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 A61K

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, BIOSIS, WPI Data

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category* | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages                                                                                                                                                                                                                                                                | Relevant to claim No. |
|-----------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------|
| X         | WO 00/46380 A (CHIRON CORP [US]; KAVANAUGH WILLIAM MICHAEL [US]; BALLINGER MARCUS [US]) 10 August 2000 (2000-08-10)<br>abstract                                                                                                                                                                                                                   | 1-39                  |
| X         | POWELL ANDREW K ET AL: "Fibroblast growth factor receptors 1 and 2 interact differently with heparin/heparan sulfate. Implications for dynamic assembly of a ternary signaling complex"<br>JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, vol. 277, no. 32, 9 August 2002 (2002-08-09), pages 28554-28563, XP002429672<br>ISSN: 0021-9258<br>the whole document | 1-39                  |

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☒ 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.

\*Z\* document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

2 June 2008

Date of mailing of the international search report

10/06/2008

Name and mailing address of the ISA/

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Aslund, Fredrik

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No  
PCT/IB2007/004354

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category* | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages                                                                                                                                                                                                                                          | Relevant to claim No. |
|-----------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------|
| X         | <p>ANDERSON JANE ET AL: "Apert syndrome mutations in fibroblast growth factor receptor 2 exhibit increased affinity for FGF ligand"</p> <p>HUMAN MOLECULAR GENETICS,<br/>vol. 7, no. 9, September 1998 (1998-09),<br/>pages 1475-1483, XP002429673<br/>ISSN: 0964-6906<br/>page 1480 - page 1481</p>                        | 1-39                  |
| A         | <p>DUCHESNE LAURENCE ET AL: "N-glycosylation of fibroblast growth factor receptor 1 regulates ligand and heparan sulfate co-receptor binding"</p> <p>JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY,<br/>vol. 281, no. 37,<br/>September 2006 (2006-09), pages<br/>27178-27189, XP002429674<br/>ISSN: 0021-9258<br/>abstract; figure 2</p> |                       |
| A         | <p>TRUEB BEAT ET AL: "Characterization of FGFR1, a novel fibroblast growth factor (FGF) receptor preferentially expressed in skeletal tissues."</p> <p>JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY,<br/>vol. 278, no. 36,<br/>5 September 2003 (2003-09-05), pages<br/>33857-33865, XP002429675<br/>ISSN: 0021-9258</p>                 |                       |

201

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/IB2007/004354

| Patent document<br>cited in search report |   | Publication<br>date |    | Patent family<br>member(s) |  | Publication<br>date |
|-------------------------------------------|---|---------------------|----|----------------------------|--|---------------------|
| WO 0046380                                | A | 10-08-2000          | AU | 3224700 A                  |  | 25-08-2000          |

|                                                                                                      |                                                       |            |      |            |                                          |                 |                           |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------|------------|------|------------|------------------------------------------|-----------------|---------------------------|
| (21) N° de solicitud:                                                                                |                                                       |            |      |            | (51) Int Cl: C12N 015/062                |                 |                           |
| 22) Fecha de solicitud:                                                                              |                                                       |            |      |            | (71) Solicitante(s) CENTELION            |                 |                           |
| (30) Prioridad                                                                                       | (31)                                                  | Prioridad  | (32) | Fecha      | (33)                                     | País            |                           |
|                                                                                                      |                                                       | 06291824.8 |      | 28/11/2006 |                                          | EP              |                           |
|                                                                                                      |                                                       | 07290042.6 |      | 11/01/2007 |                                          | EP              |                           |
|                                                                                                      |                                                       |            |      |            | (72) Inventor(es) MARK NESBIT<br>Y OTROS |                 |                           |
|                                                                                                      |                                                       |            |      |            | (74) Apoderado: EMILIO FERRERO           |                 |                           |
| (85)                                                                                                 | Fecha limite inicio fase nacional: 28/06/2009         |            |      |            |                                          | (87)            | Publicación internacional |
| (86)                                                                                                 | Datos relativos a la presentación de la solicitud PCT |            |      |            |                                          | Fecha:          | 05/06/2008                |
|                                                                                                      | Fecha de presentación de la solicitud: 28/11/2007     |            |      |            |                                          | N° publicación: | WO 2008/065543 A3         |
|                                                                                                      | No. de solicitud PCT/IB2007/004354                    |            |      |            |                                          |                 |                           |
| (54) Titulo: FUSIONES Fc CON RECEPTOR PARA FGF SOLUBLE MODIFICADAS, CON ACTIVIDAD BIOLÓGICA MEJORADA |                                                       |            |      |            |                                          |                 |                           |

**Reivindicación(es):**

1. Una fusión Fc con receptor para FGF soluble modificada que comprende una fusión de un fragmento o dominio solubles de un receptor para FGF con una región Fc de una inmunoglobulina, en donde al menos el 5° sitio de N-glicosilación de la porción de receptor para FGF está ocupado, y como máximo 45% de los N-glicanos de dicha porción de receptor para FGF no tienen grupo sialilo.

2. La fusión Fc con receptor para FGF soluble modificada, según la reivindicación 1, en la cual, además, el 3er, 4º, 6º y 7º sitios de N-glicosilación de la porción de receptor para FGF están ocupados.

3. La fusión Fc con receptor para FGF soluble modificada, según la reivindicación 2, en la cual al menos 7 sitios de N-glicosilación de la porción de receptor para FGF están ocupados.

4. La fusión Fc con receptor para FGF soluble modificada, según la reivindicación 3, en la cual todos los sitios de N-glicosilación de la porción de receptor para FGF están ocupados.

5. La fusión Fc con receptor para FGF soluble modificada, según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en la cual el número medio de ácidos siálicos por N-glicano de la porción de receptor para FGF es 0,9 o superior.

6. La fusión Fc con receptor para FGF soluble modificada, según la reivindicación 5, en la cual el número medio de ácidos siálicos por N-glicano de la porción de

receptor para FGF es 1,2 o superior.

7. La fusión Fc con receptor para FGF soluble modificada, según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en la cual el valor K<sub>D</sub> de dicha fusión hacia FGF2, medido mediante Biacore™, está comprendido entre 1 y 5 nM

8. La fusión Fc con receptor para FGF soluble modificada, según la reivindicación 7, en la cual el valor K<sub>D</sub> de dicha fusión hacia FGF2, medido mediante Biacore™, está en torno a 1,5 nM.

9. La fusión Fc con receptor para FGF soluble modificada, según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en la cual dicha fusión posee actividades de ADCC y/o CDC.

10. La fusión Fc con receptor para FGF soluble modificada, según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en la cual los N-glicanos de dicha fusión están fucosilados en un 60 - 100%.

11. La fusión Fc con receptor para FGF soluble modificada, según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en la cual dicha fusión Fc con receptor para FGF soluble modificada comprende 3 restos de manosa, una media de 1,5 a 3,0 restos de galactosa, una media de 3,5 a 5 restos de N-acetilglucosamina, y una media de 0,6 a 1 restos de fucosa por molécula de glicano.

203

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 09-053830- -00000-0000

Fecha: 2009-05-26 16:49:26 Dep. 2020 NUECREACIONE  
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI  
Act. 411 PRESENTACION Folios: 205

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 800176089-2

RECIBO OFICIAL DE CAJA : 09 - 34,475

FECHA : MAYO 11 DE 2009

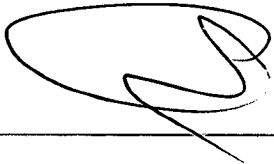
\*\*\*\*\* CONSIGNACION \*\*\*\*\*

| DEPOSITANTE       | TIPO PAGO    | BANCO           | CUENTA    | No. PAGO  | FECHA PGO  | Vr. PAGO      |
|-------------------|--------------|-----------------|-----------|-----------|------------|---------------|
| CAVELIER ABOGADOS | CONSIGNACION | BANCO DE BOGOTA | 062754387 | 105575470 | 11/05/2009 | 28,650,000.00 |

\*\*\*\*\* CONCEPTO \*\*\*\*\*

| CANT. | RENTISTICO              | CONCEPTO                            | TOTAL CONCEPTO |
|-------|-------------------------|-------------------------------------|----------------|
| 1     | 50005-01-01 SOLICITUDES | 1 TRAMITES DE SOL. DE PATENTE DE IN | 540,000.00     |
|       |                         | TOTAL :                             | \$ 540,000.00  |

SON: QUINIENTOS CUARENTA MIL PESOS

RESPONSABLE : 

RECIBO DE CAJA APLICADO AL EXPEDIENTE No. \_\_\_\_\_

COLO: 15828-841-002-6.

204

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 800176089-2

RECIBO OFICIAL DE CAJA : 09 - 3,054  
FECHA : ENERO 14 DE 2009

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 09-053830- -00000-0000

Fecha: 2009-05-26 16:49:26 Dep. 2020 NUECREACIONE  
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI  
Act. 411 PRESENTACION Folios: 205

\*\*\*\*\* CONSIGNACION \*\*\*\*\*

| DEPOSITANTE       | TIPO PAGO    | BANCO           | CUENTA    | No. PAGO  | FECHA PGO  | Vr. PAGO      |
|-------------------|--------------|-----------------|-----------|-----------|------------|---------------|
| CAVELIER ABOGADOS | CONSIGNACION | BANCO DE BOGOTA | 062754387 | 102218922 | 13/01/2009 | 61,689,000.00 |

\*\*\*\*\* CONCEPTO \*\*\*\*\*

| CANT. | RENTISTICO  | CONCEPTO                                                            | TOTAL CONCEPTO |
|-------|-------------|---------------------------------------------------------------------|----------------|
| 1     | 50005-01-09 | OTROS SERVICIOS DE PROPIEDAD I *** TASA ANUAL C.RECARGO A#OS 9 a 12 | 525,000.00     |

\*\*\*\*\*

TOTAL : \$ 525,000.00

SON: QUINIENTOS VEINTICINCO MIL PESOS

RESPONSABLE :

RECIBO DE CAJA APLICADO AL EXPEDIENTE No.

cd<sup>to</sup>: 15828-841-002-6.

205

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 09-053830- -00000-0000

Fecha: 2009-05-26 16:49:26

Tra. 11 PATENTEIYII

Act. 411 PRESENTACION

Dep. 2020 NUECREACIONE

Eve: 378 FASENACIONALI

Folios: 205

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 800176089-2

RECIBO OFICIAL DE CAJA : 09 - 34,438

FECHA : MAYO 11 DE 2009

\*\*\*\*\* CONSIGNACION \*\*\*\*\*

| DEPOSITANTE       | TIPO PAGO    | BANCO           | CUENTA    | No. PAGO  | FECHA PGO  | Vr. PAGO      |
|-------------------|--------------|-----------------|-----------|-----------|------------|---------------|
| CAVELIER ABOGADOS | CONSIGNACION | BANCO DE BOGOTA | 062754387 | 105575470 | 11/05/2009 | 28,650,000.00 |

\*\*\*\*\* CONCEPTO \*\*\*\*\*

| CANT.   | RENTISTICO  | CONCEPTO             | TOTAL CONCEPTO |
|---------|-------------|----------------------|----------------|
| 1       | 50005-01-08 | PRORROGA DE TERMINOS | 81,000.00      |
| 31      |             | PRORROGA DE TERMINOS | 81,000.00      |
| TOTAL : |             |                      | \$ 81,000.00   |

SON: OCHENTA Y UNO MIL PESOS

RESPONSABLE : \_\_\_\_\_

RECIBO DE CAJA APLICADO AL EXPEDIENTE No. \_\_\_\_\_

COLO. 1528-841-002-6.



No. 09-053830- -00000-0000

Fecha: 2009-05-26 16:49:26

Tra. 11 PATENTEIYII

Act. 411 PRESENTACION

Dep. 2020 NUECREACIONE

Eve: 378 FASENACIONALI

Folios: 205

## REQUISITOS MÍNIMOS PARA ADMISIÓN A TRAMITE PCT

PATENTE DE INVENCION

[ / ]

MODELO DE UTILIDAD [ ]

- ◇ Indicación de que se solicita la concesión de 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 [ / ]

COMPLETA [ ]

INCOMPLETA [ ]

DISEÑO INDUSTRIAL [ ]

- ◇ Indicación de que se solicita el registro de 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 [ ]

- ◇ Indicación de que se solicita el registro de un Esquema de Trazado [ ]
- ◇ Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud [ ]
- ◇ Representación gráfica del esquema trazado [ ]
- ◇ Comprobante de pago de las tasas establecidas [ ]

COMPLETA [ ]

INCOMPLETA [ ]

Edgar Naranjo

Firma Responsable

Fecha

26-07-09

Carrera 13 No. 27-00 Piso 5,7y10'

Conmutador: 3 82 0840

Fax: 3505220

E-mail: [info@sic.gov.co](mailto:info@sic.gov.co)

[www.sic.gov.co](http://www.sic.gov.co)

Bogotá D.C. - Colombia

**REPUBLICA DE COLOMBIA**  
**SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO**

Bogotá,  
2020

Doctor(a)  
FERRERO EMILIO

|            |                            |                   |
|------------|----------------------------|-------------------|
| REFERENCIA | Radicación No.             | 9 53830           |
|            | Solicitud internacional    | PCT/IB2007/004354 |
|            | Fecha inicio fase nacional | 28/06/2009        |
|            | Trámite                    | 11                |
|            | Evento                     | 378               |
|            | Actuación                  | 430               |
|            | Oficio No.                 | <b>Nº 07597</b>   |

Como resultado del examen de forma, realizado con fundamento en el artículo 38 de la Decisión 486 de la Comisión de la Comunidad Andina, artículo 27 del Tratado de Cooperación en Materia de Patentes (PCT), regla 51 bis del Reglamento y Circular Única de la Superintendencia de Industria y Comercio, se le comunica que:

1. La solicitud no contiene el poder debidamente otorgado, con el lleno de los requisitos exigidos por los artículos 63 y subsiguientes del Código de Procedimiento Civil. Adicionalmente, deberá presentar el documento que acredita la existencia y representación legal de la sociedad solicitante, cuando ésta fuere persona jurídica.

2. La solicitud no contiene la copia del documento en que consta la cesión del derecho a la patente del inventor al solicitante o a su causante, conforme a lo establecido por el artículo 26 literal k) de la Decisión 486 de la Comisión de la Comunidad Andina. Cuando se trate de documentos otorgados en el extranjero, estos deberán legalizarse de conformidad con lo dispuesto por los artículos 259 y 260 del Código de Procedimiento Civil. Cuando se trate de las declaraciones a que hace referencia la Regla 4.17 ii) del Tratado de Cooperación en Materia de Patentes PCT., el alcance de las tales declaraciones se determinará según indiquen claramente una cesión de derechos del inventor al solicitante o su causante, de conformidad con lo dispuesto en el numeral 5.2.15 del Capítulo Quinto, Título X de la Circular Única de Superintendencia de Industria y Comercio.

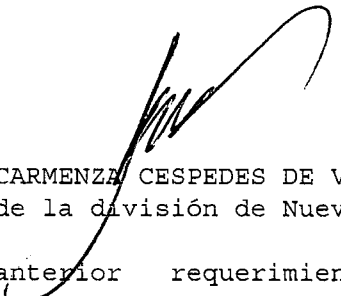
En cumplimiento de lo dispuesto por el artículo 39 de la Decisión 486, se le requiere para que dentro del término de dos meses siguientes a la fecha de notificación del presente oficio, complete los requisitos anteriormente enunciados. En caso de no dar cumplimiento al presente requerimiento, la solicitud se considerará abandonada y perderá su prelación.

Notifíquese el presente oficio conforme a lo dispuesto en el numeral 5.2, literal e), del capítulo quinto del título primero de la Circular Única No.10 de 2001.

Continúa en la página siguiente...

REPUBLICA DE COLOMBIA  
SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

Radicación No.: 9 53830



ALIX CARMENZA CESPEDES DE VERGEL  
Jefe de la división de Nuevas Creaciones

El anterior requerimiento fue notificado por fijación en lista de  
fecha 10 JUL. 2009  
jfernand