

MOLÉCULAS BIESPECÍFICAS DE UNIÓN A ANTÍGENO QUE SE UNEN A MET HUMANO Y COMPOSICIONES DEL MISMO

CAMPO DE LA INVENCION

[0001] La presente invención se relaciona con anticuerpos, anticuerpos biespecíficos y fragmentos de unión a antígeno de los mismos, así como a conjugados de anticuerpo-fármaco de tales anticuerpos, que se unen específicamente al receptor del factor de crecimiento de hepatocitos (c-Met o MET) y modulan la señal MET, su transducción, y métodos de uso de los mismos.

LISTADO DE SECUENCIAS

[0002] Una copia oficial del listado de secuencias se envía simultáneamente con la memoria descriptiva de forma electrónica a través de EFS-Web como un listado de secuencias en formato ASCII con nombre de archivo 10316WO01_Sequence_Listing_ST25_2017_11_06.TXT, con fecha de creación del 06 de noviembre de 2017 y un tamaño de alrededor de 136 kilobytes. El listado de secuencias contenido en el presente documento con formato ASCII es parte de la memoria descriptiva y se incorpora aquí por referencia en su totalidad.

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

[0003] El factor de crecimiento de hepatocitos (HGF) (también conocido como factor de dispersión [SF]) es un factor de crecimiento paracrino heterodimérico que ejerce su actividad al interactuar con el receptor de HGF (HGFR). HGFR es el producto del oncogén c-Met y también se conoce como MET. MET es un receptor tirosina quinasa que consiste en una cadena beta transmembrana unida mediante un puente disulfuro a una cadena alfa extracelular. La unión de HGF a MET activa la actividad catalítica de quinasa de MET que resulta en la fosforilación de Tyr 1234 y Tyr 1235 de la cadena beta y la subsiguiente activación de las vías de señalización corriente abajo.

[0004] Se ha demostrado que la sobreexpresión, activación o amplificación de MET y/o HGF está involucrada en el carcinoma de pulmón de células no pequeñas (NSCLC, por sus

siglas en inglés), carcinoma gástrico, ovárico, pancreático, tiroides, de mama, de cabeza y cuello, de colon y de riñón (Sierra y Tsao, *Ther. Adv. Med. Oncol.*, 3 (1 Suppl): S21-S35, 2011). Se cree que la amplificación de MET es un factor clave en la oncogénesis en los NSCLC y las neoplasias esofagogástricas malignas. Además, las mutaciones que resultan en la eliminación del exón 14 de MET han sido descritas como conductoras oncogénicas en un subconjunto de NSCLC. Las líneas celulares tumorales que tienen amplificación del gen MET son altamente dependientes de MET para el crecimiento y la supervivencia. Los datos preclínicos involucran a la señalización MET en la resistencia a terapias dirigidas a múltiples tipos de tumores, como el NSCLC, el cáncer colorrectal y el carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello (HNSCC, por sus siglas en inglés).

[0005] Tanto los resultados preclínicos como resultados clínicos recientes indican que los tumores que albergan estas alteraciones genéticas responden a los inhibidores de MET, lo que valida a MET como un promotor del cáncer. Actualmente están en desarrollo varios anticuerpos monovalentes bloqueadores de MET para el tratamiento de diversos cánceres (véanse las Patentes de EE. UU. N° 5.686.292; 5.646.036; 6.099.841; 7.476.724; 9.260.531; y 9.328.173; y Publicaciones de Solicitud de Patente de EE. UU. N° 2014/0349310 y 2005/0233960). Esos anticuerpos incluyen onartuzumab (MetMab) y emibetuzumab, (Xiang et al., *Clin. Cancer Res.* 19 (18): 5068-78, 2013, y Rosen *et al.*, *Clin. Cancer Res.*, Publicado el 10 de octubre de 2016, doi:10.1158/1078-0432.CCR-16-1418). Algunos de estos anticuerpos bloquean la señalización de MET dependiente de ligando, pero no son tan efectivos en bloquear la activación de MET independiente de ligando.

[0006] Sigue existiendo una importante necesidad médica no satisfecha de fármacos anticancerosos mejorados que bloqueen de forma potente tanto la señalización de MET dependiente del ligando como la independiente de ligando.

BREVE COMPENDIO DE LA INVENCION

[0007] En el presente documento se proporcionan anticuerpos, fragmentos de unión a antígeno de anticuerpos, combinaciones de anticuerpos monoespecíficos bivalentes y anticuerpos biespecíficos que se unen a la proteína receptora c-Met humana (MET x MET). Los anticuerpos son útiles, entre otras cosas, para dirigirse a células tumorales que

expresan MET. Los anticuerpos anti-MET, y las porciones de unión a antígeno de los mismos, se pueden usar solos en forma no modificada, o se pueden incluir como parte de un conjugado de anticuerpo-fármaco o un anticuerpo biespecífico.

[0008] Otras formas de realización se harán evidentes a partir de una revisión de la siguiente descripción detallada.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS.

[0009] La Figura 1 es una matriz que muestra los componentes de 272 anticuerpos biespecíficos MET x MET ilustrativos descritos en el presente documento. Cada célula numerada de la matriz identifica un anticuerpo biespecífico único que comprende un dominio de unión a antígeno “D1” y un dominio de unión a antígeno “D2”, en donde el dominio de unión a antígeno D1 comprende el dominio variable de inmunoglobulina (par de secuencias aminoacídicas de HCVR/LCVR) o las CDR del correspondiente anticuerpo anti-MET listado a lo largo del eje Y, y en donde el dominio de unión a antígeno D2 comprende el dominio variable de inmunoglobulina (par de secuencia aminoacídicas de HCVR/LCVR) o las CDR del correspondiente anticuerpo anti-MET listado a lo largo del eje X .

[0010] La Figura 2 es un esquema de un ensayo reportero basado en luciferasa utilizado para evaluar la activación de la vía de MET inducida por anticuerpos o el bloqueo por anticuerpos de la activación de la vía inducida por HGF en células HEK293T que contienen un constructo con un gen reportero SRE-Luciferasa.

[0011] Las Figuras 3 (A-B) son gráficos de líneas que muestran unidades de luminosidad relativa (RLU, por sus siglas en inglés) que representan la expresión de SRE-luciferasa en función de la concentración de anticuerpos en log moles por litro. Los cuadrados rellenos (■) representan el anticuerpo parental monoespecífico bivalente H4H13306P2, las pirámides rellenas (▲) representan el anticuerpo parental monoespecífico bivalente H4H13312P2, los círculos rellenos (●) representan un anticuerpo monovalente, los diamantes rellenos (◆) representan el control de isotipo y las pirámides invertidas (▼) representan sin ligando. La Figura 3A representa el anticuerpo solo sin ligando HGF. La Figura 3B representa anticuerpos más ligando HGF.

[0012] Las Figuras 4 (A-B) son gráficos de líneas que muestran unidades de luminosidad relativa (RLU) que representan la expresión de SRE-luciferasa en función de la concentración de anticuerpos en log moles por litro. Los cuadrados rellenos (■) representan un anticuerpo monovalente anti-MET, los círculos rellenos (●) representan un anticuerpo biespecífico MET x MET y los diamantes rellenos (◆) representan el anticuerpo parental H4H13312P2. La Figura 4A representa el anticuerpo solo sin ligando HGF. La Figura 4B representa anticuerpos más ligando HGF.

[0013] La Figura 5 es un gráfico de barras que representa el crecimiento celular relativo de células SNU5 de cáncer gástrico con amplificación de MET en función del tratamiento con anticuerpos 1 a 18 monoespecíficos bivalentes humanos anti-MET, un anticuerpo de control y un anticuerpo monovalente anti-MET. Para fines de comparación, el anticuerpo 8 (abscisa) es el anticuerpo parental H4H13306P2, y el anticuerpo 11 (abscisa) es el anticuerpo parental H4H13312P2.

[0014] Las Figuras 6 (A-B) contienen gráficos de barras que representan el crecimiento celular relativo de células con amplificación de MET en función del tratamiento con un anticuerpo biespecífico MET x MET, un anticuerpo de control y un anticuerpo monovalente anti-MET. La Figura 6A muestra el crecimiento relativo de las células SNU5 en función del tratamiento con el anticuerpo de control, un anticuerpo monovalente a 0,1, 1 y 10 µg/mL y un anticuerpo biespecífico MET x MET a 0,1, 1 y 10 µg/mL. La Figura 6B representa el crecimiento relativo de las células EBC-1 en función del tratamiento con el anticuerpo de control y un anticuerpo biespecífico MET x MET a 0,1 y 1 µg/mL.

[0015] Las Figuras 7 (AB) representan inmunotransferencias de pMET (MET fosforilado), MET, pErk (Erk fosforilada) y tubulina (para control de carga) extraídas de células Hs746T después del tratamiento con un anticuerpo de control y un anticuerpo biespecífico MET x MET (Figura 7A), y la expresión de MET (y tubulina como control de carga) en células Hs746T después del tratamiento con el anticuerpo biespecífico MET x MET durante 0, 2 y 6 horas (Figura 7B).

[0016] La Figura 8 representa una inmunotransferencia de pMET, MET, pErk y tubulina (para control de carga) extraídos de células Hs746T después del tratamiento con un

anticuerpo de control, un anticuerpo biespecífico MET x MET, un anticuerpo parental 1 monoespecífico bivalente anti-MET, un anticuerpo parental 2 monoespecífico bivalente anti-MET, y una combinación de los anticuerpos parentales 1 y 2.

[0017] La Figura 9 representa una inmunotransferencia de la expresión de MET (y tubulina como control de carga) en células Hs746T después del tratamiento con un anticuerpo de control y un anticuerpo biespecífico MET x MET durante 2, 6 y 18 horas.

[0018] Las Figuras 10(A-B) representan inmunotransferencias de pMET, MET, pErk y tubulina (para control de carga) extraídos de células SNU5 después del tratamiento con un anticuerpo de control y un anticuerpo biespecífico MET x MET (Figura 10A); y la expresión de MET (y tubulina como control de carga) en células SNU5 después del tratamiento con un anticuerpo de control y un anticuerpo monovalente anti-MET (Figura 10B).

[0019] La Figura 11 representa una inmunotransferencia de pMET, MET, pErk y tubulina (como control de carga) extraídos de células EBC-1 después del tratamiento con un anticuerpo de control y un anticuerpo biespecífico MET x MET.

[0020] La Figura 12 es un gráfico de líneas que representa el cambio en el volumen del tumor EBC-1 en milímetros cúbicos en función del tiempo expresado en días después de la implantación de células EBC-1 en animales tratados con el anticuerpo de control (cuadrado relleno ■), anticuerpo monovalente MET (círculo relleno ●), o anticuerpo biespecífico MET x MET (diamante relleno ♦).

[0021] Las Figuras 13(A-B) contienen gráficos de barras que representan el crecimiento celular relativo de células con amplificación de MET en función del tratamiento con un anticuerpo biespecífico MET x MET, un anticuerpo de control y un anticuerpo monovalente anti-MET. La Figura 13A muestra el crecimiento relativo de las células Hs746T en función del tratamiento con el anticuerpo de control, un anticuerpo parental 1 biespecífico MET x MET, el anticuerpo parental 1 monoespecífico MET x MET, el anticuerpo parental 2 monoespecífico MET x MET y una combinación de anticuerpos parentales 1 y 2. La Figura 13B representa el crecimiento relativo de las células Hs746T en función del tratamiento con

el anticuerpo de control, un anticuerpo monovalente a 1, 10 y 25 $\mu\text{g/mL}$, y un anticuerpo biespecífico MET x MET a 1, 10 y 25 $\mu\text{g/mL}$.

[0022] La Figura 14 es un gráfico de barras que representa el crecimiento celular relativo de células NCI-H596 en función del tratamiento con un anticuerpo de control (C), un anticuerpo biespecífico MET x MET (MM), el a anticuerpo parental 1 monoespecífico MET x MET (M1), anticuerpo parental 2 monoespecífico MET x MET (M2), una combinación de los anticuerpos parentales 1 y 2 (M1M2) y el factor de crecimiento de hepatocitos agonista de MET (HGF).

[0023] La Figura 15 es un gráfico de líneas que representa el cambio en el volumen del tumor Hs746T en milímetros cúbicos en función del tiempo expresado en días después de la implantación de células Hs746T en animales tratados con anticuerpo de control (cuadrado relleno ■), anticuerpo monovalente MET (círculo relleno ●), o anticuerpo biespecífico MET x MET (diamante relleno ♦)

[0024] La Figura 16A es un gráfico de líneas que representa el cambio en el volumen del tumor SNU5 en milímetros cúbicos en función del tiempo expresado en días después de la implantación de células SNU5 en animales tratados con anticuerpo de control (cuadrado relleno ■), anticuerpo monovalente MET a 1 mg/mL (círculo relleno ●), anticuerpo monovalente MET a 10 mg/mL (círculo vacío ○), anticuerpo biespecífico MET x MET a 1 mg/mL (diamante relleno ♦) o anticuerpo biespecífico MET x MET a 10 mg/mL (diamante vacío ◇).

[0025] La Figura 16B es una inmunotransferencia de pMET, MET y tubulina (control de carga) de un tumor SNU5 extraído de un modelo de xenoinjerto de ratón después del tratamiento con un anticuerpo de control, 10 mg/kg de un anticuerpo monovalente anti-MET, y 10 mg/kg de un anticuerpo biespecífico MET x MET.

[0026] La Figura 17 es un gráfico de líneas que representa el cambio en el volumen del tumor U87-MG en milímetros cúbicos en función del tiempo expresado en días después de la implantación de células U87-MG en animales tratados con anticuerpo de control (cuadrado

relleno ■), anticuerpo monovalente MET (círculo relleno ●), o anticuerpo biespecífico MET x MET (diamante relleno ◆)

[0027] La Figura 18 es un gráfico de líneas que representa el cambio en el volumen del tumor U118-MG en milímetros cúbicos en función del tiempo expresado en días después de la implantación de células U118-MG en animales tratados con anticuerpo de control (cuadrado relleno ■), anticuerpo monovalente MET (círculo relleno ●), o anticuerpo biespecífico MET x MET (diamante vacío ◇).

[0028] La figura 19 es un esquema que ilustra la síntesis de maitansinoide 6.

[0029] La Figura 20 es un esquema que ilustra la síntesis del intermediario 1 de maitansinoide.

DESCRIPCIÓN DETALLADA

[0030] Antes de que se describa la presente invención, debe entenderse que esta invención no está limitada a los métodos y condiciones experimentales particulares descritas, ya que dichos métodos y condiciones pueden variar. También debe entenderse que la terminología utilizada en el presente documento tiene el propósito de describir sólo formas de realización particulares, y no pretende ser limitante, ya que el alcance de la presente invención estará limitado solo por las reivindicaciones adjuntas.

[0031] A menos que se defina lo contrario, todos los términos técnicos y científicos usados en el presente documento tienen el mismo significado que entiende comúnmente un experto en la materia a la que pertenece esta invención. Como se usa en el presente documento, el término “alrededor de”, cuando se usa en referencia a un valor numérico particular indicado, significa que el valor puede variar del valor indicado en no más del 1%. Por ejemplo, la expresión “alrededor de 100”, como se usa en el presente documento, incluye 99 y 101 y todos los valores intermedios (por ejemplo, 99,1; 99,2; 99,3; 99,4; etc.).

[0032] Aunque en la práctica o en el ensayo de la presente invención se pueden usar cualesquiera métodos y materiales similares o equivalentes a los descritos en el presente documento, aquí se describen los métodos y materiales preferidos. Todas las patentes,

solicitudes y publicaciones no patentes mencionadas en esta memoria descriptiva se incorporan aquí por referencia en su totalidad.

PROTEÍNA MET

[0033] Las expresiones “MET”, “c-Met”, y similares, como se usan en el presente documento, se refieren al receptor tirosina quinasa en la membrana humana, el que comprende (1) la secuencia aminoacídica como se establece en la SEQ ID NO: 145, y/o que tienen la secuencia aminoacídica como se indica bajo el número de acceso NCBI NM_001127500,2, que representa la preproteína no procesada de isoforma “a”, (2) la secuencia aminoacídica como se establece en la SEQ ID NO: 146, y/o que tiene la secuencia aminoacídica como se indica bajo el número de acceso NCBI NM_000236.2, que representa la preproteína no procesada de isoforma “b”, (3) la secuencia aminoacídica como se establece en la SEQ ID NO: 147, y/o que tiene la secuencia aminoacídica indicada bajo el número de acceso NM_001311330,1 del NCBI, que representa la preproteína no procesada de isoforma “c”, y/o (3) la proteína madura que comprende la subunidad alfa citoplásmica (SEQ ID NO: 148) compartida por las tres isoformas y subunidad beta transmembrana (SEQ ID NO: 149, 150 o 151 de las isoformas a, b y c, respectivamente). La expresión “MET” incluye moléculas MET tanto monoméricas como multiméricas. Como se usa en el presente documento, la expresión “MET humano monomérico” significa una proteína MET o una porción de la misma que no contiene o posee ningún dominio multimerizante y que existe en condiciones normales como una única molécula MET sin una conexión física directa con otra molécula MET. Una molécula MET monomérica ilustrativa es la molécula referida en el presente documento como “hMET.mmh” que comprende la secuencia aminoacídica de SEQ ID NO: 152 (véase, por ejemplo, el Ejemplo 3 en el presente documento). Como se usa en el presente documento, la expresión “MET humano dimérico” significa una construcción que comprende dos moléculas MET conectadas entre sí a través de un enlazador, un enlace covalente, un enlace no covalente, o mediante un dominio multimerizante, como un dominio Fc de anticuerpo. Una molécula de MET dimérica ilustrativa es la molécula referida en el presente documento como “hMET.mFc” que comprende la secuencia aminoacídica de SEQ ID NO: 153 (véase, por ejemplo, el Ejemplo 3 en el presente documento).

[0034] Todas las referencias a proteínas, polipéptidos y fragmentos de proteínas, en el presente documento, pretenden referirse a la versión humana de la proteína respectiva, polipéptido o fragmento de proteína, a menos que se especifique explícitamente que son de una especie no humana. Por lo tanto, la expresión “MET” significa MET humano a menos que se especifique que proviene de una especie no humana, por ejemplo, “MET de ratón”, “MET de mono”, etc.

[0035] Como se usa en el presente documento, la expresión “MET expresado en la superficie celular” significa una o más proteínas MET, o su dominio extracelular, que se expresan en la superficie de una célula *in vitro* o *in vivo*, de modo que al menos una porción de una proteína MET está expuesta al lado extracelular de la membrana celular y es accesible a una porción de unión a antígeno de un anticuerpo. Un “MET expresado en la superficie celular” puede comprender o consistir en una proteína MET expresada en la superficie de una célula que normalmente expresa una proteína MET. Alternativamente, el “MET expresado en la superficie celular” puede comprender o consistir en una proteína MET expresada en la superficie de una célula que normalmente no expresa el MET humano en su superficie, pero ha sido diseñada artificialmente para expresar MET en su superficie.

ANTICUERPOS ANTI-MET Y FRAGMENTOS DE UNIÓN A ANTÍGENO DE LOS MISMOS

[0036] Según un aspecto, se proporcionan anticuerpos anti-MET (por ejemplo, anticuerpos monoespecíficos anti-MET). Los anticuerpos anti-MET ilustrativos de acuerdo con este aspecto se enumeran en las Tablas 1 y 2 de este documento. La Tabla 1 presenta los identificadores de secuencia aminoacídica de las regiones variables de la cadena pesada (HCVR), las regiones variables de la cadena ligera (LCVR), las regiones determinantes de la complementariedad de cadena pesada (HCDR1, HCDR2 y HCDR3), y las regiones determinantes de la complementariedad de la cadena ligera (LCDR1, LCDR2, y LCDR3) de los anticuerpos anti-MET ilustrativos a partir de los cuales se pueden derivar las moléculas biespecíficas de unión a antígeno (usadas indistintamente en el presente documento con la proteína biespecífica de unión a antígeno) descritas en el presente documento. La Tabla 2 muestra los identificadores de las secuencias de ácido nucleico de las HCVR, LCVR,

HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 y LCDR3 de los anticuerpos anti-MET ilustrativos.

[0037] En el presente documento también se proporcionan anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno de los mismos que se unen específicamente a MET y agonizan (por ejemplo, activan) la vía de señalización de MET en las células, así como el uso de dichos anticuerpos en entornos terapéuticos donde la activación de la señalización de MET sería beneficiosa o terapéuticamente útil. Los ejemplos no limitantes de tales anticuerpos agonistas anti-MET incluyen el anticuerpo al que se hace referencia en el presente documento como “H4H14636D”, así como los anticuerpos y sus fragmentos de unión a antígeno que comprenden las CDR de las cadenas pesada y ligera (SEQ ID NO: 28, 30, 32, 140, 142, 144) y/o dominios variables de las cadenas pesada y ligera (SEQ ID NO: 26/138) de los mismos.

[0038] En el presente documento se proporcionan anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno que se unen específicamente a MET, los que comprenden una HCVR que comprende una secuencia aminoacídica seleccionada de entre cualquiera de las secuencias aminoacídicas de HCVR enumeradas en la Tabla 1, o una secuencia sustancialmente similar a la misma que tiene al menos 90 %, al menos el 95%, al menos el 98% o al menos el 99% de la identidad de la secuencia.

[0039] En el presente documento se proporcionan anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno que se unen específicamente a MET, los que comprenden una LCVR que comprende una secuencia aminoacídica seleccionada de entre cualquiera de las LCVR las secuencias aminoacídicas enumeradas en la Tabla 1, o una secuencia sustancialmente similar a las mismas que tienen al menos un 90%, al menos un 95%, al menos un 98% o al menos un 99% de identidad de secuencia a las mismas.

[0040] En el presente documento se proporcionan anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno que se unen específicamente a MET, los que comprenden un par de secuencias aminoacídicas de HCVR y LCVR (HCVR/LCVR) que comprende cualquiera de las secuencias aminoacídicas de HCVR enumeradas en la Tabla 1 apareadas con cualquiera de las secuencias aminoacídicas de LCVR enumeradas en la Tabla 1. Según ciertas formas de realización, los anticuerpos, o fragmentos de unión a antígeno de los mismos, comprenden

un par de secuencias aminoacídicas de HCVR/LCVR contenido dentro de cualquiera de los anticuerpos anti-MET ilustrativos enumerados en la Tabla 1. En ciertas formas de realización, el par de secuencias aminoacídicas de HCVR/LCVR se selecciona del grupo que consiste en: SEQ ID NO: 2/138, 10/138, 18/138, 26/138, 34/138, 42/138, 50/138, 58/138, 66/138, 74/138, 82/138, 90/138, 98/138, 106/138, 114/138, 122/138 y 130/138.

[0041] También se proporcionan anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno de los mismos que se unen específicamente a MET, los que comprenden una CDR1 de cadena pesada (HCDR1) que comprende una secuencia aminoacídica seleccionada de entre cualquiera de las secuencias aminoacídicas de HCDR1 enumeradas en la Tabla 1 o una secuencia sustancialmente similar a la misma que tiene al menos un 90%, al menos un 95%, al menos un 98% o al menos un 99% de identidad de secuencia.

[0042] También se proporcionan anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno de los mismos que se unen específicamente a MET, los que comprenden una CDR2 de cadena pesada (HCDR2) que comprende una secuencia aminoacídica seleccionada de entre cualquiera de las secuencias aminoacídicas de HCDR2 enumeradas en la Tabla 1 o una secuencia sustancialmente similar a la misma que tiene al menos un 90%, al menos un 95%, al menos un 98% o al menos un 99% de identidad de secuencia.

[0043] También se proporcionan anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno de los mismos que se unen específicamente a MET, los que comprenden una CDR3 de cadena pesada (HCDR3) que comprende una secuencia aminoacídica seleccionada de entre cualquiera de las secuencias aminoacídicas de HCDR3 enumeradas en la Tabla 1 o una secuencia sustancialmente similar a la misma que tiene al menos un 90%, al menos un 95%, al menos un 98% o al menos un 99% de identidad de secuencia.

[0044] También se proporcionan anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno de los mismos que se unen específicamente a MET, los que comprenden una CDR1 de cadena ligera (LCDR1) que comprende una secuencia aminoacídica seleccionada de entre cualquiera de las secuencias aminoacídicas de LCDR1 enumeradas en la Tabla 1 o una secuencia sustancialmente similar a la misma que tiene al menos un 90%, al menos un 95%, al menos un 98% o al menos un 99% de identidad de secuencia.

[0045] También se proporcionan anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno de los mismos que se unen específicamente a MET, los que comprenden un par de secuencias aminoacídicas de HCDR1 y LCDR1 (HCDR1/LCDR1) que comprende cualquiera de las secuencias aminoacídicas HCDR1 enumeradas en la Tabla 1 apareadas con cualquiera de los Secuencias aminoacídicas de LCDR1 enumeradas en la Tabla 1. Según ciertas formas de realización, los anticuerpos, o fragmentos de unión a antígeno de los mismos, comprenden un par de secuencias aminoacídicas de HCDR3/LCDR3 contenido dentro de cualquiera de los anticuerpos anti-MET ilustrativos enumerados en la Tabla 1. En ciertas formas de realización, el par de secuencias aminoacídicas de HCDR1/LCDR1 se selecciona del grupo que consiste en: SEQ ID NO: 4/140, 12/140, 20/140, 28/140, 36/140, 44/140, 52/140, 60/140, 68/140, 76/140, 84/140, 92/140, 100/140, 108/140, 116/140, 124/140 y 132/140,

[0046] También se proporcionan anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno de los mismos que se unen específicamente a MET, los que comprenden una CDR2 de cadena ligera (LCDR2) que comprende una secuencia aminoacídica seleccionada de entre cualquiera de las secuencias aminoacídicas de LCDR2 enumeradas en la Tabla 1 o una secuencia sustancialmente similar a la misma que tiene al menos un 90%, al menos un 95%, al menos un 98% o al menos un 99% de identidad de secuencia.

[0047] También se proporcionan anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno de los mismos que se unen específicamente a MET, los que comprenden un par de secuencias aminoacídicas de HCDR2 y LCDR2 (HCDR2/LCDR2) que comprende cualquiera de las secuencias aminoacídicas de HCDR2 enumeradas en la Tabla 1 emparejadas con cualquiera de las secuencias aminoacídicas de LCDR2 enumeradas en la Tabla 1. Según ciertas formas de realización, los anticuerpos, o fragmentos de unión a antígeno de los mismos, comprenden un par de secuencias aminoacídicas de HCDR2/LCDR2 contenido dentro de cualquiera de los anticuerpos anti-MET ilustrativos enumerados en la Tabla 1. En ciertas formas de realización, el par de secuencias aminoacídicas de HCDR2/LCDR2 se selecciona del grupo que consiste en: SEQ ID NO: 6/142, 14/142, 22/142, 30/142, 38/142, 46/142, 54/142, 62/142, 70/142, 78/142, 86/142, 94/142, 102/142, 110/142, 118/142, 126/142 y 134/142.

[0048] También se proporcionan anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno de los mismos que se unen específicamente a MET, los que comprenden una CDR3 de cadena ligera

(LCDR3) que comprende una secuencia aminoacídica seleccionada de entre cualquiera de las secuencias aminoacídicas de LCDR3 enumeradas en la Tabla 1 o una secuencia sustancialmente similar a la misma que tiene al menos un 90%, al menos un 95%, al menos un 98% o al menos un 99% de identidad de secuencia.

[0049] En el presente documento también se proporcionan anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno que se unen específicamente a MET, los que comprenden un par de secuencias aminoacídicas de HCDR3 y LCDR3 (HCDR3/LCDR3) que comprenden cualquiera de las secuencias aminoacídicas de HCDR3 enumeradas en la Tabla 1 apareada con cualquiera de las secuencias aminoacídicas de LCDR3 enumeradas en la Tabla 1. Según ciertas formas de realización, los anticuerpos, o fragmentos de unión a antígeno de los mismos, comprenden un par de secuencias aminoacídicas de HCDR3/LCDR3 contenido dentro de cualquiera de los anticuerpos anti-MET ilustrativos enumerados en la Tabla 1. En ciertas formas de realización, el par de secuencias aminoacídicas HCDR3/LCDR3 se selecciona del grupo que consiste en: SEQ ID NO: 8/144, 16/144, 24/144, 32/144, 40/144, 48/144, 56/144, 64/144, 72/144, 80/144, 88/144, 96/144, 104/144, 112/144, 120/144, 128/144 y 136/144.

[0050] En el presente documento también se proporcionan anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno que se unen específicamente a MET, los que comprenden un conjunto de seis CDR (es decir, HCDR1-HCDR2-HCDR3-LCDR1-LCDR2-LCDR3) contenidas dentro de cualquiera de los anticuerpos anti-MET ilustrativos enumerados en la Tabla 1. En ciertas formas de realización, el conjunto de secuencias aminoacídicas HCDR1-HCDR2-HCDR3-LCDR1-LCDR2-LCDR3 se selecciona del grupo que consiste en: SEQ ID NO: 4-6-8-140-142-144, 12-14-16-140-142-144, 20-22-24-140-142-144, 28-30-32-140-142-144, 36-38-40-140-142-144, 44-46-48-140-142-144, 52-54-56-140-142-144, 60-62-64-140-142-144, 68-70-72-140-142-144, 76-78-80-140-142-144, 84-86-88-140-142-144, 92-94-96-140-142-144, 100-102-104-140-142-144, 108-110-112-140-142-144, 116-118-120-140-142-144, 124-126-128-140-142-144 y 132-134-136-140-142-144.

[0051] En una forma de realización relacionada, los anticuerpos, o fragmentos de unión a antígeno de los mismos que se unen específicamente a MET, comprenden un conjunto de seis CDR (es decir, HCDR1-HCDR2-HCDR3-LCDR1-LCDR2-LCDR3) contenidas dentro

de un par de secuencias aminoacídicas de HCVR/LCVR como se definen en cualquiera de los anticuerpos anti-MET ilustrativos enumerados en la Tabla 1. Por ejemplo, los anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno de los mismos que se unen específicamente a MET comprenden el conjunto de secuencias aminoacídicas HCDR1-HCDR2-HCDR3-LCDR1-LCDR2-LCDR3 contenido dentro de un par de secuencias aminoacídicas de HCVR/LCVR seleccionado del grupo que consiste en: SEQ ID NO: 4-6-8-140-142-144, 12-14-16-140-142-144, 20-22-24-140-142-144, 28-30-32-140-142-144, 36-38-40-140-142-144, 44-44-48-140-142-144, 52-54-56-140-142-144, 60-62-64-140-142-144, 68-70-72-140-142-144, 76-78-80-140-142-144, 84-86-88-140-142-144, 92-94-96-140-142-144, 100-102-104-140-142-144, 108-110-112-140-142-144, 116-118-120-140-142-144, 124-126-128-140-142-144 y 132-134-136-140-142-144.

[0052] Los métodos y técnicas para identificar las CDR dentro de las secuencias aminoacídicas de HCVR y LCVR son bien conocidos en la técnica y se pueden usar para identificar las CDR dentro de las secuencias aminoacídicas especificadas de HCVR y/o LCVR descritas en el presente documento. Los ejemplos de convenciones que se pueden usar para identificar los límites de las CDR incluyen, por ejemplo, la definición de Kabat, la definición de Chothia y la definición de AbM. En términos generales, la definición de Kabat se basa en la variabilidad de la secuencia, la definición de Chothia se basa en la ubicación de las regiones de bucle estructurales, y la definición de AbM es un término medio entre los enfoques de Kabat y Chothia. Véase, por ejemplo, Kabat, “Sequences of Proteins of Immunological Interest”, National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1991); Al-Lazikani *et al.*, J. Mol. Biol. 273:927-948 (1997); y Martin *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86:9268-9272 (1989). Para identificar las secuencias de CDR dentro de un anticuerpo también están disponibles bases de datos públicas

[0053] En el presente documento también se proporcionan moléculas de ácido nucleico que codifican anticuerpos anti-MET o porciones de los mismos. Por ejemplo, la presente invención proporciona moléculas de ácido nucleico que codifican cualquiera de las secuencias aminoacídicas de HCVR enumeradas en la Tabla 1; en ciertas formas de realización, la molécula de ácido nucleico comprende una secuencia polinucleotídica seleccionada de entre cualquiera de las secuencias de ácido nucleico de HCVR enumeradas

en la Tabla 2, o una secuencia sustancialmente similar a la misma que tiene al menos el 90%, al menos el 95%, al menos el 98% o al menos el 99 % de identidad de secuencia con la misma.

[0054] También se proporcionan moléculas de ácido nucleico que codifican cualquiera de las secuencias aminoacídicas de LCVR enumeradas en la Tabla 1; en ciertas formas de realización, la molécula de ácido nucleico comprende una secuencia polinucleotídica seleccionada de entre cualquiera de las secuencias de ácido nucleico de LCVR enumeradas en la Tabla 2, o una secuencia sustancialmente similar a la misma que tiene al menos el 90%, al menos el 95%, al menos el 98% o al menos el 99 % de identidad de secuencia con la misma.

[0055] También se proporcionan moléculas de ácido nucleico que codifican cualquiera de las secuencias aminoacídicas de HCDR1 enumeradas en la Tabla 1; en ciertas formas de realización, la molécula de ácido nucleico comprende una secuencia polinucleotídica seleccionada de entre cualquiera de las secuencias de ácido nucleico de HCDR1 enumeradas en la Tabla 2, o una secuencia sustancialmente similar a la misma que tiene al menos el 90%, al menos el 95%, al menos el 98% o al menos el 99 % de identidad de secuencia con la misma.

[0056] También se proporcionan moléculas de ácido nucleico que codifican cualquiera de las secuencias aminoacídicas de HCDR2 enumeradas en la Tabla 1; en ciertas formas de realización, la molécula de ácido nucleico comprende una secuencia polinucleotídica seleccionada de entre cualquiera de las secuencias de ácido nucleico de HCDR2 enumeradas en la Tabla 2, o una secuencia sustancialmente similar a la misma que tiene al menos el 90%, al menos el 95%, al menos el 98% o al menos el 99 % de identidad de secuencia con la misma.

[0057] También se proporcionan moléculas de ácido nucleico que codifican cualquiera de las secuencias aminoacídicas de HCDR3 enumeradas en la Tabla 1; en ciertas formas de realización, la molécula de ácido nucleico comprende una secuencia polinucleotídica seleccionada de entre cualquiera de las secuencias de ácido nucleico HCDR3 enumeradas en

la Tabla 2, o una secuencia sustancialmente similar a la misma que tiene al menos el 90%, al menos el 95%, al menos el 98% o al menos el 99 % de identidad de secuencia con la misma.

[0058] También se proporcionan moléculas de ácido nucleico que codifican cualquiera de las secuencias aminoacídicas de LCDR1 enumeradas en la Tabla 1; en ciertas formas de realización, la molécula de ácido nucleico comprende una secuencia polinucleotídica seleccionada de entre cualquiera de las secuencias de ácido nucleico de LCDR1 enumeradas en la Tabla 2, o una secuencia sustancialmente similar a la misma que tiene al menos el 90%, al menos el 95%, al menos el 98% o al menos el 99 % de identidad de secuencia con la misma.

[0059] También se proporcionan moléculas de ácido nucleico que codifican cualquiera de las secuencias aminoacídicas de LCDR2 enumeradas en la Tabla 1; en ciertas formas de realización, la molécula de ácido nucleico comprende una secuencia polinucleotídica seleccionada de entre cualquiera de las secuencias de ácido nucleico de LCDR2 enumeradas en la Tabla 2, o una secuencia sustancialmente similar a la misma que tiene al menos el 90%, al menos el 95%, al menos el 98% o al menos el 99 % de identidad de secuencia con la misma.

[0060] También se proporcionan moléculas de ácido nucleico que codifican cualquiera de las secuencias aminoacídicas de LCDR3 enumeradas en la Tabla 1; en ciertas formas de realización, la molécula de ácido nucleico comprende una secuencia polinucleotídica seleccionada de entre cualquiera de las secuencias de ácido nucleico de LCDR3 enumeradas en la Tabla 2, o una secuencia sustancialmente similar a la misma que tiene al menos el 90%, al menos el 95%, al menos el 98% o al menos el 99 % de identidad de secuencia con la misma.

[0061] También se proporcionan moléculas de ácido nucleico que codifican una HCVR, en donde la HCVR comprende un conjunto de tres CDR (es decir, HCDR1-HCDR2-HCDR3), en donde el conjunto de secuencias aminoacídicas de HCDR1-HCDR2-HCDR3 es como se define para cualquiera de los anticuerpos anti-MET ilustrativos enumerados en la Tabla 1.

[0062] También se proporcionan moléculas de ácido nucleico que codifican una LCVR, en donde la LCVR comprende un conjunto de tres CDR (es decir, LCDR1-CLR2-LCDR3), en donde el conjunto de secuencias aminoacídicas de LCDR1-LCDR2-LCDR3 es como se define para cualquiera de los anticuerpos anti-MET ilustrativos enumerados en la Tabla 1.

[0063] También se proporcionan moléculas de ácido nucleico que codifican una HCVR y una LCVR, en donde la HCVR comprende una secuencia aminoacídica de entre cualquiera de las secuencias aminoacídicas de HCVR enumeradas en la Tabla 1, y en donde la LCVR comprende una secuencia aminoacídica de entre cualquiera de las secuencias aminoacídicas de LCVR enumeradas en la Tabla 1. En ciertas formas de realización, la molécula de ácido nucleico comprende una secuencia polinucleotídica seleccionada de entre cualquiera de las secuencias de ácido nucleico de HCVR enumeradas en la Tabla 2, o una secuencia sustancialmente similar a la misma que tiene al menos el 90%, al menos el 95%, al menos el 98% o al menos 99% de identidad de secuencia con la misma, y una secuencia polinucleotídica seleccionada de entre cualquiera de las secuencias de ácido nucleico de LCVR enumeradas en la Tabla 2, o una secuencia sustancialmente similar a la misma que tiene al menos el 90%, al menos el 95%, al menos el 98% o al menos el 99% de identidad de secuencia con la misma. En ciertas formas de realización de acuerdo con este aspecto, la molécula de ácido nucleico codifica una HCVR y una LCVR, en donde la HCVR y la LCVR se derivan del mismo anticuerpo anti-MET enumerado en la Tabla 1.

[0064] En el presente documento también se proporcionan vectores de expresión recombinantes capaces de expresar un polipéptido que comprende una región variable de cadena pesada o ligera de un anticuerpo anti-MET. Por ejemplo, los vectores de expresión recombinante comprenden cualquiera de las moléculas de ácido nucleico mencionadas anteriormente, es decir, las moléculas de ácido nucleico que codifican cualquiera de las secuencias de HCVR, LCVR y/o CDR como se establece en la Tabla 1. El alcance de la presente divulgación también incluye células hospederas en las que se han introducido dichos vectores, así como los métodos para producir los anticuerpos o porciones de los mismos cultivando las células hospederas en condiciones que permitan la producción de los anticuerpos o fragmentos de anticuerpos, y recuperar los anticuerpos y fragmentos de anticuerpos así producidos.

[0065] En el presente documento se proporcionan anticuerpos anti-MET que tienen un patrón de glicosilación modificado. En algunas formas de realización, la modificación para eliminar sitios de glicosilación indeseables o, por ejemplo, un anticuerpo que carece de un resto de fucosa presente en la cadena de oligosacáridos, puede ser útil para aumentar la función de la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC, por sus siglas en inglés) (ver Shield *et al.* (2002) JBC 277: 26733). En otras aplicaciones, la modificación de la galactosilación se puede hacer para modificar la citotoxicidad dependiente del complemento (CDC, por sus siglas en inglés).

MOLÉCULAS DE UNIÓN ANTÍGENO BIESPECÍFICAS MET X MET

[0066] Los presentes inventores han observado que ciertas moléculas de unión a antígeno monoespecíficas anti-MET que bloquean la unión de HGF a MET tienden a activar de manera potente la señalización de MET (una consecuencia indeseable para una molécula terapéutica). Sin embargo, los presentes inventores han descubierto sorprendentemente que las moléculas de unión a antígeno biespecíficas que se unen simultáneamente a dos epítopos separados en el dominio extracelular de la proteína MET son efectivas para bloquear la unión del ligando a MET mientras que causan poco agonismo en la señalización de MET.

[0067] Por consiguiente, en el presente documento se proporcionan moléculas de unión a antígeno biespecíficas que comprenden un primer dominio de unión a antígeno (también denominado en el presente documento como “D1”), y un segundo dominio de unión a antígeno (también denominado en el presente documento como “D2”). La unión simultánea de la molécula de unión a antígeno biespecífica a los dos epítopos MET separados da como resultado un bloqueo efectivo del ligando con una activación mínima de la señalización de MET.

[0068] Las moléculas de unión a antígeno biespecíficas, que comprenden un primer dominio de unión a antígeno (D1) que se une específicamente a un primer epítipo de MET humano y un segundo dominio de unión a antígeno (D2) que se une específicamente a un segundo epítipo de MET humano, se pueden denominar en el presente documento como “anticuerpos biespecíficos MET x MET”, “MET x MET” u otra terminología relacionada. En algunas formas de realización, el primer epítipo de MET humano comprende los

aminoácidos 192-204 de la SEQ ID NO: 155. En algunas formas de realización, el segundo epítipo de MET humano comprende los aminoácidos 305-3015 y 421-455 de la SEQ ID NO: 155. En algunas formas de realización, el primer epítipo de MET humano comprende los aminoácidos 192-204 de la SEQ ID NO: 155; y el segundo epítipo de MET humano comprende los aminoácidos 305-315 y 421-455 de la SEQ ID NO: 155.

[0069] En ciertas formas de realización, los dominios D1 y D2 de un anticuerpo biespecífico MET x MET no son competitivos entre sí. La no competencia entre D1 y D2 para unirse a MET significa que las proteínas de unión a antígeno monoespecíficas respectivas, de las que se derivaron D1 y D2, no compiten entre sí por la unión a MET humana. Los ejemplos de ensayos de competición de proteínas por su unión a antígeno son conocidos en la técnica, ejemplos no limitativos de estos se describen en otra parte del presente documento.

[0070] En ciertas formas de realización, D1 y D2 se unen a diferentes epítopos (por ejemplo, no superpuestos o parcialmente superpuestos) en MET, como se describe en otra parte del presente documento.

[0071] Las moléculas de unión a antígeno biespecíficas MET x MET pueden construirse usando los dominios de unión a antígeno de dos anticuerpos monoespecíficos anti-MET separados. Por ejemplo, se puede producir una colección de anticuerpos monoclonales monoespecíficos anti-MET usando métodos estándar conocidos en la técnica. Los anticuerpos individuales producidos de este modo pueden probarse por pares unos contra otros en una competencia cruzada para unirse a una proteína MET. Si dos anticuerpos anti-MET diferentes pueden unirse a MET al mismo tiempo (es decir, no compiten entre sí), entonces el dominio de unión a antígeno del primer anticuerpo anti-MET y el dominio de unión a antígeno del segundo anticuerpo anti-MET no competitivo se puede introducir en el diseño de un solo anticuerpo biespecífico MET x MET de acuerdo con la presente divulgación.

[0072] Según la presente divulgación, una molécula biespecífica de unión a antígeno puede ser un único polipéptido multifuncional, o puede ser un complejo multimérico de dos o más polipéptidos que están asociados de forma covalente o no covalente entre sí. Como se hará

evidente a partir de la presente descripción, cualquier constructo de unión a antígeno con capacidad de unirse simultáneamente a dos epítomos no idénticos separados de la molécula MET se considera como una molécula de unión a antígeno biespecífica. Cualquiera de las moléculas de unión a antígeno biespecíficas descritas en el presente documento, o variantes de las mismas, se puede construir usando técnicas estándares de biología molecular (por ejemplo, ADN recombinante y tecnología de expresión de proteínas) como sabrá todo experto con conocimientos normales en la técnica.

DOMINIOS DE UNIÓN A ANTIGENO

[0073] Las moléculas de unión a antígeno biespecíficas de la presente divulgación comprenden dos dominios de unión a antígeno separados (D1 y D2). Como se usa en el presente documento, la expresión “dominio de unión a antígeno” significa cualquier péptido, polipéptido, molécula de ácido nucleico, molécula de tipo andamio, molécula de presentación de péptido o constructo que contiene polipéptido que es capaz de unirse específicamente a un antígeno particular de interés (por ejemplo, MET humano). El término “se une específicamente” o similar, como se usa en el presente documento, significa que el dominio de unión a antígeno forma un complejo con un antígeno particular caracterizado por una constante de disociación (K_D) de 500 pM o menos, y no se une a otros antígenos no relacionados en condiciones normales de prueba. Los “antígenos no relacionados” son proteínas, péptidos o polipéptidos que tienen una identidad de aminoácidos inferior al 95% entre sí.

[0074] Los ejemplos de categorías de dominios de unión a antígeno que se pueden usar en el contexto de la presente divulgación incluyen anticuerpos, porciones de unión a antígeno de anticuerpos, péptidos que interactúan específicamente con un antígeno particular (por ejemplo, pepticuerpos (del inglés peptibodies)), moléculas receptoras que interactúan específicamente con un antígeno particular, proteínas que comprenden una porción de unión a ligando de un receptor que se une específicamente a un antígeno particular, andamios de unión a antígeno (p. ej., DARPin, proteínas de la repetición HEAT, proteínas de la repetición ARM, proteínas de la repetición tetratricopéptido y otros andamios basados en proteínas de repeticiones de origen natural, etc., [véase, por ejemplo, Boersma y Pluckthun,

2011, *Curr. Opin. Biotechnol.* 22:849-857, y las referencias citadas en ese documento]), y aptámeros o partes de los mismos.

[0075] Los métodos para determinar si dos moléculas se unen específicamente entre sí son bien conocidos en la técnica e incluyen, por ejemplo, diálisis de equilibrio, resonancia de plasmones superficiales, y similares. Por ejemplo, un dominio de unión a antígeno, como se usa en el contexto de la presente divulgación, incluye polipéptidos que se unen a un antígeno particular (por ejemplo, una molécula diana [T] o una proteína efectora internalizadora [E]) o una porción del mismo con una K_D de menos de alrededor de 500 pM, menos de alrededor de 400 pM, menos de alrededor de 300 pM, menos de alrededor de 200 pM, menos de alrededor de 100 pM, menos de alrededor de 90 pM, menos de alrededor de 80 pM, menos de alrededor de 70 pM, menos de alrededor de 60 pM, menos de alrededor de 50 pM, menos de alrededor de 40 pM, menos de alrededor de 30 pM, menos de alrededor de 20 pM, menos de alrededor de 10 pM, menos de alrededor de 5 pM, menos de alrededor de 4 pM, menos de alrededor de 2 pM, menos de alrededor de 1 pM, menos de alrededor de 0,5 pM, menos de alrededor de 0,2 pM, menos de alrededor de 0,1 pM, o menos de alrededor de 0,05 pM, medida en un ensayo de resonancia de plasmones superficiales.

[0076] El término “resonancia de plasmones superficiales”, como se usa en el presente documento, se refiere a un fenómeno óptico que permite el análisis de interacciones en tiempo real mediante la detección de alteraciones en las concentraciones de proteínas dentro de una matriz de biosensores, por ejemplo, utilizando el sistema BIAcore™ (División Biacore Life Sciences de Biacore de GE Healthcare, Piscataway, NJ).

[0077] El término “ K_D ”, como se usa en el presente documento, significa la constante de disociación en equilibrio de una interacción proteína-proteína particular (por ejemplo, interacción anticuerpo-antígeno). A menos que se indique lo contrario, los valores de K_D descritos en el presente documento se refieren a valores de K_D determinados por el ensayo de resonancia de plasmones superficiales a 25 °C.

[0078] Como se indicó anteriormente, un “dominio de unión a antígeno” (D1 y/o D2) puede comprender o consistir en un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno de un anticuerpo. El término “anticuerpo”, como se usa en el presente documento, significa

cualquier molécula de unión a antígeno o complejo molecular que comprende al menos una región determinante de complementariedad (CDR) que se une específicamente o interactúa con un antígeno particular (por ejemplo, MET humano). El término “anticuerpo” incluye moléculas de inmunoglobulina que comprenden cuatro cadenas polipeptídicas, dos cadenas pesadas (H) y dos cadenas ligeras (L) interconectadas por enlaces disulfuro, así como los multímeros de los mismos (por ejemplo, IgM). Cada cadena pesada comprende una región variable de cadena pesada (abreviada en el presente documento como HCVR o V_H) y una región constante de cadena pesada. La región constante de la cadena pesada comprende tres dominios, C_{H1} , C_{H2} y C_{H3} . Cada cadena ligera comprende una región variable de cadena ligera (abreviada en el presente documento como LCVR o V_L) y una región constante de cadena ligera. La región constante de la cadena ligera comprende un dominio (C_{L1}). Las regiones V_H y V_L pueden subdividirse adicionalmente en regiones de hipervariabilidad, denominadas regiones determinantes de complementariedad (CDR), intercaladas con regiones más conservadas denominadas regiones marco (FR). Cada V_H y V_L se compone de tres CDR y cuatro FR, dispuestas desde el extremo amino hasta el extremo carboxi en el siguiente orden: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4. En diferentes formas de realización, las FR de los anticuerpos proporcionados en el presente documento (o su porción de unión a antígeno) pueden ser idénticas a las secuencias de la línea germinal humana, o pueden modificarse de forma natural o artificial. Una secuencia de consenso de aminoácidos se puede definir en base a un análisis comparativo directo de dos o más CDR.

[0079] Los componentes D1 y/o D2 de las moléculas biespecíficas de unión a antígeno proporcionados en el presente documento pueden comprender o consistir en fragmentos de unión a antígeno de moléculas de anticuerpo completas. Los términos “porción de unión a antígeno” de un anticuerpo, “fragmento de unión a antígeno” de un anticuerpo, y similares, como se usan en el presente documento, incluyen cualquier polipéptido o glicoproteína de origen natural, obtenible enzimáticamente, sintético o genéticamente modificado que se une específicamente a un antígeno para formar un complejo. Los fragmentos de unión a antígeno de un anticuerpo pueden derivarse, por ejemplo, de moléculas de anticuerpo completas usando cualquier técnica estándar adecuada, como la digestión proteolítica o técnicas de ingeniería genética recombinante que involucran la manipulación y la expresión de ADN que codifica dominios variables y, opcionalmente, dominios constantes de anticuerpos. Dicho

ADN es conocido y/o está fácilmente disponible de, por ejemplo, fuentes comerciales, genotecas de ADN (que incluyen, por ejemplo, genotecas de fagos-anticuerpos), o se pueden sintetizar. El ADN puede secuenciarse y manipularse químicamente o mediante el uso de técnicas de biología molecular, por ejemplo, para arreglar uno o más dominios variables y/o constantes en una configuración adecuada, o para introducir codones, crear residuos de cisteína, modificar, agregar o eliminar aminoácidos, etc.

[0080] Los ejemplos no limitantes de fragmentos de unión a antígeno incluyen: (i) fragmentos Fab; (ii) fragmentos F(ab')₂; (iii) fragmentos Fd; (iv) fragmentos Fv; (v) moléculas de cadena única Fv (scFv); (vi) fragmentos dAb; y (vii) unidades de reconocimiento mínimas que consisten en los residuos de aminoácidos que imitan la región hipervariable de un anticuerpo (por ejemplo, una región determinante de complementariedad aislada (CDR), tal como un péptido CDR3), o un péptido FR3-CDR3-FR4 restringido. Otras moléculas de diseño, tales como, los anticuerpos con dominio específico, anticuerpos con dominio único, anticuerpos con dominio eliminado, anticuerpos quiméricos, anticuerpos con CDR injertada, diacuerpos, triacuerpos, tetracuerpos, minicuerpos, nanocuerpos (por ejemplo, nanocuerpos monovalentes, nanocuerpos bivalentes, etc.), los fármacos inmunofarmacéuticos modulares pequeños (SMIP) y los dominios variables de IgNAR de tiburón, también están incluidos dentro de la expresión “fragmento de unión a antígeno”, tal como se usa en el presente documento.

[0081] Un fragmento de unión a antígeno de un anticuerpo típicamente comprenderá al menos un dominio variable. El dominio variable puede ser de cualquier tamaño o composición de aminoácidos y generalmente comprenderá al menos una CDR que es adyacente o está en el mismo marco de lectura que una o más secuencias de marco. En los fragmentos de unión a antígeno que tienen un dominio de V_H asociado con un dominio de V_L, los dominios V_H y V_L pueden estar situados en cualquier disposición adecuada entre sí. Por ejemplo, la región variable puede ser dimérica y contener dímeros V_H-V_H, V_H-V_L o V_L-V_L. De forma alternativa, el fragmento de unión a antígeno de un anticuerpo puede contener un dominio V_H o V_L monomérico.

[0082] En ciertas formas de realización, un fragmento de unión a antígeno de un anticuerpo puede contener al menos un dominio variable unido covalentemente a al menos un dominio

constante. Los ejemplos de configuraciones de dominios variables y constantes no limitantes que se pueden encontrar dentro de un fragmento de unión a antígeno de un anticuerpo de la presente invención incluyen: (i) V_H-C_H1 ; (ii) V_H-C_H2 ; (iii) V_H-C_H3 ; (iv) $V_H-C_H1-C_H2$; (v) $V_H-C_H1-C_H2-C_H3$; (vi) $V_H-C_H2-C_H3$; (vii) V_H-C_L ; (viii) V_L-C_H1 ; (ix) V_L-C_H2 ; (x) V_L-C_H3 ; (xi) $V_L-C_H1-C_H2$; (xii) $V_L-C_H1-C_H2-C_H3$; (xiii) $V_L-C_H2-C_H3$; y (xiv) V_L-C_L . En cualquier configuración de los dominios variables y constantes, incluyendo cualquiera de las configuraciones ilustrativas enumeradas anteriormente, los dominios variables y constantes pueden estar, ya sea, directamente enlazados entre sí o pueden estar enlazados por una región bisagra completa o parcial o una región enlazadora. Una región bisagra puede consistir en al menos 2 (por ejemplo, 5, 10, 15, 20, 40, 60 o más) aminoácidos que dan como resultado un enlace flexible o semiflexible entre dominios variables y/o constantes adyacentes en una única molécula polipeptídica. Además, un fragmento de unión a antígeno de un anticuerpo de la presente invención puede comprender un homodímero o heterodímero (u otro multímero) de cualquiera de las configuraciones de dominio constante y variable enumeradas anteriormente en asociación no covalente entre sí y/o con uno o más dominios V_H y V_L monoméricos (por ejemplo, mediante enlace(s) disulfuro).

[0083] Las moléculas de unión a antígeno biespecíficas proporcionadas en el presente documento pueden comprender o consistir en anticuerpos humanos y/o anticuerpos humanos recombinantes, o fragmentos de los mismos. El término “anticuerpo humano”, como se usa en el presente documento, incluye anticuerpos que tienen regiones variables y constantes derivadas de secuencias de inmunoglobulina de la línea germinal humana. No obstante, los anticuerpos humanos pueden incluir residuos de aminoácidos no codificados por secuencias de inmunoglobulina de la línea germinal humana (por ejemplo, mutaciones introducidas por mutagénesis aleatoria o específica de sitio *in vitro* o por mutación somática *in vivo*), por ejemplo en las CDR y en particular CDR3. Sin embargo, el término “anticuerpo humano”, como se usa en el presente documento, no pretende incluir anticuerpos en los cuales las secuencias de CDR derivadas de la línea germinal de otra especie de mamífero, como por ejemplo un ratón, se hayan injertado en secuencias marco humanas.

[0084] Las moléculas de unión a antígeno biespecíficas de la presente divulgación pueden comprender o consistir en anticuerpos humanos recombinantes o fragmentos de unión a

antígeno de los mismos. El término “anticuerpo humano recombinante”, como se usa en el presente documento, pretende incluir todos los anticuerpos humanos que se preparan, expresan, crean o aíslan por medios recombinantes, como los anticuerpos expresados usando un vector de expresión recombinante transfectado en una célula hospedera (que se describe más adelante), anticuerpos aislados de una genoteca de anticuerpos humanos combinatoria y recombinante (que se describe más adelante), anticuerpos aislados de un animal (por ejemplo, un ratón) que es transgénico para los genes de inmunoglobulina humana (véase, por ejemplo, Taylor et al. (1992) Nucl. Acids Res. 20: 6287-6295) o anticuerpos preparados, expresados, creados o aislados por cualquier otro medio que implique el corte y empalme de secuencias de genes de inmunoglobulina humana con otras secuencias de ADN. Tales anticuerpos humanos recombinantes tienen regiones variables y constantes derivadas de secuencias de inmunoglobulina de la línea germinal humana. Sin embargo, en ciertas formas de realización, dichos anticuerpos humanos recombinantes se someten a mutagénesis *in vitro* (o mutagénesis somática *in vivo*, cuando se usa un animal transgénico para las secuencias de Ig humana) y, por tanto, las secuencias aminoacídicas de las regiones V_H y V_L de los anticuerpos recombinantes son secuencias que, aunque derivadas y relacionadas con las secuencias de V_H y V_L de línea germinal humana, pueden no existir de forma natural *in vivo* dentro del repertorio de la línea germinal de anticuerpos humanos.

[0085] Los métodos para producir anticuerpos biespecíficos se conocen en la técnica y se pueden usar para construir las moléculas de unión a antígeno biespecíficas descritas en el presente documento. Los ejemplos de formatos biespecíficos que se pueden usar en el contexto de la presente divulgación incluyen, sin limitación, por ejemplo, formatos de diacuerpos o basados en scFv, fusiones IgG-scFv, dominio variable dual (DVD)-Ig, cuadroma, botón en ojal (del inglés *knob-into-hole*), cadena ligera común (por ejemplo, una cadena ligera común con *botón en ojal*, etc.), CrossMab, CrossFab, cuerpos(SEED), cremallera de leucina, Duobody, IgG1/IgG2, Fab doble acción (DAF)-IgG, y formatos biespecíficos Mab² (para una revisión de los formatos anteriores véase, por ejemplo, Klein *et al.* 2012, mAbs 4:6, 1-11, y las referencias citadas en el mismo).

[0086] Los dominios de unión a antígeno ilustrativos (D1 y D2) que pueden incluirse en las moléculas de unión a antígeno biespecíficas MET x MET proporcionadas en el presente

documento incluyen los dominios de unión a antígeno derivados de cualquiera de los anticuerpos anti-MET descritos en el presente documento. Por ejemplo, la presente divulgación incluye moléculas de unión a antígeno biespecíficas MET x MET que comprenden un dominio de unión a antígeno D1 o D2 que comprende una HCVR que comprende una secuencia aminoacídica seleccionada de entre cualquiera de las secuencias aminoacídicas de HCVR enumeradas en la Tabla 1, o una secuencia sustancialmente similar a la misma que tiene al menos el 90%, al menos el 95%, al menos el 98% o al menos el 99% de identidad de secuencia con la misma.

[0087] En el presente documento también se proporcionan moléculas de unión a antígeno biespecíficas MET x MET que comprenden un dominio de unión a antígeno D1 o D2 que comprende una LCVR que comprende una secuencia aminoacídica seleccionada de entre cualquiera de las secuencias aminoacídicas de LCVR enumeradas en la Tabla 1, o una secuencia sustancialmente similar a la misma que tiene al menos el 90%, al menos el 95%, al menos el 98% o al menos el 99% de identidad de secuencia con la misma.

[0088] En el presente documento se proporcionan las moléculas de unión a antígeno biespecíficas MET x MET que comprenden un dominio de unión a antígeno D1 o D2 que comprende un par de secuencias aminoacídicas de HCVR y LCVR (HCVR/LCVR) que comprende cualquiera de las secuencias aminoacídicas de HCVR enumeradas en la Tabla 1 apareadas con cualquiera de las secuencias aminoacídicas de LCVR enumeradas en la Tabla 1. Según ciertas formas de realización, la presente invención proporciona moléculas de unión a antígeno biespecíficas MET x MET que comprenden un dominio de unión a antígeno D1 o D2 que comprende un par de secuencias aminoacídicas de HCVR/LCVR contenido dentro de cualquiera de los anticuerpos anti-MET ilustrativos enumerados en la Tabla 1.

[0089] En el presente documento también se proporcionan moléculas de unión a antígeno biespecíficas MET x MET que comprenden un dominio de unión a antígeno D1 o D2 que comprende una CDR1 de cadena pesada (HCDR1) que comprende una secuencia aminoacídica seleccionada de entre cualquiera de las secuencias aminoacídicas de HCDR1 enumeradas en la Tabla o una secuencia sustancialmente similar a la misma que tiene al menos el 90%, al menos el 95%, al menos el 98% o al menos el 99% de identidad de secuencia.

[0090] También se proporcionan moléculas de unión a antígeno biespecíficas MET x MET que comprenden un dominio de unión a antígeno D1 o D2 que comprende una CDR2 de cadena pesada (HCDR2) que comprende una secuencia aminoacídica seleccionada de entre cualquiera de las secuencias aminoacídicas de HCDR2 enumeradas en la Tabla 1 o una secuencia sustancialmente similar a la misma que tiene al menos el 90%, al menos el 95%, al menos el 98% o al menos el 99% de identidad de secuencia.

[0091] También se proporcionan moléculas de unión a antígeno biespecíficas MET x MET que comprenden un dominio de unión a antígeno D1 o D2 que comprende una CDR3 de cadena pesada (HCDR3) que comprende una secuencia aminoacídica seleccionada de entre cualquiera de las secuencias aminoacídicas de HCDR3 enumeradas en la Tabla 1 o una secuencia sustancialmente similar a la misma que tiene al menos un 90%, al menos un 95%, al menos un 98% o al menos un 99% de identidad de secuencia.

[0092] También se proporcionan moléculas de unión a antígeno biespecíficas MET x MET que comprenden un dominio de unión a antígeno D1 o D2 que comprende una CDR1 de cadena ligera (LCDR1) que comprende una secuencia aminoacídica seleccionada de entre cualquiera de las secuencias aminoacídicas de LCDR1 enumeradas en la Tabla 1 o una secuencia sustancialmente similar a la misma que tiene al menos un 90%, al menos un 95%, al menos un 98% o al menos un 99% de identidad de secuencia.

[0093] También se proporcionan moléculas de unión a antígeno biespecíficas MET x MET que comprenden un dominio de unión a antígeno D1 o D2 que comprende una CDR2 de cadena ligera (LCDR2) que comprende una secuencia aminoacídica seleccionada de entre cualquiera de las secuencias aminoacídicas de LCDR2 enumeradas en la Tabla 1 o una secuencia sustancialmente similar a la misma que tiene al menos un 90%, al menos un 95%, al menos un 98% o al menos un 99% de identidad de secuencia.

[0094] También se proporcionan moléculas de unión a antígeno biespecíficas MET x MET que comprenden un dominio de unión a antígeno D1 o D2 que comprende una CDR3 de cadena ligera (LCDR3) que comprende una secuencia aminoacídica seleccionada de entre cualquiera de las secuencias aminoacídicas de LCDR3 enumeradas en la Tabla 1 o una

secuencia sustancialmente similar a la misma que tiene al menos un 90%, al menos un 95%, al menos un 98% o al menos un 99% de identidad de secuencia.

[0095] También se proporcionan moléculas de unión a antígeno biespecíficas MET x MET que comprenden un dominio de unión a antígeno D1 o D2 que comprende un par de secuencias aminoacídicas de HCDR3 y LCDR3 (HCDR3/LCDR3) que comprende cualquiera de las secuencias aminoacídicas de HCDR3 enumeradas en la Tabla 1 apareadas con cualquiera de las secuencias aminoacídicas de LCDR3 enumeradas en la Tabla 1. Según ciertas formas de realización, la presente divulgación proporciona anticuerpos, o fragmentos de unión a antígeno de los mismos, que comprenden un par de secuencias aminoacídicas de HCDR3/LCDR3 contenido dentro de cualquiera de los anticuerpos anti-MET ilustrativos enumerados en la Tabla 1.

[0096] También se proporcionan moléculas de unión a antígeno biespecíficas MET x MET que comprenden un dominio de unión a antígeno D1 o D2 que comprende un conjunto de seis CDR (es decir, HCDR1-HCDR2-HCDR3-LCDR1-LCDR2-LCDR3) contenido dentro de cualquiera de los ejemplos de anticuerpos anti-MET enumerados en la Tabla 1.

[0097] En una forma de realización relacionada, la presente divulgación proporciona moléculas de unión a antígeno biespecíficas MET x MET que comprenden un dominio de unión a antígeno D1 o D2 que comprende un conjunto de seis CDR (es decir, HCDR1-HCDR2-HCDR3-LCDR1-LCDR2-LCDR3) contenido dentro de un par de secuencias aminoacídicas de HCVR/LCVR como se define en cualquiera de los ejemplos de anticuerpos anti-MET enumerados en la Tabla 1.

[0098] Las moléculas de unión a antígeno biespecíficas MET x MET proporcionadas en el presente documento pueden comprender un dominio de unión a antígeno D1 derivado de cualquiera de los anticuerpos anti-MET de la Tabla 1, y un dominio de unión a antígeno D2 derivado de cualquier otro anticuerpo anti-MET de la tabla 1. Los ejemplos no limitantes de los anticuerpos biespecíficos MET x MET de la presente divulgación se representan en la Figura 1. La Figura 1 es una matriz que ilustra los componentes de 272 anticuerpos biespecíficos MET x MET ilustrativos. Cada celda numerada de la matriz (numerada del 1 al 272) identifica un anticuerpo biespecífico único que comprende un dominio de unión a

antígeno “D1” y un dominio de unión a antígeno “D2”, en donde el dominio de unión a antígeno D1 comprende el dominio variable de inmunoglobulina (par de secuencias aminoacídicas de HCVR/LCVR) o CDR del correspondiente anticuerpo anti-MET listado a lo largo del eje Y, y en donde el dominio de unión a antígeno D2 comprende el dominio variable de inmunoglobulina (par de secuencias aminoacídicas de HCVR/LCVR) o CDR del correspondiente anticuerpo anti-MET enumerado a lo largo del eje X. Así, por ejemplo, la molécula de unión a antígeno biespecífica MET x MET “número 10” que se muestra en la matriz comprende un dominio de unión a antígeno D1 que comprende un par de HCVR/LCVR, o conjunto de 6-CDR, del anticuerpo anti-MET H4H13290P2 ilustrativo y un dominio de unión a antígeno D2 que comprende un par de HCVR/LCVR, o un conjunto de 6-CDR, del anticuerpo anti-MET H4H13321P2 ilustrativo. Los ejemplos adicionales de anticuerpos biespecíficos MET x MET proporcionados en el presente documento se describen en el Ejemplo 4 del presente documento.

[0099] Como un ejemplo ilustrativo no limitante, la presente divulgación incluye moléculas de unión a antígeno biespecíficas MET x MET que comprenden un dominio de unión a antígeno D1 y un dominio de unión a antígeno D2, en donde el dominio de unión a antígeno D1 comprende un par de secuencias aminoacídicas de HCVR/LCVR de SEQ ID NO: 58/138, o un conjunto de CDR de cadenas pesadas y ligeras (HCDR1-HCDR2-HCDR3-LCDR1-LCDR2-LCDR3) que comprende las SEQ ID NO: 60-62-64-140-142-144, y en donde el dominio de unión a antígeno D2 comprende un par de secuencias aminoacídicas de HCVR/LCVR de SEQ ID NO: 82/138, o un conjunto de CDR de cadena pesada y ligera (HCDR1-HCDR2-HCDR3-LCDR1-LCDR2-LCDR3) que comprende las SEQ ID NO: 84-86-88-140-142-144. Un ejemplo de anticuerpo biespecífico MET x MET que tiene estas características de secuencia es el anticuerpo biespecífico denominado H4H14639D, también denominado anticuerpo biespecífico N° 122, el que comprende un D1 derivado de H4H13306P2 y un D2 derivado de H4H13312P2 (ver Ejemplo 4, Tabla 5 de este documento).

[0100] Como otro ejemplo ilustrativo no limitante, la presente divulgación incluye moléculas de unión a antígeno biespecíficas MET x MET que comprenden un dominio de unión a antígeno D1 y un dominio de unión a antígeno D2, en donde el dominio de unión a

antígeno D1 comprende un par de secuencias aminoacídicas de HCVR/LCVR de SEQ ID NO: 18/138, o un conjunto de CDR de cadenas pesada y ligera (HCDR1-HCDR2-HCDR3-LCDR1-LCDR2-LCDR3) que comprende las SEQ ID NO: 20-22-24-140-142-144 y donde el dominio de unión a antígeno D2 comprende un par de secuencias aminoacídicas de HCVR/LCVR de SEQ ID NO: 82/138, o un conjunto de CDR de cadenas pesada y ligera (HCDR1-HCDR2-HCDR3-LCDR1-LCDR2-LCDR3) que comprende las SEQ ID NO: 84-86-88-140-142-144. Un ejemplo de anticuerpo biespecífico MET x MET que tiene estas características de secuencia es el anticuerpo biespecífico denominado H4H14635D, también denominado anticuerpo biespecífico N° 42, el que comprende un D1 derivado de H4H13295P2 y un D2 derivado de H4H13312P2 (ver Ejemplo 4, Tabla 5 de este documento).

COMPONENTES MULTIMERIZANTES

[0101] Las moléculas de unión a antígeno biespecíficas proporcionadas en el presente documento, en ciertas formas de realización también pueden comprender uno o más componentes multimerizantes. Los componentes multimerizantes pueden funcionar para mantener la asociación entre los dominios de unión a antígeno (D1 y D2). Como se usa en el presente documento, un “componente multimerizante” es cualquier macromolécula, proteína, polipéptido, péptido o aminoácido que tiene la capacidad de asociarse con un segundo componente multimerizante de la misma o similar estructura o constitución. Por ejemplo, un componente multimerizante puede ser un polipéptido que comprende un dominio C_H3 de inmunoglobulina. Un ejemplo no limitante de un componente multimerizante es una porción Fc de una inmunoglobulina, por ejemplo, un dominio Fc de una IgG seleccionada de los isotipos IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4, así como cualquier alotipo dentro de cada grupo de isotipos. En ciertas formas de realización, el componente multimerizante es un fragmento Fc o una secuencia aminoacídica de 1 a alrededor de 200 aminoácidos de longitud que contiene al menos un residuo de cisteína. En otras formas de realización, el componente multimerizante es un residuo de cisteína, o un péptido corto que contiene cisteína. Otros dominios multimerizantes incluyen péptidos o polipéptidos que comprenden o consisten en una cremallera de leucina, un motivo de bucle-hélice o un motivo superhelicoidal.

[0102] En ciertas formas de realización, las moléculas de unión a antígeno biespecíficas proporcionadas en el presente documento comprenden dos dominios multimerizantes, M1 y M2, en donde D1 está unido a M1 y D2 está unido a M2, y en donde la asociación de M1 con M2 facilita el enlace físico de D1 y D2 entre sí en una única molécula de unión a antígeno biespecífica. En ciertas formas de realización, M1 y M2 son idénticos entre sí. Por ejemplo, M1 puede ser un dominio Fc que tiene una secuencia aminoacídica particular, y M2 es un dominio Fc con la misma secuencia aminoacídica que M1. Alternativamente, M1 y M2 pueden diferir entre sí en una o más posiciones de aminoácidos. Por ejemplo, M1 puede comprender un primer dominio C_H3 de inmunoglobulina (Ig) y M2 pueden comprender un segundo dominio C_H3, en donde el primer y segundo dominios C_H3 de Ig difieren entre sí en al menos un aminoácido, y en donde al menos una diferencia de aminoácido reduce la unión del constructo direccionado a la proteína A en comparación con un constructo de referencia que tiene secuencias M1 y M2 idénticas. En una forma de realización, el dominio C_H3 de Ig de M1 se une a la proteína A y el dominio C_H3 de Ig de M2 contiene una mutación que reduce o anula la unión a la proteína A, como una modificación H95R (por numeración de exones IMGT; H435R por numeración EU). El C_H3 de M2 puede comprender además una modificación Y96F (por IMGT; Y436F por EU). Otras modificaciones que se pueden encontrar dentro de C_H3 de M2 incluyen: D16E, L18M, N44S, K52N, V57M y V82I (por IMGT; D356E, L358M, N384S, K392N, V397M, y V422I por EU) en el caso de un dominio Fc de IgG1; N44S, K52N y V82I (IMGT; N384S, K392N y V422I por EU) en el caso de un dominio Fc de IgG2; y Q15R, N44S, K52N, V57M, R69K, E79Q y V82I (por IMGT; Q355R, N384S, K392N, V397M, R409K, E419Q y V422I por EU) en el caso de un dominio Fc de IgG4.

[0103] Las moléculas de unión a antígeno biespecíficas de la divulgación pueden ser “aisladas”. Una “molécula de unión a antígeno biespecífica aislada”, como se usa en el presente documento, significa una molécula de unión a antígeno biespecífica que ha sido identificada y separada y/o recuperada a partir de al menos un componente de su ambiente natural. Por ejemplo, para los fines de la presente divulgación, un anticuerpo biespecífico que se ha separado o extraído desde al menos un componente de un organismo, o de un tejido o célula en el que se produce el anticuerpo, es un “anticuerpo biespecífico aislado”. Una molécula de unión a antígeno biespecífica aislada también incluye moléculas *in situ* dentro

de una célula recombinante. Las moléculas aisladas de unión a antígeno biespecíficas son moléculas que se han sometido a al menos una etapa de purificación o aislamiento. Según ciertas formas de realización, una molécula de unión a antígeno biespecífica aislada puede estar sustancialmente libre de otro material celular y/o productos químicos.

[0104] Las moléculas de unión a antígeno biespecíficas descritas en el presente documento, o sus dominios de unión a antígeno (D1 y/o D2) pueden comprender una o más sustituciones, inserciones y/o deleciones de aminoácidos en las regiones marco y/o CDR de los dominios variables de cadena pesada y ligera en comparación con las secuencias de la línea germinal correspondientes de las que se derivaron las proteínas de unión a antígeno o los dominios de unión a antígeno. Dichas mutaciones pueden determinarse fácilmente comparando las secuencias aminoacídicas descritas en el presente documento con las secuencias de la línea germinal disponibles, por ejemplo, en bases de datos públicas de secuencias de anticuerpos. El presente la divulgación incluye moléculas de unión a antígeno biespecíficas descritas en el presente documento, o sus dominios de unión a antígeno (D1 y/o D2), que se derivan de cualquiera de las secuencias aminoacídicas descritas en el presente documento, en donde uno o más aminoácidos dentro de una o más regiones marco y/o CDR se mutan a el o los residuos correspondientes de la secuencia de la línea germinal a partir de la cual se derivó el anticuerpo, o a el o los residuos correspondientes de otra secuencia de la línea germinal humana, o a una sustitución conservadora de aminoácidos de el o los residuos correspondientes de la línea germinal. (estos cambios de secuencia se denominan aquí colectivamente como “mutaciones de la línea germinal”).

[0105] Una persona con experiencia ordinaria en la técnica, comenzando con las secuencias de la región variable de la cadena pesada y ligera descritas en el presente documento puede producir fácilmente numerosas moléculas de unión a antígeno biespecíficas, o dominios de unión a antígeno de las mismas (D1 y/o D2), que comprenden una o más mutaciones individuales de la línea germinal o combinaciones de las mismas. En ciertas formas de realización, todos los residuos del marco y/o CDR dentro de los dominios V_H y/o V_L se vuelven a mutar a los residuos encontrados en la secuencia parental de la línea germinal de la que se derivó el anticuerpo. En otras formas de realización, solo ciertos residuos se vuelven a mutar a la secuencia parental de la línea germinal, por ejemplo, solo

los residuos mutados que se encuentran dentro de los primeros 8 aminoácidos de FR1 o dentro de los últimos 8 aminoácidos de FR4, o solo los residuos mutados que se encuentran dentro de CDR1, CDR2 o CDR3. En otras formas de realización, uno o más de los residuos del marco y/o CDR se mutan a los residuos correspondientes de una secuencia de línea germinal diferente (es decir, una secuencia de línea germinal que es diferente de la secuencia de línea germinal de la que se derivó originalmente el anticuerpo).

[0106] Además, las moléculas de unión a antígeno biespecíficas, o sus dominios de unión a antígeno (D1 y/o D2), de la presente divulgación pueden contener cualquier combinación de dos o más mutaciones de línea germinal dentro de las regiones marco y/o CDR, por ejemplo, en donde ciertos residuos individuales se mutan al residuo correspondiente de una secuencia de línea germinal particular mientras que otros residuos, que difieren de la secuencia de línea germinal parental, se mantienen o se mutan al residuo correspondiente de una secuencia de línea germinal diferente. Una vez obtenidos, las moléculas de unión a antígeno biespecíficas, o sus dominios de unión a antígeno (D1 y/o D2), que contienen una o más mutaciones de la línea germinal se pueden probar fácilmente para detectar la presencia una o más propiedades deseadas, tales como, especificidad de unión mejorada, afinidad de unión aumentada, propiedades biológicas antagonistas o agonistas mejoradas o aumentadas (según sea el caso), inmunogenicidad reducida, etc. Dentro de La presente divulgación se incluyen las moléculas de unión a antígeno biespecíficas, o los dominios de unión a antígeno de las mismas (D1 y/o D2), obtenidos de esta manera general.

VARIANTES

[0107] La presente divulgación también incluye anticuerpos anti-MET y moléculas de unión a antígeno biespecíficas que comprenden variantes de cualquiera de las secuencias aminoacídicas de HCVR, LCVR y/o CDR descritas en el presente documento. Los ejemplos de variantes incluidos en este aspecto incluyen variantes de cualquiera de las secuencias aminoacídicas de HCVR, LCVR y/o CDR descritas en el presente documento que tienen una o más sustituciones conservadoras. Por ejemplo, la presente divulgación incluye anticuerpos anti-MET y moléculas de unión a antígeno biespecíficas MET x MET que tienen secuencias aminoacídicas de HCVR, LCVR y/o CDR con, por ejemplo, 10 o menos, 8 o menos, 6 o menos, 4 o menos, etc. sustituciones de aminoácidos conservadoras con respecto a cualquiera

de las secuencias aminoacídicas de HCVR, LCVR y/o CDR expuestas en la Tabla 1 de este documento.

[0108] Los ejemplos de variantes incluidos dentro de este aspecto de la divulgación también incluyen variantes que tienen una identidad de secuencia sustancial con cualquiera de las secuencias aminoacídicas de HCVR, LCVR y/o CDR descritas en el presente documento. Tal como se usa en el presente documento en el contexto de las secuencias aminoacídicas, el término “identidad sustancial” o “sustancialmente idéntico” significa que dos secuencias aminoacídicas, cuando están alineadas de manera óptima, como con los programas GAP o BESTFIT que usan pesos de huecos predeterminados, comparten al menos 95%, 98% o 99% de identidad de secuencia. En ciertas formas de realización, las posiciones de residuos que no son idénticos se diferencian por sustituciones conservadoras de aminoácidos. Una “sustitución conservadora de aminoácidos” es aquella en la que un residuo de aminoácido está sustituido por otro residuo de aminoácido que tiene una cadena lateral (grupo R) con propiedades químicas similares (por ejemplo, carga o hidrofobicidad). En general, una sustitución de aminoácidos conservadora no cambiará sustancialmente las propiedades funcionales de una proteína. En los casos en que dos o más secuencias aminoacídicas difieren entre sí por sustituciones conservadoras, el porcentaje de identidad de secuencia o el grado de similitud se puede ajustar hacia arriba para corregir la naturaleza conservadora de la sustitución. Los medios para realizar este ajuste son bien conocidos por los expertos en la técnica. Véase, por ejemplo, Pearson (1994) *Methods Mol. Biol.* 24: 307 - 331, que se incorpora aquí como referencia. Los ejemplos de grupos de aminoácidos que tienen cadenas laterales con propiedades químicas similares incluyen 1) cadenas laterales alifáticas: glicina, alanina, valina, leucina e isoleucina; 2) cadenas laterales alifáticas-hidroxilo: serina y treonina; 3) cadenas laterales que contienen amida: asparagina y glutamina; 4) cadenas laterales aromáticas: fenilalanina, tirosina y triptófano; 5) cadenas laterales básicas: lisina, arginina e histidina; 6) cadenas laterales ácidas: aspartato y glutamato, y 7) cadenas laterales que contienen azufre: cisteína y metionina. Los grupos conservadores preferidos de sustitución de aminoácidos son: valina-leucina-isoleucina, fenilalanina-tirosina, lisina-arginina, alanina-valina, glutamato-aspartato y asparagina-glutamina. De forma alternativa, un reemplazo conservativo es cualquier cambio que tenga un valor positivo en la matriz de probabilidad logarítmica PAM250 descrita en Gonnet et

al. (1992) Science 256: 1443-45, incorporado aquí como referencia. Un reemplazo “moderadamente conservativo” es cualquier cambio que tenga un valor no negativo en la matriz de probabilidad logarítmica PAM250,

[0109] La identidad de secuencia entre dos secuencias aminoacídicas diferentes se mide típicamente usando un software de análisis de secuencia. El software de análisis de secuencias empareja secuencias similares utilizando medidas de similitud asignadas a varias sustituciones, deleciones y otras modificaciones, incluidas las sustituciones conservadoras de aminoácidos. Por ejemplo, el software GCG contiene programas tales como GAP y BESTFIT que pueden usarse con parámetros predeterminados para determinar la homología de secuencia o identidad de secuencia entre polipéptidos estrechamente relacionados, tales como polipéptidos homólogos de diferentes especies de organismos o entre una proteína de tipo silvestre y una muteína de la misma. Véase, por ejemplo, GCG Versión 6.1. Las secuencias polipeptídicas también se pueden comparar usando FASTA con parámetros predeterminados o recomendados; un programa en GCG Versión 6.1. FASTA (por ejemplo, FASTA2 y FASTA3) proporciona alineaciones y porcentaje de identidad de secuencia de las regiones de la mejor superposición entre las secuencias de consulta y de búsqueda (Pearson (2000) supra). Otro algoritmo preferido cuando se compara una secuencia de la invención con una base de datos que contiene un gran número de secuencias de diferentes organismos es el programa informático BLAST, especialmente BLASTP o TBLASTN, que usa parámetros por defecto. Véase, por ejemplo, Altschul et al. (1990) J. Mol. Biol. 215: 403 - 410 y (1997) Nucleic Acids Res. 25: 3389-402, cada uno incorporada aquí por referencia.

Anticuerpos anti-MET y moléculas de unión a antígeno biespecíficas MET x MET que comprenden variantes de Fc

[0110] Según ciertas formas de realización proporcionadas en el presente documento, se proporcionan anticuerpos anti-MET y proteínas de unión a antígeno biespecíficas MET x MET que comprenden un dominio Fc que comprende una o más mutaciones que potencian o disminuyen la unión del anticuerpo al receptor FcRn, por ejemplo, a pH ácido en comparación con pH neutro. Por ejemplo, la presente divulgación incluye anticuerpos anti-MET y proteínas de unión a antígeno biespecíficas MET x MET que comprenden una mutación en la región C_H2 o C_H3 del dominio Fc, en donde la o las mutaciones aumentan la

afinidad del dominio Fc a FcRn en un ambiente ácido (por ejemplo, en un endosoma donde el pH varía de alrededor de 5,5 a alrededor de 6,0). Dichas mutaciones pueden dar como resultado un aumento en la semivida en suero del anticuerpo cuando se administra a un animal. Los ejemplos no limitantes de tales modificaciones de Fc incluyen, por ejemplo, una modificación en la posición 250 (por ejemplo, E o Q); 250 y 428 (por ejemplo, L o F); 252 (por ejemplo, L/Y/F/W o T), 254 (por ejemplo, S o T), y 256 (por ejemplo, S/R/Q/E/D o T); o una modificación en la posición 428 y/o 433 (por ejemplo, H/L/R/S/P/Q o K) y/o 434 (por ejemplo, A, W, H, F o Y [N434A, N434W, N434H, N434F o N434Y]); o una modificación en la posición 250 y/o 428; o una modificación en la posición 307 o 308 (por ejemplo, 308F, V308F) y 434. En una forma de realización, la modificación comprende una modificación 428L (por ejemplo, M428L) y 434S (por ejemplo, N434S); una modificación 428L, 259I (por ejemplo, V259I) y 308F (por ejemplo, V308F); una modificación 433K (por ejemplo, H433K) y una modificación 434 (por ejemplo, 434Y); una modificación 252, 254 y 256 (por ejemplo, 252Y, 254T y 256E); una modificación 250Q y 428L (por ejemplo, T250Q y M428L); y una modificación 307 y/o 308 (por ejemplo, 308F o 308P).

[0111] Por ejemplo, la presente divulgación incluye anticuerpos anti-MET y proteínas de unión a antígeno biespecífico MET x MET que comprenden un dominio Fc que comprende uno o más pares o grupos de mutaciones seleccionadas del grupo que consiste en: 250Q y 248L (por ejemplo, T250Q y M248L); 252Y, 254T y 256E (por ejemplo, M252Y, S254T y T256E); 428L y 434S (por ejemplo, M428L y N434S); y 433K y 434F (por ejemplo, H433K y N434F). Dentro del alcance de la presente divulgación se contemplan todas las combinaciones posibles de las anteriores mutaciones del dominio Fc, y otras mutaciones dentro de los dominios variables de los anticuerpos descritos en el presente documento.

Características biológicas de las moléculas de unión a antígeno proporcionadas en el presente documento

[0112] En el presente documento se proporcionan anticuerpos y fragmentos de unión a antígeno de los mismos que se unen con alta afinidad a MET humano monomérico. Por ejemplo, la presente divulgación incluye anticuerpos anti-MET que se unen a MET humano monomérico (por ejemplo, hMET.mmh) con una K_D de menos de alrededor de 230 nM, medida por resonancia de plasmones superficiales a 25 °C o 37 °C, por ejemplo, utilizando

un formato de ensayo como se define en el Ejemplo 3 de este documento, o un ensayo sustancialmente similar. Según ciertas formas de realización, se proporcionan anticuerpos anti-MET que se unen a MET humano monomérico a 37 °C con una K_D de menos de alrededor de 230 nM, menos de alrededor de 200 nM, menos de alrededor de 150 nM, menos de alrededor de 100 nM, menos de alrededor de 50 nM, menos de alrededor de 25 nM, menos de alrededor de 20 nM, menos de alrededor de 10 nM, menos de alrededor de 8 nM, menos de alrededor de 6 nM, menos de alrededor de 5 nM, menos de alrededor de 4 nM, o menos de alrededor de 3 nM, medida por resonancia de plasmones superficiales, por ejemplo, usando un formato de ensayo como se define en el Ejemplo 3 de este documento, o un ensayo sustancialmente similar.

[0113] La presente divulgación también incluye anticuerpos y fragmentos de unión a antígeno de los mismos que se unen a MET humano monomérico (por ejemplo, hMET.mmh) con una semivida disociativa ($t_{1/2}$) mayor que alrededor de 1 minuto, medida por resonancia de plasmones superficiales a 25 °C o 37 °C, por ejemplo, utilizando un formato de ensayo como se define en el Ejemplo 3 de este documento, o un ensayo sustancialmente similar. Según ciertas formas de realización, se proporcionan anticuerpos anti-MET que se unen a MET humano monomérico a 37 °C con una $t_{1/2}$ mayor que alrededor de 1 minuto, mayor que alrededor de 2 minutos, mayor que alrededor de 4 minutos, mayor que alrededor de 6 minutos, mayor que alrededor de 8 minutos, mayor que alrededor de 10 minutos, mayor que alrededor de 12 minutos, mayor que alrededor de 14 minutos, mayor que alrededor de 16 minutos, mayor que alrededor de 18 minutos, o mayor que alrededor de 20 minutos, o más, medida por resonancia de plasmones superficiales, por ejemplo, utilizando un formato de ensayo como se define en el Ejemplo 3 de este documento, o un ensayo sustancialmente similar .

[0114] En el presente documento se proporcionan anticuerpos y fragmentos de unión a antígeno de los mismos que se unen con alta afinidad a MET humano dimérico (por ejemplo, hMET.mFc). Por ejemplo, la presente divulgación incluye anticuerpos anti-MET que se unen a MET dimérico humano con una K_D de menos de alrededor de 3 nM, medida por resonancia de plasmones superficiales a 25 °C o 37 °C, por ejemplo, utilizando un formato de ensayo como se define en Ejemplo 3 en el presente documento, o un ensayo sustancialmente similar.

Según ciertas formas de realización, se proporcionan anticuerpos anti-MET que se unen a MET dimérico humano a 37 °C con una K_D de menos de alrededor de 3 nM, menos de alrededor de 2 nM, menos de alrededor de 1 nM, menos de alrededor de 0,9 nM, menos de alrededor de 0,8 nM, menos de alrededor de 0,7 nM, menos de alrededor de 0,6 nM, menos de alrededor de 0,5 nM, menos de alrededor de 0,4 nM, menos de alrededor de 0,3 nM, o menos de alrededor de 0,25 nM, medida por resonancia de plasmones superficiales, por ejemplo, utilizando un formato de ensayo como se define en el Ejemplo 3 de este documento, o un ensayo sustancialmente similar.

[0115] En el presente documento también se proporcionan anticuerpos y fragmentos de unión a antígeno de los mismos que se unen a MET humano dimérico (por ejemplo, hMET.mFc) con una semivida disociativa ($t_{1/2}$) mayor que alrededor de 4 minutos, medida por resonancia de plasmones superficiales a 25 °C o 37 °C, por ejemplo, utilizando un formato de ensayo como se define en el Ejemplo 3 de este documento, o un ensayo sustancialmente similar. Según ciertas formas de realización, se proporcionan anticuerpos anti-MET que se unen a MET humano dimérico a 37 °C con una $t_{1/2}$ mayor que alrededor de 4 minutos, mayor que alrededor de 5 minutos, mayor que alrededor de 10 minutos, mayor que alrededor de 20 minutos, mayor que alrededor de 30 minutos, mayor que alrededor de 40 minutos, mayor que alrededor de 50 minutos, mayor que alrededor de 60 minutos, mayor que alrededor de 70 minutos, mayor que alrededor de 80 minutos, mayor que alrededor de 90 minutos, mayor que alrededor de 100 minutos, mayor que alrededor de 105 minutos, o más, medida por resonancia de plasmones superficiales, por ejemplo, utilizando un formato de ensayo como el que se define en el Ejemplo 3 de este documento, o un ensayo sustancialmente similar.

[0116] En el presente documento también se proporcionan proteínas de unión a antígeno biespecíficas MET x MET que se unen a MET humano dimérico (por ejemplo, hMET.mFc) con una semivida disociativa ($t_{1/2}$) de más de alrededor de 10 minutos, según lo medido por resonancia de plasmones superficiales a 25 °C o 37 °C, por ejemplo, utilizando un formato de ensayo como se define en el Ejemplo 5 de este documento, o un ensayo sustancialmente similar. Según ciertas formas de realización, se proporcionan proteínas de unión a antígeno biespecíficas MET x MET que se unen a MET humano dimérico a 37 °C con una $t_{1/2}$ mayor que alrededor de 10 minutos, mayor que alrededor de 20 minutos, mayor que alrededor de

30 minutos, mayor que alrededor de 40 minutos, mayor que alrededor de 50 minutos, mayor que alrededor de 60 minutos, mayor que alrededor de 70 minutos, mayor que alrededor de 80 minutos, mayor que alrededor de 90 minutos, mayor que alrededor de 100 minutos, mayor que alrededor de 200 minutos, mayor que alrededor de 300 minutos, mayor que alrededor de 400 minutos, mayor que alrededor de 500 minutos, mayor que alrededor de 600 minutos, mayor que alrededor de 700 minutos, mayor que alrededor de 800 minutos, mayor que alrededor de 900 minutos, mayor que alrededor de 1000 minutos, mayor que alrededor de 1100 minutos, o más, medida por resonancia de plasmones superficiales, por ejemplo, usando un formato de ensayo como se define en el Ejemplo 5 de este documento, o un ensayo sustancialmente similar.

[0117] En el presente documento también se proporcionan anticuerpos anti-MET y proteínas de unión a antígeno biespecíficas MET x MET que bloquean la interacción entre HGF y MET, por ejemplo, en un ensayo de unión a ligando *in vitro*. Según ciertas formas de realización proporcionadas en el presente documento, se proporcionan proteínas de unión a antígeno biespecíficas MET x MET que bloquean la unión de HGF a células que expresan MET humano, e inducen una activación mínima o nula de MET en ausencia de señalización de HGF. Por ejemplo, la presente divulgación proporciona proteínas de unión a antígeno biespecíficas MET x MET que muestran un grado de actividad agonista de MET en un ensayo reportero de actividad MET basado en células que es inferior al 50%, inferior al 40%, inferior al 30%, inferior al 20%, inferior al 10%, inferior al 5%, inferior al 3%, inferior al 2% o inferior al 1% de la actividad agonista de MET observada en un ensayo reportero de actividad equivalente utilizando un anticuerpo monoespecífico que comprende D1 o D2 solos.

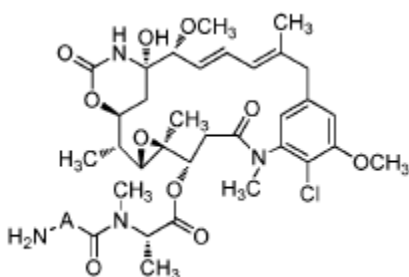
[0118] Los anticuerpos y proteínas de unión a antígeno de la presente divulgación pueden poseer una o más de las características biológicas mencionadas anteriormente, o cualquier combinación de las mismas. La lista anterior de características biológicas de los anticuerpos no pretende ser exhaustiva. Otras características biológicas de los anticuerpos proporcionados en el presente documento serán evidentes para una persona con experiencia normal en la técnica a partir de una revisión de la presente divulgación que incluye los ejemplos de trabajo en el presente documento.

Conjugados de anticuerpo-fármaco (ADC)

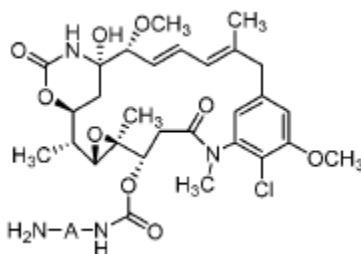
[0119] En el presente documento se proporcionan conjugados anticuerpo-fármaco (ADC, por sus siglas en inglés) que comprenden un anticuerpo anti-MET o una proteína de unión a antígeno biespecífica MET x MET conjugada con un resto terapéutico tal como un agente citotóxico, un fármaco quimioterapéutico o un radioisótopo.

[0120] Los agentes citotóxicos incluyen cualquier agente que sea perjudicial para el crecimiento, la viabilidad o la propagación de las células, incluidos, entre otros, los agentes que interactúan con la tubulina y agentes que dañan el ADN. Los ejemplos de agentes citotóxicos y agentes quimioterapéuticos adecuados que pueden conjugarse con anticuerpos anti-MET de acuerdo con este aspecto de la divulgación incluyen, por ejemplo, 1-(2-cloroetil)-1,2-dimetanosulfonil hidrazida, 1,8-dihidroxi-biciclo[7.3.1]trideca-4,9-dieno-2,6-diyne-13-ona, 1-dehidrotestosterona, 5-fluorouracilo, 6-mercaptopurina, 6-tioguanina, 9-amino camptotecina, actinomicina D, amanitinas, aminopterina, anguidina, antraciclina, antramina (AMC), auristatina, bleomicina, busulfán, ácido butírico, caliqueamicinas (por ejemplo, caliqueamicina γ_1), camptotecina, carminomicinas, carmustina, cemadotinas, cisplatino, colchicina, combretastatina, ciclofosfamida, citarabina, citocalasina B, dactinomicina, daunorubicina, decarbazina, diacetoxipentildoxorubicina, dibromomanitol, dihidróxido de antracina diona, disorazoles, dolastatina (por ejemplo, dolastatin 10), doxorubicina, duocarmicina, equinomicinas, eleuterobinas, emetina, epotilones, esperamicina, estramustinas, bromuro de etidio, etopósido, fluorouracilos, geldanamycinas, gramicidina D, glucocorticoides, irinotecanos, inhibidores de la proteína del huso de quinesina (KSP), leptomicinas, leurosinas, lidocaína, lomustina (CCNU), maitansinoides, mecloretamina, melfalán, mercatopurinas, metopterinas, metotrexato, mitramicina, mitomicina, mitoxantrona, N8-acetil espermidina, podofilotoxinas, procaína, propranolol, pteridinas, puromicina, pricrolbenzodiazinoszinas (PBD), rizoxinas, estreptoizotocinas, tallisomicinas, taxol, tenopósido, tetracaina, tiotepa clorambucil, tomamicinas, topotecanos, tubulisina, vinblastina, vincristina, vindesina, vinorelbina, y derivados de cualquiera de los anteriores. Según ciertas formas de realización, el agente citotóxico que se conjuga con un anticuerpo anti-MET es un maitansinoide tal como DM1 o DM4, un derivado de tomamicina o un derivado de dolastatina. Según ciertas realizaciones, el agente citotóxico que se conjuga con un anticuerpo anti-MET es una auristatina tal como MMAE, MMAF, o derivados de los mismos. Dentro del alcance de la presente divulgación se contemplan otros agentes

[0122] En algunas formas de realización, el maitansinoide tiene la siguiente estructura:

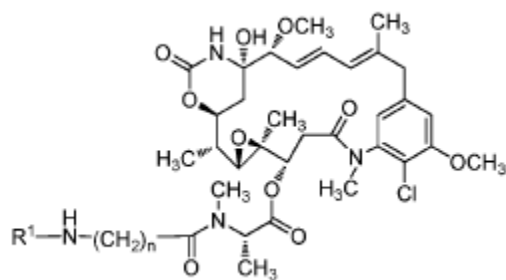


[0123] En algunas formas de realización, el maitansinoide tiene la siguiente estructura:



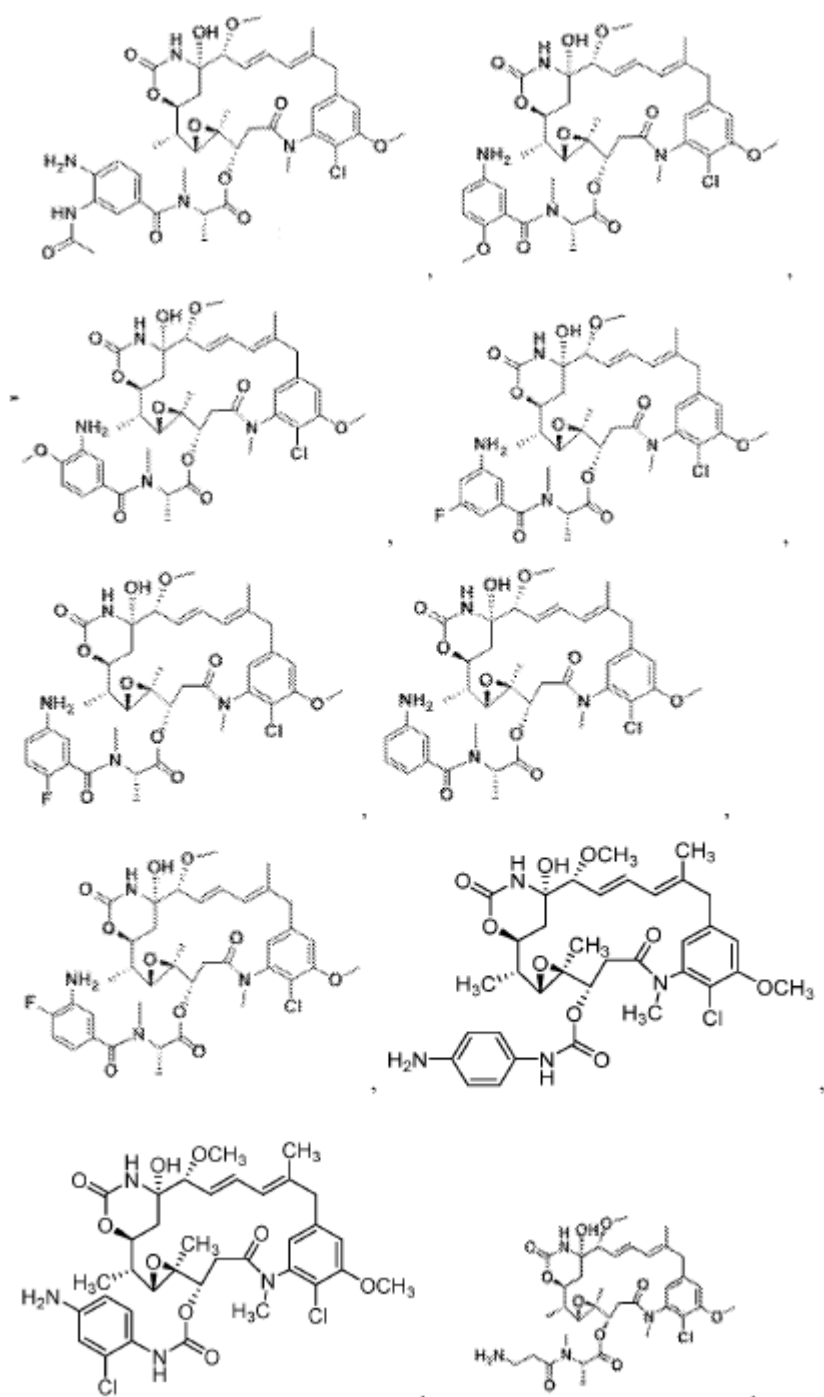
en donde A es un arileno o heteroarileno opcionalmente sustituido.

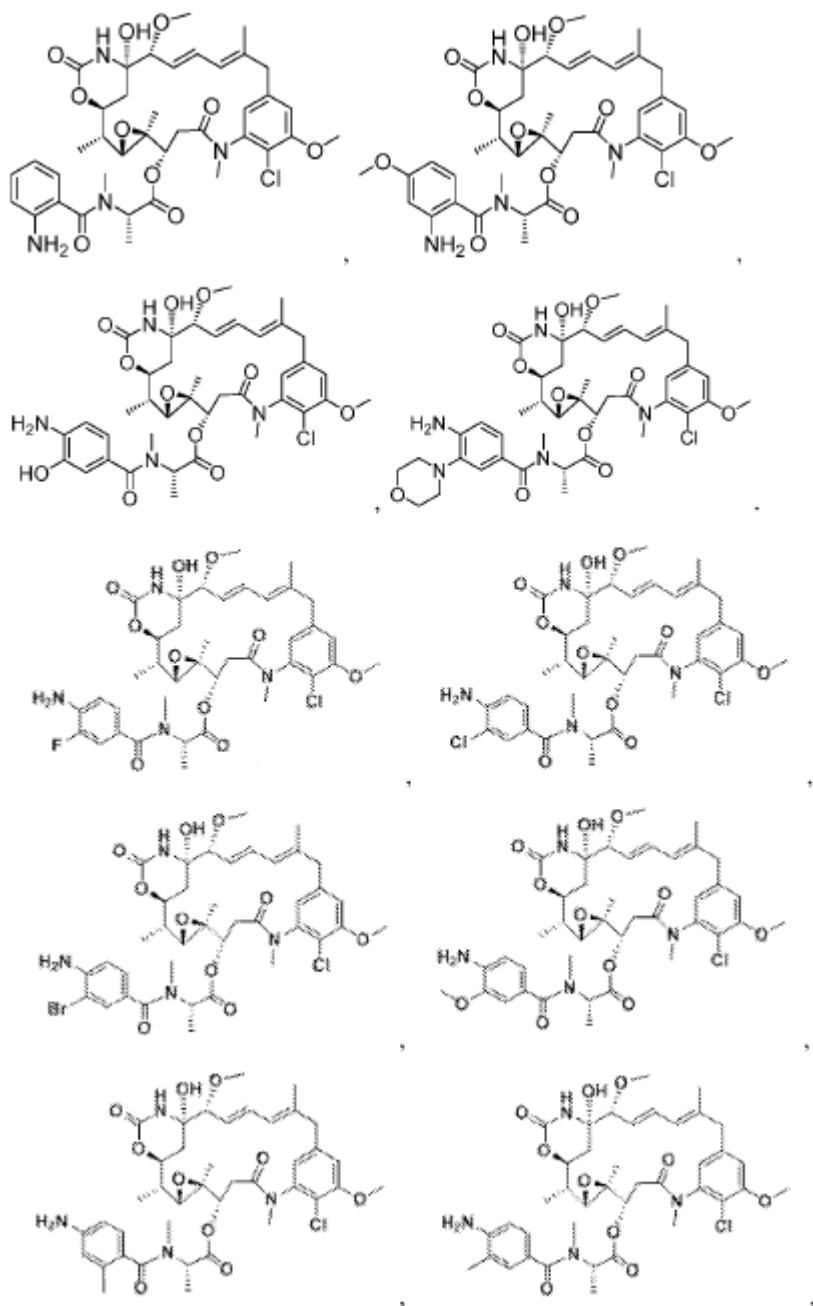
[0124] En algunas formas de realización, el maitansinoide tiene la siguiente estructura:

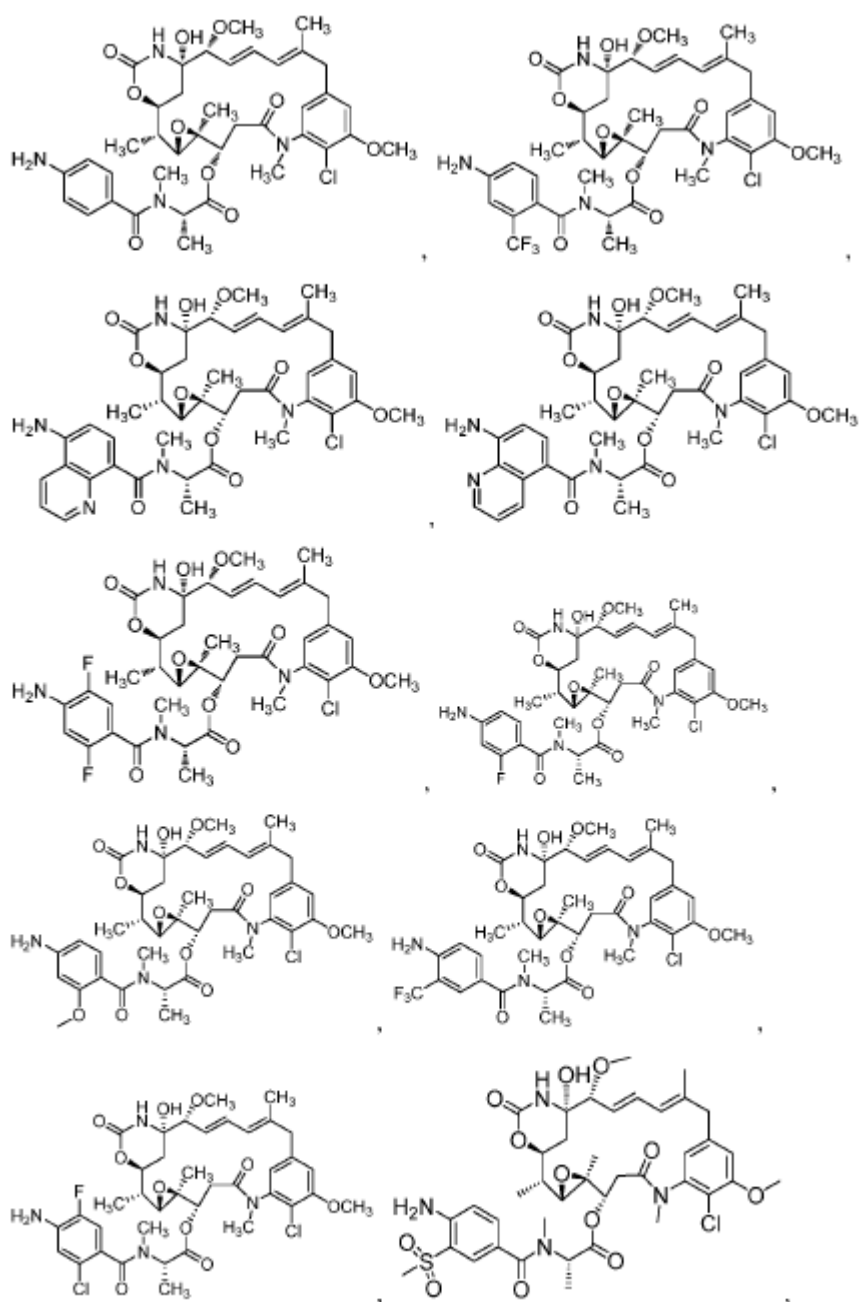


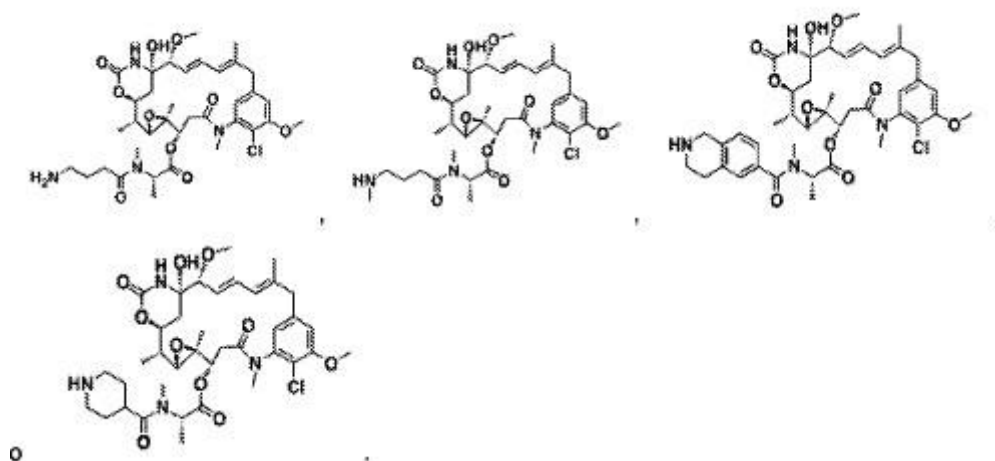
en donde n es un número entero de 1-12 y R¹ es alquilo.

[0125] En algunas formas de realización, el maitansinoide es:

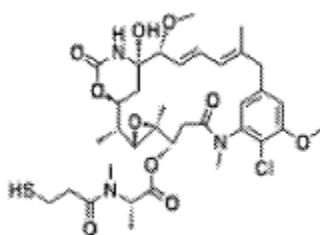




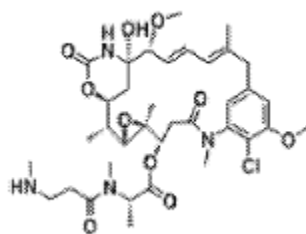




[0126] En algunas formas de realización, el maitansinoide es:



[0127] En algunas formas de realización, el maitansinoide es:



[0128] En el presente documento también se proporcionan conjugados anticuerpo-radionúclido (ARC, por sus siglas en inglés) que comprenden anticuerpos anti-MET conjugados con uno o más radionúclidos. Los ejemplos de radionúclidos que se pueden usar

en el contexto de este aspecto de la divulgación incluyen, entre otros, por ejemplo, ^{225}Ac , ^{212}Bi , ^{213}Bi , ^{131}I , ^{186}Re , ^{227}Th , ^{222}Rn , ^{223}Ra , ^{224}Ra , e ^{90}Y .

[0129] En ciertas formas de realización proporcionadas en el presente documento, se proporcionan ADC que comprenden un anticuerpo anti-MET o una proteína de unión a antígeno biespecífica MET x MET conjugada con un agente citotóxico (por ejemplo, cualquiera de los agentes citotóxicos descritos anteriormente) a través de una molécula enlazadora. Los enlazadores son cualquier grupo o resto que enlaza, conecta o une el anticuerpo o las proteínas de unión a antígeno descritas en el presente documento con un resto terapéutico, por ejemplo, un agente citotóxico. Los enlazadores adecuados se pueden encontrar, por ejemplo, en *Antibody-Drug Conjugates and Immunotoxins*; Phillips, G. L, Ed.; Springer Verlag: New York, 2013; *Antibody-Drug Conjugates*; Ducry, L, Ed.; Humana Press, 2013; *Antibody-Drug Conjugates*; Wang, J., Shen, W.-C, y Zaro, J. L, Eds.; Springer International Publishing, 2015, los contenidos de cada uno de ellos se incorpora en el presente documento por referencia en su totalidad. En general, los agentes enlazadores de unión adecuados para los conjugados de anticuerpos descritos en el presente documento son aquellos que son suficientemente estables para explotar la semivida de circulación del anticuerpo y, al mismo tiempo, pueden liberar su carga útil después de la internalización del conjugado mediada por antígeno. Los enlazadores pueden ser escindibles o no escindibles. Los enlazadores escindibles incluyen enlazadores que se escinden por metabolismo intracelular después de la internalización, por ejemplo, escisión por hidrólisis, reducción o reacción enzimática. Los enlazadores no escindibles incluyen enlazadores que liberan una carga útil adjunta a través de la degradación lisosomal del anticuerpo después de la internalización. Los enlazadores adecuados incluyen, pero no se limitan a, enlazadores lábiles en ácido, enlazadores lábiles a la hidrólisis, enlazadores escindibles enzimáticamente, enlazadores lábiles a la reducción, enlazadores autoinmolables y enlazadores no escindibles. Los enlazadores adecuados también incluyen, pero no se limitan a, aquellos que son o comprenden péptidos, glucurónidos, succinimida-tioéteres, unidades de polietilenglicol (PEG), hidrazonas, unidades de mal-caproilo, unidades de dipéptidos, unidades de valina-citrulina y unidades de paraaminobencilo (PAB).

[0130] Para crear o construir un ADC de la presente divulgación, se puede usar cualquier molécula enlazadora o tecnología de enlace conocida en la técnica. En ciertas formas de realización, el enlazador es un enlazador escindible. De acuerdo con otras formas de realización, el enlazador es un enlazador no escindible. Los ejemplos de enlazadores que se pueden usar en el contexto de la presente divulgación incluyen, enlazadores que comprenden o consisten en, por ejemplo, MC (6-maleimidocaproil), MP (maleimidopropanoilo), val-cit (valina-citrulina), val-ala (valina-alanina), sitio dipeptídico en el enlazador escindible por proteasa, ala-phe (alanina-fenilalanina), sitio dipeptídico en el enlazador escindible por proteasa, PAB (p-aminobenciloxicarbonilo), SPP (4-(2-piridiltio)pentanoato de N-succinimidilo), SMCC (4-(N-maleimidometil)ciclohexano-1-carboxilato de N-succinimidilo), SIAB (4-yodo-acetil)aminobenzoato de N-succinimidilo), y variantes y combinaciones de los mismos. Se proporcionan ejemplos adicionales de enlazadores que se pueden usar en el contexto de la presente divulgación, por ejemplo, en los documentos US 7.754.681 y en Ducry, Bioconjugate Chem., 2010, 27: 5-13, y las referencias citadas en el mismo, cuyos contenidos se incorporan en el presente documento por referencia en su totalidad.

[0131] En ciertas formas de realización, los enlazadores son estables en condiciones fisiológicas. En ciertas formas de realización, los enlazadores son escindibles, por ejemplo, pueden liberar al menos la porción de carga útil en presencia de una enzima o en un intervalo o valor de pH particular. En algunas formas de realización, un enlazador comprende un resto escindible por enzimas. Los restos escindibles por enzimas ilustrativos incluyen, pero no se limitan a, enlaces peptídicos, enlaces éster, hidrazonas y enlaces disulfuro. En algunas formas de realización, el enlazador comprende un enlazador escindible por catepsina.

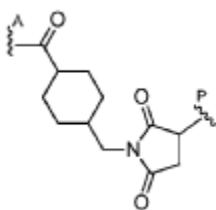
[0132] En algunas formas de realización, el enlazador comprende un resto no escindible.

[0133] Los enlazadores adecuados también incluyen, pero no se limitan a, aquellos que están unidos químicamente a dos residuos de cisteína de un único agente de unión, por ejemplo, un anticuerpo. Dichos enlazadores pueden servir para imitar los enlaces disulfuro del anticuerpo que se rompen como resultado del proceso de conjugación.

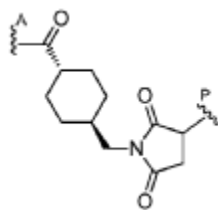
[0134] En algunas formas de realización, el enlazador comprende uno o más aminoácidos. Los aminoácidos adecuados incluyen los aminoácidos naturales, no naturales, estándares, no estándares, proteinogénicos, no proteinogénicos y L- o D-. En algunas formas de realización, el enlazador comprende alanina, valina, glicina, leucina, isoleucina, metionina, triptófano, fenilalanina, prolina, serina, treonina, cisteína, tirosina, asparagina, glutamina, ácido aspártico, ácido glutámico, lisina, arginina, histidina, citrulina, un derivado de los mismos, o una combinación de los mismos. En ciertas formas de realización, una o más cadenas laterales de los aminoácidos están unidas a un grupo de cadena lateral, que se describe a continuación. En algunas formas de realización, el enlazador comprende valina y citrulina. En algunas formas de realización, el enlazador comprende lisina, valina y citrulina. En algunas formas de realización, el enlazador comprende lisina, valina y alanina. En algunas formas de realización, el enlazador comprende valina y alanina.

[0135] En algunas formas de realización, el enlazador comprende un grupo autoinmolativo. El grupo autoinmolativo puede ser cualquier grupo conocido por los expertos. En formas de realización particulares, el grupo autoinmolativo es *p*-aminobencilo (PAB), o un derivado del mismo. Los derivados útiles incluyen *p*-aminobenciloxycarbonilo (PABC). Los expertos reconocerán que un grupo autoinmolativo es capaz de llevar a cabo una reacción química que libera los átomos restantes de un enlazador desde una carga útil.

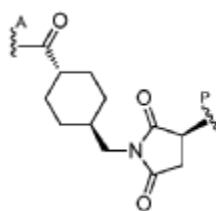
[0136] En algunas formas de realización, el enlazador es:



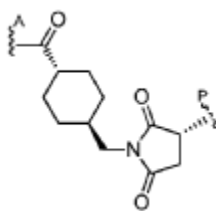
en donde $\text{---}\overset{\text{A}}{\underset{\text{~}}{\text{~}}}$ es un enlace al anticuerpo o proteína de unión a antígeno (por ejemplo, a través de residuos de lisina) y $\text{---}\overset{\text{P}}{\underset{\text{~}}{\text{~}}}$ es un enlace al agente citotóxico (por ejemplo, DM1). En algunas formas de realización, el enlazador es:



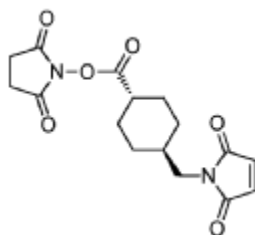
en donde $\begin{array}{c} \text{A} \\ \text{---} \end{array}$ es un enlace al anticuerpo o proteína de unión a antígeno (por ejemplo, a través de un residuo de lisina) y $\begin{array}{c} \text{P} \\ \text{---} \end{array}$ es un enlace al agente citotóxico (por ejemplo, DM1). En ciertas formas de realización, el enlazador es:



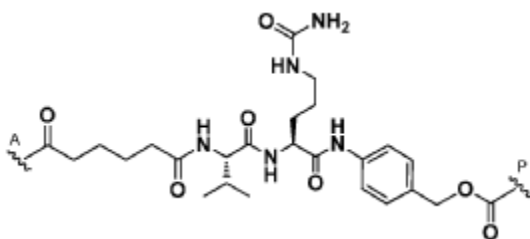
[0137] En ciertas formas de realización, el enlazador es:



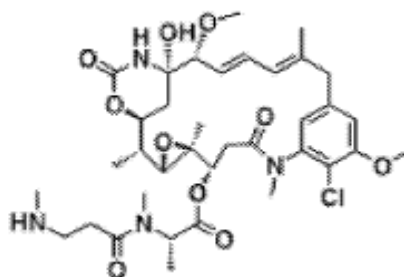
[0138] En algunas formas de realización, el enlazador se deriva de maleimidilmetil-4-trans-ciclohexancarboxiscinato:



[0139] En algunas formas de realización, el enlazador es:



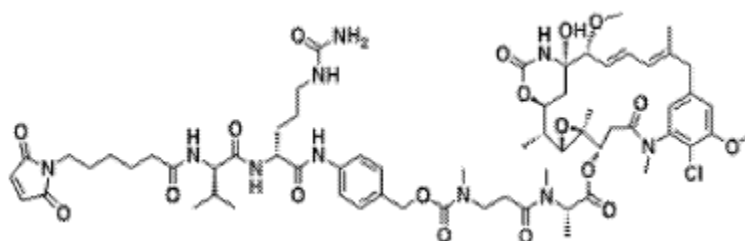
en donde $\text{---}\overset{\text{A}}{\text{~}}\text{---}$ es un enlace al anticuerpo o proteína de unión a antígeno (por ejemplo, a través de residuos de lisina) y $\text{---}\overset{\text{P}}{\text{~}}\text{---}$ es un enlace al agente citotóxico (por ejemplo, un compuesto que tiene la siguiente fórmula:



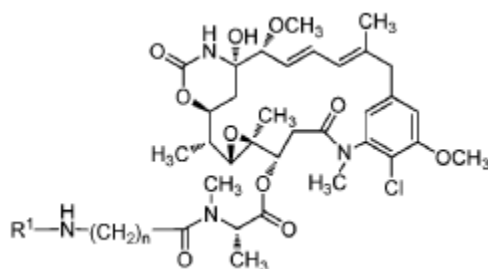
[0140] La presente divulgación comprende los ADC en los que un enlazador conecta un anticuerpo anti-MET o una proteína de unión a antígeno biespecífica MET x MET a un fármaco o citotoxina a través de una unión a un aminoácido particular dentro del anticuerpo o molécula de unión a antígeno. Ejemplos de uniones de aminoácidos que se pueden usar en el contexto de este aspecto son, por ejemplo, lisina (véase, por ejemplo, US 5,208,020; US 2010/0129314; Hollander et al., *Bioconjugate Chem.*, 2008, 19: 358-361; WO 2005/089808; US 5.714.586; US 2013/0101546; y US 2012/0585592), cisteína (véase, por ejemplo, US 2007/0258987; WO 2013/055993; WO 2013/055990; WO 2013/053873; WO 2013/053872; WO 2011/130598; US 2013/0101546; US 7,750,116), selenocisteína (véase, por ejemplo, WO 2008/122039; y Hofer et al., *Proc. Natl Acad Sci.*, USA, 2008, 105: 12451-12456), formilglutamina (véase, por ejemplo, Carrico et al., *Nat. Chem. Biol.*, 2007, 3: 321-322; Agarwal et al., *Proc. Natl. Acad. Sci.*, USA, 2013, 110: 46-51, y Rabuka et al., *Nat. Protocols*, 2012, 10:1052-1067), aminoácidos no naturales (véase, por ejemplo, el documento WO 2013/068874 y WO 2012/166559), y aminoácidos ácidos (véase, por ejemplo, WO 2012/05982). Los enlazadores también pueden conjugarse con una proteína de unión a

antígeno mediante la unión a carbohidratos (véase, por ejemplo, US 2008/0305497, WO 2014/065661, y Ryan et al., *Food & Agriculture Immunol.*, 2001, 73: 127-130) y enlazadores disulfuro (véase, por ejemplo, WO 2013/085925, WO 2010/010324, WO 2011/018611, y Shaunak et al., *Nat. Chem. Biol.*, 2006, 2: 312-313). También pueden emplearse técnicas de conjugación específicas de sitio para dirigir la conjugación a residuos particulares del anticuerpo o proteína de unión a antígeno (véase, por ejemplo, Schumacher et al. *J Clin Immunol* (2016) 36 (Supl. 1): 100). Las técnicas de conjugación específicas del sitio incluyen, entre otras, la conjugación de glutamina a través de la transglutaminasa (véase, por ejemplo, Schibli, *Angew Chemie Inter Ed.* 2010, 49, 9995).

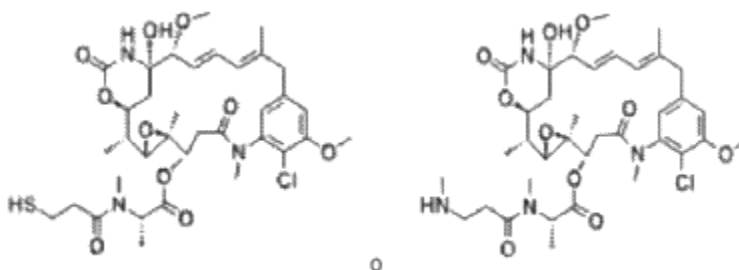
[0141] Según ciertas formas de realización, la presente divulgación proporciona ADC, en donde un anticuerpo anti-MET o una proteína de unión a antígeno biespecífica MET x MET, como se describe en el presente documento, se conjuga con una composición enlazador-fármaco como se divulga en la Publicación de Patente Internacional WO2014/145090, (por ejemplo, el compuesto “7”, también denominado aquí como “M0026” y representado a continuación), cuya descripción se incorpora en el presente documento por referencia en su totalidad:



[0142] En el presente documento también se proporcionan conjugados anticuerpo-fármaco que comprenden los anticuerpos monoespecíficos anti-MET y los anticuerpos biespecíficos MET x MET descritos en el presente documento, donde dicho anticuerpo anti-MET o anticuerpo biespecífico MET x MET se conjuga con un agente citotóxico. En ciertas formas de realización, el agente citotóxico es un maitansinoide. En ciertas formas de realización, el maitansinoide es un compuesto que tiene la siguiente fórmula:

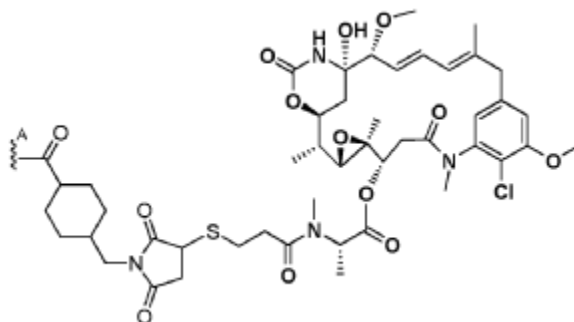


en donde n es un número entero de 1-12 y R^1 es alquilo. En ciertas formas de realización, el maitansinoide es



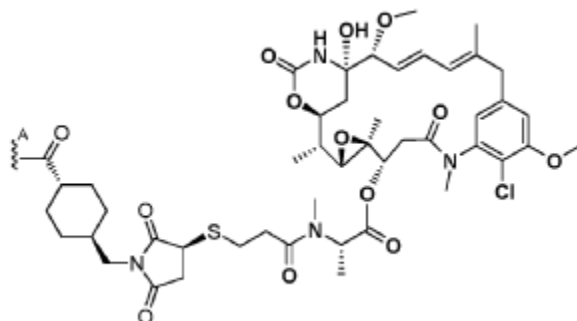
En ciertas formas de realización, el agente citotóxico es un maitansinoide, y el maitansinoide está unido covalentemente al anticuerpo a través del enlazador no escindible. En ciertas formas de realización, el agente citotóxico es un maitansinoide, y el maitansinoide está unido covalentemente al anticuerpo a través un enlazador escindible.

[0143] En una forma de realización, el anticuerpo se conjuga con:



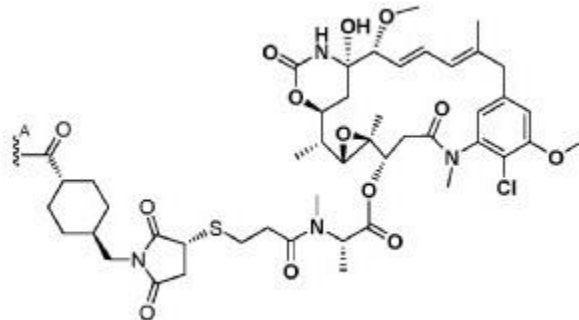
en donde $\overset{A}{\underset{2}{\text{S}}}$ es un enlace al anticuerpo.

[0144] En una forma de realización, el anticuerpo se conjuga con:



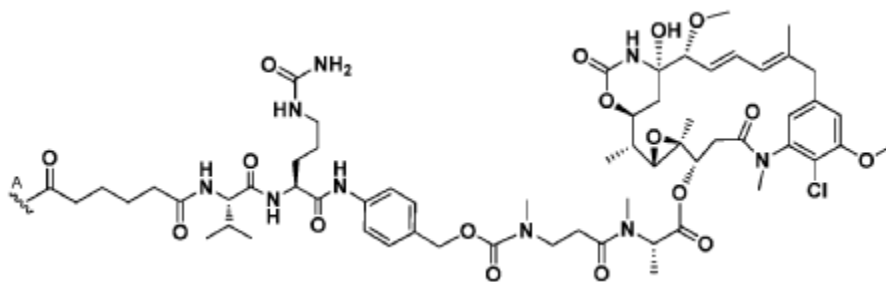
en donde $\begin{array}{c} \text{A} \\ \text{---} \\ \text{---} \\ \text{---} \end{array}$ es un enlace al anticuerpo.

[0145] En una forma de realización, el anticuerpo se conjuga con:



en donde $\begin{array}{c} \text{A} \\ \text{---} \\ \text{---} \\ \text{---} \end{array}$ es un enlace al anticuerpo.

[0146] En una forma de realización, el anticuerpo se conjuga con:



en donde $\begin{array}{c} \text{A} \\ \text{---} \\ \text{---} \\ \text{---} \end{array}$ es un enlace al anticuerpo.

[0147] En algunas formas de realización, los conjugados tienen la siguiente estructura:



en donde:

Ab es un anticuerpo anti-MET o una proteína de unión a antígeno biespecífica MET x MET como se describe en el presente documento;

L es un enlazador;

Pay es un agente citotóxico; y

n es un número entero de 1-10,

[0148] En algunas formas de realización, Ab es un anticuerpo anti-MET que comprende las CDR dentro del par de secuencias aminoacídicas de HCVR/LCVR de SEQ ID NO: 82/138. En algunas formas de realización, Ab es un anticuerpo anti-MET que comprende la secuencia aminoacídica de HCVR de SEQ ID NO: 82 y la secuencia aminoacídica de LCVR de la SEQ ID NO: 138.

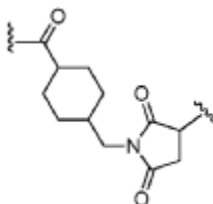
[0149] En algunas formas de realización, Ab es una proteína de unión a antígeno biespecífica MET x MET que comprende las CDR dentro de la secuencia aminoacídica de D1-HCVR de SEQ ID NO: 58 y las CDR dentro de la secuencia aminoacídica de D2-HCVR de SEQ ID NO: 82. En algunos aspectos, la proteína de unión a antígeno biespecífica MET x MET comprende además las CDR dentro de la secuencia aminoacídica de LCVR de SEQ ID NO: 138. En algunas formas de realización, Ab es una proteína de unión a antígeno biespecífica MET x MET que comprende la secuencia aminoacídica de D1-HCVR de SEQ ID NO: 58 y la secuencia aminoacídica de D2-HCVR de SEQ ID NO: 82. En algunos aspectos, la proteína de unión a antígeno biespecífica MET x MET comprende además la secuencia aminoacídica de LCVR de SEQ ID NO: 138.

[0150] En algunas formas de realización, Ab es una proteína de unión a antígeno biespecífica MET x MET que comprende las CDR dentro de la secuencia aminoacídica de D1-HCVR de SEQ ID NO: 18 y las CDR dentro de la secuencia aminoacídica de D2-HCVR

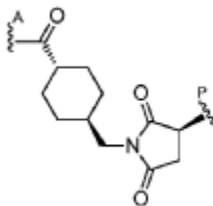
de SEQ ID NO: 82. En algunos aspectos, la proteína de unión a antígeno biespecífica MET x MET comprende además las CDR dentro de la secuencia aminoacídica de LCVR de SEQ ID NO: 138. En algunas formas de realización, Ab es una proteína de unión a antígeno biespecífica MET x MET que comprende la secuencia aminoacídica de D1-HCVR de SEQ ID NO: 18 y la secuencia aminoacídica de D2-HCVR de SEQ ID NO: 82.

[0151] En algunas formas de realización, L es un enlazador escindible. En algunas formas de realización, L es un enlazador no escindible. En algunas formas de realización, L comprende un dipéptido. En algunas formas de realización, L comprende un resto PAB.

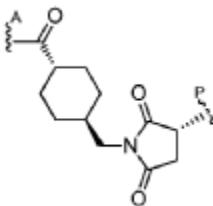
[0152] En algunas formas de realización, L comprende un resto que tiene la siguiente estructura:



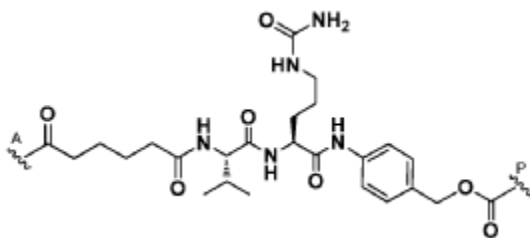
[0153] En algunas formas de realización, L comprende un resto que tiene la siguiente estructura:



[0154] En algunas formas de realización, L comprende un resto que tiene la siguiente estructura:

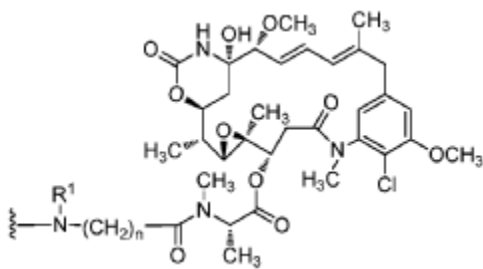


[0155] En algunas formas de realización, L comprende un resto que tiene la siguiente estructura:



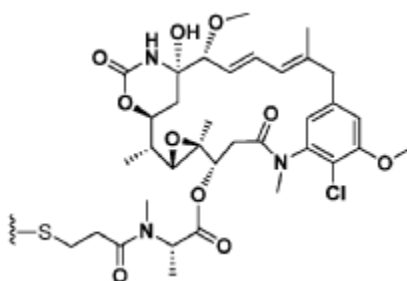
[0156] En algunas formas de realización, Pay es un maitansinoide.

[0157] En algunas formas de realización, Pay es:

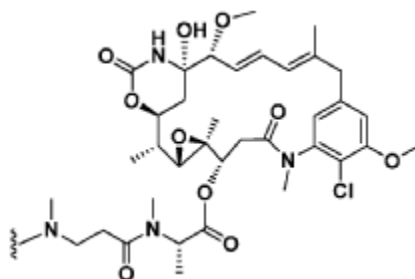


en donde R^1 es alquilo.

[0158] En algunas formas de realización, Pay es:

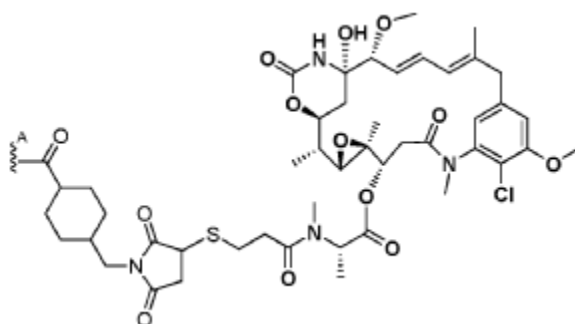


[0159] En algunas formas de realización, Pay es:



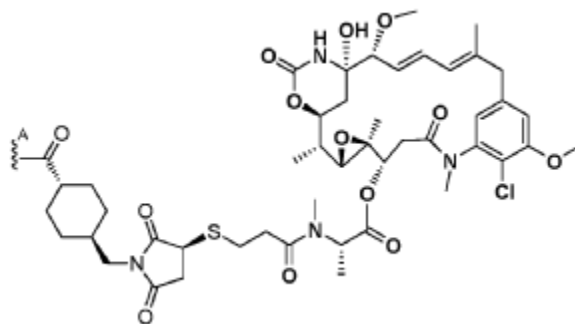
[0160] En algunas formas de realización, n es un número entero de 2 a 5.

[0161] En algunas formas de realización, -L-Pay es:



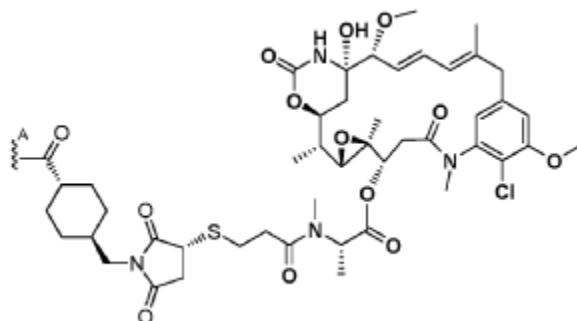
en donde $\begin{matrix} \text{A} \\ \text{---} \\ \text{---} \end{matrix}$ es un enlace al anticuerpo.

[0162] En algunas formas de realización, -L-Pay es:



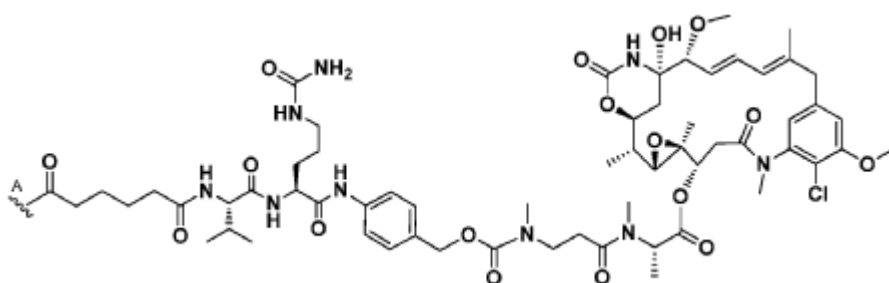
en donde $\begin{matrix} \text{A} \\ \text{---} \\ \text{---} \end{matrix}$ es un enlace al anticuerpo.

[0163] En algunas formas de realización, -L-Pay es



en donde $\overset{A}{\underset{\sim}{\sim}}$ es un enlace al anticuerpo.

[0164] En algunas formas de realización, -L-Pay es:



en donde $\overset{A}{\underset{\sim}{\sim}}$ es un enlace al anticuerpo.

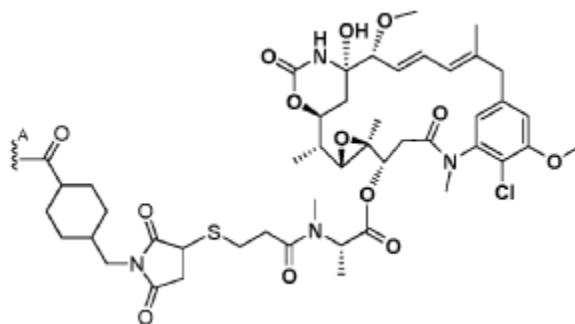
[0165] En algunas formas de realización, los conjugados tienen la siguiente estructura:



en donde:

Ab es un anticuerpo anti-MET que comprende la secuencia aminoacídica de HCVR de SEQ ID NO: 82 y la secuencia aminoacídica de LCVR de SEQ ID NO: 138;

L-Pay es



en donde $\begin{matrix} \text{A} \\ \text{S} \\ \text{S} \end{matrix}$ es un enlace al anticuerpo; y n es un número entero de 2-5.

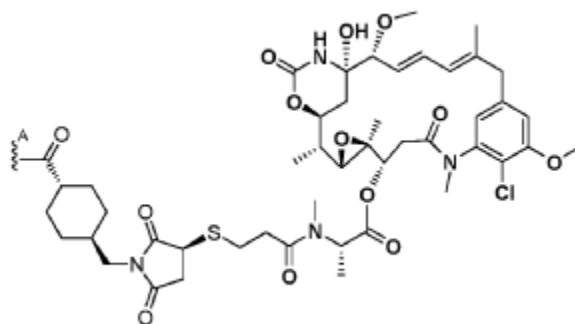
[0166] En algunas formas de realización, los conjugados tienen la siguiente estructura:



en donde:

Ab es un anticuerpo anti-MET que comprende la secuencia aminoacídica de HCVR de SEQ ID NO: 82 y la secuencia aminoacídica de LCVR de SEQ ID NO: 138;

L-Pay es



en donde $\begin{matrix} \text{A} \\ \text{S} \\ \text{S} \end{matrix}$ es un enlace al anticuerpo; y n es un número entero de 2-5.

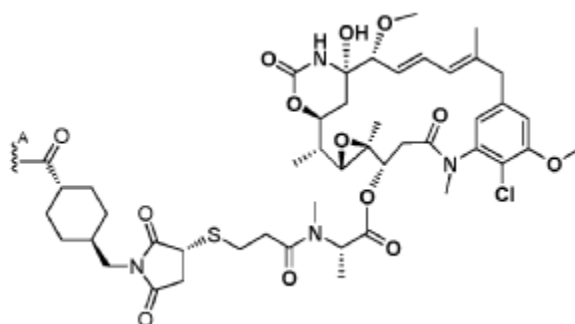
[0167] En algunas formas de realización, los conjugados tienen la siguiente estructura:



en donde:

Ab es un anticuerpo anti-MET que comprende la secuencia aminoacídica de HCVR de SEQ ID NO: 82 y la secuencia aminoacídica de LCVR de SEQ ID NO: 138;

L-Pay es



en donde  es un enlace al anticuerpo; y n es un número entero de 2-5.

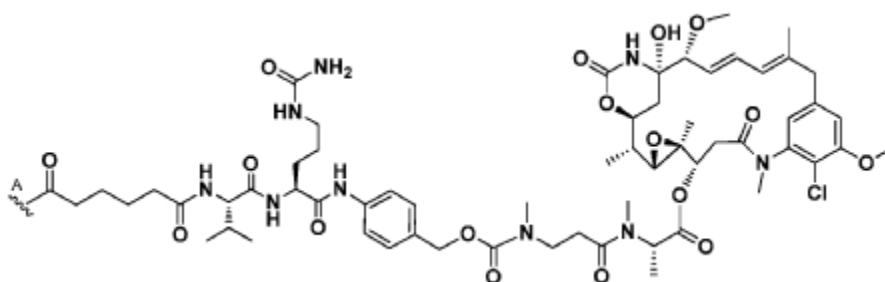
[0168] En algunas formas de realización, los conjugados tienen la siguiente estructura:



en donde:

Ab es un anticuerpo anti-MET que comprende la secuencia aminoacídica de HCVR de SEQ ID NO: 82 y la secuencia aminoacídica de LCVR de SEQ ID NO: 138;

L-Pay es



en donde  es un enlace al anticuerpo; y n es un número entero de 2-5.

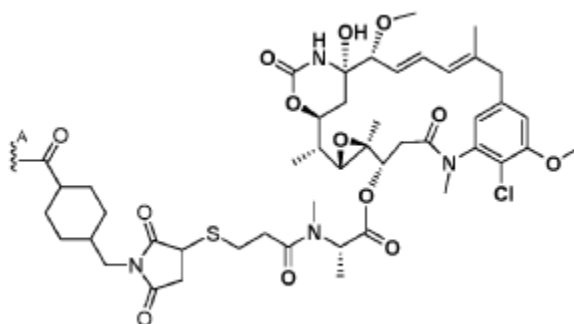
[0169] En algunas formas de realización, los conjugados tienen la siguiente estructura:



en donde:

Ab es una proteína de unión a antígeno biespecífica MET x MET que comprende la secuencia aminoacídica de D1-HCVR de SEQ ID NO: 58 y la secuencia aminoacídica de D2-HCVR de SEQ ID NO: 82;

L-Pay es



en donde  es un enlace a la proteína de unión a antígeno; y n es un número entero de 2-5.

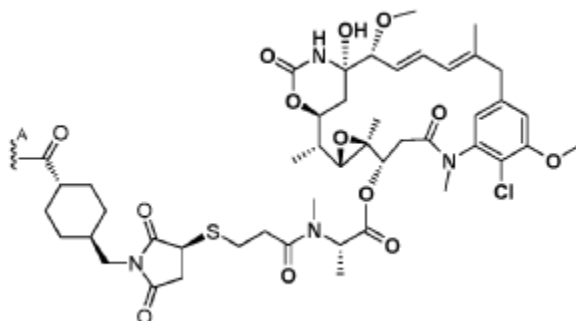
[0170] En algunas formas de realización, los conjugados tienen la siguiente estructura:



en donde:

Ab es una proteína de unión a antígeno biespecífica MET x MET que comprende la secuencia aminoacídica de D1-HCVR de SEQ ID NO: 58 y la secuencia aminoacídica de D2-HCVR de SEQ ID NO: 82;

L-Pay es



en donde $\begin{array}{c} \text{A} \\ \text{---} \\ \text{---} \end{array}$ es un enlace a la proteína de unión a antígeno; y n es un número entero de 2-5.

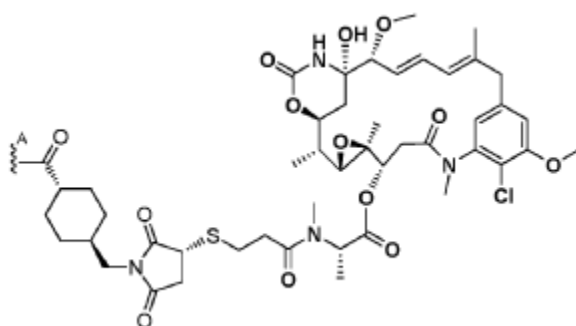
[0171] En algunas formas de realización, los conjugados tienen la siguiente estructura:



en donde:

Ab es una proteína de unión a antígeno biespecífica MET x MET que comprende la secuencia aminoacídica de D1-HCVR de SEQ ID NO: 58 y la secuencia aminoacídica de D2-HCVR de SEQ ID NO: 82;

L-Pay es



en donde $\begin{array}{c} \text{A} \\ \text{---} \\ \text{---} \end{array}$ es un enlace a la proteína de unión a antígeno; y n es un número entero de 2-5.

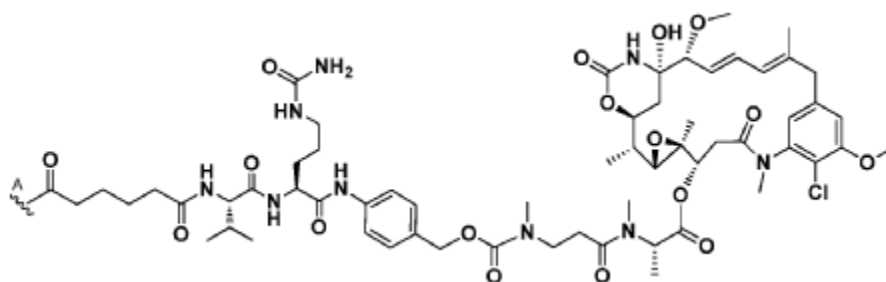
[0172] En algunas formas de realización, los conjugados tienen la siguiente estructura:



en donde:

Ab es una proteína de unión a antígeno biespecífica MET x MET que comprende la secuencia aminoacídica de D1-HCVR de SEQ ID NO: 58 y la secuencia aminoacídica de D2-HCVR de SEQ ID NO: 82;

L-Pay es



en donde  es un enlace a la proteína de unión a antígeno; y n es un número entero de 2-5.

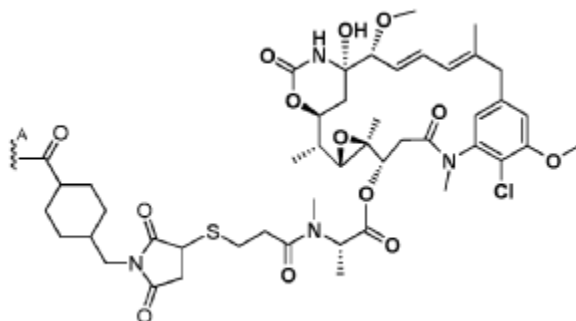
[0173] En algunas formas de realización, los conjugados tienen la siguiente estructura:



en donde:

Ab es una proteína de unión a antígeno biespecífica MET x MET que comprende la secuencia aminoacídica de D1-HCVR de SEQ ID NO: 18 y la secuencia aminoacídica de D2-HCVR de SEQ ID NO: 82;

L-Pay es



en donde $\begin{smallmatrix} A \\ \text{---} \\ \text{---} \end{smallmatrix}$ es un enlace a la proteína de unión a antígeno; y n es un número entero de 2-5.

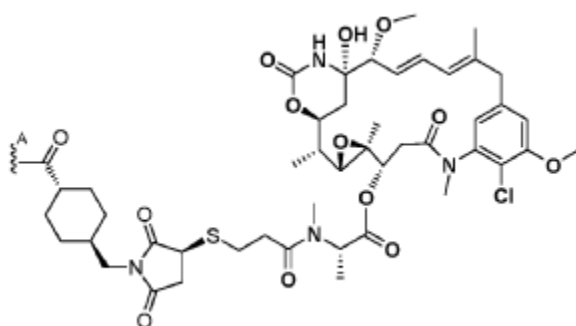
[0174] En algunas formas de realización, los conjugados tienen la siguiente estructura:



en donde:

Ab es una proteína de unión a antígeno biespecífica MET x MET que comprende la secuencia aminoacídica de D1-HCVR de SEQ ID NO: 18 y la secuencia aminoacídica de D2-HCVR de SEQ ID NO: 82;

L-Pay es



en donde $\begin{smallmatrix} A \\ \text{---} \\ \text{---} \end{smallmatrix}$ es un enlace a la proteína de unión a antígeno; y n es un número entero de 2-5.

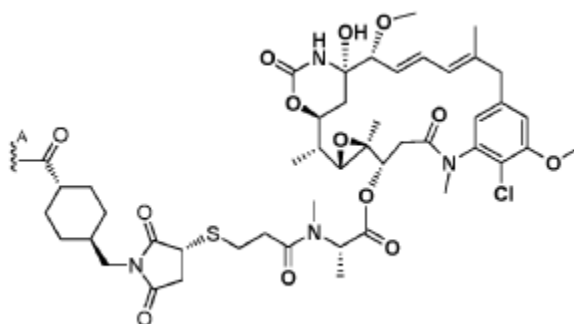
[0175] En algunas formas de realización, los conjugados tienen la siguiente estructura:



en donde:

Ab es una proteína de unión a antígeno biespecífica MET x MET que comprende la secuencia aminoacídica de D1-HCVR de SEQ ID NO: 18 y la secuencia aminoacídica de D2-HCVR de SEQ ID NO: 82;

L-Pay es



en donde  es un enlace a la proteína de unión a antígeno; y n es un número entero de 2-5.

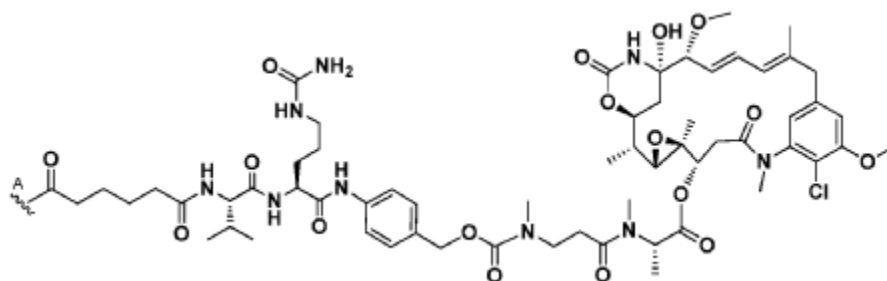
[0176] En algunas formas de realización, los conjugados tienen la siguiente estructura:



en donde:

Ab es una proteína de unión a antígeno biespecífica MET x MET que comprende la secuencia aminoacídica de D1-HCVR de SEQ ID NO: 18 y la secuencia aminoacídica de D2-HCVR de SEQ ID NO: 82;

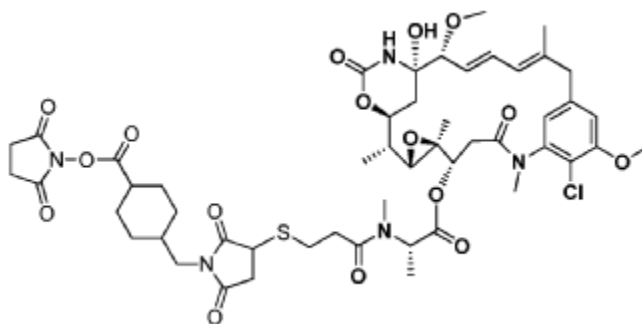
L-Pay es



en donde $\text{---}\overset{\text{A}}{\underset{\text{S}}{\text{Z}}}\text{---}$ es un enlace a la proteína de unión a antígeno; y n es un número entero de 2-5.

[0177] Los conjugados anticuerpo-fármaco descritos en el presente documento pueden prepararse utilizando condiciones de conjugación conocidas por los expertos en la materia (véase, por ejemplo, Doronina *et al. Nature Biotechnology* 2003, 21, 7, 778, que se incorpora aquí por referencia en su totalidad). En algunas formas de realización, se prepara un conjugado de un anticuerpo anti-MET y fármaco o un conjugado de un anticuerpo correspondiente a una proteína de unión a antígeno biespecífica MET x MET y fármaco mediante el contacto de un anticuerpo anti-MET o una proteína de unión a antígeno biespecífica MET x MET, como se describe en el presente documento, con un compuesto que comprende el enlazador y el agente citotóxico deseados, en donde dicho enlazador posee un resto que es reactivo con el anticuerpo o proteína de unión a antígeno, por ejemplo, en el residuo deseado del anticuerpo o proteína de unión a antígeno.

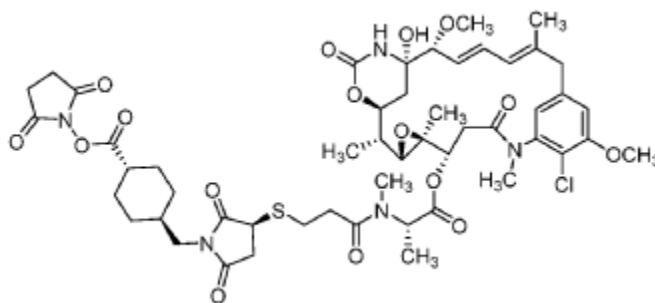
[0178] En algunas formas de realización, en el presente documento se proporcionan procedimientos para preparar un conjugado de anticuerpo-fármaco que comprende poner en contacto un anticuerpo anti-MET o una proteína de unión a antígeno biespecífica MET x MET, como se describe en el presente documento, con un compuesto que tiene la siguiente fórmula A¹:

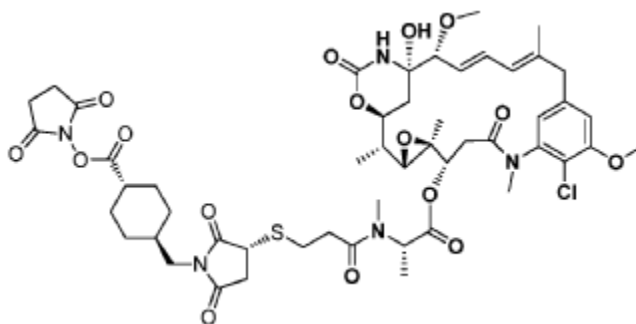
A¹

y diluyente acuoso.

[0179] En algunas formas de realización, el compuesto de fórmula A¹ está presente en un exceso estequiométrico. En algunas formas de realización, el compuesto de fórmula A¹ está presente en un exceso estequiométrico de 5 a 6 veces. En algunas formas de realización, el diluyente acuoso comprende HEPES. En algunas formas de realización, el diluyente acuoso comprende DMA.

[0180] En algunas formas de realización, el compuesto de fórmula A¹ es un compuesto de fórmula A² o A³:

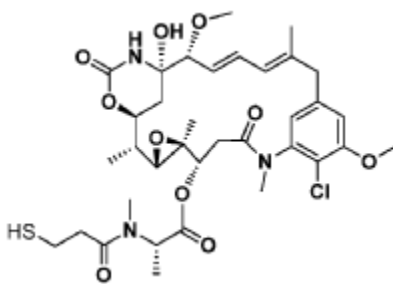
A²

A³

[0181] En algunas formas de realización, el compuesto de fórmula A² es A³ estereoméricamente puro. En algunas formas de realización, el compuesto de fórmula A¹ comprende un compuesto de fórmula A¹ o A², en donde el compuesto A¹ o A² está presente en un exceso diastereomérico de más del 50%. En ciertas formas de realización, el exceso diastereomérico es más del 70%. En ciertas formas de realización, el exceso diastereomérico es más del 90%. En ciertas formas de realización, el exceso diastereomérico es más del 95%.

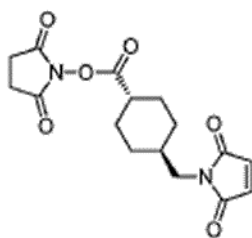
[0182] El término “exceso diastereomérico” se refiere a la diferencia entre la fracción molar del diastereómero individual deseado en comparación con los diastereómeros restantes en una composición. El exceso diastereomérico se calcula de la siguiente manera: (cantidad de diastereómero individual)-(cantidad de otros diastereómeros)/1. Por ejemplo, una composición que contiene 90% de 1 y 10% de 2, 3, 4 o una mezcla de los mismos, tiene un exceso diastereomérico de 80% [(90-10)/1]. Una composición que contiene 95% de 1 y 5% de 2, 3, 4, o una mezcla de los mismos, tiene un exceso diastereomérico de 90% [(95-5)/1]. Una composición que contiene 99% de 1 y 1% de 2, 3, 4, o una mezcla de los mismos, tiene un exceso diastereomérico de 98% [(99-1)/1]. El exceso diastereomérico se puede calcular de manera similar para cualquiera de los 1, 2, 3 o 4.

[0183] En algunas formas de realización, el compuesto de fórmula A¹ se prepara poniendo en contacto un compuesto de fórmula (a):



(a)

con un compuesto de fórmula (b)

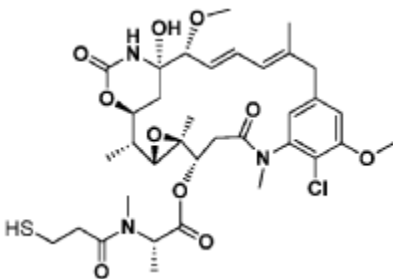


(b)

en presencia de gel de sílice y diluyente. En algunas formas de realización, el diluyente comprende un solvente orgánico y agua.

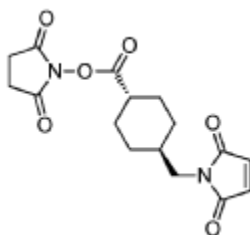
[0184] En el presente documento también se proporciona el producto preparado mediante el proceso de:

- (i) poner en contacto un compuesto de fórmula (a):



(a)

con un compuesto de fórmula (b):

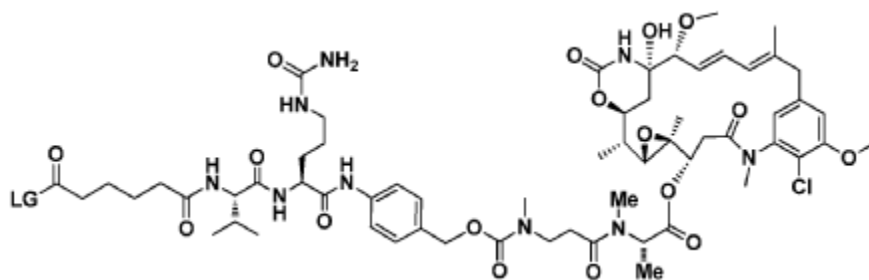


(b)

en presencia de gel de sílice y diluyente para sintetizar un intermediario; y

(ii) poner en contacto un anticuerpo anti-MET o una proteína de unión a antígeno biespecífica MET x MET, como se describe en el presente documento, con el intermediario y el diluyente acuoso.

[0185] En algunas formas de realización, en el presente documento se proporcionan procedimientos para preparar un conjugado anticuerpo-fármaco que comprende poner en contacto un anticuerpo anti-MET o una proteína de unión a antígeno biespecífica MET x MET, como se describe en el presente documento, con un compuesto que tiene la siguiente fórmula B:



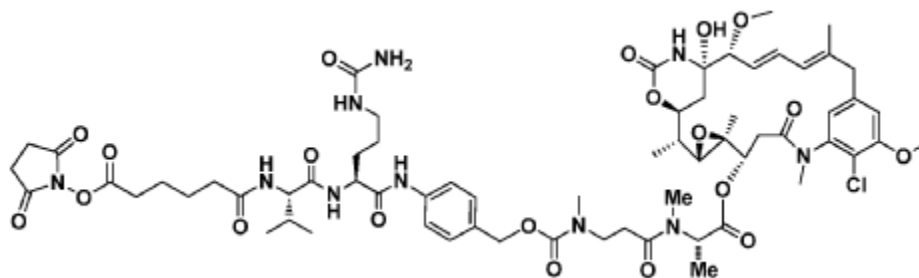
B

en donde LG es un grupo saliente y diluyente acuoso.

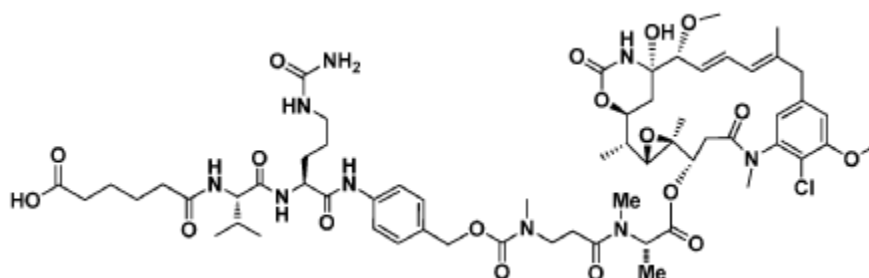
[0186] En algunas formas de realización, el compuesto de fórmula B está presente en un exceso estequiométrico. En algunas formas de realización, el compuesto de fórmula B está presente en un exceso estequiométrico de 5 a 6 veces. En algunas formas de realización, el diluyente acuoso comprende HEPES. En algunas formas de realización, el diluyente acuoso

comprende DMA. En algunas formas de realización, el -C(O)-LG es un éster, por ejemplo, NHS o éster trifluorofenílico.

[0187] En algunas formas de realización, el compuesto de fórmula B es un compuesto de fórmula B¹:

B¹

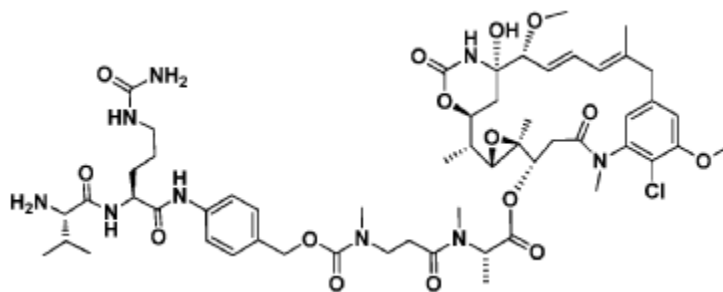
[0188] En algunas formas de realización, el compuesto de fórmula B¹ se prepara poniendo en contacto un compuesto de fórmula C:



C

con N-hidroxisuccinimida (NHS), un reactivo de acoplamiento peptídico y un diluyente orgánico. Los reactivos de acoplamiento peptídicos adecuados incluyen aquellos que activan, es decir, hacen reactivos, restos de ácido carboxílico para su reacción con un nucleófilo. En ciertas formas de realización, el reactivo de acoplamiento peptídico es clorhidrato de N-(3-dimetilaminopropil)-N'-etilcarbodiimida (EDC). En algunas formas de realización, el solvente orgánico es diclorometano.

[0189] En algunas formas de realización, el compuesto de fórmula C se prepara poniendo en contacto un compuesto de fórmula D:



D

con ácido adípico, un agente de acoplamiento peptídico y un solvente orgánico. En ciertas formas de realización, el agente de acoplamiento peptídico es 2-etoxi-1-etoxycarbonil-1,2-dihidroquinolina (EEDQ). En ciertas formas de realización, el solvente orgánico comprende diclorometano. El compuesto D se puede preparar como se describe en el documento WO2014/145090,

Maapeo de epítapos y tecnologías relacionadas

[0190] El epítapo al que se unen los anticuerpos y los dominios de unión a antígeno puede consistir en una única secuencia contigua de 3 o más (por ejemplo, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 o más) aminoácidos de una proteína MET. Alternativamente, el epítapo relevante puede consistir en una pluralidad de aminoácidos no contiguos (o secuencias aminoacídicas) de MET. En algunas formas de realización, el epítapo se encuentra en o cerca del dominio de unión a ligando de MET. En otras formas de realización, el epítapo está ubicado fuera del dominio de unión a ligando de MET, por ejemplo, en una ubicación en la superficie de MET en la que un anticuerpo, cuando se une a dicho epítapo, no interfiere con la unión de HGF a MET.

[0191] Como se describe en otra parte del presente documento, los dominios de unión a antígeno individuales (D1 y D2) de las moléculas de unión a antígeno biespecíficas MET x MET pueden unirse a epítapos distintos, o no superpuestos, o parcialmente superpuestos, entre sí. Como se usa en el presente documento, “epítapos parcialmente superpuestos” significa que el primer y segundo epítapos comparten menos de 5, menos de 4, menos de 3, o sólo un aminoácido en común, según se determina mediante cualquier metodología de mapeo de epítapos conocida en la técnica (por ejemplo, Cristalografía de rayos X,

mutagénesis de alanina, intercambio de hidrógeno/deuterio [HDX], intercambio de dominios, etc.). Los dominios D1 y D2 pueden no ser competitivos entre sí. Por ejemplo, en ciertas formas de realización, la unión de un dominio D1 de una molécula de unión a antígeno biespecífica MET x MET particular a su epítipo en MET no inhibe (o solo inhibe de manera mínima) la unión del dominio D2 de la molécula de unión a antígeno biespecífica MET x MET a su epítipo en MET. Debido a la naturaleza no superpuesta (o, a lo sumo, parcialmente superpuesta) de los epítopos respectivos de los componentes D1 y D2, las molécula de unión a antígeno biespecíficas MET x MET son capaces de unirse a una única molécula MET sobre una superficie celular.

[0192] Para determinar el epítipo en MET con el que interactúan los anticuerpos y los dominios de unión a antígeno de la presente divulgación se pueden usar diversas técnicas conocidas por los expertos en la materia. Los ejemplos de técnicas que se pueden usar para determinar un epítipo o dominio de unión de un anticuerpo o dominio de unión a antígeno particular incluyen, por ejemplo, mutagénesis puntual (por ejemplo, mutagénesis por barrido de alanina, mutagénesis por barrido de arginina, etc.), análisis de transferencia de péptidos (Reineke, 2004, *Methods Mol Biol* 248: 443-463), protección de proteasas y análisis de escisión de péptidos. Además, se pueden emplear métodos tales como la escisión de epítopos, la extracción de epítopos y la modificación química de antígenos (Tomer, 2000, *Protein Science* 9:487-496). Otro método que puede usarse para identificar los aminoácidos dentro de un polipéptido con el que interactúa un anticuerpo es el intercambio de hidrógeno/deuterio detectado por espectrometría de masas. En términos generales, el método de intercambio hidrógeno/deuterio involucra marcar con deuterio la proteína de interés, seguido de la unión del anticuerpo a la proteína marcada con deuterio. A continuación, el complejo de proteína/anticuerpo se transfiere a agua para permitir que se produzca un intercambio de hidrógeno-deuterio en todos los residuos, excepto los residuos protegidos por el anticuerpo (que permanecen marcados con deuterio). Después de la disociación del anticuerpo, la proteína diana se somete a análisis de escisión de proteasas y espectrometría de masas, revelando así los residuos marcados con deuterio que corresponden a los aminoácidos específicos con los que el anticuerpo interactúa. Véase, por ejemplo, Ehring (1999) *Analytical Biochemistry* 267 (2): 252-259; Engen y Smith (2001) *Anal. Chem.* 73: 256A-

265A. El análisis de la estructura cristalina de rayos X también se puede usar para identificar los aminoácidos dentro de un polipéptido con el que interactúa un anticuerpo.

[0193] Además, en el presente documento se proporcionan anticuerpos anti-MET (incluidos los anticuerpos biespecíficos) que se unen al mismo epítipo que cualquiera de los anticuerpos o dominios de unión a antígeno ilustrativos específicos que se describen en el presente documento (por ejemplo, los anticuerpos que comprenden cualquiera de las secuencias aminoacídicas que se exponen en Tabla 1 del presente documento). Del mismo modo, en el presente documento también se proporcionan anticuerpos anti-MET que compiten por la unión a MET con cualquiera de los anticuerpos ilustrativos específicos descritos en el presente documento (por ejemplo, anticuerpos que comprenden cualquiera de las secuencias aminoacídicas como se establece en la Tabla 1 del presente documento). En algunas formas de realización, el epítipo MET humano al que se unen los anticuerpos anti-MET comprende los aminoácidos 192-204, los aminoácidos 305-315 y/o los aminoácidos 421 a 455 de la SEQ ID NO: 155. En algunas formas de realización, el primer epítipo de MET humano comprende los aminoácidos 192-204 de la SEQ ID NO: 155; y el segundo epítipo de MET humano comprende los aminoácidos 305-315 y 421-455 de la SEQ ID NO: 155.

[0194] Se puede determinar fácilmente si un anticuerpo se une al mismo epítipo que, o compite por unirse con, un anticuerpo anti-MET de referencia usando métodos de rutina conocidos en la técnica y los aquí ejemplificados. Por ejemplo, para determinar si un anticuerpo de prueba se une al mismo epítipo que un anticuerpo anti-MET de referencia proporcionado en el presente documento, se permite que el anticuerpo de referencia se una a una proteína MET. A continuación, se evalúa la capacidad de un anticuerpo de prueba para unirse a la molécula MET. Si el anticuerpo de prueba es capaz de unirse a MET luego de la unión de saturación con el anticuerpo anti-MET de referencia, se puede concluir que el anticuerpo de prueba se une a un epítipo diferente al del anticuerpo anti-MET de referencia. Por otro lado, si el anticuerpo de prueba no es capaz de unirse a la molécula MET luego de la unión de saturación con el anticuerpo anti-MET de referencia, entonces puede que el anticuerpo de prueba se una al mismo epítipo que el epítipo unido por el anticuerpo anti-MET de referencia. Se pueden llevar a cabo experimentación adicional de rutina (por

ejemplo, análisis de mutación de péptidos y de unión) para confirmar si la falta de unión del anticuerpo de prueba observada se debe en realidad a la unión al mismo epítopo que el anticuerpo de referencia o si el responsable de la falta de unión observada es el bloqueo estérico (u otro fenómeno). Los experimentos de este tipo se pueden realizar utilizando ELISA, RIA, Biacore, citometría de flujo o cualquier otro ensayo cuantitativo o cualitativo de unión a anticuerpos disponible en la técnica. Según ciertas formas de realización, dos anticuerpos se unen al mismo epítopo (o superpuesto) si, por ejemplo, un exceso de 1, 5, 10, 20 o 100 veces de un anticuerpo inhibe la unión del otro en al menos 50 %, pero preferiblemente 75%, 90% o incluso 99%, medido en un ensayo de unión competitiva (véase, por ejemplo, Junghans *et al.*, *Cancer Res.* 1990:50:1495-1502). Alternativamente, se considera que dos anticuerpos se unen al mismo epítopo si esencialmente todas las mutaciones de aminoácidos en el antígeno que reducen o eliminan la unión de un anticuerpo reducen o eliminan la unión del otro. Se considera que dos anticuerpos tienen “epítomos superpuestos” si solo un subconjunto de las mutaciones de aminoácidos que reducen o eliminan la unión de un anticuerpo reduce o elimina la unión del otro.

[0195] Para determinar si un anticuerpo compite por la unión (o compite de forma cruzada por la unión) con un anticuerpo anti-MET de referencia, la metodología de unión descrita anteriormente se realiza en dos orientaciones: En una primera orientación, se permite que el anticuerpo de referencia se una a una proteína MET en condiciones de saturación seguida de una evaluación de la unión del anticuerpo de prueba a la molécula MET. En una segunda orientación, se permite que el anticuerpo de prueba se una a una molécula MET en condiciones de saturación, seguido de una evaluación de la unión del anticuerpo de referencia a la molécula MET. Si en ambas orientaciones sólo el primer anticuerpo (de saturación) es capaz de unirse a la molécula MET, entonces se concluye que el anticuerpo de prueba y el anticuerpo de referencia compiten por la unión a MET. Como apreciará una persona con experiencia normal en la materia, un anticuerpo que compite por la unión con un anticuerpo de referencia no necesariamente se puede unir al mismo epítopo que el anticuerpo de referencia, sino que puede bloquear estéricamente la unión del anticuerpo de referencia al unirse a un epítopo superpuesto o adyacente.

Preparación de anticuerpos humanos

[0196] Los anticuerpos anti-MET y los anticuerpos biespecíficos MET x MET proporcionados en el presente documento pueden ser anticuerpos completamente humanos. Los métodos para generar anticuerpos monoclonales, incluyendo anticuerpos monoclonales completamente humanos, son conocidos en la técnica. Cualquiera de tales métodos conocidos se puede usar en el contexto de la presente divulgación para elaborar anticuerpos humanos que se unen específicamente a MET humano.

[0197] Por ejemplo, utilizando la tecnología VELOCIMMUNE™ o cualquier otro método conocido similar para generar anticuerpos monoclonales completamente humanos, los anticuerpos quiméricos de alta afinidad contra MET se aíslan inicialmente teniendo una región variable humana y una región constante de ratón. Al igual que en la sección experimental a continuación, los anticuerpos se caracterizan y se seleccionan según las características deseables, que incluyen afinidad, actividad de bloqueo de ligandos, selectividad, epítipo, etc. Si es necesario, las regiones constantes de ratón se reemplazan con una región constante humana deseada, por ejemplo de IgG1 o IgG4 modificadas o tipo silvestre, para generar un anticuerpo anti-MET completamente humano. Si bien la región constante seleccionada puede variar según el uso específico, las características de unión a antígeno de alta afinidad y especificidad por la diana residen en la región variable. En ciertos casos, los anticuerpos anti-MET completamente humanos se aíslan directamente de las células B positivas para el antígeno.

Bioequivalentes

[0198] Los anticuerpos anti-MET y los fragmentos de anticuerpos proporcionados en el presente documento abarcan proteínas que tienen secuencias aminoacídicas que varían de las de los anticuerpos descritos pero que retienen la capacidad de unirse a MET humana. Dichos anticuerpos y fragmentos de anticuerpos variantes comprenden una o más adiciones, eliminaciones o sustituciones de aminoácidos cuando se comparan con la secuencia parental, pero muestran una actividad biológica que es esencialmente equivalente a la de los anticuerpos descritos. Del mismo modo, las secuencias de ADN que codifican el anticuerpo anti-MET de la presente divulgación abarcan secuencias que comprenden una o más adiciones, deleciones o sustituciones de nucleótidos cuando se comparan con la secuencia descrita, pero que codifican un anticuerpo o fragmento de anticuerpo anti-MET que es

esencialmente bioequivalente a un anticuerpo o fragmento de anticuerpo anti-MET de la divulgación. Los ejemplos de tales variantes de aminoácidos y secuencias de ADN ya se discutieron anteriormente.

[0199] Dos proteínas de unión a antígeno, o anticuerpos, se consideran bioequivalentes si, por ejemplo, son equivalentes farmacéuticos o alternativas farmacéuticas cuya tasa y grado de absorción no muestran una diferencia significativa cuando se administran a la misma dosis molar en condiciones experimentales similares, ya sea solos o en dosis múltiples. Algunos anticuerpos se considerarán equivalentes o alternativas farmacéuticas si son equivalentes en el grado de su absorción pero no en su tasa de absorción y, sin embargo, pueden considerarse bioequivalentes, ya que tales diferencias en la tasa de absorción son intencionales y se reflejan en el etiquetado, no son esenciales para el logro de concentraciones efectivas de fármacos en el cuerpo, por ejemplo, el uso crónico, y se consideran médicamente insignificantes para el producto farmacéutico estudiado en particular.

[0200] En una forma de realización, dos proteínas de unión a antígeno son bioequivalentes si no hay diferencias clínicamente significativas en su seguridad, pureza y potencia.

[0201] En una forma de realización, dos proteínas de unión a antígeno son bioequivalentes si un paciente puede cambiarse una o más veces entre el producto de referencia y el producto biológico sin que se espere un aumento del riesgo de efectos adversos, incluido un cambio clínicamente significativo en la inmunogenicidad, o eficacia disminuida, en comparación con la terapia continua sin tal cambio.

[0202] En una forma de realización, dos proteínas de unión a antígeno son bioequivalentes si ambas actúan por un mecanismo o mecanismos de acción comunes para la condición o condiciones de uso, en la medida en que tales mecanismos sean conocidos.

[0203] La bioequivalencia se puede demostrar mediante métodos *in vivo* e *in vitro*. Las medidas de bioequivalencia incluyen, por ejemplo, (a) una prueba *in vivo* en humanos u otros mamíferos, en la cual la concentración del anticuerpo o sus metabolitos se mide en sangre, plasma, suero u otro fluido biológico en función del tiempo; (b) una prueba *in vitro* que se ha correlacionado y es razonablemente predictiva de los datos de biodisponibilidad *in vivo*

en humanos; (c) una prueba *in vivo* en humanos u otros mamíferos en la cual el efecto farmacológico agudo apropiado del anticuerpo (o su diana) se mide en función del tiempo; y (d) en un ensayo clínico bien controlado que establezca seguridad, eficacia o biodisponibilidad o bioequivalencia de un anticuerpo.

[0204] Las variantes bioequivalentes de los anticuerpos anti-MET proporcionados en el presente documento pueden construirse, por ejemplo, haciendo varias sustituciones de residuos o secuencias o eliminando residuos o secuencias terminales o internas que no son necesarias para la actividad biológica. Por ejemplo, los residuos de cisteína que no son esenciales para la actividad biológica pueden eliminarse o reemplazarse con otros aminoácidos para evitar la formación de puentes disulfuro intramoleculares innecesarios o incorrectos en el momento de la renaturalización. En otros contextos, los anticuerpos bioequivalentes pueden incluir variantes de anticuerpos anti-MET que comprenden cambios de aminoácidos que modifican las características de glicosilación de los anticuerpos, por ejemplo, mutaciones que eliminan o remueven la glicosilación.

Selectividad de especies y reactividad cruzada de especies

[0205] La presente divulgación, según ciertas formas de realización, proporciona anticuerpos anti-MET (y moléculas de unión a antígeno que comprenden dominios de unión a antígeno anti-MET) que se unen al MET humano pero no al MET de otras especies. La presente descripción también incluye anticuerpos anti-MET (y moléculas de unión a antígeno que comprenden dominios de unión a antígeno anti-MET) que se unen a MET humano y a MET de una o más especies no humanas. Por ejemplo, los anticuerpos anti-MET y las moléculas de unión a antígeno pueden unirse a MET humano y pueden unirse o no, según sea el caso, a uno o más de MET de ratón, ratas, cobayo, hámsters, gerbo, cerdo, gato, perro, conejo, cabra, oveja, vaca, caballo, camello, macaco cangrejero (*cynomolgus macaque*), tití, macao de la India (*rhesus macaque*) o chimpancé. Según ciertas formas de realización ilustrativas, se proporcionan anticuerpos y moléculas de unión a antígeno anti-MET que se unen específicamente a MET humano y MET de macaco cangrejero (por ejemplo, *Macaca fascicularis*). Otros anticuerpos anti-MET y moléculas de unión a antígeno se unen a MET humano pero no se unen, o solo se unen débilmente, a MET de macaco cangrejero.

Anticuerpos multiespecíficos

[0206] Como se describe en otra parte del presente documento, la presente divulgación proporciona moléculas de unión a antígeno biespecíficas que comprenden dos dominios de unión a antígeno diferentes, en donde el primer dominio de unión a antígeno (D1) se une a un primer epítipo en MET, y en donde el segundo dominio de unión a antígeno (D2) se une a un segundo epítipo en MET. En ciertas formas de realización, el primer y segundo epítipos en MET a los que se unen los dominios D1 y D2 son distintos, o no se superponen, o se superponen parcialmente. Según este aspecto, el dominio D1 puede comprender cualquiera de las secuencias aminoacídicas de HCVR/LCVR o CDR como se muestran en la Tabla 1 del presente documento, y el dominio D2 pueden comprender cualquier otra de las secuencias aminoacídicas de HCVR/LCVR o CDR como se muestran en la Tabla 1 del presente documento (siempre que la especificidad de unión del dominio D1 sea diferente de la especificidad de unión del dominio D2, y/o la proteína de unión a antígeno de la que se obtuvo D1 no compite por la unión a MET con la proteína de unión a antígeno de la que se obtuvo D2). En algunas formas de realización, el epítipo de MET humano al que se unen los anticuerpos anti-MET comprende los aminoácidos 192-204, los aminoácidos 305-315 y/o los aminoácidos 421 a 455 de la SEQ ID NO: 155. En algunas formas de realización, el primer epítipo de MET humano comprende los aminoácidos 192-204 de la SEQ ID NO: 155; y el segundo epítipo de MET humano comprende los aminoácidos 305-315 y 421-455 de la SEQ ID NO: 155.

[0207] De acuerdo con un aspecto separado de la presente divulgación, también se proporcionan anticuerpos biespecíficos convencionales en los que un brazo del anticuerpo biespecífico se une a un epítipo en MET humano, y el otro brazo del anticuerpo biespecífico se une a un segundo antígeno distinto de MET. El brazo de unión a MET puede comprender cualquiera de las secuencias aminoacídicas de HCVR/LCVR o CDR como se muestran en la Tabla 1 del presente documento. En ciertas formas de realización, el brazo de unión a MET se une a MET humano y bloquea la unión de HGF a MET. En otras formas de realización, el brazo de unión a MET se une a MET humano pero no bloquea la unión de HGF a MET.

[0208] Un ejemplo formato de anticuerpo biespecíficos que se puede utilizar en el contexto de la presente divulgación involucra el uso de un primer dominio C_H3 de inmunoglobulina

(y un segundo dominio C_H3 de Ig, en donde el primer y segundo dominios C_H3 de Ig difieren entre sí en al menos un aminoácido, y en donde al menos una diferencia de aminoácidos reduce la unión del anticuerpo biespecífico a la proteína A en comparación con un anticuerpo biespecífico que carece de la diferencia de aminoácidos. En una forma de realización, el primer dominio C_H3 de Ig se une a la Proteína A y el segundo dominio C_H3 de Ig contiene una mutación que reduce o anula la unión a la Proteína A, como una Modificación H95R (por numeración de exones IMGT; H435R por numeración de EU). El segundo C_H3 puede comprender además una modificación Y96F (por IMGT; Y436F por EU). Otras modificaciones que se pueden encontrar dentro del segundo C_H3 incluyen: D16E, L18M, N44S, K52N, V57M y V82I (por IMGT; D356E, L358M, N384S, K392N, V397M y V422I por EU) en el caso de anticuerpos tipo IgG1; N44S, K52N y V82I (IMGT; N384S, K392N y V422I por EU) en el caso de anticuerpos tipo IgG2; y Q15R, N44S, K52N, V57M, R69K, E79Q y V82I (por IMGT; Q355R, N384S, K392N, V397M, R409K, E419Q, y V422I por EU) en el caso de anticuerpos tipo IgG4. Dentro del alcance de la presente divulgación se contemplan las variaciones en el formato de anticuerpo biespecífico anteriormente descritas.

[0209] Otros ejemplos de formatos biespecíficos a que pueden usarse en el contexto de la presente divulgación incluyen, sin limitación, por ejemplo, formatos biespecíficos basados en scFv o diacuerpo, fusiones IgG-scFv, dominio variable dual (DVD)-Ig, cuadroma, botón en ojal, cadena ligera común (por ejemplo, una cadena ligera común con *botón en ojal*, etc.), CrossMab, CrossFab, cuerpos(SEED), cremallera de leucina, Duobody, IgG1/IgG2, Fab doble acción (DAF)-IgG, y formatos biespecíficos Mab² (para una revisión de los formatos anteriores véase, por ejemplo, Klein *et al.* 2012, mAbs 4:6, 1-11 y las referencias citadas en el mismo). Los anticuerpos biespecíficos también pueden construirse usando conjugación péptido/ácido nucleico, por ejemplo, en donde se usan aminoácidos no naturales con reactividad química ortogonal para generar conjugados de oligonucleótidos-anticuerpos específicos de sitio que luego se autoensamblan en complejos multiméricos con composición, valencia y geometría definidas. (Véase, por ejemplo, Kazane et al., *J. Am. Chem. Soc.* [Epub: 4 de diciembre de 2012]).

Formulación y Administración Terapéutica.

[0210] En el presente documento se proporcionan composiciones farmacéuticas que comprenden los anticuerpos anti-MET o moléculas de unión a antígeno biespecíficas MET x MET de la presente invención. Las composiciones farmacéuticas pueden formularse con portadores, excipientes y otros agentes adecuados que proporcionan una transferencia, entrega, tolerancia y similares mejorados.

Usos Terapéuticos de los Anticuerpos

[0211] En el presente documento se proporcionan métodos que comprenden administrar a un sujeto que lo necesite una composición terapéutica que comprende un anticuerpo anti-MET o una molécula de unión a antígeno biespecífica MET x MET (por ejemplo, un anti-MET que comprende cualquiera de las secuencias de HCVR/LCVR o CDR como se muestran en la Tabla 1 de este documento, o una molécula de unión a antígeno biespecífica MET x MET que comprende cualquiera de los componentes D1 y D2 como se muestran en la Tabla 5 de este documento). La composición terapéutica puede comprender cualquiera de los anticuerpos anti-MET o moléculas de unión a antígeno biespecíficas MET x MET descritos en el presente documento, y un portador o diluyente farmacéuticamente aceptable.

[0212] Los anticuerpos anti-MET y las moléculas de unión a antígeno biespecíficas MET x MET son útiles, entre otras cosas, para el tratamiento, la prevención y/o la mejora de cualquier enfermedad o trastorno asociado o mediado por la expresión, señalización o actividad de MET, o que se puede tratar bloqueando la interacción entre MET y HGF, o inhibiendo de otro modo la actividad y/o señalización de MET, y/o promoviendo la internalización del receptor y/o disminuyendo el número de receptores en la superficie celular.

[0213] Por ejemplo, los anticuerpos anti-MET y las moléculas de unión a antígeno biespecíficas MET x MET de la presente divulgación son útiles para el tratamiento de tumores que expresan (o sobreexpresan) MET. Por ejemplo, los anticuerpos anti-MET y las moléculas de unión a antígeno biespecíficas MET x MET se pueden usar para tratar tumores primarios y/o metastásicos que surgen en el cerebro y las meninges, orofaringe, pulmón y árbol bronquial, tracto gastrointestinal, tracto reproductivo masculino y femenino, músculo, hueso, piel y apéndices, tejido conectivo, bazo, sistema inmunológico, células formadoras de

sangre y médula ósea, hígado y tracto urinario, y órganos sensoriales especiales como el ojo. En ciertas formas de realización, los anticuerpos anti-MET y las moléculas de unión a antígeno biespecíficas MET x MET se usan para tratar uno o más de los siguientes cánceres: leucemia mielógena aguda, leucemia de células T adultas, astrocitomas, cáncer de vejiga, cáncer de mama, cáncer cervical, colangiocarcinoma, leucemia mielóide crónica, cáncer colorrectal, cáncer de endometrio, cáncer de esófago, cáncer gástrico (por ejemplo, cáncer gástrico con amplificación de MET), glioblastoma, cáncer de cabeza y cuello (por ejemplo, carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello [HNSCC]), sarcoma de Kaposi, cáncer de riñón, leiomiomas, cáncer de hígado, cáncer de pulmón (por ejemplo, cáncer de pulmón de células no pequeñas [NSCLC]), linfomas, gliomas malignos, mesotelioma maligno, melanoma, mesotelioma, MFH/fibrosarcoma, mieloma múltiple, carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello [HNSCC], sarcoma de Kaposi, cáncer de riñón, leiomiomas, cáncer de hígado, cáncer de pulmón (p. ej., cáncer de pulmón de células no pequeñas [NSCLC]), linfomas, gliomas malignos, mesotelioma maligno, melanoma, mesotelioma MFH/fibrosarcoma, mieloma múltiple, cáncer nasofaríngeo, osteosarcoma, cáncer de ovario, carcinoma pancreático, cáncer de próstata, carcinoma de células renales, rabdomiosarcoma, cáncer de pulmón de células pequeñas, sarcoma sinovial, cáncer de tiroides y tumor de Wilms.

[0214] En el contexto de los métodos de tratamiento descritos en el presente documento, los anticuerpos anti-MET y las moléculas de unión a antígeno biespecíficas MET x MET se pueden administrar como una monoterapia (es decir, como el único agente terapéutico) o en combinación con uno o más agentes terapéuticos adicionales (ejemplos de los cuales se describen en otra parte de este documento).

Terapias combinadas y formulaciones

[0215] En el presente documento se proporcionan composiciones y formulaciones terapéuticas que comprenden cualquiera de los anticuerpos anti-MET y las moléculas de unión a antígeno biespecíficas MET x MET descritas en el presente documento en combinación con uno o más componentes terapéuticamente activos adicionales, y métodos de tratamiento que comprenden administrar dichas combinaciones a los sujetos que los necesitan.

[0216] Los anticuerpos anti-MET y las moléculas de unión a antígeno biespecíficas MET x MET pueden coformularse y/o administrarse en combinación con uno o más componentes terapéuticamente activos seleccionados del grupo que consiste en: un antagonista de MET (por ejemplo, un anticuerpo anti-MET [por ejemplo, onartuzumab, emibetuzumab y H4H14639D] o inhibidor de molécula pequeña de MET), un antagonista de EGFR (por ejemplo, un anticuerpo anti-EGFR [por ejemplo, cetuximab o panitumumab] o inhibidor de molécula pequeña de EGFR [por ejemplo, gefitinib o erlotinib]), un antagonista de otro miembro de la familia del EGFR, como Her2/ErbB2, ErbB3 o ErbB4 (por ejemplo, anti-ErbB2 [por ejemplo, trastuzumab o T-DM1 {KADCYLA®}], anticuerpo anti-ErbB3 o anti-ErbB4 o inhibidor de molécula pequeña actividad de ErbB2, ErbB3 o ErbB4), un antagonista de EGFRvIII (por ejemplo, un anticuerpo anti-EGFRvIII), un antagonista de IGF1R (por ejemplo, un anticuerpo anti-IGF1R), un inhibidor de B-raf (por ejemplo, vemurafenib, sorafenib, GDC-0879, PLX-4720), un inhibidor de PDGFR- α (por ejemplo, un anticuerpo anti-PDGFR- α), un inhibidor de PDGFR- β (por ejemplo, un anticuerpo anti-PDGFR- β o un inhibidor de quinasa de molécula pequeña, por ejemplo, mesilato de imatinib o malato de sunitinib), un inhibidor del ligando de PDGF (por ejemplo, un anticuerpo anti-PDGF-A, -B, -C o -D, aptámero, ARNip etc.), un antagonista de VEGF (por ejemplo, un VEGF-Trap como aflibercept, véase, por ejemplo, US 7.087.411 (también denominado en el presente documento como “proteína de fusión que inhibe VEGF”), anticuerpo anti-VEGF (por ejemplo, bevacizumab), inhibidor de quinasa de molécula pequeña del receptor de VEGF (por ejemplo, sunitinib, sorafenib o pazopanib), un antagonista de DLL4 (por ejemplo, un anticuerpo anti-DLL4 descrito en el documento US 2009/0142354 como REGN421), un antagonista de Ang2 (por ejemplo, un anticuerpo anti-Ang2 descrito en el documento US 2011/0027286, como H1 H685P), un antagonista de FOLH1 (por ejemplo, un anticuerpo anti-FOLH1), un antagonista de STEAP1 o STEAP2 (por ejemplo, un anticuerpo anti-STEAP1 o un anticuerpo anti-STEAP2), un TMPRSS2 antagonista (por ejemplo, un anticuerpo anti-TMPRSS2), un antagonista de MSLN (por ejemplo, un anticuerpo anti-MSLN), un antagonista de CA9 (por ejemplo, un anticuerpo anti-CA9), un antagonista de uroplaquina (por ejemplo, un anticuerpo de anti-uroplaquina [por ejemplo, anti-UPK3A]), un antagonista de MUC16 (por ejemplo, un anticuerpo anti-MUC16), un antagonista del antígeno Tn (por ejemplo, un anticuerpo anti-Tn), un antagonista de CLEC12A (por ejemplo,

un anticuerpo anti-CLEC12A), un antagonista de TNFRSF17 (por ejemplo, un anticuerpo anti-TNFRSF17), un antagonista de LGR5 (por ejemplo, un anticuerpo anti-LGR5), un antagonista de CD20 monovalente (por ejemplo, un anticuerpo anti-CD20 monovalente tal como rituximab), un anticuerpo biespecífico CD20 x CD3, un agente bloqueador de PD-1 (por ejemplo, un anticuerpo anti-PD-1, como pembrolizumab o nivolumab), etc. Otros agentes que pueden administrarse de manera beneficiosa en combinación con los anticuerpos proporcionados en el presente documento incluyen, por ejemplo, tamoxifeno, inhibidores de la aromataasa e inhibidores de citoquinas, incluyendo inhibidores de citoquinas de molécula pequeña y anticuerpos que se unen a citoquinas tales como IL-1, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-8, IL-9, IL-10, IL-12, IL-13, IL-17, IL-18, o a sus respectivos receptores.

[0217] Ilustrativamente, un inhibidor de PD-1 tal como un anticuerpo anti-PD-1 puede combinarse con un conjugado de anticuerpo anti-Met-fármaco como se describe en el presente documento. La población de pacientes objetivo incluye específicamente aquellos pacientes con tumores que sobreexpresan la mutación c-Met, tal como un paciente con un cáncer de pulmón de células no pequeñas que expresan c-Met.

[0218] En el presente documento se proporcionan composiciones y formulaciones terapéuticas que comprenden cualquiera de los anticuerpos anti-MET y las moléculas de unión a antígeno biespecíficas MET x MET descritas en el presente documento en combinación con uno o más agentes quimioterapéuticos. Los ejemplos de agentes quimioterapéuticos incluyen agentes alquilantes tales como tiotepa y ciclosfosfamida (CytosanTM); sulfonatos de alquilo tales como busulfán, improsulfán y piposulfán; aziridinas tales como benzodopa, carboquona, meturedopa y uredopa; etileniminas y metilamelaminas que incluyen altretamina, trietilenemelamina, trietilenofosforamida, trietilenotiofosfoamida y trimetilolomelamina; mostazas nitrogenadas como clorambucil, clornafazina, colofosfamida, estramustina, ifosfamida, mecloretamina, clorhidrato de óxido de mecloretamina, melfalán, novembiquina, fenesterina, prednimustina, trofosfamida, uracilo y mostaza; nitrosoureas tales como carmustina, clorozotocina, fotemustina, lomustina, nimustina, ranimustina; antibióticos tales como aclacinomisinas, actinomicina, autramicina, azaserina, bleomicinas, cactinomicina, caliqueamicina, carabicina, carminomicina, carzinofilina, cromomicinas, dactinomicina, daunorubicina, detorubicina, 6-diazo-5-oxo-L-

norleucina, doxorubicina, epirubicina, esorubicina, idarubicina, marcelomicina, mitomicinas, ácido micofenólico, nogalamicina, olivomicinas, peplomicina, potfiromicina, puromicina, quelamicina, rodorubicina, estreptonigrina, estreptozocina, tubercidina, ubenimex, zinostatina, zorubicina; antimetabolitos como metotrexato y 5-fluorouracilo (5-FU); análogos del ácido fólico tales como denopterina, metotrexato, pteropterina, trimetrexato; análogos de purina tales como fludarabina, 6-mercaptopurina, tiamiprina, tioguanina; análogos de pirimidina tales como ancitabina, azacitidina, 6-azauridina, carmofur, citarabina, didesoxiuridina, doxifluridina, enocitabina, floxuridina; andrógenos tales como calusterona, propionato de dromostanolona, epitioestano, mepitioestano, testolactona; antiadrenales tales como aminoglutetimida, mitotano, trilostano; relleno de ácido fólico tal como ácido frolínico; aceglatona; glucósido de aldofosfamida; antimetabolitos como metotrexato y 5-fluorouracilo (5-FU); análogos del ácido fólico tales como denopterina, metotrexato, pteropterina, trimetrexato; análogos de purina tales como fludarabina, 6-mercaptopurina, tiamiprina, tioguanina; análogos de pirimidina tales como ancitabina, azacitidina, 6-azauridina, carmofur, citarabina, didesoxiuridina, doxifluridina, enocitabina, floxuridina; andrógenos tales como calusterona, propionato de dromostanolona, epitioestano, mepitioestano, testolactona; antiadrenales tales como aminoglutetimida, mitotano, trilostano; relleno de ácido fólico tal como ácido frolínico; aceglatona; glucósido de aldofosfamida; glucósido de aldofosfamida; ácido aminolevulínico; amsacrina; bestabucilo; bisantreno; edatraxato; defofamina; demecolcina diaziquona; elfornitina; acetato de eliptinio; etoglucido; nitrato de galio; hidroxiaurea; lentinan lonidamina; mitoguazone; mitoxantrona; mopidamol; nitracrina; pentostatina; fenamet pirarubicina; ácido podofilínico; 2-etilhidracida; procarbazona; PSKTM; razoxano; sizofiran; espirogermanio; ácido tenuazónico; triaziquona; 2,2',2''-triclorotrietilamina; uretano; vindesina; dacarbazina; manomustina; mitobronitol; mitolactol; pipobroman; gacitosina; arabinósido ("Ara-C"); ciclofosfamida; tiotepa; taxanos, por ejemplo, paclitaxel (TaxolTM, Bristol-Myers Squibb Oncology, Princeton, NJ) y docetaxel (TaxotereTM; Aventis Antony, Francia); clorambucil; gemcitabina; 6-tioguanina; mercaptopurina; metotrexato; análogos de platino tales como cisplatino y carboplatino; vinblastina; platino; etopósido (VP-16); ifosfamida; mitomicina C; mitoxantrona; vincristina; vinorelbina; navelbina; novantrona tenipósido; daunomicina; aminopterina; xeloda; ibandronato; CPT-11; inhibidor de

topoisomerasa RFS 2000; difluorometilornitina (DMFO); ácido retinoico; esperamicinas; capecitabina; y sales, ácidos o derivados farmacéuticamente aceptables de cualquiera de los anteriores. También se incluyen en esta definición los agentes anti-hormonales que actúan para regular o inhibir la acción hormonas en tumores como los antiestrógenos, como por ejemplo el tamoxifeno, raloxifeno, aromatasa que inhibe 4(5)-imidazoles, el 4-hidroxitamoxifeno, trioxifeno, keoxifeno, LY 117018, onapristona y toremifeno (Fareston); y anti-andrógenos tales como flutamida, nilutamida, bicalutamida, leuprolida y goserelina; y sales, ácidos o derivados farmacéuticamente aceptables de cualquiera de los anteriores.

[0219] Los anticuerpos anti-MET y las moléculas de unión a antígeno biespecíficas MET x MET también pueden administrarse y/o coformularse en combinación con antivirales, antibióticos, analgésicos, corticoesteroides, esteroides, oxígeno, antioxidantes, inhibidores de COX, cardioprotectores, metales quelantes, IFN-gamma y/o AINE.

[0220] El o los componentes terapéuticamente activos adicionales, por ejemplo, cualquiera de los agentes enumerados anteriormente o sus derivados, se pueden administrar justo antes, simultáneamente o poco después de la administración de un anticuerpo anti-MET o molécula de unión a antígeno biespecífica MET x MET; (para los fines de la presente descripción, tales regímenes de administración se consideran la administración de un anticuerpo “en combinación con” un componente terapéuticamente activo adicional). La presente divulgación incluye composiciones farmacéuticas en las que un anticuerpo anti-MET o una molécula de unión a antígeno biespecífica MET x MET se formula conjuntamente con uno o más de los componentes terapéuticamente activos adicionales como se describe en otra parte en el presente documento.

Regímenes de administración

[0221] Según ciertas formas de realización, dosis múltiples de un anticuerpo anti-MET o una molécula de unión a antígeno biespecífica MET x MET (o una composición farmacéutica que comprende una combinación de un anticuerpo anti-MET o una molécula de unión a antígeno biespecífica MET x MET y cualquiera de los agentes terapéuticamente activos adicionales mencionados en el presente documento) se pueden administrar a un sujeto durante un período de tiempo definido. Los métodos de acuerdo con este aspecto comprenden

administrar secuencialmente a un sujeto múltiples dosis de un anticuerpo anti-MET o una molécula de unión a antígeno biespecífica MET x MET proporcionados en el presente documento. Como se usa en el presente documento, “administración secuencial” significa que cada dosis de anticuerpo se administra al sujeto en un punto temporal diferente, por ejemplo, en días diferentes separados por un intervalo predeterminado (por ejemplo, horas, días, semanas o meses). La presente divulgación incluye métodos que comprenden administrar secuencialmente al paciente una dosis inicial única de un anticuerpo anti-MET o una molécula de unión a antígeno biespecífica MET x MET, seguida de una o más dosis secundarias del anticuerpo anti-MET o molécula de unión a antígeno biespecífica MET x MET, y opcionalmente seguida de una o más dosis terciarias del anticuerpo anti-MET o molécula de unión a antígeno biespecífica MET x MET.

[0222] Los términos “dosis inicial”, “dosis secundarias” y “dosis terciarias” se refieren a la secuencia temporal de administración del anticuerpo anti-MET o de la molécula de unión a antígeno biespecífica MET x MET. Por lo tanto, la “dosis inicial” es la dosis que se administra al comienzo del régimen de tratamiento (también conocida como la “dosis basal”); las “dosis secundarias” son las dosis que se administran después de la dosis inicial; y las “dosis terciarias” son las dosis que se administran después de las dosis secundarias. Las dosis iniciales, secundarias y terciarias pueden contener la misma cantidad de anticuerpo anti-MET o molécula de unión a antígeno biespecífica MET x MET, pero en general pueden diferir entre sí en términos de frecuencia de administración. En ciertas formas de realización, sin embargo, la cantidad de anticuerpo contenida en las dosis iniciales, secundarias y/o terciarias varía entre sí (por ejemplo, se ajustan hacia arriba o hacia abajo según sea apropiado) durante el curso del tratamiento. En ciertas formas de realización, se administran dos o más dosis (por ejemplo, 2, 3, 4 o 5) al comienzo del régimen de tratamiento como “dosis de carga” seguidas de dosis posteriores que se administran de forma menos frecuente (por ejemplo, “dosis de mantenimiento”).

Usos Diagnósticos de los Anticuerpos

[0223] El anticuerpo anti-MET o la molécula de unión a antígeno biespecífica MET x MET de la presente divulgación también se puede usar para detectar y/o medir MET, o células que expresan MET en una muestra, por ejemplo, con fines de diagnóstico. Por ejemplo, un

anticuerpo anti-MET, o un fragmento del mismo, se puede usar para diagnosticar una afección o enfermedad caracterizada por una expresión aberrante (por ejemplo, sobreexpresión, expresión insuficiente, falta de expresión, etc.) de MET. Los ejemplos de ensayos diagnósticos para detectar MET pueden comprender, por ejemplo, poner en contacto una muestra obtenida de un paciente con un anticuerpo anti-MET o una molécula de unión a antígeno biespecífica MET x MET, en donde el anticuerpo está marcado con una marca detectable o molécula reportera. Alternativamente, se puede usar un anticuerpo anti-MET o una molécula de unión a antígeno biespecífica MET x MET no marcados en aplicaciones de diagnóstico en combinación con un anticuerpo secundario que está marcado de manera detectable. La etiqueta detectable o la molécula reportera puede ser un radioisótopo, como ^3H , ^{14}C , ^{32}P , ^{35}S o ^{125}I ; un resto fluorescente o quimioluminiscente tal como fluoresceína o rodamina; o una enzima tal como fosfatasa alcalina, beta-galactosidasa, peroxidasa de rábano picante o luciferasa. Los ejemplos de ensayos específicos que se pueden usar para detectar o medir la MET en una muestra incluyen ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA), radioinmunoensayo (RIA), inmuno-PET (por ejemplo, ^{89}Zr , ^{64}Cu , etc.) y clasificación de células activadas por fluorescencia (FACS).

[0224] Las muestras que se pueden usar en ensayos diagnósticos de MET de acuerdo con la presente divulgación incluyen cualquier muestra de tejido o fluido obtenible de un paciente. En general, se medirán los niveles de MET en una muestra particular obtenida de un paciente sano (por ejemplo, un paciente que no padece una enfermedad o afección asociada con niveles o actividad anormales de MET) para establecer inicialmente un nivel basal, o nivel estándar, de MET. Este nivel basal de MET puede compararse con los niveles de MET medidos en muestras obtenidas de individuos sospechosos de tener una enfermedad o afección relacionada con MET.

EJEMPLOS

[0225] Los siguientes ejemplos se presentan para proporcionar a los expertos en la materia una descripción y divulgación completas de cómo hacer y usar los métodos y composiciones proporcionados en el presente documento, y no pretenden limitar el alcance de lo que los inventores consideran como su invención. Se han realizado esfuerzos para garantizar la precisión con respecto a los números utilizados (por ejemplo, cantidades, temperatura, etc.)

pero se deben tener en cuenta algunos errores y desviaciones experimentales. A menos que se indique lo contrario, las partes son partes en peso, el peso molecular es el peso molecular promedio, la temperatura está en grados centígrados y la presión está en o cerca de la atmósfera.

Ejemplo 1. Generación de anticuerpos anti-MET

[0226] Los anticuerpos anti-MET se obtuvieron inmunizando un ratón modificado genéticamente que comprende ADN que codifica regiones variables de cadena pesada y ligera kappa de inmunoglobulina humana con un inmunógeno que comprende el dominio extracelular MET recombinante humano fusionado con Fc humano (R&D Systems, # de Catálogo 358-MT, Minneapolis, MN). Los ratones utilizados para las inmunizaciones expresan una “cadena ligera universal”. Es decir, los anticuerpos producidos en este ratón tienen diferentes regiones variables de cadena pesada pero dominios variables de cadena ligera esencialmente idénticos.

[0227] La respuesta inmunitaria del anticuerpo se monitorizó mediante un inmunoensayo específico para identificar MET. Cuando se logró una respuesta inmunitaria deseada, se recogieron los esplenocitos y se fusionaron con células de mieloma de ratón para preservar su viabilidad y formar líneas celulares de hibridoma. Las líneas celulares de hibridoma se cribaron y seleccionaron para identificar líneas celulares que produjeran anticuerpos específicos para MET. Utilizando esta técnica, se obtuvieron varios anticuerpos quiméricos anti-MET (es decir, anticuerpos que poseen dominios variables humanos y dominios constantes de ratón). Además, se aislaron directamente varios anticuerpos anti-MET completamente humanos a partir de células B positivas para el antígeno no fusionadas con células de mieloma, como se describe en el documento US 2007/0280945A1.

[0228] En los Ejemplos que se presentan a continuación se describen en detalle ciertas propiedades biológicas de los anticuerpos anti-MET ilustrativos generados de acuerdo con los métodos de este Ejemplo, y los anticuerpos biespecíficos contruidos a partir de los mismos.

Ejemplo 2. Secuencias de ácidos nucleicos y secuencias aminoacídicas de regiones variables de cadena pesada y ligera.

[0229] La Tabla 1 presenta los identificadores de secuencias aminoacídicas de las regiones variables de cadena pesada y ligera y las CDR de los anticuerpos anti-MET seleccionados descritos en el presente documento. (Como se señaló anteriormente, todos los anticuerpos generados en el Ejemplo 1 poseen la misma región variable de la cadena ligera, y por lo tanto también las mismas secuencias de CDR de cadena ligera). Los correspondientes identificadores de secuencias de ácido nucleicos se presentan en la Tabla 2.

Tabla 1: Identificadores de secuencias aminoacídicas

Designación de Anticuerpo	SEQ ID NOS:							
	HCVR	HCDR1	HCDR2	HCDR3	LCVR	LCDR1	LCDR2	LCDR3
H4H13290P2	2	4	6	8	138	140	142	144
H4H13291P2	10	12	14	16	138	140	142	144
H4H13295P2	18	20	22	24	138	140	142	144
H4H13299P2	26	28	30	32	138	140	142	144
H4H13300P2	34	36	38	40	138	140	142	144
H4H13301 P2	42	44	46	48	138	140	142	144
H4H13302P2	50	52	54	56	138	140	142	144
H4H13306P2	58	60	62	64	138	140	142	144
H4H13309P2	66	68	70	72	138	140	142	144
H4H13311 P2	74	76	78	80	138	140	142	144
H4H13312P2	82	84	86	88	138	140	142	144
H4H13313P2	90	92	94	96	138	140	142	144
H4H13316P2	98	100	102	104	138	140	142	144
H4H13318P2	106	108	110	112	138	140	142	144
H4H13319P2	114	116	118	120	138	140	142	144
H4H13325P2	122	124	126	128	138	140	142	144
H4H13331P2	130	132	134	136	138	140	142	144

Tabla 2: Identificadores de secuencia de ácidos nucleicos

	SEQ ID NOS:							
Designación de Anticuerpo	HCVR	HCDR1	HCDR2	HCDR3	LCVR	LCDR1	LCDR2	LCDR3
H4H13290P2	1	3	5	7	137	139	141	143
H4H13291P2	9	11	13	15	137	139	141	143
H4H13295P2	17	19	21	23	137	139	141	143
H4H13299P2	25	27	29	31	137	139	141	143
H4H13300P2	33	35	37	39	137	139	141	143
H4H13301P2	41	43	45	47	137	139	141	143
H4H13302P2	49	51	53	55	137	139	141	143
H4H13306P2	57	59	61	63	137	139	141	143
H4H13309P2	65	67	69	71	137	139	141	143
H4H13311P2	73	75	77	79	137	139	141	143
H4H13312P2	81	83	85	87	137	139	141	143
H4H13313P2	89	91	93	95	137	139	141	143
H4H13316P2	97	99	101	103	137	139	141	143
H4H13318P2	105	107	109	111	137	139	141	143
H4H13319P2	113	115	117	119	137	139	141	143
H4H13325P2	121	123	125	127	137	139	141	143
H4H13331P2	129	131	133	135	137	139	141	143

[0230] En el presente documento, los anticuerpos normalmente se denominan de acuerdo con la siguiente nomenclatura: prefijo de Fc (por ejemplo, "H4H"), seguido de un identificador numérico (por ejemplo, "13290", "13291", "13295", etc.), seguido de un sufijo "P2", como se muestra en las Tablas 1 y 2. De este modo, de acuerdo con la nomenclatura usada en este documento un anticuerpo se puede denominar, por ejemplo, "H4H13290P2", "H4H13291P2", "H4H13295P2", etc. El prefijo en las designaciones de anticuerpos aquí usados indican el isotipo particular de la región Fc del anticuerpo. En particular, un anticuerpo "H4H" tiene un Fc de IgG4 humana (todas las regiones variables son completamente humanas se indican a través de la primera "H" al nombrar el anticuerpo). Como apreciará una persona con experiencia normal en la técnica, un anticuerpo que tenga

un isotipo de Fc particular puede convertirse en un anticuerpo con un isotipo Fc diferente (por ejemplo, un anticuerpo con un Fc de IgG4 de ratón se puede convertir en un anticuerpo con una Fc de IgG1 humana, etc.), pero en cualquier caso, los dominios variables (incluidas las CDR), que se indican mediante los identificadores numéricos que se muestran en las Tablas 1 y 2 seguirán siendo los mismos, y se espera que, independientemente de la naturaleza del dominio Fc, las propiedades de unión sean idénticas o sustancialmente similares,.

Ejemplo 3. Constantes cinéticas y afinidades de unión de anticuerpos monoclonales humanos anti-MET (monoespecíficos) derivadas de resonancia de plasmones superficiales.

[0231] Las afinidades de unión y las constantes cinéticas de los anticuerpos anti-MET humanos se determinaron mediante resonancia de plasmones superficiales (Biacore 4000 o T-200) a 37 °C. Los anticuerpos anti-Met probados en este ejemplo eran enlazadores monoespecíficos bivalentes de MET. Los anticuerpos, expresados como IgG4 humana (designados “H4H”), se capturaron en una superficie del sensor CM4 o CM5 de Biacore derivatizados a través de un acoplamiento de amina con un anticuerpo monoclonal de ratón anti-Fc humano (GE, BR-1008-39). Se inyectaron diversas concentraciones de proteínas Met solubles monoméricas (Met.mmh humana (h); SEQ ID NO: 152; Met.mmh de macaca fascicularis (mf); SEQ ID NO: 154) o diméricas (hMet.mFc; SEQ ID NO: 153) sobre la superficie capturada del anticuerpo anti-MET a una velocidad de flujo de 30 o 50 μ L/minuto. La asociación de hMET.mmh o hMET.mFc al anticuerpo monoclonal capturado se monitorizó durante 4 o 5 minutos y la disociación de hMET.mmh o hMET.mFc en tampón de corrida HBS-ET (HEPES 0,01 M, pH 7,4, NaCl 0,15 M, EDTA 3 mM, Surfactante P20 al 0,05% v/v) o PBS-P (Fosfato de Sodio 0,01 M, pH 7.4, NaCl 0,15M, Surfactante con P20 al 0,05% v/v) se monitorizó durante 10 minutos.

[0232] Las constantes de velocidad de asociación (k_a) y disociación (k_d) cinética se determinaron ajustando los sensogramas en tiempo real a un modelo de unión 1:1 utilizando el software de ajuste de curva Scrubber 2.0c. La constante de equilibrio de disociación de la unión (K_D) y la semivida disociativa ($t_{1/2}$) se calcularon a partir de las constantes de velocidad cinética como:

$$K_D(M) = \frac{k_d}{k_a}, \quad y \quad t_{1/2} (min) = \frac{\ln(2)}{60 \cdot k_d}$$

[0233] Los parámetros cinéticos de unión de los anticuerpos monoespecíficos anti-Met a la proteína Met monomérica y dimérica se muestran a continuación en la Tabla 3.

Tabla 3: Afinidades de unión Biacore de Anticuerpos monoclonales (mAbs) monoespecíficos anti-MET a 37 °C

Unión a 37°C / Formato Captura-Anticuerpo					
Anticuerpo	Analito	k_a (Ms ⁻¹)	k_d (s ⁻¹)	K_D (Molar)	t1/2 (min)
H4H13290P2	hMet.mmh	2,53E+05	8,03E-04	3,17E-09	14,4
	hMET.mFc	6,15E+05	3,15E-04	5,13E-10	36,6
	mfMet.mmh	1,23E+05	6,33E-04	5,16E-09	18,2
H4H13291P2	hMet.mmh	2,55E+04	2,38E-03	9,34E-08	4,8
	hMET.mFc	3,33E+05	3,39E-04	1,02E-09	34
	mfMet.mmh	3,70E+04	1,39E-03	3,76E-08	8,3
H4H13295P2	hMet.mmh	1,67E+04	5,40E-04	3,24E-08	21,4
	hMET.mFc	2,28E+05	2,64E-04	1,16E-09	43,8
	mfMet.mmh	1,65E+04	9,79E-04	5,93E-08	11,8
H4H13299P2	hMet.mmh	9,10E+04	7,80E-04	8,57E-09	14,8
	hMET.mFc	3,57E+05	3,14E-04	8,78E-10	36,8
	mfMet.mmh	1,13E+05	8,84E-04	7,86E-09	13,1
H4H13300P2	hMet.mmh	3,35E+04	2,43E-03	7,25E-08	4,8
	hMET.mFc	2,65E+05	2,95E-04	1,12E-09	39,1
	mfMet.mmh	5,13E+04	1,94E-03	3,77E-08	6,0
H4H13301 P2	hMet.mmh	7,57E+04	6,22E-03	8,22E-08	1,9
	hMET.mFc	7,05E+05	1,14E-03	1,62E-09	10,1
	mfMet.mmh	6,85E+04	5,30E-03	7,74E-08	2,2
H4H13302P2	hMet.mmh	5,24E+04	2,46E-03	4,70E-08	4,7
	hMET.mFc	2,51E+05	5,84E-04	2,33E-09	19,8
	mfMet.mmh	3,56E+04	2,92E-03	8,20E-08	4,0
H4H13306P2	hMet.mmh	1,52E+05	1,66E-02	1,09E-07	0,7
	hMET.mFc	1,21E+06	2,60E-03	2,15E-09	4,4
	mfMet.mmh	1,21E+06	3,11E-02	2,58E-08	0,4
H4H13309P2	hMet.mmh	9,20E+04	5,87E-04	6,38E-09	19,7
	hMET.mFc	4,06E+05	2,67E-04	6,57E-10	43,3
	mfMet.mmh	1,23E+05	6,33E-04	5,16E-09	18,2
H4H13311 P2	hMet.mmh	4,48E+04	5,19E-03	1,16E-07	2,2
	hMET.mFc	3,02E+05	4,68E-04	1,55E-09	24,7
	mfMet.mmh	7,61E+04	6,04E-03	7,94E-08	1,9
H4H13312P2	hMet.mmh	7,19E+04	1,63E-02	2,27E-07	0,7
	hMET.mFc	6,14E+05	1,71E-03	2,79E-09	6,7
	mfMet.mmh	1,47E+05	7,72E-03	5,24E-08	1,5
H4H13313P2	hMet.mmh	8,78E+04	5,70E-03	6,49E-08	2
	hMET.mFc	7,50E+05	8,93E-04	1,19E-09	12,9

Unión a 37°C / Formato Captura-Anticuerpo					
Anticuerpo	Analito	k_a (Ms ⁻¹)	k_d (s ⁻¹)	K_D (Molar)	t1/2 (min)
H4H13316P2	mfMet.mmh	5,10E+04	4,08E-03	8,00E-08	2,8
	hMet.mmh	7,82E+04	1,51E-03	1,93E-08	7,6
	hMET.mFc	2,93E+05	1,08E-04	3,67E-10	107,4
	mfMet.mmh	NB	NB	NB	NB
H4H13318P2	hMet.mmh	3,30E+04	2,92E-03	8,83E-08	4
	hMET.mFc	3,52E+05	1,65E-04	4,67E-10	70,2
	mfMet.mmh	NB	NB	NB	NB
H4H13319P2	hMet.mmh	3,11E+04	2,38E-03	7,65E-08	4,9
	hMET.mFc	3,82E+05	5,42E-04	1,42E-09	21,3
	mfMet.mmh	2,66E+04	1,15E-03	4,33E-08	10,0
H4H13325P2	hMet.mmh	9,53E+04	2,36E-03	2,48E-08	4,9
	hMET.mFc	3,06E+05	1,85E-04	6,05E-10	62,4
	mfMet.mmh	NB	NB	NB	NB
H4H13331 P2	hMet.mmh	2,61E+05	8,73E-04	3,35E-09	13,2
	hMET.mFc	6,39E+05	1,56E-04	2,44E-10	74,1
	mfMet.mmh	1,61E+05	1,04E-03	6,47E-09	11,1

NB = No se observa unión en las condiciones usadas

[0234] Como se muestra en la Tabla 3, varios anticuerpos mostraron una unión de alta afinidad a la proteína MET humana y de mono.

Ejemplo 4. Anticuerpos anti-Met se unen a epítomos distintos en el receptor Met

[0235] Para evaluar si dos anticuerpos anti-Met son capaces de competir entre sí para unirse a sus respectivos epítomos en MET, se realizó un ensayo de competición por la unión utilizando interferometría de bicapa (BLI) en tiempo real y sin marcadores en un Biosensor HTX OCTET® (ForteBio Corp., Menlo Park, CA).

[0236] En resumen, alrededor de 0,25 nM del dominio extracelular de MET humano expresado con una etiqueta myc-myc-hexahistidina C-terminal (hMet.mmh) se capturó primero sobre biosensores OCTET® recubiertos con anticuerpos anti-penta-His (ForteBio Corp., # 18-5079) sumergiendo los biosensores durante 5 minutos en pocillos que contienen una solución de 20 µg/mL de hMET.mmh. Los biosensores con el antígeno capturado se saturaron luego con el primer anticuerpo monoclonal anti-MET (posteriormente denominado mAb-1) por inmersión en pocillos que contenían una solución de mAb-1 de 50 µg/mL durante 5 minutos. Los biosensores se sumergieron luego en pocillos que contenían una

solución de 50 µg/mL de un segundo anticuerpo monoclonal anti-MET (posteriormente denominado mAb-2) durante 3 minutos. Entre cada paso del experimento todos los biosensores se lavaron en tampón (HBS-EP) con solución salina de EDTA tamponada con HEPES de OCTET®. La respuesta de unión en tiempo real fue monitoreada durante el curso del experimento y se registró la respuesta de unión al final de cada paso. Se comparó la respuesta de la unión de mAb-2 a MET previamente acomplexado con mAb-1 y se determinó el comportamiento competitivo/no competitivo de los diferentes anticuerpos monoclonales anti-MET utilizando un umbral de inhibición del 50%. La Tabla 4 define explícitamente las relaciones de los anticuerpos que compiten en ambas direcciones, independientemente del orden de unión.

Tabla 4: Competencia cruzada de anticuerpos anti-MET por la unión a hMET.mmh

Primer mAb (mAb-1) Capturado usando biosensores Octet anti-penta-His	Anticuerpos mAb-2 que compiten con mAb-1	Primer mAb (mAb-1) Capturado usando biosensores Octet anti-penta-His	Anticuerpos mAb-2 que compiten con mAb-1
H4H13301P2	H4H13302P2	H4H13300P2	H4H13291P2
H4H13302P2	H4H13301P2		H4H13295P2
H4H13290P2	H4H13306P2		H4H13311 P2
	H4H13316P2		H4H13318P2
H4H13306P2	H4H13290P2		H4H13319P2
	H4H13316P2	H4H13311P2	H4H13291P2
H4H13316P2	H4H13290P2		H4H13295P2
	H4H13306P2		H4H13300P2
	H4H13325P2		H4H13318P2
	H4H13331P2		H4H13319P2
H4H13325P2	H4H13316P2	H4H13318P2	H4H13291P2
	H4H13331P2		H4H13295P2
H4H13312P2	H4H13331P2		H4H13300P2
H4H13291P2	H4H13295P2		H4H13311P2
	H4H13300P2		H4H13319P2
	H4H13311P2		H4H13291P2

Primer mAb (mAb-1) Capturado usando biosensores Octet anti-penta-His	Anticuerpos mAb-2 que compiten con mAb-1	Primer mAb (mAb-1) Capturado usando biosensores Octet anti-penta-His	Anticuerpos mAb-2 que compiten con mAb-1
H4H13295P2	H4H13318P2	H4H13319P2	H4H13295P2
	H4H13319P2		H4H13300P2
	H4H13291P2		H4H13311P2
	H4H13300P2		H4H13318P2
	H4H13311P2	H4H13331P2	H4H13316P2
	H4H13318P2		H4H13325P2
	H4H13319P2		H4H13312P2

Ejemplo 5. Construcción de anticuerpos biespecíficos que tienen dos diferentes dominios de unión a antígeno específicos para diferentes epítomos de MET

[0237] Este ejemplo describe la construcción de anticuerpos biespecíficos que comprenden dos dominios diferentes de unión a antígeno (D1 y D2), en donde D1 y D2 se derivan de diferentes anticuerpos anti-MET y, en consecuencia, se unen a epítomos separados en el dominio extracelular MET.

[0238] Los dominios de unión a antígeno anti-MET individuales utilizados para construir los anticuerpos biespecíficos de este Ejemplo se derivaron de varios anticuerpos bivalentes, mono-específicos anti-MET descritos en los Ejemplos 1 a 3, en el presente documento. Todos los anticuerpos anti-MET aquí descritos comprenden la misma (“común”) cadena ligera (que comprende la secuencia aminoacídica de la región variable de cadena ligera [LCVR] de SEQ ID NO: 138, y las secuencias aminoacídicas de CDR de cadena ligera [LCDR1, LCDR2 y LCDR3] de SEQ ID NO: 140, 142 y 144). Además, todos los anticuerpos biespecíficos ilustrados en este Ejemplo contienen un brazo “D2” derivado del anticuerpo anti-MET ilustrativo H4H13312P2. Por lo tanto, ambos dominios de unión a antígeno (D1 y D2) de todos los anticuerpos biespecíficos descritos en este ejemplo comprenden esta región variable de cadena ligera común y todos los brazos de unión a D2 comprenden la región variable de cadena pesada de H4H13312P2; sin embargo, los anticuerpos biespecíficos difieren entre sí en términos de sus regiones variables de cadena pesada (HCVR) y sus CDR de cadena pesada

(HCDR) de D1. Los componentes de los anticuerpos biespecíficos de este Ejemplo se resumen en la Tabla 5.

Tabla 5: Resumen de los componentes de los anticuerpos biespecíficos MET x MET

Anticuerpos biespecíficos	SEQ ID NO: (Secuencias aminoacídicas)							
	Primer dominio de unión a antígeno (D1)				Segundo dominio de unión a antígeno (D2)			
	D1-HCVR	D1-HCDR1	D1-HCDR2	D1-HCDR3	D2-HCVR	D2-HCDR1	D2-HCDR2	D2-HCDR3
H4H14634D (Nº 10)	H4H13290P2				H4H13312P2			
	2	4	6	8	82	84	86	88
H4H14635D (Nº 42)	H4H13295P2				H4H13312P2			
	18	20	22	24	82	84	86	88
H4H14636D (Nº 74)	H4H13299P2				H4H13312P2			
	26	28	30	32	82	84	86	88
H4H14637D (Nº 90)	H4H13301P2				H4H13312P2			
	42	44	46	48	82	84	86	88
H4H14638D (Nº 106)	50H4H13302P2				H4H13312P2			
	50	52	54	56	82	84	86	88
H4H14639D (Nº 122)	H4H13306P2				H4H13312P2			
	58	60	62	64	82	84	86	88
H4H14640D (Nº 138)	H4H13309P2				H4H13312P2			
	66	68	70	72	82	84	86	88
H4H14641D (Nº 187)	H4H13313P2				H4H13312P2			
	90	92	94	96	82	84	86	88
H4H16445D (Nº 26)	H4H13291P2				H4H13312P2			
	10	12	14	16	82	84	86	88
H4H16446D (Nº 58)	H4H13300P2				H4H13312P2			
	34	36	38	40	82	84	86	88
H4H16447D (Nº 154)	H4H13311P2				H4H13312P2			
	74	76	78	80	82	84	86	88
H4H16448D	H4H13318P2							

Anticuerpos biespecíficos	SEQ ID NO: (Secuencias aminoacídicas)							
	Primer dominio de unión a antígeno (D1)				Segundo dominio de unión a antígeno (D2)			
	D1- HCVR	D1- HCDR1	D1- HCDR2	D1- HCDR3	D2- HCVR	D2- HCDR1	D2- HCDR2	D2- HCDR3
(Nº 219)	106	108	110	112	82	84	86	88
H4H16449D (Nº 235)	H4H13319P2				H4H13312P2			
	114	116	118	120	82	84	86	88

*La designación de los números entre paréntesis (por ejemplo, "Nº 10") bajo los identificadores de los anticuerpos biespecíficos indica el número de anticuerpo biespecífico representado en la matriz de anticuerpos biespecíficos MET x MET de la Figura 1.

Ejemplo 6. Afinidades de unión y constantes cinéticas de anticuerpos monoclonales biespecíficos humanos MET x MET derivadas de resonancia de plasmones superficiales

[0239] Las afinidades de unión y las constantes cinéticas de los anticuerpos biespecíficos MET x MET contruidos de acuerdo con el Ejemplo 4 del presente documento se determinaron por resonancia de plasmones superficiales (Biacore 4000 o T-200) a 37 °C. Los anticuerpos biespecíficos, expresados como IgG4 humana (designado "H4H"), se capturaron sobre una superficie del sensor CM4 o CM5 Biacore derivatizada mediante un acoplamiento de amina con un anticuerpo monoclonal de ratón anti-Fc humano (GE, BR-1008-39). Se inyectaron diversas concentraciones de proteína MET monomérica soluble (hMet.mmh, SEQ ID NO: 152) sobre la superficie donde se encuentra capturado el anticuerpo biespecífico anti-MET x MET a una velocidad de flujo de 30 o 50 µL/minuto. La asociación del analito al anticuerpo biespecífico capturado se monitorizó durante 4 o 5 minutos y la disociación del analito en tampón HBS-ET (HEPES 0,01 M, pH 7,4, NaCl 0,15 M, EDTA 3 mM, Surfactante P20 al 0,05% v/v) o PBS-P (fosfato de sodio 0,01 M, pH 7,4, NaCl 0,15 M, surfactante P20 al 0,05% v/v) se monitorizó durante 10 minutos.

[0240] Las constantes de velocidad de asociación (k_a) y disociación (k_d) cinética se determinaron como se describe en el Ejemplo 3.

[0241] Los parámetros cinéticos de unión de los anticuerpos anti-Met biespecíficos a la proteína Met monomérica (hMET.mmh) se muestran en la Tabla 6.

Tabla 6: Afinidades de unión Biacore de mAbs anti-MET biespecíficos a 37 °C

Unión a 37°C / Formato captura-Anticuerpo					
Anticuerpo biespecífico	Analito	ka (Ms ⁻¹)	kd (s ⁻¹)	Ko(Molar)	T1/2 (min)
H4H14634D	hMet.mmh	N/A	≤ 1E-5	N/A	≥1155
H4H14635D	hMet.mmh	N/A	8,21E-05	N/A	140,6
H4H14636D	hMet.mmh	N/A	≤ 1E-5	N/A	≥1155
H4H14637D	hMet.mmh	N/A	3,26E-04	N/A	35,4
H4H14638D	hMet.mmh	N/A	1,65E-04	N/A	70,2
H4H14639D	hMet.mmh	N/A	1,63E-04	N/A	70,8
H4H14640D	hMet.mmh	N/A	≤ 1E-5	N/A	≥1155
H4H14641D	hMet.mmh	N/A	3,27E-04	N/A	35,3
H4H16445D	hMet.mmh	N/A	3,93E-04	N/A	29,4
H4H16446D	hMet.mmh	N/A	1,03E-04	N/A	111,8
H4H16447D	hMet.mmh	N/A	8,48E-04	N/A	13,6
H4H16448D	hMet.mmh	N/A	5,92E-04	N/A	19,5
H4H16449D	hMet.mmh	N/A	2,94E-04	N/A	39,3

[0242] Como se muestra en la Tabla 6, los anticuerpos biespecíficos “MET x MET” descritos en el presente documento mostraron valores de T_{1/2} de hasta más de 1155 minutos.

[0243] Como se muestra en la Tabla 7, la velocidad de disociación del anticuerpo biespecífico H4H14639D es significativamente más baja que las velocidades de disociación de cada uno de sus anticuerpos parentales, H4H13306P2 y H4H13312P2.

Tabla 7: Afinidades de unión Biacore de anticuerpos monoclonales (mAb) anti-MET biespecíficos y parentales monoespecíficos a 37 °C

Unión a 37°C / Formato captura-Anticuerpo			
Anticuerpo	Analito	kd (s ⁻¹)	T1/2 (min)
H4H13306P2	hMet.mmh	1,66E-02	0,7

Unión a 37°C / Formato captura-Anticuerpo			
Anticuerpo	Analito	kd (s ⁻¹)	T1/2 (min)
H4H13312P2	hMet.mmh	8,40E-03	1,4
H4H14639D	hMet.mmh	1,63E-04	70,8

Ejemplo 7: Anticuerpos anti-Met bloquean la activación de Met mediada por HFG en bioensayo reportero de luciferasa SRE

[0244] Se examinó la capacidad de los anticuerpos anti-MET para bloquear la activación de MET mediada por el factor de crecimiento de hepatocitos (HGF) en un ensayo reportero basado en luciferasa. El factor de crecimiento HGF se une al dominio extracelular de su receptor c-Met (MET), lo que desencadena una rápida homodimerización y la activación de varias cascadas de señalización aguas abajo. Los anticuerpos anti-MET probados en este ejemplo eran enlazadores monoespecíficos bivalentes de MET, o “biespecíficos” anti-MET, en los que cada brazo del anticuerpo biespecífico se unía a un epítipo diferente y distinto en MET.

[0245] Se utilizó un ensayo reportero de luciferasa basado en células diseñado (Figura 2) para determinar la capacidad de los anticuerpos anti-MET para activar la señalización de MET (Figura 3, panel A; Tabla 8, columnas 3 y 4) y para bloquear la activación de MET mediada por ligando (Figura 3, panel B; Tabla 8, columnas 1 y 2). Brevemente, se usó el kit Lenti SRE Reporter (luc) Kit SIGNAL™ (SABiosciences, Hilden, DE) para generar células HEK293/SRE-Luc. Se seleccionaron células HEK293 (riñón embrionario humano) porque expresan endógenamente c-Met. El reportero luciferasa (Luc) dependiente del elemento de respuesta del suero (SRE) se incorporaron de manera estable en células HEK293/SRE-Luc (ver Dinter *et al.*, PLoS ONE 10(2): e0117774, 2015). Las células HEK293/SRE-Luc en se cultivaron en DMEM suplementado con suero bovino fetal (FBS) al 10%, penicilina/estreptomicina/glutamina y 1 µg/mL de puromicina.

[0246] A continuación, se sembraron $2,0 \times 10^5$ células de HEK293/SRE-Luc en medio de ensayo de luciferasa en placas de 96 pocillos y se incubaron durante la noche a 37°C en CO₂ al 5%. Se generaron curvas de respuesta a la dosis del factor de crecimiento de hepatocitos

(HGF) agregando HGF diluido en serie (0,01 pM a 1,0 nM) a las células y registrando la señal de luciferasa después de la incubación a 37 °C durante cuatro a seis horas en ausencia de anticuerpos. Para generar curvas de inhibición de anticuerpos, las células se incubaron previamente durante una hora a 37 °C con anticuerpos anti- MET humano diluidos en serie (1,1 pM a 200 nM). Luego se agregó HGF a una concentración de 73 pM o 100 pM durante cuatro a seis horas adicionales antes de registrar la señal. Por separado, también se evaluó la capacidad de los anticuerpos para activar c-Met en ausencia de ligando.

[0247] La actividad de la luciferasa se detectó utilizando el sistema de ensayo de luciferasa ONE-Glo™ (Promega, Madison, WI) y la luz emitida se midió en un luminómetro Victor o Envision (Perkin Elmer, Shelton, CT) y se expresó como unidades de luz relativas (RLU). Los valores de CE50/CI50 se determinaron a partir de una ecuación logística de cuatro parámetros sobre una curva de respuesta de 12 puntos utilizando GRAPHPAD PRISM®. Se informó el porcentaje de bloqueo de HGF y las veces de activación de MET (anticuerpos monoclonales (mAbs) solos) para la dosis más alta de anticuerpo. Los resultados se muestran en la Tabla 8.

Tabla 8: Bloqueo de la señalización mediada por HGF producida por anticuerpos anti-Met y activación de SRE-Luc en ausencia de ligando

	Actividad de bloqueo en HEK293/RE-Luc (unión previa del mAb 1h)		Activación de HEK293/SRE-Luc independiente de ligando (HGF)	
ID Anticuerpo	% Inhibición	CI ₅₀ (M)	Veces de respuesta	CE ₅₀ (M)
Anticuerpos monoespecíficos bivalentes anti-MET				
Anticuerpos expresados con un hlgG1-Fc				
H1H13301P2	42	3,3E-09	1,4	ND
H1H13316P2	86	4,0E-11	1,7	ND
Anticuerpos expresados con un hlgG4-Fc				
H4H13312P2	48	7,7E-11	10,9	1,2E-10
H4H13325P2	69	1,3E-11	4,3	1,9E-10

	Actividad de bloqueo en HEK293/RE-Luc (unión previa del mAb 1h)		Activación de HEK293/SRE-Luc independiente de ligando (HGF)	
ID Anticuerpo	% Inhibición	CI ₅₀ (M)	Veces de respuesta	CE ₅₀ (M)
H4H13316P2	74	7,8E-12	2,3	4,7E-11
H4H13302P2	45	1,6E-09	1,8	ND
H4H13313P2	47	2,3E-09	1,2	ND
H4H13301P2	40	1,5E-09	1,6	ND
H4H13295P2	70	5,5E-11	2,8	3,0E-10
H4H13306P2	67	ND	9,8	1,3E-11
H4H13291P2	61	1,3E-10	2,7	3,9E-10
H4H13319P2	67	5,2E-11	4,8	1,8E-10
H4H13309P2	77	2,0E-10	9,2	3,9E-10
H4H13318P2	77	1,0E-10	3,1	ND
H4H13300P2	69	1,2E-10	2,8	4,8E-10
H4H13290P2	56	< 2,0E-12	9,8	< 2,0E-12
H4H13311P2	62	3,5E-11	5,2	3,0E-10
H4H13331P2	75	< 1,0E-11	7,1	2,3E-12
H4H13299P2	51	ND	14,4	3,7E-12
Anticuerpos biespecíficos anti-MET (hlgG4-Fc)				
H4H14639D	95	2,4E-11	1,8	5,7E-11
H4H14640D	89	5,2E-10	2,5	6,8E-09
H4H14634D	85	9,7E-12	3,4	9,0E-11
H4H14635D	85	1,9E-10	2,2	1,4E-09
H4H14638D	79	1,1E-09	2,6	5,9E-09
H4H14641D	75	2,7E-09	4,4	8,4E-08
H4H14636D	74	ND	2,8	2,8E-10
H4H14637D	73	ND	2,1	4,1E-09
H4H16445D	81	5,2E-10	4,3	1,0E-09
H4H16446D	83	1,0E-09	4,0	1,4E-09
H4H16447D	76	8,6E-10	5,8	1,4E-09
H4H16448D	87	6,2E-10	4,3	9,1E-10
H4H16449D	85	3,2E-10	4,2	4,2E-10

NT = no probado; ND = CE50/CI50 no determinado debido a curvas no sigmoideas o bloqueo incompleto.

[0248] Como se resume en la Tabla 8, la mayoría de los anticuerpos inhibió la activación del indicador SRE, con valores de CI50 que van desde < 2,0 pM hasta alrededor de 1,0 nM. Varios ejemplos de anticuerpos anti-MET bivalentes monoespecíficos, como H4H13306P2 y H4H13309P2, fueron potentes inhibidores de la activación de SRE-luc, con valores de inhibición porcentual del 67% y 77%, respectivamente. Los anticuerpos biespecíficos anti-MET (MET x MET) mostraron una mayor inhibición de la activación global de SRE-luc. Por ejemplo, el anticuerpo biespecífico MET x MET H4H14639D mostró una inhibición del 95 por ciento. Además, varios anticuerpos bloqueadores se activaron débilmente en ausencia de ligando con respuestas de veces de activación que oscilaron entre 0,8 y 14,4 por encima de los niveles de referencia.

[0249] También, como se muestra en la Figura 3, cada uno de los anticuerpos monoespecíficos bivalentes, H4H13306P2 y H4H13312P2, activan la ruta Met en ausencia de ligando HGF (panel A) y también bloquean la activación de Met por HGF (panel B).

[0250] También se evaluó el efecto de un anticuerpo biespecífico MET x MET (por ejemplo, H4H14639D) sobre la activación de MET dependiente de HGF e independiente de HGF utilizando el sistema HEK293/SRE-Luc. La actividad de la Luciferasa impulsada por SRE se midió en células HEK293T tratadas con los anticuerpos MET H4H14639D (anticuerpo biespecífico MET x MET), un anticuerpo monovalente anti-MET y el anticuerpo parental H4H14639D H4H13312P2 a diversas concentraciones para determinar el nivel de agonismo de MET independiente de HGF. Si bien el anticuerpo parental monoespecífico bivalente anti-MET mostró actividad agonista de MET, ni el anticuerpo monovalente ni el biespecífico MET x MET mostraron actividad agonista de MET (Figura 4, panel A).

[0251] La actividad de la Luciferasa impulsada por SRE se midió en células HEK293T tratadas con los anticuerpos MET: H4H14639D (el anticuerpo biespecífico MET x MET), un anticuerpo monovalente anti-MET y el anticuerpo parental H4H14639D H4H13312P2 a diversas concentraciones para determinar el nivel de inhibición o bloqueo del agonismo de MET dependiente de HGF. Si bien el anticuerpo parental monoespecífico bivalente anti-

MET mostró cierta actividad de bloqueo de HGF, tanto el anticuerpo monovalente como el biespecífico MET x MET mostraron un mayor bloqueo de HGF (Figura 4, panel B).

[0252] El anticuerpo biespecífico MET x MET bloquea la señalización de HGF y muestra una baja actividad agonista de MET.

Ejemplo 8: Los anticuerpos anti-Met inhiben el crecimiento de células con amplificación de Met

[0253] A continuación, se analizaron anticuerpos anti-Met seleccionados para determinar su capacidad para inhibir el crecimiento de células SNU5 con amplificación de MET. En resumen, se sembraron $2,5 \times 10^3$ células de carcinoma gástrico humano (SNU5) en medios de crecimiento completos en presencia de anticuerpos anti-MET en concentraciones que oscilaron entre 1,5 pM y 100 nM. El medio de crecimiento completo SNU5 contenía Medio de Dulbecco modificado por Iscove, FBS al 10% y penicilina/estreptomicina/glutamina. Las células se incubaron durante 5 días y el número de células viables se determinó utilizando el kit de ensayo de viabilidad de células luminiscentes CELLTITER-GLO® (Promega, Madison, WI) de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

[0254] Como se resume en la Tabla 9, varios anticuerpos anti-MET, como H4H13312P2 y H4H13325P2, bloquearon el crecimiento de SNU5 en más del 50%, con una CI50 global que oscilaba entre 44 pM y 780 pM.

[0255] La figura 5 representa el crecimiento celular relativo de células SNU5 tratadas con diversos anticuerpos monoespecíficos bivalentes anti-MET (es decir, anticuerpos convencionales). Un subconjunto de anticuerpos MET convencionales inhibe el crecimiento de células SNU5 de cáncer gástrico con amplificación de MET (Figura 5). Las células SNU5 se trataron en placas de 96 pocillos con cada anticuerpo a 10 µg/mL y el crecimiento celular se determinó después de 5 días mediante la reducción del reactivo ALAMARBLUE® (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA). El anticuerpo MET monovalente (columna 2, Figura 5) se generó utilizando las secuencias variables de cadena pesada y ligera de MetMab como se establece en la Patente de Estados Unidos 7.892.550 B2, que se incorpora aquí por referencia en su totalidad. El anticuerpo convencional 8 es H4H13306P2, y el anticuerpo

convencional 11 es H4H13312P2, los que se usaron para construir el anticuerpo biespecífico MET x MET H4H14639D.

[0256] En un ensayo de crecimiento separado se evaluó la actividad de bloqueo de un anticuerpo biespecífico MET x MET (es decir, H4H14639D) tanto en SNU5 como en la línea celular EBC-1 de cáncer de pulmón de células no pequeñas (NSCLC), que también presenta el gen Met amplificado y sobreexpresa MET (Lutterbach et al., *Cancer Res.* 67(5):2081-2088, 2007). El medio de crecimiento completo para las células EBC-1 contenían MEM con sales de Earle, suero bovino fetal (FBS) al 10%, penicilina/estreptomicina/glutamina y aminoácidos no esenciales para MEM. H4H14369D mostró el mayor porcentaje de inhibición en la actividad MET de acuerdo con la lectura de SRE-luciferasa. En el presente experimento, se sembraron $3,0 \times 10^3$ células SNU5 o EBC-1 en medios de crecimiento completos en presencia de H4H14639D a concentraciones que oscilaban entre 15 pM y 100 nM. Las células se incubaron durante 3 días a 37 °C en CO₂ al 5%. Las células se fijaron luego en formaldehído al 4% y se tiñeron con 3 µg/mL de Hoechst 33342 para marcar los núcleos. Las imágenes se adquirieron en el IMAGEEXPRESS® Micro XL (Molecular Devices, Sunnyvale, CA) y los recuentos nucleares se determinaron a través del software de análisis de imagen METAXPRESS® (Molecular Devices, Sunnyvale, CA). Los recuentos nucleares de fondo de las células tratadas con digitonina 40 nM se restaron de todos los pocillos y la viabilidad se expresó como un porcentaje de los controles no tratados. Los valores de CI₅₀ se determinaron a partir de una ecuación logística de cuatro parámetros sobre una curva de respuesta de 10 puntos (GRAPHPAD PRISM®). Los valores de CI₅₀ y el porcentaje de destrucción celular se muestran en la Tabla 9.

Tabla 9: Bloqueo de anticuerpos anti-MET del crecimiento de SNU5

Anticuerpo	% de inhibición de crecimiento	CI ₅₀ (M)	Anticuerpo	% de inhibición de crecimiento	CI ₅₀ (M)
H4H13312P2	69	7,8E-10	H4H13291P2	24	ND
H4H13325P2	57	4,4E-11	H4H13319P2	23	1,0E-10
H4H13316P2	53	1,0E-10	H4H13309P2	22	1,0E-10

Anticuerpo	% de inhibición de crecimiento	CI ₅₀ (M)	Anticuerpo	% de inhibición de crecimiento	CI ₅₀ (M)
H4H13302P2	40	1,1E-10	H4H13318P2	18	5,1E-11
H4H13313P2	34	4,4E-11	H4H13300P2	16	ND
H4H13301 P2	33	7,4E-11	H4H13290P2	12	ND
H1H13301P2	33	1,0E-10	H4H13311P2	8	ND
H1H13316P2	30	2,0E-10	H4H13331 P2	5	ND
H4H13295P2	30	ND	H4H13299P2	-8	ND
H4H13306P2	28	7,1E-11			

ND = CI₅₀ no determinado debido a curvas no sigmoideas o bloqueo incompleto

[0257] Como se resume en la Tabla 10, a continuación, el anticuerpo biespecífico MET x MET, H4H14639D, inhibió el crecimiento de células EBC-1 y SNU5 en 37 y 40 por ciento, y con una CI₅₀ de 0,82 nM y 0,3 nM, respectivamente.

Tabla 10: Anticuerpos biespecíficos anti-MET bloquean el crecimiento de EBC-1 y SNU5

mAb	CI ₅₀ (M)		% de inhibición de crecimiento	
	EBC-1	SNU5	EBC-1	SNU5
H4H14639D	0,82	0,30	37	40

[0258] Se trataron células SNU5 (gástricas) en placas de 96 pocillos con un anticuerpo de control, un anticuerpo monovalente MET o un anticuerpo biespecífico MET x MET a 0,1 µg/mL, 1 µg/mL o 10 µg/mL. El crecimiento celular se determinó después de 5 días mediante la reducción del reactivo ALAMARBLUE® (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA). El anticuerpo biespecífico MET x MET redujo significativamente el crecimiento celular relativo de las células SNU5 en comparación con el control y el anticuerpo monovalente (Figura 6, panel A).

[0259] Asimismo, se evaluó el efecto del anticuerpo biespecífico MET x MET sobre el crecimiento de células EBC-1. Se sembraron 2.500 células EBC-1 en una placa de 96 pocillos

y se cultivaron en Medio de Dulbecco suplementado con FBS al 10%. Las células se trataron con un anticuerpo de control o un anticuerpo biespecífico MET x MET a 0,1 g/mL o 1 mg/mL, y se incubaron posteriormente en CO₂ al 5% a 37 °C. Después de 5 días, se determinó el crecimiento celular relativo midiendo la reducción del colorante indicador ALAMARBLUE® a su forma altamente fluorescente en un lector de placas SPECTRAMAX® M3 (Molecular Devices, LLC, Sunnyvale, CA). Los resultados se muestran en la Tabla 11 y la Figura 6, panel B. El anticuerpo biespecífico MET x MET (H4H14639D) redujo significativamente el crecimiento celular relativo de las células EBC-1 en comparación con el anticuerpo de control (Figura 6, panel B).

[0260] Varios anticuerpos anti-MET, tanto monoespecíficos bivalentes como bivalentes MET x MET, son potentes inhibidores de la activación de SRE-Luc e inhiben el crecimiento de líneas celulares con amplificación de MET y sobreexpresión de MET.

Tabla 11: Anticuerpo biespecífico anti-Met bloquea el crecimiento celular de EBC-1

	Crecimiento celular relativo (n=3)	Desviación estandar
Control	1,000	0,045
H4H14639D a 0,1 µg/mL	0,397	0,032
H4H14639D a 1 µg/mL	0,462	0,028

Ejemplo 9. Un anticuerpo biespecífico MET x MET induce una actividad moderada y transitoria de la vía de MET en células NCI-H596 NSCLC

[0261] Se evaluó *in vitro* el efecto de un anticuerpo biespecífico MET x MET sobre la vía de MET en células humanas de carcinoma adenoescamoso de pulmón.

[0262] Se sembraron 250,000 células NCI-H596 en una placa de 12 pocillos y se cultivaron en medio RPMI suplementado con FBS al 10%. Las células se trataron con factor de crecimiento de hepatocitos (HGF) a 50 ng/mL o con el anticuerpo biespecífico MET x MET H4H14639D a 10 µg/mL por duplicado. Las células se incubaron posteriormente en CO₂ al 5% a 37 °C. Después de 0, 2, 6 o 18 horas se prepararon los lisados celulares, se normalizó

el contenido de proteínas y se realizó un análisis de inmunotransferencia. La fosforilación de MET y la fosforilación de ERK se cuantificaron con el programa de procesamiento de imágenes ImageJ (T. Collins, BioTechniques 43: S25-S30, 2007). Los niveles de fosforilación se normalizaron con respecto al control de carga de tubulina y se expresaron como veces de cambio relativos al tratamiento de control. Los resultados se resumen en la Tabla 12.

Tabla 12: Fosforilación de MET y ERK

Tratamiento (horas)	Fosfo-MET (media $\pm$ SD)	Fosfo-ERK (media $\pm$ SD)
Control (hFc) (18)	1,0 $\pm$ 0,5	1,0 $\pm$ 0,3
HGF (2)	202,3 $\pm$ 38,7	16,7 $\pm$ 1,6
HGF (6)	38,9 $\pm$ 4,9	12,4 $\pm$ 3,9
HGF (18)	59,2 $\pm$ 24,4	12,4 $\pm$ 0,9
H4H14639D (2)	69,7 $\pm$ 7,0	2,2 $\pm$ 0,9
H4H14639D (6)	9,9 $\pm$ 7,4	0,3 $\pm$ 0,4
H4H14639D (18)	1,4 $\pm$ 0,1	0,1 $\pm$ 0,1

[0263] El tratamiento con HGF de células NCI-H596 indujo una fuerte activación de MET y ERK que alcanzó su punto máximo a las 2 horas y se mantuvo después de 18 horas. Con el tratamiento con el anticuerpo biespecífico H4H14636D, se detectó una fosforilación moderada de MET y ERK, la que volvió a los niveles basales en 18 o 6 horas, respectivamente.

Ejemplo 10, Un anticuerpo biespecífico MET x MET induce la degradación de MET e inhibe la actividad de la vía de manera más potente que los anticuerpos monoespecíficos en células de cáncer gástrico Hs746T

[0264] Se evaluó el efecto *in vitro* de un anticuerpo biespecífico MET x MET sobre la actividad MET de células de carcinoma gástrico humano. Se sembraron 250,000 células Hs746T de carcinoma gástrico (H. Smith, *J. Nat'l. Cancer Inst.* 62(2): 225-230, 1979) en una placa de 12 pocillos y se cultivaron en medio de Dulbecco modificado suplementado con FBS al 10%. Las células se trataron con (1) 5 μ g/mL de la molécula de control hFc, (2) 5

µg/mL del anticuerpo parental monoespecífico bivalente anti-MET H4H13306P2, (3) 5 µg/mL del anticuerpo parental monoespecífico bivalente anti-MET H4H13312P2, (4) la combinación de 2,5 µg/mL de H4H13306P2 y 2,5 µg/mL de H4H13312P2, o (5) 5 µg/mL del anticuerpo biespecífico MET x MET H4H14639D. Las células se incubaron posteriormente en CO₂ al 5% a 37 °C. Después de 18 horas, se prepararon los lisados celulares, se normalizó el contenido de proteínas y se realizó un análisis de inmunotransferencia. Se cuantificó la expresión de MET, la fosforilación de MET y la fosforilación de ERK usando el programa de procesamiento de imágenes ImageJ (T. Collins, BioTechniques 43: S25-S30, 2007). Los resultados se resumen en la Tabla 13 y la Figura 7, panel A, que representan los datos de inmunotransferencia sin procesar. El panel B de la Figura 7 representa la expresión de la proteína MET en células que fueron tratadas con el anticuerpo biespecífico MET x MET a 10 µg/mL durante 0, 2 o 6 horas. Los niveles totales de MET en las células Hs747T disminuyeron con el tiempo tras el tratamiento con el anticuerpo biespecífico MET x MET. Se obtuvieron resultados similares para la línea celular NCI-H820 de adenocarcinoma papilar humano con amplificación de MET (Bean et al., “MET amplification occurs with or without T790M mutations in EGFR mutant lung tumors with acquired resistance to gefitinib or erlotinib”, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 2007 Dec 26, 104(52): 20932-20937).

Tabla 13: Niveles relativos de la proteína MET y activación de la vía de MET/ERK

Molécula	Nivel relativo de proteína MET (media± SD)	Nivel relativo de Fosfo-MET (media± SD)	Nivel relativo de Fosfo-ERK (media± SD)
Control (hFc)	1,00 ± 0,06	1,00 ± 0,06	1,00 ± 0,03
H4H13306P2	0,61 ± 0,09	0,57 ± 0,02	0,41 ± 0,03
H4H13312P2	1,15 ± 0,19	0,93 ± 0,04	0,39 ± 0,11
H4H13306P2+H4H13312P2	1,06 ± 0,02	1,07 ± 0,10	1,04 ± 0,23
H4H14639D	0,41 ± 0,02	0,20 ± 0,01	0,04 ± 0,01

[0265] El anticuerpo biespecífico, H4H14639D, indujo la degradación de MET de forma más potente que sus anticuerpos convencionales parentales. Tanto la fosforilación de MET como de ERK fueron inhibidas más efectivamente con el tratamiento con H4H14636D que con los anticuerpos parentales o la combinación de los anticuerpos parentales.

[0266] Se trataron células de cáncer gástrico Hs746T con el anticuerpo de control, el anticuerpo biespecífico MET x MET H4H14639D, el anticuerpo parental anti-MET H4H13306P2, el anticuerpo parental anti-MET H4H13312P2, y la combinación de anticuerpos parentales 1 y 2, cada uno de los anticuerpos a 10 µg/mL o la combinación de anticuerpos parentales a 5 µg/mL cada uno, durante 18 horas. La expresión de MET (MET) y la activación de la vía (pMET y pErk) se determinaron mediante inmunotransferencia con los anticuerpos indicados (Figura 8). El anticuerpo biespecífico MET x MET inhibe la activación de la vía de MET más efectivamente que sus anticuerpos parentales en células Hs746T de cáncer gástrico.

Ejemplo 11: Un anticuerpo biespecífico MET x MET induce una degradación de MET de forma más potente que los anticuerpos monoespecíficos en células NCI-H596 de cáncer de pulmón

[0267] Se evaluó el efecto de un anticuerpo biespecífico MET x MET y de los anticuerpos monoespecíficos bivalentes parentales en los niveles de expresión del receptor del factor de crecimiento de hepatocitos (HGFR o MET) en células de carcinoma adenoescamoso de pulmón humano. Se sembraron 250,000 células NCI-H596 de carcinoma adenoescamoso de pulmón humano en una placa de 12 pocillos y se cultivaron en medio RPMI suplementado con FBS al 10%. Las células se trataron con (1) 5 µg/mL de la molécula de control hFc, (2) 5 µg/mL del anticuerpo parental monoespecífico bivalente anti-MET H4H13306P2, (3) 5 µg/mL del anticuerpo parental monoespecífico bivalente anti-MET H4H13312P2, (4) la combinación de 2,5 µg/mL de H4H13306P2 y 2,5 µg/mL de H4H13312P2, o (5) 5 µg/mL del anticuerpo biespecífico MET x MET H4H14639D. Las células se incubaron posteriormente en CO₂ al 5% a 37 °C. Después de 18 horas, se prepararon los lisados celulares, se normalizó el contenido de proteínas y se realizó un análisis de inmunotransferencia. Se cuantificó la expresión de MET con el programa de procesamiento de imágenes ImageJ (T. Collins, BioTechniques 43: S25-S30, 2007). Los resultados se resumen en la Tabla 14.

Tabla 14: Nivel relativo de proteína MET

Molécula	Nivel relativo de MET
Control (hFc)	1 ± 0,03
H4H13306P2	0,50 ± 0,01
H4H13312P2	0,35 ± 0,04
H4H13306P2+H4H13312P2	0,61 ± 0,04
H4H14639D	0,24 ± 0,01

[0268] Las células NCI-H596 de cáncer de pulmón (mutación por omisión del exón 14 de MET) también se trataron con control o anticuerpos biespecíficos MET x MET a 10 µg/mL durante 2, 6 o 18 horas. La expresión de MET se determinó mediante inmunotransferencia (Figura 9), la que muestra la degradación inducida por el anticuerpo biespecífico MET x MET de MET a medida que aumenta el tiempo de tratamiento.

[0269] El anticuerpo biespecífico H4H14636D, induce la degradación de MET más potentemente que sus anticuerpos parentales convencionales en células NCI-H596 de cáncer de pulmón.

Ejemplo 12: Los anticuerpos biespecíficos MET x MET inducen la degradación de MET e inhiben la actividad de la vía de forma más potente que los anticuerpos monoespecíficos en células SNU5 de cáncer gástrico

[0270] Se evaluó el efecto de un anticuerpo monoespecífico bivalente anti-MET y varios anticuerpos biespecíficos MET x MET sobre los niveles de expresión del receptor del factor de crecimiento de hepatocitos (HGFR o MET) en células de carcinoma gástrico. Las células SNU5 del carcinoma gástrico humano fueron sembradas en medio de Iscove que contenía 20% de FBS más pen-estrep-glutamina. 24 horas después de la siembra, las células se trataron con hFc de control, el anticuerpo parental monoespecífico bivalente anti-MET H4H13312P2, o los anticuerpos biespecíficos MET x MET (H4H14634D, H4H14635D, H4H14636D, H4H14637D, H4H14638D, H4H14639D, H4H14640D, H4H14641D) durante 18 horas. Luego se prepararon los lisados celulares y se analizaron por transferencia Western. Se sondaron las inmunotransferencias para detectar MET y tubulina. El nivel de

expresión de la proteína MET se cuantificó y normalizó en relación con el control de carga de tubulina. Los resultados se presentan en la Tabla 15 y en la Figura 10, panel B.

Tabla 15: Nivel relativo de proteína MET

Molécula	Nivel relativo de MET	Molécula	Nivel relativo de MET
Control (hFc)	1	H4H14637D	0,49
H4H13312P2	0,62	H4H14638D	0,35
H4H14634D	0,45	H4H14639D	0,27
H4H14635D	0,27	H4H14640D	0,18
H4H14636D	0,50	H4H14641D	0,31

[0271] Las células cancerosas SNU5 se trataron con un anticuerpo de control o un anticuerpo biespecífico MET x MET o un anticuerpo monovalente MET a 10 µg/mL durante 18 horas como se describió anteriormente. La expresión de MET (Figura 10, paneles A y B) y la activación de la vía (es decir, pMET y pERK; panel A) se determinaron mediante inmunotransferencia con los anticuerpos indicados. Las inmunotransferencias se muestran en la Figura 10,

[0272] El tratamiento de células SNU5 con anticuerpos biespecíficos MET x MET indujo una degradación más potente de MET que el tratamiento con el anticuerpo monoespecífico bivalente anti-MET (H4H13312P2) (Figura 10, panel B), anticuerpo monovalente MET o control hFc. El tratamiento de las células SNU5 con el anticuerpo biespecífico MET x MET inhibió los efectores aguas abajo de la vía MET. Se obtuvieron resultados similares para la línea celular NCI-H1993 de adenocarcinoma de cáncer de pulmón de células no pequeñas con amplificación de MET (Kubo *et al.*, “MET gene amplification or EGFR mutation activate MET in lung cancers untreated with EGFR tyrosine kinase inhibitors”, *Int. J. Cancer* 15 abril de 2009; 124(8): 1778-1784).

Ejemplo 13. Un anticuerpo biespecífico MET x MET induce la degradación de MET, inhibe la actividad de la vía e inhibe el crecimiento del tumor de forma más potente que los anticuerpos monoespecíficos en células EBC-1

[0273] Células EBC-1 de carcinoma de células escamosas de pulmón humano con amplificación de MET (Lutterbach *et al.*, “Lung cancer cell lines harboring MET gene amplification are dependent on Met for growth and survival”, *Cancer Res.* 1 Mar 2007; 67(5):2081-8) se trataron con un anticuerpo de control o 10 µg/mL de un anticuerpo biespecífico MET x MET durante 18 horas como se describió anteriormente. La expresión de MET y la activación de la vía de MET verificada mediante la expresión de pMET y pErk se determinaron mediante inmunotransferencia con los anticuerpos indicados. Las inmunotransferencias se muestran en la Figura 11.

[0274] El tratamiento de las células EBC-1, que albergan la amplificación del gen MET, con anticuerpos biespecíficos MET x MET indujo una degradación más potente de MET que el tratamiento con el anticuerpo de control. El tratamiento de las células EBC-1 con el anticuerpo biespecífico MET x MET inhibió los efectores aguas abajo de la vía de MET.

[0275] En otro experimento, se implantaron por vía subcutánea 5 millones de células EBC-1 en el flanco de ratones CB17 SCID. Una vez que los volúmenes de los tumores alcanzaron alrededor de 150 mm³, los ratones fueron distribuidos aleatoriamente en grupos de 6 y se trataron dos veces a la semana con un anticuerpo de control a 25 mg/kg o el anticuerpo biespecífico MET x MET H4H14639D a 25 mg/kg. El crecimiento del tumor se controló durante 30 días después de la implantación y se midió el volumen del tumor (mm³) en cada grupo experimental a lo largo del tiempo. Los resultados se muestran en la Tabla 16 y la Figura 12, que muestra que el anticuerpo biespecífico MET x MET inhibe significativamente el crecimiento de los tumores EBC-1.

Tabla 16: Crecimientos relativos de tumores EBC-1

Tratamiento	Crecimiento del tumor (mm ³) desde el inicio del tratamiento (media ± SEM)
Control a 25 mg/kg	1394 ± 226
H4H14639D a 25 mg/kg	89 ± 47

Ejemplo 14. Un anticuerpo biespecífico MET x MET inhibe el crecimiento *in vitro* de células Hs746T de cáncer gástrico de forma más potente que los anticuerpos monoespecíficos

[0276] Se evaluó *in vitro* el efecto de un anticuerpo biespecífico MET x MET sobre el crecimiento de células de carcinoma gástrico humano. Se sembraron 2.500 células Hs746T de carcinoma gástrico (H. Smith, J. Nat'l. Cancer Inst. 62(2): 225-230, 1979) en una placa de 96 pocillos y se cultivaron en medio de Dulbecco modificado suplementado con FBS al 10%. Las células se trataron con (1) anticuerpos monoespecíficos bivalentes anti-MET individuales (H4H13306P2 o H4H13312P2) a 5 µg/mL, (2) una combinación de los dos anticuerpos parentales monoespecíficos bivalentes anti-MET (H4H13306P2 y H4H13312P2) a 2,5 µg/mL cada uno, o (3) el anticuerpo biespecífico que contiene un brazo de unión de H4H13306P2 y el otro brazo de unión de H4H13312P2 (H4H14639D) a 5 µg/mL. Las células se incubaron posteriormente en CO₂ al 5% a 37 °C. Después de 5 días, se determinó el crecimiento celular relativo midiendo la reducción del colorante indicador, ALAMAR BLUE® (ThermoFischer Scientific, Waltham, MA), a su forma altamente fluorescente en un lector de placas SPECTRAMAX® M3 (Molecular Devices, Sunnyvale, CA). El aumento de la fluorescencia se correlaciona con el crecimiento celular. En la Tabla 17 se representa el crecimiento relativo de las células Hs746T en cada tratamiento con anticuerpos, normalizado con respecto al crecimiento de células Hs746T control (sin tratamiento). El anticuerpo biespecífico H4H14639D inhibe la proliferación de las células Hs746T de forma más potente que sus anticuerpos monoespecíficos parentales, individualmente o en combinación.

Tabla 17: Crecimiento normalizado de células Hs746T

	Crecimiento celular relativo (n=3)	Desviación estándar
Control	1	0,133497801
H4H14639D	0,647408139	0,019090432
H4H13306P2	1,623312821	0,189647479
H4H13312P2	0,852680493	0,01728527
H4H13306P2+H4H13312P2	1,767720125	0,077445717

[0277] Las células Hs746T de cáncer gástrico se trataron con el anticuerpo de control, el anticuerpo biespecífico MET x MET H4H14639D, el anticuerpo parental anti-MET H4H13306P2, el anticuerpo parental anti-MET H4H13312P2, y la combinación de los anticuerpos parentales 1 y 2, cada anticuerpo a 2 µg/mL. El crecimiento celular se determinó después de 5 días mediante la reducción del reactivo ALAMAR BLUE® (Figura 13, panel A). El anticuerpo biespecífico MET x MET inhibió el crecimiento celular con respecto a los anticuerpos parentales solos o combinados e inhibió la activación de la vía de MET más efectivamente que sus anticuerpos parentales en células Hs746T de cáncer gástrico.

[0278] Las células Hs746T de cáncer gástrico se trataron en placas de 96 pocillos con anticuerpo de control a 25 µg/mL, anticuerpo monovalente MET a 1 µg/mL, 10 µg/mL o 25 µg/mL, o anticuerpo biespecífico MET x MET a 1 µg/mL, 10 µg/mL o 25 µg/mL. El crecimiento celular del cáncer gástrico Hs746T se determinó después de 5 días mediante la reducción del reactivo ALAMARBLUE® (Figura 13, panel B). El anticuerpo biespecífico MET x MET inhibe potentemente el crecimiento de las células con amplificación de MET.

Ejemplo 15. Un anticuerpo biespecífico MET x MET no induce el crecimiento de células NCI-H596 de cáncer de pulmón *in vitro*

[0279] Se evaluó *in vitro* el efecto de un anticuerpo biespecífico MET x MET sobre el crecimiento de células humanas de cáncer de pulmón de células no pequeñas (NSCLC) (NCI-H596). Se sembraron 10,000 células NCI-H596 de carcinoma adenoescamoso de pulmón (Nair et al., *J. Nat'l. Cancer Inst.* 86(5): 378-383, 1994) en placas de 96 pocillos en una capa de agar al 0,66% en medio suplementado con suero bovino fetal al 1% (FBS). Las células se cultivaron en medio RPMI 1640 suplementado con FBS al 1% con agarosa al 0,3%. Las células se trataron con (1) anticuerpos parentales monoespecíficos anti-MET individuales (H4H13306P2 o H4H13312P2) a 5 µg/mL, (2) una combinación de los dos anticuerpos parentales monoespecíficos bivalentes anti-MET (H4H13306P2 y H4H13312P2) a 2,5 µg/mL cada uno, (3) un anticuerpo biespecífico que contiene un brazo de unión de H4H13306P2 y el otro brazo de unión de H4H13312P2 (H4H14639D) a 5 µg/mL, o (4) 100 ng/ml de factor de crecimiento de hepatocitos (HGF). Las células se incubaron posteriormente en CO₂ al 5% a 37 °C. Después de dos semanas, se determinó el crecimiento celular relativo midiendo la reducción del colorante indicador, ALAMAR BLUE® (Thermo

Fischer Scientific, Waltham, MA), a su forma altamente fluorescente en un lector de placas SPECTRAMAX® M3 (Molecular Devices, Sunnyvale, CA). El aumento de la fluorescencia se correlaciona con el crecimiento celular. La Tabla 18 y la Figura 14 representan el crecimiento relativo de células NCI-H596 en cada tratamiento con anticuerpos, normalizado con respecto al crecimiento de células NCI-H596 de control (sin tratamiento). El tratamiento de células NCI-H596 de cáncer de pulmón con HGF dio como resultado una potente inducción del crecimiento en agar blando. El anticuerpo biespecífico MET x MET H4H14639D (MM en la Figura 14) no alteró significativamente el crecimiento en relación con las células tratadas con control. Se observó una inducción moderada del crecimiento celular con cada anticuerpo parental monoespecífico bivalente H4H13306P2 (M1) o H4H13312P2 (M2) individualmente, o combinados (H4H13306P2 y H4H13312P2) (M1 M2).

Tabla 18: Crecimiento normalizado de células NCI-H596

	Crecimiento celular relativo (n=3)	Desviación estándar
Control	1	0,030074808
H4H14639D	1,070339237	0,075103746
H4H13306P2	2,9593578	0,337877264
H4H13312P2	1,686580346	0,145670753
H4H13306P2+H4H13312P2	1,693724668	0,168651046
HGF	7,87655937	0,46057617

Ejemplo 16. Un anticuerpo biespecífico MET x MET inhibe el crecimiento *in vitro* de células SNU5 de cáncer gástrico de forma más potente que los anticuerpos monoespecíficos

[0280] Se evaluó *in vitro* el efecto de un anticuerpo biespecífico MET x MET sobre el crecimiento de células de carcinoma gástrico humano. Se sembraron 2.500 células SNU5 de carcinoma gástrico humano (Ku y Park, *Cancer Res. Treat.* 37 (1): 1-19, 2005) en una placa de 96 pocillos y se cultivaron en medio de Dulbecco modificado por Iscove suplementado con 20% de FBS. Las células se trataron con (1) anticuerpos monoespecíficos bivalentes anti-

MET individuales (H4H13306P2 o H4H13312P2) a 5 µg/mL, (2) una combinación de los dos anticuerpos monoespecíficos bivalentes anti-MET (H4H13306P2 y H4H13312P2) a 2,5 µg/mL cada uno, o (3) un anticuerpo biespecífico que contiene un brazo de unión de H4H13306P2 y el otro brazo de unión de H4H13312P2 (H4H14639D) a 5 µg/mL. Las células se incubaron posteriormente en CO₂ al 5% a 37 °C. Después de 5 días, se determinó el crecimiento celular relativo midiendo la reducción del colorante indicador, ALAMAR BLUE® (Thermo Fischer Scientific, Waltham, MA), a su forma altamente fluorescente en un lector de placas SPECTRAMAX® M3 (Molecular Devices, Sunnyvale, CA). El aumento de la fluorescencia se correlaciona con el crecimiento celular. La Tabla 19 representa el crecimiento relativo de células SNU5 normalizado con respecto al crecimiento de células SNU5 de control (sin tratamiento) en cada tratamiento de anticuerpos. El anticuerpo biespecífico, H4H14639D, inhibe la proliferación de células SNU5 de forma más potente que sus anticuerpos parentales monoespecíficos.

Tabla 19: Crecimiento normalizado de células SNU5

	Crecimiento celular relativo (n=3)	Desviación estándar
Control	1	0,070814765
H4H14639D	0,271100069	0,01324024
H4H13306P2	0,766317547	0,061930288
H4H13312P2	0,431990234	0,033183065
H4H13306P2+H4H13312P2	0,331287005	0,012042949

Ejemplo 17. Un anticuerpo biespecífico MET x MET induce regresión de xenoinjertos de tumor Hs746T

[0281] Se evaluó el efecto de un anticuerpo biespecífico MET x MET sobre un tumor de carcinoma gástrico humano en un modelo de ratón inmunocomprometido. Tres millones de células Hs746T de carcinoma gástrico humano se implantaron por vía subcutánea en el flanco de ratones CB-17 SCID (Bancroft et al., *J. Immunol.* 137(1): 4-9, 1986). Una vez que los volúmenes de los tumores alcanzaron alrededor de 200 mm³, los ratones fueron distribuidos aleatoriamente en grupos de seis y se trataron dos veces por semana con un anticuerpo de

control a 25 mg/kg o con un anticuerpo biespecífico MET x MET (H4H14639D) a 25 mg/kg. El crecimiento del tumor se monitorizó durante 16 días después de la implantación en el grupo de control, cuando los tumores tratados con control alcanzaron los límites de tamaño del protocolo. El crecimiento del tumor se monitorizó durante 30 días después de la implantación en el grupo tratado con H4H14639.

[0282] El tratamiento de tumores con el anticuerpo biespecífico MET x MET indujo la regresión del tamaño del tumor durante 21 días en relación con el inicio del tratamiento. Los tumores tratados con control mostraron un aumento medio en el volumen de alrededor de 12 veces en 16 días de crecimiento (Tabla 20). En la Figura 15 se muestra el volumen del tumor a lo largo del tiempo, que muestra la regresión del tumor Hs746T debido al anticuerpo biespecífico MET x MET.

Tabla 20: Crecimiento del tumor gástrico Hs746T

Anticuerpo (mg/kg)	Crecimiento del tumor (mm³) desde el inicio del tratamiento (media $\pm$ SEM)
Control (10)	1164 $\pm$ 138
H4H14639D (25)	-215 $\pm$ 8,3

Ejemplo 18. Un anticuerpo biespecífico MET x MET induce la regresión de xenoinjertos de tumor SNU5

[0283] Se evaluó el efecto de un anticuerpo biespecífico MET x MET sobre un tumor de carcinoma gástrico humano en un modelo de ratón inmunocomprometido. Diez millones de células SNU5 de carcinoma gástrico humano se implantaron por vía subcutánea en el flanco de ratones CB-17 SCID. Una vez que los volúmenes del tumor alcanzaron alrededor de 500 mm³, los ratones se asignaron al azar a grupos de cinco y se trataron dos veces por semana con un anticuerpo de control a 10 mg/kg o con un anticuerpo biespecífico MET x MET (H4H14639D) a 1 mg/kg o 10 mg/kg. El crecimiento del tumor se monitorizó durante 81 días después de la implantación, cuando los tumores tratados con control alcanzaron los límites de tamaño del protocolo.

[0284] Los tumores de ratones tratados con 1 mg/kg o 10 mg/kg del anticuerpo MET x MET demostraron una reducción media en el tamaño de alrededor del 95% o el 98%, respectivamente. Los tumores tratados con control mostraron un aumento medio en el volumen de alrededor de 12 veces desde el inicio del tratamiento (Tabla 21).

Tabla 21: Crecimiento del tumor gástrico SNU5

Anticuerpo (mg/kg)	Crecimiento del tumor (mm ³) desde el inicio del tratamiento (media $\pm$ SEM)
Control (10)	1123 $\pm$ 194
H4H14639D (1)	-477 $\pm$ 43
H4H14639D (10)	-492 $\pm$ 18

[0285] Los tumores SNU5 implantados por vía subcutánea se trataron dos veces por semana con el anticuerpo de control, el anticuerpo monovalente MET a 1 mg/kg o 10 mg/kg, o el anticuerpo biespecífico MET x MET a 1 mg/kg o 10 mg/kg. Se observó una regresión potente y sostenida de los tumores SNU5 con amplificación de MET (es decir, reducción en el volumen del tumor) a lo largo del tiempo en los ratones tratados con el anticuerpo biespecífico MET x MET (Figura 16, panel A). La proteína se extrajo de los tumores al final del estudio y se determinó la expresión de MET y la activación de la vía indicada mediante la fosforilación de MET (expresión de pMET) por inmunotransferencia. Los ratones (tumores) tratados con MET x MET mostraron una reducción en la expresión de MET y pMET en relación con los controles (Figura 16, panel B). El anticuerpo biespecífico MET x MET es un potente inhibidor de los tumores que albergan MET amplificado.

Ejemplo 19. Un anticuerpo biespecífico MET x MET induce la regresión de xenoinjertos de tumor U87-MG

[0286] Se evaluó el efecto de un anticuerpo biespecífico MET x MET sobre un tumor de glioblastoma humano en un modelo de ratón inmunocomprometido. Cinco millones de células U87-MG de glioblastoma humano (Vordermark y Brown, *Int. J. Radiation Biol.* 56 (4): 1184-1193, 2003) se implantaron por vía subcutánea en el flanco de ratones CB-17 SCID. Los modelos de xenoinjerto de glioblastoma U87-MG son impulsados por la

señalización autocrina de HGF. Una vez que los volúmenes de los tumores alcanzaron alrededor de 100 mm^3 , los ratones fueron distribuidos aleatoriamente en grupos de seis y se trataron con un anticuerpo de control o el anticuerpo biespecífico MET x MET (H4H14639D). Se administraron 25 mg/kg de anticuerpo (control o MET x MET) a cada ratón dos veces por semana. El crecimiento del tumor se monitorizó durante 29 días después de la implantación, cuando los tumores tratados con control alcanzaron los límites de tamaño del protocolo.

[0287] Los tumores de ratones tratados con el anticuerpo MET x MET demostraron una reducción media en el tamaño de alrededor del 38%, mientras que los tumores tratados con control mostraron un aumento medio en el volumen de alrededor de 19 veces durante los 29 días de crecimiento (Tabla 22). En la figura 17 se muestra el volumen del tumor a lo largo del tiempo, que muestra una regresión del tumor U87-MG debido al anticuerpo biespecífico MET x MET.

Tabla 22: Crecimiento del tumor de glioblastoma

Anticuerpo (mg/kg)	Crecimiento del tumor (mm^3) desde el inicio del tratamiento (media $\pm$ SEM)
Control (25)	1777 ± 98
H4H14639D (25)	-38 ± 18

Ejemplo 20. Un anticuerpo biespecífico MET x MET inhibe el crecimiento de xenoinjertos de tumor U118-MG

[0288] Se evaluó el efecto de un anticuerpo biespecífico MET x MET sobre un tumor de glioblastoma humano en un modelo de ratón inmunocomprometido. Los modelos de xenoinjerto de glioblastoma U118-MG son impulsados por señalización autocrina de HGF. Cinco millones de células U118-MG de glioblastoma humano (Olopade et al., *Cancer Research* 52: 2523-2529, 1992) se implantaron por vía subcutánea en el flanco de ratones CB-17 SCID. Una vez que los volúmenes de los tumores alcanzaron alrededor de 100 mm^3 , los ratones fueron distribuidos aleatoriamente en grupos de seis y se trataron con un

anticuerpo de control o el anticuerpo biespecífico MET x MET (H4H14639D). Se administró 25 mg/kg de anticuerpo (control o MET x MET) a cada ratón dos veces por semana. El crecimiento del tumor se monitorizó durante 72 días después de la implantación.

[0289] El anticuerpo MET inhibió el crecimiento tumoral en un 99% durante el período de 72 días (Tabla 23).

Tabla 23: Crecimiento del tumor de glioblastoma

Anticuerpo (mg/kg)	Crecimiento del tumor (mm ³) desde el inicio del tratamiento (media $\pm$ SEM)	% de disminución del el crecimiento del tumor versus control
Control (25)	1228 $\pm$ 123	-
H4H 14639D (25)	11 $\pm$ 18	99,1

[0290] En otro experimento, los tumores de glioblastoma U118-MG implantados por vía subcutánea en ratones se trataron dos veces a la semana con 25 mg/kg de anticuerpo de control, anticuerpo monovalente MET o anticuerpo biespecífico MET x MET. Se midió el volumen del tumor (mm³) en cada grupo experimental a lo largo del tiempo. Los resultados se muestran en la Figura 18, que muestra que el anticuerpo biespecífico MET x MET inhibe el crecimiento de los tumores U118-MG.

Ejemplo 21: Síntesis de maitansinoide

[0291] Se sintetizó a maitansin-3-N-metil-L-alanina-N-Me-beta-alanina-carbamilo(p-amino)bencil-citrulina-valina-adipoil-succinato (Compuesto **1** en la Figura 20) partir de un compuesto **2** (Figura 19) como se describe a continuación.

[0292] Maitansin-3-N-metil-L-alanina-Fmoc-N-Me-beta-alanina (Compuesto **3, Figura 19).** Se pesó Des-acetil-maitansina (Compuesto **2**, Figura 19, 0,433 g, 0,666 mmol), Fmoc-N-Me-beta-Ala (0,434 g, 1,33 mmol) y HATU (0,757 g, 1,99 mmol) en un matraz seco, se disolvió en DMF anhidro (9 mL) y se trató con 4-metilmorfolina (0,300 mL, 2,73 mmol). El matraz se selló con un septo de goma, se purgó con argón y la reacción se agitó a temperatura ambiente. Después de 3 días, la mezcla se evaporó a un aceite, se disolvió en acetonitrilo y agua, y se purificó por cromatografía ultrarrápida en una columna de sílice C18

de 275 g (30-90% de acetonitrilo en agua durante 20 minutos, ácido acético al 0,05% en ambas fases). La liofilización de las fracciones del producto dio el compuesto del título como un sólido blanco. El producto en bruto se purificó en una columna de 80 g de gel de sílice (AcOEt - 5:5:1 AcOEt: DCM: MeOH durante 17 min). Las fracciones puras se combinaron, se evaporaron, y se secó al vacío durante la noche dando el compuesto del título en forma de un sólido blanco (0,424 g, 66%). MS (ESI, pos.): calculado para $C_{51}H_{61}ClN_4O_{12}$, 956,4; encontrado 956,9 (M+H), 979,0 (M+Na), 939,0 (M-H₂O+H).

[0293] Éster succinato de N-terc-butoxicarbonil-N-metil-beta-alanina (Compuesto 4, Figura 19). El compuesto del título se preparó a partir de Boc-N-Me-beta-Ala-OH comercial mediante un método bien conocido en la técnica (véase Widdison *et al.*, *J. Med. Chem.*, 2006, 49 (14), 4401). ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃): δ 3,62 (bm, 2H), 2,88 (m, 9H), 1,47 (s, 9H).

[0294] Maitansin-3-N-metil-L-alanina-Boc-N-Me-beta-alanina (Compuesto 5, Figura 19). Método A: el producto de la etapa anterior (Compuesto 4, Figura 19, 0,453 g, 1,51 mmol) y des-acetil-maitansina (Compuesto 2, Figura 19, 0,304 g, 0,468 mmol) se disolvieron en acetonitrilo/agua a 3:1 (8 mL), se trató con NaHCO₃ acuoso 1 M (0,5 mL), y se agitó a temperatura ambiente durante 18 horas. Cuando se completó la reacción según lo determinado por TLC, se procedió a agitar con salmuera durante 10 minutos y se extrajo tres veces con acetato de etilo (AcOEt). Las capas orgánicas combinadas se secaron luego sobre Na₂SO₄, se filtró y el filtrado se concentró y secó al vacío hasta obtener un jarabe de color oro que se purificó por cromatografía ultrarrápida en un cartucho de gel de sílice de 20 g (MeOH al 0-10% en AcOEt durante 15 minutos), lo que dio el compuesto del título en forma de un sólido blanco (0,084 g, 43%). MS (ESI, pos.): calculado para $C_{41}H_{59}ClN_4O_{12}$ 834,4; encontrado 835,2 (M + H), 857,2 (M + Na), 817,4 (M-H₂O + H).

[0295] Método B: Se disolvió Boc-N-Me-beta-Ala-OH (0,294 g, 1,45 mmol) en DMF anhidro (5 ml), se trató con difenilfosfinato de pentafluorofenilo (FDPP, 0,555 g, 1,44 mmol), y la reacción se agitó a temperatura ambiente durante 30 min. La mezcla se transfirió luego a un matraz más grande que contenía una mezcla de des-acetil-maitansina (Compuesto 2, Figura 19, 0,462 g, 0,711 mmol) y diisopropiletilamina (DIEA, 0,250 ml, 1,44 mmol) en DMF anhidro (7 mL), el matraz se selló con un septo de goma, se purgó con argón y la reacción se agitó nuevamente a temperatura ambiente. Después de 24 horas, la reacción se concentró al

vacío hasta obtener un aceite, se disolvió en acetato de etilo (AcOEt, 2 mL) y se purificó en un cartucho de gel de sílice de 40 g (AcOEt - 5:5:1 AcOEt/DCM/MeOH durante 15 min), dando el compuesto del título en forma de un sólido amarillo pálido (0,468 g, 79%). MS (ESI, pos.): calculado para $C_{41}H_{59}ClN_4O_{12}$, 834,4; encontrado 857,2 (M + Na), 817,2 (M-H₂O + H).

[0296] Maitansin-3-N-metil-L-alanina-N-Me-beta-alanina (Compuesto 6, Figura 19).

Método A: Se disolvió maitansin-N-Me-L-Ala-Boc-N-Me-beta-Ala (Compuesto 5, Figura 19, 0,464 g, 0,555 mmol) en una mezcla 3:1:1 de acetonitrilo/agua/ácido trifluoroacético (7 mL), el matraz se selló con un septo de goma, se purgó con argón y la reacción se agitó a temperatura ambiente durante 24 horas, luego se tapó y se almacenó a -20 °C durante 3 días. La mezcla de reacción cruda se calentó a temperatura ambiente durante 2 horas, se concentró brevemente al vacío, se purificó en una columna C18 RediSep Gold de 100g (20-80% de acetonitrilo en agua durante 25 minutos, 0,1% de TFA en ambos solventes) y las fracciones puras combinadas se evaporaron parcialmente a temperatura ambiente. Se congelaron en un baño de hielo seco y se liofilizaron para dar el compuesto del título en forma de un sólido amarillo pálido (0,295 g, 63%). MS (ESI, pos.): calculado para $C_{36}H_{51}ClN_4O_{10}$, 734,3; encontrado 735,7 (M + H), 1471,3 (2M + H).

Método B: Se disolvió maitansin-N-Me-L-Ala-Fmoc-beta-Ala (Compuesto 3, Figura 19, 0,422 g, 0,441 mmol) en piperidina al 5% en DMF (6,00 mL, 3,04 mmol), el matraz de reacción se selló con un septo de goma, se purgó con argón y la mezcla se agitó a temperatura ambiente. Después de 3 horas, la reacción se completó mediante LCMS, luego se concentró al vacío, se selló y se almacenó a -20 °C durante la noche. El producto crudo se calentó a temperatura ambiente, se trató con acetonitrilo y ácido acético acuosos al 10% (3 mL cada uno), y se purificó por cromatografía ultrarrápida en una columna de sílice C18 de 275 g (10-90% de acetonitrilo en agua durante 20 minutos, ácido acético al 0,05% en ambos solventes). La liofilización de las fracciones del producto dio el compuesto del título como un sólido blanco. El sólido se trituró tres veces con dietil éter seco, se filtró, los sólidos se lavaron para separarlos del filtro con DCM, y el filtrado se evaporó y se secó al vacío, dando el compuesto del título en forma de un sólido blanco (0,311 g, 89%). MS (ESI, pos.): calculado para $C_{36}H_{51}ClN_4O_{10} + O$, 734,3; encontrado 735,0 (M + H).

[0298] Maitansin-3-N-methyl-L-alanina-N-Me-beta-alanina-carbamil-(p-amino)bencil-citrulina-valina-Fmoc (Compuesto 7, Figura 20). *Paso 7:* El producto del paso anterior (Compuesto 6, Figura 19, 0,310 g, 0,390 mmol) junto con 1-hidroxi-7-azabenzotriazol (HOAT, 0,164 g, 1,20 mmol), bicarbonato de sodio (0,138 g, 1,64 mmol), y Fmoc-valina-citrulina-(p-amino)bencil-(p-nitrofenil)carbonato (0,595 g, 0,776 mmol, preparado por un método conocido en la técnica, véase Gangwar et al., Patente de EE.UU. 7,714,016 B2) se disolvieron en DMF anhidro (10 ml), el matraz de reacción se selló con un septo de goma, se purgó con argón y la mezcla se agitó a temperatura ambiente. Después de 24 horas, la reacción se evaporó parcialmente al vacío hasta aprox. 2-3 mL, se trató con ácido acético acuoso al 10% y agua (aprox. 1 mL cada uno), se disolvió en acetonitrilo (aprox. 6 mL) y se purificó por cromatografía ultrarrápida en una columna de sílice C18 de 275 g (30-90% de acetonitrilo en agua durante 20 min, 0°C, ácido acético al 0,05% en ambos solventes). La evaporación parcial, congelación y liofilización dio el compuesto del título en forma de un sólido blanco (0,362 g, 68%). MS (ESI, pos.): calculado para $C_{70}H_{88}ClN_9O_{17}$, 1361,6; encontrado 1362,1 (M + H), 1384,1 (M + Na), 1344,1 (M-H₂O + H).

[0299] Paso 2: el producto de la etapa anterior (0,360 g, 0,264 mmol) se disolvió en piperidina al 5% en DMF (7 ml), el matraz de reacción se selló con un septo de goma, se purgó con argón y la mezcla se agitó a temperatura ambiente. Después de 3 horas, la reacción se evaporó al vacío, el residuo se trató con ácido acético acuoso al 10% (2 mL), se disolvió en acetonitrilo (4 ml) y se purificó por cromatografía ultrarrápida en una columna de sílice C18 de 275 g (10-70% de acetonitrilo en agua durante 20 minutos, ácido acético al 0,05% en ambos solventes). Las fracciones puras se combinaron, se almacenaron a -20 °C durante la noche, se evaporaron parcialmente al vacío a 25-30 °C, se congelaron en hielo seco y se liofilizaron durante 6 días dando el compuesto del título en forma de un sólido amarillo pálido (0,303 g, 95%). MS (ESI, pos.): calculado para $C_{15}H_7ClN_9O_{15}$, 1139,5; encontrado 1140,1 (M + H), 1162,0 (M + Na).

[0300] Ácido maitansin-3-N-metil-L-alanina-N-Me-beta-alanina-carbamil-(p-amino)bencil-citrulina-valina-adípico (Compuesto 8, Figura 20). El producto del paso anterior (Compuesto 7, Figura 20, 0,205 g, 0,171 mmol), ácido adípico (0,258 g, 1,77 mmol) y 2-etoxi-1-etoxicarbonil-1,2-dihidroquinolina (EEDQ, 0,215 g, 0,869 mmol) se disolvieron

en DCM seco (10 ml) y metanol anhidro (5 ml), el matraz de reacción se selló con un septo de goma, se purgó con argón y la mezcla se agitó a temperatura ambiente. Después de 21 horas, la reacción se evaporó al vacío, el residuo se disolvió en unos pocos mililitros de acetonitrilo/agua y se purificó por cromatografía ultrarrápida en una columna de sílice C18 de 150 g (20-80% de acetonitrilo en agua durante 17 minutos, ácido acético al 0,05% en agua en ambos solventes). La evaporación parcial, congelación, y liofilización de las fracciones puras durante 18 horas dio el compuesto del título como un sólido blanco (0,140 g, 65%). MS (ESI, pos.): calculado para $C_{61}H_{86}ClN_9O_{18}$, 1267,6; encontrado 1268,9 (M + H), 1290,9 (M + Na).

[0301] Maitansin-3-N-metil-L-alanina-N-Me-beta-alanina-carbamilo-(p-amino)bencil-citrulina-valina-adipoil-succinato (Compuesto 1, Figura 20). El producto del paso anterior (Compuesto 8, Figura 20, 0,061 g, 0,048 mmol), N-hidroxisuccinimida (0,063 g, 0,55 mmol) y clorhidrato de N-(3-Dimetilaminopropil)-N'-etilcarbodiimida (EDC-HCl, 0,071 g, 0,37 mmol) se disolvieron en DCM seco (7 mL), el matraz de reacción se selló con un septo de goma, se purgó con argón y la mezcla se agitó a temperatura ambiente. Después de 5 días, la reacción se evaporó al vacío, el residuo se disolvió en unos pocos mililitros de acetonitrilo/agua y se purificó por cromatografía ultrarrápida en una columna de sílice C18 de 100 g (30-90% de acetonitrilo en agua durante 15 minutos, ácido acético al 0,05% en agua en ambos solventes). La evaporación parcial, congelación y liofilización de las fracciones de producto más limpias durante 18 horas produjo el compuesto del título en forma de un sólido blanco (0,044 g, 67%). MS (ESI, pos.): calculado para $C_{65}H_{89}ClN_{10}O_{20}$, 1364,6; encontrado 1365,7 (M + H), 1387,7 (M + Na), 1347,7 (MH₂O + H). ¹H-RMN (500 MHz; CDCl₃): δ 7,56 (d; J = 8,3 Hz; 2H); 7,20 (d; J = 8,7 Hz; 1 H); 6,80 (s; 1 H); 6,71 (m; 1 H); 6,62 (d; J = 10,0 Hz; 1 H); 6,39 (dd; J = 15,1; 11,3 Hz; 1 H); 5,68 (dd; J = 15,3; 9,1 Hz; 1 H); 5,38-5,32 (m; 1 H); 5,03 (t; J = 15,1 Hz; 1 H); 4,88 (d; J = 12,3 Hz; 1 H); 4,73 (d; J = 11,3 Hz; 1 H); 4,61 (dd; J = 9,1; 3,6 Hz; 1 H); 4,26 (d; J = 7,0 Hz; 1 H); 4,17 (t; J = 7,1 Hz; 1 H); 3,95 (s; 3H); 3,61 (d; J = 11,7 Hz; 1 H); 3,57 (d; J = 12,4 Hz; 1 H); 3,46 (d; J = 9,1 Hz; 2H); 3,33 (s; 3H); 3,27 (t; J = 6,9 Hz; 1 H); 3,17-3,07 (m; 5H); 2,97 (dd; J = 16,6; 9,9 Hz; 1H); 2,88 (d; J = 11,7 Hz; 3H); 2,84 (s; 4H); 2,77 (s; 2H); 2,66 (s; 2H); 2,62 (t; J = 4,8 Hz; 2H); 2,56 (d; J = 13,1 Hz; 1H); 2,32 (t; J = 6,6 Hz; 2H); 2,15 (d; J = 14,0 Hz; 1 H); 2,10

(q; J = 6,8 Hz; 1H); 1,92 (s; 4H); 1,75 (m; 5H); 1,61 (s; 3H); 1,52 (s; 3H); 1,27 (d; J = 6;3 Hz;3H); 1,22 (dt; J = 12,7; 6,3 Hz; 6H); 0,95 (t; J = 5,9 Hz; 7H); 0,78 (s; 3H).

[0302] DM1 se sintetizó como un solo diastereómero en base a los procedimientos descritos en WO 2015/031396 (por ejemplo, Ejemplo 2, párrafo [00106]), incorporado aquí por referencia en su totalidad.

Ejemplo 22. Conjugación de anticuerpos y caracterización de conjugados.

[0303] Conjugación de Anticuerpos

[0304] Los anticuerpos (H4H14639D, H4H13312P, H4H14635D y control de isotipo; 10-20 mg/ml) en HEPES 50 mM, NaCl 150 mM, pH 8,0 y DMA al 10-15% (v/v) se conjugaron con un exceso de 5-6 veces el diastereómero SMCC-DM1 preparado como se describe en el Ejemplo 21, (Maitansinoide A) o maitansin-3-N-metil-L-alanina-N-Me-beta-alanina-carbamil-(p-amino)bencil-citrulina-valina-adipoil-succinato (Compuesto **1**, Figura 20) (Maitansinoide B) durante 2 horas a temperatura ambiente. Los conjugados se purificaron por cromatografía de exclusión por tamaño o por ultrafiltración extensa y se filtraron de forma estéril. Las concentraciones de proteína se determinaron mediante análisis espectral UV. La HPLC de exclusión por tamaño estableció que todos los conjugados utilizados eran >90% monoméricos, y la RP-HPLC estableció que había <1% de carga útil del enlazador no conjugado. Todos los anticuerpos conjugados se analizaron mediante UV para determinar los valores de carga de carga útil del enlazador de acuerdo con Hamblett *et al.* (Asociación Americana para la Investigación del Cáncer. 2004 oct. 15; 10(20): 7063-70) y/o por diferencia de masa, nativo versus conjugado. Las relaciones de carga a anticuerpos se muestran en la Tabla 24.

Tabla 24: Porcentaje de rendimiento y relación de carga útil a anticuerpo para cada uno de los conjugados de fármaco y anticuerpo

Anticuerpo	Rendimiento (%)	DAR (MS)	DAR (UV)
H4H14639D-maitansinoide A	60	3,8	3,7
H4H14639D-maitasinoide B	50	2,4	2,4

Anticuerpo	Rendimiento (%)	DAR (MS)	DAR (UV)
H4H13312P-maitansinoide A	60	4,1	4,1
H4H13312P-maitansinoide B	50	2,3	2,5
isotipo Control REGN1945-maitansinoide B	70	2,3	2,5
isotipo Control REGN1945-maitansinoide A	80	3,7	3,7

Caracterización de conjugados por cromatografía líquida-espectrometría de masas

[0305] Para determinar la carga de enlazadores-cargas útiles en el anticuerpo, los conjugados se desglicosilaron y se analizaron por LC-MS.

[0306] Para el ensayo, se diluyeron 50 µg del conjugado con agua milli-Q hasta una concentración final de 1 mg/mL. Se añadieron 10 µL de solución de PNGase F [la solución de PNGase F se preparó agregando 150 µL de stock de PNGase F (New England Biolabs, N° de cat. P0704L) y 850 µL de agua milli-Q y mezclando bien] a la solución de conjugado diluido y luego se incubó a 37 °C durante la noche. Se realizaron inyecciones de 5 µL de cada muestra en LC-MS (Waters Synat G2-Si) y se eluyeron con 0,1 mL/minuto de una fase móvil de gradiente 20-40% durante 25 minutos (Fase móvil A: 0,1 v/v de FA en H₂O; Fase móvil B: 0,1% v/v de FA en acetonitrilo). La separación por CL se logró en una columna BEH C4 Waters Acquity (1,0 X 50 mM, 1,7 µM) a 80 °C.

[0307] Los espectros de espectrometría de masas se deconvoluyeron utilizando el software Masslynx y la relación de fármaco a anticuerpo (DAR) se calculó utilizando las siguientes ecuaciones:

1.- Porcentaje relativo (%) de fármaco (Dn) por la intensidad máxima de distribución (PI):

$$Dn\% = \frac{P_{in}}{\sum (PI_0 + PI_1 + PI_2 + PI_i)} \times 100$$

(n = 0, 1, 2,3, ..., i)

2.- Cálculo del DAR promedio:

$$DAR = \sum (1 \times D1\% + 2 \times D2\% + 3 \times D3\% + \dots + i \times Di\%)$$

Ejemplo 23. Afinidades de unión y constantes cinéticas de anticuerpos monoclonales humanos anti-MET (monoespecíficos y biespecíficos) conjugados derivados de resonancia de plasmones superficiales

[0308] Se determinaron las constantes de disociación de equilibrio (valores K_D) para la unión de MET a anticuerpos anti-MET conjugados con el diastereómero MCC-DM1 (maitansinoide A) o maitansin-3-N-metil-L-alanina-N-Me-beta-alanina-carbamil-(p-amino)bencil-citrulina-valina-adipoil-succinato (Compuesto 1, Figura 20) (maitansinoide B) usando un ensayo de biosensor de resonancia de plasmones superficiales en tiempo real en un instrumento Biacore 2000. La superficie del sensor Biacore se derivatizó mediante un acoplamiento de amina con un anticuerpo monoclonal de ratón anti-Fc humano (GE Healthcare, # BR-1008-39) para capturar conjugados anticuerpos anti-MET-ADC y anticuerpos parentales no modificados expresados con regiones constantes humanas. Los estudios de unión de Biacore se realizaron en tampón de corrida (HBS)-EP en solución salina tamponada de HEPES (HEPES 0,01 M, pH 7,4, NaCl 0,15 M, EDTA 3 mM, surfactante P20 al 0,05% v/v). El MET humano se preparó en el laboratorio para expresar una etiqueta myc-myc-hexahistidine C-terminal (hMET-mmh). Se inyectaron diferentes concentraciones (diluciones de 3 veces) de hMET-mmh (con un rango de 30 nM a 1,1 nM) preparadas en el tampón de corrida HBS-EP sobre la superficie capturada del ADC-anti-MET o el anticuerpo a una velocidad de flujo de 40 μ L/min. La asociación de hMET-mmh a cada uno de los ADC y los anticuerpos monoclonales capturados se monitorizó durante 4 minutos. Posteriormente, la disociación de hMET-mmh se monitorizó durante 6 minutos en tampón de corrida HBS-EP. La superficie del anti-Fc humano se regeneró mediante una inyección breve de H_3PO_4 20 mM. Todos los experimentos cinéticos de unión se realizaron a 25°C.

[0309] Se determinó las constantes de velocidad de asociación (k_a) y disociación (k_d) cinética ajustando los sensogramas en tiempo real a un modelo de unión 1:1 utilizando software de ajuste de curva Scrubber 2.0c. Todos los sensogramas fueron doblemente referenciados restando la señal del sensograma de la inyección del tampón del sensorgrama del analito correspondiente, eliminando así los artefactos causados por la disociación del anticuerpo desde la superficie de captura. Las constantes de equilibrio de disociación de la

unión (K_D) y las semividas disociativas ($t_{1/2}$) se calcularon a partir de las constantes de velocidad cinética como:

$$K_D(M) = \frac{k_d}{k_a}, \quad y \quad t_{1/2} (min) = \frac{\ln(2)}{60 \cdot k_d}$$

[0310] Los parámetros cinéticos de unión para los anticuerpos monoespecíficos y biespecíficos anti-Met conjugados con Maitansinoide A o Maitansinoide B se muestran a continuación en la Tabla 25, con algunos experimentos realizados por duplicado.

Tabla 25: Afinidades de unión Biacore de anticuerpos anti-MET monoclonales mono y bi-específicos conjugados a 25 °C

Anticuerpo	mAb Capturado (RU)	Antígeno unido (RU)	k_a (1/Ms)	k_d (1/s)	K_D (M)	$t_{1/2}$ (min)
H4H13312P2	148,1±1,2	12,3	2,59E+05	5,35E-03	2,07E-08	2,2
H4H13312P2	142,7±0,3	12,1	1,87E+05	4,85E-03	2,59E-08	2,4
H4H13312P2-Maitansinoide A	232,6±0,5	11,9	1,82E+05	7,18E-03	3,94E-08	1,6
H4H13312P2-Maitansinoide B	263,0±2,6	10,9	1,80E+05	6,32E-03	3,51E-08	1,8
H4H14639D	283,6±4,4	82,8	5,90E+05	1,56E-03	2,64E-09	7,4
H4H14639D-Maitansinoide A	207,7±0,8	55,8	4,95E+05	1,81E-03	3,65E-09	6,4
H4H14639D-Maitansinoide B	227,5±0,4	55,4	4,83E+05	1,87E-03	3,86E-09	6,2
H4H14639D-Maitansinoide A	284,0±1,1	62,8	4,70E+05	1,76E-03	3,74E-09	6,6
H4H14639D-Maitansinoide B	268,7±0,7	72,8	4,91E+05	1,45E-03	2,95E-09	8,0

Ejemplo 24: Potencias *in vitro* de conjugados de anticuerpo anti-MET y fármaco (ADC)

[0311] Para determinar la potencia de destrucción celular relativa de los conjugados de anticuerpo anti-MET y fármaco (ADC) descritos en el presente documento, se realizaron ensayos de destrucción celular en múltiples líneas celulares que expresan niveles variables

de MET endógeno. Las líneas celulares EBC-1 (Riken Cell Bank; # RBRC-RCB1965), MKN-45 (JCRB; # JCRB0254), NCI-H1993 (ATCC; # CRL-5909), J.RT3 (ATCC; # TIB-153) se mantuvieron en RPMI + FBS al 10% + 1 X penicilina/estreptomicina/L-glutamina (P/S/G); SNU-5 (ATCC; # CRL-5973) se mantuvo en Iscove + FBS al 10% + 1 X P/S/G, Hs746t (ATCC; # HTB-135) y HEK293 (ATCC; # 003041) se mantuvo en DME + FBS al 10% + 1 X P/S/G; MDA-MB-231 (ATCC; # HTB-26) se mantuvo en L-15 de Liebowitz + FBS al 10% + 1 X P/S/G + 1 X aminoácidos no esenciales (NEAA) sin CO₂; U87MG (ATCC; # HTB-14) se mantuvo en MEM con sales de Earle + FBS al 15% + 1 X P/S/G + 1 X NEAA; T47D (ATCC; # HTB-133) se mantuvo en RPMI 1640 + FBS al 10% + 1 X P/S/G + HEPES 10 mM + piruvato sódico 1 mM + insulina bovina a 10 ug/ml; y A549 (ATCC; # CCL-185) se mantuvo de nutrientes de Kaighn F-12 (F-12K de HAM) + FBS al 10% + 1 X P/S/G.

[0312] Inicialmente, la unión relativa de los anticuerpos anti-MET se evaluó con los anticuerpos H4H14635D, H4H14639D y H4H13312P2 no conjugados en todo el panel de líneas celulares mediante citometría de flujo. Brevemente, 1×10^6 células se incubaron con 10 µg/mL de H4H14635D, H4H14639D, H4H13312P2 o un anticuerpo control de isotipo (REGN1945) durante 30 minutos en hielo en PBS + FBS (tampón FACS) al 2%. Después de un lavado con tampón FACS, las células se incubaron con 10 µg/mL de anticuerpo secundario antihumano conjugado con Alexa647 (Jackson ImmunoResearch, # 109-606-170) durante 30 minutos en hielo. Después de un lavado adicional con tampón FACS, las muestras se fijaron con Cytofix (BD Biosciences, N° 554655), se filtraron con tampón FACS y se analizaron en un citómetro de flujo iQue (Intellicyte). Los datos de intensidad de fluorescencia media (MFI) se determinaron utilizando el software FlowJo (FlowJo LLC). La unión FACS se expresa como veces de MFI por encima de los niveles de control del isotipo, y los resultados se resumen en la Tabla 26. La unión relativa de los tres anticuerpos anti-Met fue comparable en cada línea celular y varió de 447 a 7 veces por sobre los controles de isotipo anteriores. No se observó unión detectable de ninguno de los 3 anticuerpos anti-MET analizados en células T47D, HEK293 o J.RT3.

[0313] Para medir la citotoxicidad *in vitro* de los ADC anti-MET, se evaluaron los recuentos nucleares después de un tratamiento de 3 o 6 días con los ADC. Brevemente, las células se sembraron en placas de 96 pocillos recubiertas de colágeno (Greiner, VWR; #

82050-812) a 750-3000 células/pocillo en medio de crecimiento completo y se cultivaron durante la noche a 37 °C, CO₂ al 5%. Para las curvas de viabilidad celular, se agregaron a las células ADC, anticuerpos no conjugados o carga útil libre, diluidos en serie a concentraciones finales que variaron de 100 nM a 0,01 nM (basado en la concentración de toxina) y se incubaron durante 3 o 6 días a 37 °C en CO₂ al 5%. Las células se trataron posteriormente con 3 µg/mL de tinción nuclear Hoechst 33342 (Invitrogen, N° H3570) mientras se fijaron con formaldehído al 4%. Las imágenes se adquirieron en ImageXpress micro XL (Molecular Devices, Sunnyvale, CA) y los recuentos nucleares se determinaron mediante el software de análisis de imágenes MetaXpress (Molecular Devices, Sunnyvale, CA). Los recuentos nucleares de fondo de las células tratadas con digitonina 40 nM se restaron de todos los pocillos y la viabilidad se expresó como un porcentaje de los controles no tratados. Los valores de CI₅₀ se determinaron a partir de una ecuación logística de cuatro parámetros sobre una curva de respuesta de 10 puntos (GraphPad Prism). También se incluye en el análisis la condición no tratada para cada curva de dosis-respuesta y se representa como la dosis más baja. Los valores de CI₅₀ y el porcentaje de destrucción celular se muestran en las Tablas 27 y 28.

[0314] Como se resume en la Tabla 27, el conjugado de anticuerpo anti-MET y fármaco H4H14639D-Maitansinoide A redujo específicamente la viabilidad celular en los fondos celulares EBC-1, SNU-5, MKN-45, NCI-HI 993 y Hs746t con amplificación de Met con valores de CI₅₀ que iban desde 0,35 nM hasta 0,96 nM. El porcentaje de células muertas (máx % de destrucción celular) varió de 73% a 100%. El conjugado H4H14639D-maitansinoide A también destruyó específicamente 84% de las células A549 con valores de CI₅₀ de 13,91 nM. Los valores de CI₅₀ de H4H14639D-Maitansinoide A fueron mayores que 37 nM en líneas celulares de baja expresión (MDA-MB-231 y U87MG) y sin expresión (T47D, HEK293 y J.RT3). De forma similar, el anticuerpo de control de isotipo conjugado destruyó todas las líneas celulares con valores de CI₅₀ superiores a 35 nM. La versión disulfuro de metilo y DM1 (MeS-DM1) destruyó todas las líneas analizadas con valores de CI₅₀ que iban de 0,07 nM a 2,86 nM.

[0315] En un experimento separado, tres anticuerpos anti-Met (H4H14639D, H4H14635D y H4H13312P2) se conjugaron con cargas útiles de Maitansinoide A o Maitansinoide B, y se

evaluó la citotoxicidad *in vitro* en células EBC-1, Hs746t, A549 después de un tratamiento de 6 días. Como se resume en la Tabla 28, todos los conjugados de anticuerpo anti-Met-y fármaco redujeron de manera potente y específica la viabilidad celular en células positivas para Met, con valores de CI_{50} tan bajos como 10 pM en las células EBC-1; 0,82 nM en células Hs746t y 3,5 nM en células A549. El porcentaje de células destruidas fue superior al 95% en las células EBC-1, superior al 86% en las células Hs746t, y superior al 72% en células A549. Las células T47D (negativas para Met) no fueron específicamente destruidas por los ADC anti-Met. Los anticuerpos de control de isotipo conjugados de forma similar redujeron la viabilidad celular en todas las líneas celulares analizadas con valores de CI_{50} superiores a 5 nM en células EBC-1, superiores a 33 nM en células Hs746t, y superiores a 90 nM en células A549 y T47D. El H4H14639D no conjugado redujo la viabilidad celular en las células EBC-1, Hs746t y A549, pero en un porcentaje menor que los anticuerpos conjugados. Los H4H14635D y H4H13312P2 no conjugadas tuvieron poco o ningún impacto en la viabilidad de ninguna de las líneas celulares probadas. La versión de disulfuro de metilo de DM1 (MeS-DM1) destruyó todas las líneas analizadas con valores de CI_{50} que iban desde 0,12 nM a 1,39 nM. En contraste, M24 (la carga útil liberada de Maitansinoide B) destruyó las células con $CI_{50} > 100$ nM.

Tabla 26: Unión FACS de anticuerpos MET no conjugados con líneas celulares tumorales.

Línea celular	Unión FACS (Veces MFI por sobre el control de isotipo)					
	No teñida	Sólo secundario	REGN1945 (Control isotipo)	H4H14635D	H4H14639D	H4H13312P2
EBC-1	0,7	0,6	1	263	252	147
SNU-5	1	1,2	1	477	454	235
MKN-45	1	0,8	1	183	156	94
NCI-H1993*	1	2	ND	ND	188	188
Hs746t	0,8	1,1	1	39	34	27
MDA-MB-231	3	5,6	1	11	12	7
U87MG	1,6	0,7	1	18	18	10
T47D	1	0,9	1	1,3	1	1,4
A549	0,7	0,5	1	12	10	7
HEK293	0,2	0,2	1	1,8	1,8	1,2
J.RT3	0,8	1	1	1,6	1,4	1,1

* Expresado como veces por sobre no teñido para NCI-H1993.

Tabla 27: CI₅₀ y % máx. de destrucción de ADC anti-MET en un ensayo de citotoxicidad *in vitro* de 3 días.

Conjugado Anticuerpo-Fármaco	EBC-1		SNU-5		MKN-45		NCI-H1993	
	CI ₅₀ (nM)	Max % destrucción	CI ₅₀ (nM)	Max % destrucción	CI ₅₀ (nM)	Max % destrucción	CI ₅₀ (nM)	Max % destrucción
OM1 (MeS-OM1)	2,22	90	1,22	99	2,73	85	2,86	81
H4H146390	0,82	37	0,30	40	ND	o	ND	o
H4H146390-Maitansinoide A	0,96	89	0,40	100	0,35	86	0,41	94
REGN1945-Maitansinoide A	35,06	65	>100	14	>100	39	49,42	68

Conjugado Anticuerpo-Fármaco	Hs746t		MDA-MB-231		U87MG	
	CI ₅₀ (nM)	Max % destrucción	CI ₅₀ (nM)	Max % destrucción	CI ₅₀ (nM)	Max % destrucción
DM1 (fármaco libre)	1,46	81	1,53	89	0,61	89
H4H14639D	0,42	7	>100	6	>100	6
H4H14639D-Maitansinoide A	0,56	73	>100	48	100	58
REGN1945-Maitansinoide A	33,22	44	>100	42	94,71	58

Conjugado Anticuerpo-Fármaco	T47D		A549		HEK293		J.RT3	
	CI ₅₀ (nM)	Max % destrucción	CI ₅₀ (nM)	Max % destrucción	CI ₅₀ (nM)	Max % destrucción	CI ₅₀ (nM)	Max % destrucción
DM1 (fármaco libre)	1,33	91	2,56	97	0,15	95	0,07	100
H4H14639D	>100	0	>100	37	ND	o	>100	5
H4H14639D-Maitansinoide A	>100	6	13,91	84	40,90	65	37,82	59
REGN1945-Maitansinoide A	>100	1	>100	63	>100	44	39,79	70

Tabla 28: CI₅₀ y % máx. de destrucción celular de ADC anti-MET en un ensayo de citotoxicidad *in vitro* de 6 días.

Conjugado Anticuerpo-Fármaco	EBC-1		Hs746t		T47D		A549	
	CI ₅₀ (nM)	Max % destrucción	CI ₅₀ (nM)	Max % destrucción	CI ₅₀ (nM)	Max % destrucción	CI ₅₀ (nM)	Max % destrucción
DM1 (MeS-DM1)	0,12	62	1,39	88	0,24	96	0,49	90
M24 (carga útil liberada de Maitansinoide B)	>100	32	>100	10	>100	0	>100	10
H4H14639D	0,37	66	0,44	35	>100	0	0,17	29
H4H14639D-Maitansinoide A	0,27	97	0,82	87	>100	3	6,01	86
H4H14639D-Maitansinoide B	0,01	96	0,86	90	>100	0	3,54	80
H4H13312P2	>100	30	>100	0	>100	0	>100	7
H4H13312P2-Maitansinoide A	0,39	95	1,59	87	>100	6	18,30	89
H4H13312P2-Maitansinoide B	0,07	95	0,89	90	>100	3	27,10	85
H4H14635D	>100	11	>100	7	>100	7	>100	0
H4H14635D-Maitansinoide A	0,76	96	1,76	86	>100	92	6,78	91
H4H14635D-Maitansinoide B	0,26	96	2,32	89	>100	2	21,40	72
REGN1945	>100	0	>100	0	>100	0	>100	1
REGN1945-Maitansinoide A	28,08	93	33,06	76	>100	14	93,40	49
REGN1945-Maitansinoide B	5,01	97	>100	0	>100	1	>100	15

Ejemplo 25: Eficacia *in vivo* contra células de cáncer gástrico

[0316] Se implantaron 3 millones de células Hs746T de cáncer gástrico por vía subcutánea en el flanco de ratones CB-17 SCID. Una vez que los volúmenes del tumor alcanzaron alrededor de 150 mm³, los ratones se asignaron al azar en grupos de 6 y se trataron con los anticuerpos de control REGN1945-Maitansinoide B o REGN1945-Maitansinoide A a 10 mg/kg o con H4H14639D-Maitansinoide A o H4H14639D-Maitansinoide B a 3 o 10 mg/kg. Todos los anticuerpos se administraron tres veces a una frecuencia de una vez por semana. El crecimiento del tumor se monitorizó durante 37 días después de la implantación.

[0317] Se evaluó el efecto de H4H14639D-Maitansinoide A o H4H14639D-Maitansinoide B en el crecimiento de xenoinjertos de tumores humanos en ratones inmunocomprometidos, y los resultados se muestran en la Tabla 29. Los tumores tratados con los anticuerpos de control, REGN1945-Maitansinoide B o REGN1945-Maitansinoide A, crecieron hasta alcanzar los límites de tamaño del protocolo en 20 días. Los tumores tratados con H4H14639D-Maitansinoide A a 3 mg/kg crecieron hasta alcanzar los límites de tamaño de protocolo en 27 días. El crecimiento de los tumores tratados con H4H14639D-Maitansinoide

B a 3 mg/kg se inhibió durante la duración del experimento. El tratamiento de los tumores con H4H14639D-Maitansinoide A o H4H14639D-Maitansinoide B a 10 mg/kg indujo la regresión del tamaño del tumor en relación con el inicio del tratamiento.

Tabla 29: Crecimiento tumoral en ratones SCID tratados con conjugados de anticuerpo anti-Met-C

Anticuerpo (mg/kg)	Crecimiento del tumor (mm³) desde el inicio del tratamiento (media $\pm$ SD)
REGN1945- Maitansinoide A 10 mg/kg	1244 $\pm$ 199
REGN1945- Maitansinoide B 10 mg/kg	1345 $\pm$ 121
H4H14639D- Maitansinoide A 3 mg/kg	832 $\pm$ 15
H4H14639D- Maitansinoide A 10 mg/kg	-148 $\pm$ 0,17
H4H14639D- Maitansinoide e B 3 mq/kq	19 $\pm$ 147
H4H14639D - Maitansinoide B 10 mg/kg	-137 $\pm$ 0

Ejemplo 26: Eficacia *in vivo* contra células de cáncer de pulmón

[0318] Se implantaron 5 millones de células de cáncer de pulmón EBC1 por vía subcutánea en el flanco de ratones CB-17 SCID. Una vez que los volúmenes del tumor alcanzaron alrededor de 170 mm³, los ratones se asignaron al azar en grupos de 6 y se trataron con el anticuerpo de control REGN1945-Maitansinoide B a 15 mg/kg o H4H14639D-Maitansinoide B a 2,5; 5; 10 o 15 mg/kg. Los anticuerpos se administraron dos veces con una frecuencia de una vez por semana. El crecimiento del tumor se monitorizó durante 73 días después de la implantación.

[0319] Se evaluó el efecto de H4H14639D sobre el crecimiento de los xenoinjertos de tumores humanos en ratones inmunocomprometidos. Los tumores tratados con el anticuerpo de control REGN1945-maitansinoide B crecieron hasta alcanzar los límites de tamaño de protocolo dentro de 24 días (protocolos IACUC requieren sacrificio de animales que albergan

tumores que exceden los 2 cm de diámetro, aproximadamente 1.500 mm³). El tratamiento de los tumores con H4H14639D-Maitansinoide B a 2,5; 5; 10 o 15 mg/kg indujo la regresión del tamaño del tumor en relación con el inicio del tratamiento. Los resultados se muestran en la Tabla 30.

Tabla 30: Crecimiento tumoral en ratones SCID tratados con conjugados de anticuerpo anti-Met-C

Anticuerpo (mg/kg)	Crecimiento del tumor (mm ³) desde el inicio del tratamiento (media $\pm$ SD)
REGN1945-Maitansinoide B 15 mg/kg	1106 $\pm$ 165
H4H14639D-Maitansinoide B 2.5 mg/kg	-142 $\pm$ 24
H4H14639D-Maitansinoide B 5 mg/kg	-163 $\pm$ 0
H4H14639D-Maitansinoide B 10 mg/kg	-173 $\pm$ 0
H4H14639D-Maitansinoide B 15 mg/kg	-179 $\pm$ 0

Ejemplo 26: Eficacia *in vivo* contra tumores de NSCLC derivados de pacientes

[0320] Tumores de NSCLC CTG-0165 que expresan Met derivados de pacientes fueron implantados de forma subcutánea en el flanco de los ratones lampiños nu/nu. Una vez que el volumen tumoral alcanzó alrededor de 150 mm³, los ratones fueron distribuidos aleatoriamente en grupos de 6 y se trataron con anticuerpos de control REGN1945-maitansinoide B o REGN1945-maitansinoide A a 10 mg/kg o con H4H14639D-maitansinoide A o H4H14639D-maitansinoide B a 3 ó 10 mg/kg. Todos los anticuerpos se administraron tres veces a una frecuencia de una vez por semana. El crecimiento del tumor se monitorizó durante 61 días después de la implantación.

[0321] Se evaluó el efecto de H4H14639D-Maitansinoide A o H4H14639D-Maitansinoide B sobre el crecimiento de los xenoinjertos de tumores humanos en ratones inmunocomprometidos. Los tumores tratados con los anticuerpos de control REGN1945-

Maitansinoid A o REGN1945-Maitansinoid B crecieron hasta alcanzar los límites de tamaño del protocolo dentro de los 27 días. El crecimiento de los tumores tratados con H4H14639D-Maitansinoide A o H4H14639D-Maitansinoide B a 3 mg/kg se inhibió durante 27 días. El tratamiento de los tumores con H4H14639D-Maitansinoide A o H4H14639D-Maitansinoide B a 10 mg/kg indujo la regresión del tamaño del tumor en relación con el inicio del tratamiento. Los datos se proporcionan en la Tabla 31.

Tabla 31: Crecimiento tumoral en ratones lampiños tratados con conjugados de anticuerpo anti-Met-C

Anticuerpo (mg/kg)	Crecimiento del tumor (mm³) desde el inicio del tratamiento (media $\pm$ SD)
REGN1945-Maitansinoide A 10 mg/kg	967 $\pm$ 136
REGN1945-Maitansinoide B 10 mg/kg	1537 $\pm$ 373
H4H14639D-Maitansinoide A 3 mg/kg	154 $\pm$ 227
H4H14639D-Maitansinoide A 10 mg/kg	"-141 $\pm$ 2.3
H4H14639D-Maitansinoide B 3 mg/kg	517 $\pm$ 362
H4H14639D-Maitansinoide B 10 mg/kg	"-145 $\pm$ 2

Ejemplo 27: Mapeo de epítomos basado en el intercambio de hidrógeno/deuterio (H/D)
Mapeo de epítomos de anticuerpos anti-Met H4H13312P2, H4H13306P2 y H4H14639D que se unen a MET humano

[0322] Se realizaron experimentos para determinar las regiones específicas del ectodominio del receptor del factor de crecimiento de hepatocitos humanos (SEQ ID NO: 155: isoforma 1 de Met humano (Uniprot ID: P08581) expresado con una etiqueta myc-myc-hexahistidinef-mmh); en lo sucesivo denominado hMet) con el que interactúan los

anticuerpos anti-Met H4H13312P2, H4H13306P2 y H4H14639D. Los H4H13312P2 y H4H13306P2 son anticuerpos anti-Met bivalentes y monoespecíficos; H4H14639D es un anticuerpo biespecífico que comprende dos cadenas pesadas que se unen a distintos epítomos en Met, cada una de H4H13312P2 y H4H13306P2, respectivamente, y una cadena ligera universal. (Ver Ejemplo 5).

[0323] Se utilizó el mapeo de epítomos basado en el intercambio de hidrógeno/deuterio (H/D) con detección por espectrometría de masas (HDX-MS), para determinar los epítomos de unión de los anticuerpos mencionados anteriormente. Una descripción general del método HDX se expone, por ejemplo, en Ehring (1999) *Analytical Biochemistry* 267(2): 252-259; y Engen y Smith (2001) *Anal. Chem.* 73: 256A-265A.

Procedimiento experimental

[0324] Para mapear el o los epítomos de unión de los anticuerpos anti-Met H4H13312P2, H4H13306P2 y H4H14639D en hMET a través de HDX, los anticuerpos individuales se unieron covalentemente en forma separada a perlas de Sefarosa 4 Flujo Rápido activadas por NHS (GE Healthcare, Pittsburgh, PA). Para confirmar los epítomos de unión de los anticuerpos anti-Met se utilizaron dos métodos “On-Antigen” y “On-Complex”, como se describe a continuación.

[0325] En la condición experimental “On-Antigen”, hMET se deuteroó durante 5,0 minutos o 10,0 minutos en tampón PBS preparado con D₂O, El antígeno deuteroado se unió a las perlas de anticuerpo H4H13312P2 o H4H13306P2 a través de una breve incubación y luego se eluyó desde las perlas con un tampón de enfriamiento de bajo pH helado. La muestra eluida se cargó manualmente en un sistema Waters H/DX-MS que consiste en digestión de péptidos, atrapamiento, separación por cromatografía líquida (LC) de 9,0 minutos y adquisición de datos por MS Synapt G2-Si integrados en línea.

[0326] En la condición experimental “On-Complex”, hMET se unió primero H4H13312P2 o H4H13306P2 a las perlas y luego se deuteroó durante 5,0 minutos o 10,0 minutos mediante incubación en un tampón PBS preparado con D₂O, El hMET deuteroado se eluyó y analizó mediante Sistema Waters H/DX-MS como se mencionó anteriormente.

[0327] Para la identificación de los péptidos pépticos de hMET, se procesaron los datos de LC-MS^E de la muestra no deuterada y se buscaron en MET humano usando el software Waters ProteinLynx Global Server (PLGS). Los péptidos identificados se importaron al software DynamX 3.0 y se filtraron usando los siguientes dos criterios: 1) los productos mínimos por aminoácido son 0,3; 2) el umbral del archivo de replicación es 3.0. El software DynamX 3.0 posteriormente calculó automáticamente la diferencia de absorción de deuterio de cada péptido identificado entre “On-Antigen” y “On-Complex” en los puntos de tiempo de deuteración de 5 min y 10 min. El pico isotópico individual de cada péptido recogido por el software DynamX para el cálculo del valor del centroide también se examinó manualmente para garantizar la precisión del cálculo de captación de deuterio.

[0328] En general, se utilizaron valores delta para la deuteración por encima de 0,2 como punto de corte para determinar un epítipo de unión específica.

Resultados

[0329] Utilizando la digestión de pepsina en línea a través de la columna de pepsina BEH Enzymate™ Waters (2,1 x 30 mm, 5 µm) acoplada a una adquisición de datos de LC-MS^E por 9,0 minutos, se identificaron de forma reproducible un total de 162 péptidos pépticos de MET humanos con captación de deuterio detectable tanto para los experimentos “On-Antigen” como “On-Complex” cuando se usaron las perlas de anticuerpo H4H13312P2. Estos péptidos representan una cobertura de secuencia del 55,7%. Entre todos estos péptidos, solo se encontró que cinco habían reducido significativamente la captación de deuteración tras la unión a H4H13312P2 (“On-Complex”) en comparación con la deuteración del antígeno solo (“On-Antigen”). Los valores de centroide de estos cinco péptidos en ambas condiciones experimentales se ilustraron en la Tabla 32. La región correspondiente a los residuos 192-204 cubiertos por estos cinco péptidos se definió como el epítipo de unión para el anticuerpo H4H13312P2 en base a los datos HDX.

Tabla 32: péptidos pépticos de hMET con captación reducida de deuterio tras la unión a H4H13312P2

Residuos de hMET	5 min de deutерación			10 min de deutерación		
	Centroide On-Complex <i>MH+</i>	Centroide On-Antigen <i>MH+</i>	Δ	Centroide On-Complex <i>MH+</i>	Centroide On-Antigen <i>MH+</i>	Δ
192-202	1351,25	1351,83	-0,58	1351,39	1352,27	-0,88
192-203	1482,34	1482,94	-0,60	1482,50	1483,40	-0,90
192-204	1629,84	1630,71	-0,87	1630,01	1631,10	-1,09
193-202	1252,07	1252,79	-0,72	1252,25	1253,08	-0,83
193-203	1383,22	1383,79	-0,57	1383,40	1384,17	-0,77

[0330] En el experimento HDX llevado a cabo utilizando perlas de anticuerpo H4H13306P2, se identificaron reproduciblemente un total de 98 péptidos pépticos de hMET con captación de deuterio rastreable durante los experimentos “On-Antigen” y “On-Complex”. Estos 98 péptidos representan una cobertura de secuencia del 52,1%. Entre todos estos péptidos, se observó que doce habían reducido significativamente la captación de deutерación tras la unión al H4H13306P2 (“On-Complex”) en comparación con la deutерación del antígeno solo (“On-Antigen”). Los valores de centroide de estos doce péptidos en ambas condiciones experimentales se ilustraron en la Tabla 33. Las regiones correspondientes a los residuos 305-315 y los residuos 421 a 455 cubiertos por estos péptidos se definieron como el epítipo de unión para el anticuerpo H4H13306P2 basado en los datos de HDX.

Tabla 33: péptidos pépticos de hMET con captación reducida de deuterio tras la unión a H4H13306P2

Residuos de hMET	5 min de deutерación			10 min de deutерación		
	Centroide On-Complex <i>MH+</i>	Centroide On-Antigen <i>MH+</i>	Δ	Centroide On-Complex <i>MH+</i>	Centroide On-Antigen <i>MH+</i>	Δ
305-312	818,20	818,83	-0,63	818,31	819,13	-0,82
305-315	1161,50	1162,58	-1,08	1161,80	1162,95	-1,15
306-313	818,48	818,97	-0,49	818,71	819,28	-0,57
421-431	1206,24	1206,75	-0,51	1206,28	1206,95	-0,67
421-435	1581,28	1581,84	-0,56	1581,41	1582,09	-0,68
421-438	1941,58	1942,15	-0,57	1941,71	1942,39	-0,68
422-438	1794,58	1795,04	-0,46	1794,72	1795,34	-0,62
439-447	963,90	964,83	-0,93	963,97	965,24	-1,27
439-455	1846,58	1847,79	-1,21	1847,24	1847,85	-0,61
439-456	1960,24	1961,32	-1,08	1960,83	1961,42	-0,59
441-455	1586,30	1587,71	-1,41	1587,33	1587,79	-0,46
442-455	1487,50	1488,50	-1,00	1487,92	1488,54	-0,62

[0331] La misma metodología que se describe anteriormente se usó para determinar los epítomos de unión para el anticuerpo anti-Met biespecífico H4H14639D. Los epítomos de unión a H4H14639D en hMET, determinados por esta metodología corresponden a los epítomos determinados para los anticuerpos parentales.

[0332] Epítomo de unión del anticuerpo anti-Met H4H13312P2: AA 192-204: VRRLKETKDGFMF (SEQ ID NO: 156) de la SEQ ID NO: 155.

[0333] Epítomo de unión del anticuerpo anti-Met H4H13306P2: AA 305-315: LARQIGASLND (SEQ ID NO: 157) de la SEQ ID NO: 155 y AA 421-455: FIKGDLTIANLGTSEGRFMQVVVSRSGPSTPHVNF (SEQ ID NO: 158) de la SEQ ID NO: 155.

[0334] La presente invención no está limitada en su alcance por las formas de realización específicas descritas en el presente documento. De hecho, diversas modificaciones de la invención, además de las descritas en el presente documento, serán evidentes para los expertos en la técnica a partir de la descripción anterior y las figuras adjuntas. Dichas modificaciones pretenden estar dentro del alcance de las reivindicaciones adjuntas.

REIVINDICACIONES

- 1.** Una molécula de unión a antígeno biespecífica caracterizada porque comprende:

 - un primer dominio de unión a antígeno (D1); y
 - un segundo dominio de unión a antígeno (D2);

en la que D1 se une específicamente a un primer epítipo de MET humana;

en la que D2 se une específicamente a un segundo epítipo de MET humana; y

en la que D1 comprende tres regiones determinantes de complementariedad de la cadena pesada (HCDR1, HCDR2 y HCDR3) dentro de una región variable de cadena pesada (HCVR) que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 18 y tres regiones determinantes de complementariedad de la cadena ligera (LCDR1, LCDR2 y LCDR3) dentro de una región variable de cadena ligera (LCVR) que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 138.
- 2.** La molécula de unión a antígeno biespecífica de acuerdo con la reivindicación 1, caracterizada porque D1 comprende: un HCDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 20; un HCDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 22; un HCDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 24; un LCDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 140; un LCDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 142; y un LCDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 144.
- 3.** La molécula de unión a antígeno biespecífica de acuerdo con la reivindicación 2, caracterizada porque D1 comprende: un HCVR que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 18; y un LCVR que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 138.

4. La molécula de unión a antígeno biespecífica de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, caracterizada porque D2 comprende: tres regiones determinantes de complementariedad de cadena pesada (HCDR1, HCDR2 y HCDR3) dentro de una región variable de cadena pesada (HCVR) que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 82 y tres regiones determinantes de complementariedad de cadena ligera (LCDR1, LCDR2 y LCDR3) dentro de una región variable de cadena ligera (LCVR) que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 138.

5. La molécula de unión a antígeno biespecífica de acuerdo con la reivindicación 1, caracterizada porque D2 comprende: un HCDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 84; un HCDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 86; un HCDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 88; un LCDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 140; un LCDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 142; y un LCDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 144.

6. La molécula de unión a antígeno biespecífica de acuerdo con la reivindicación 5, caracterizada porque D2 comprende: un HCVR que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 82; y un LCVR que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 138.

7. La molécula de unión a antígeno biespecífica de acuerdo con la reivindicación 1, caracterizada porque:

D1 comprende: un HCDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 20; un HCDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 22; un HCDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 24; un LCDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 140; un LCDR2 que comprende la secuencia de

P-2003
Solicitud divisional de NC2019/0004955
Enero 31 de 2022

aminoácidos de la SEQ ID NO: 142; y un LCDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 144; y

D2 comprende: un HCDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 84; un HCDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 86; un HCDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 88; un LCDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 140; un LCDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 142; y un LCDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 144.

8. La molécula de unión a antígeno biespecífica de acuerdo con la reivindicación 1, caracterizada porque el primer epítipo de MET humana comprende los aminoácidos 192-204 de la SEQ ID NO:155.

9. La molécula de unión a antígeno biespecífica de acuerdo con la reivindicación 1, en la que el segundo epítipo de MET humana comprende los aminoácidos 305-315 y 421-455 de la SEQ ID NO:155.

10. La molécula de unión a antígeno biespecífica de acuerdo con la reivindicación 1, caracterizada porque el primer epítipo de MET humana comprende los aminoácidos 192-204 de la SEQ ID NO:155; y el segundo epítipo de MET humana comprende los aminoácidos 305-315 y 421-455 de la SEQ ID NO:155.

11. La molécula de unión a antígeno biespecífica de acuerdo con la reivindicación 1, caracterizada porque la molécula de unión a antígeno biespecífica está conjugada con una citotoxina.

12. La molécula de unión a antígeno biespecífica de acuerdo con la reivindicación 11, caracterizada porque la citotoxina se selecciona del grupo que consiste en biotoxinas, agentes quimioterapéuticos y radioisótopos.

P-2003
Solicitud divisional de NC2019/0004955
Enero 31 de 2022

13. La molécula de unión a antígeno biespecífica de acuerdo con la reivindicación 11, caracterizada porque la citotoxina se selecciona del grupo que consiste en maitansinoides, auristatinas, duocarmicinas, ^{225}Ac , ^{227}Th y cualquier derivado de los mismos.

14. La molécula de unión a antígeno biespecífica de acuerdo con la reivindicación 1, caracterizada porque la molécula de unión a antígeno biespecífica se conjuga con un agente citotóxico a través de un enlazador.

15. La molécula de unión a antígeno biespecífica de acuerdo con la reivindicación 14, caracterizada porque el agente citotóxico es un maitansinoide.

16. Una composición farmacéutica caracterizada porque comprende la molécula de unión a antígeno biespecífica de acuerdo con la reivindicación 1 y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

RESUMEN

En el presente documento se proporcionan anticuerpos y moléculas de unión a antígeno biespecíficas que se unen a MET y métodos de uso de los mismos. Las moléculas de unión a antígeno biespecíficas comprenden un primer y un segundo dominio de unión a antígeno, en donde el primer y el segundo dominio de unión a antígeno se unen a dos epítomos diferentes (preferiblemente no superpuestos) del dominio extracelular del MET humano. Las moléculas de unión a antígeno biespecíficas son capaces de bloquear la interacción entre MET humano y su ligando HGF. Las moléculas de unión a antígeno biespecíficas pueden exhibir una actividad agonista de MET mínima o nula, por ejemplo, en comparación con las moléculas de unión a antígeno monovalentes que comprenden solo uno de los dominios de unión a antígeno de la molécula biespecífica, los que tienden a ejercer una actividad agonista de MET no deseada. También se incluyen los conjugados anticuerpo-fármaco (ADC) que comprenden los anticuerpos o moléculas de unión a antígeno biespecíficas proporcionados en el presente documento enlazados a un agente citotóxico, radionúclido u otro resto, así como a métodos para tratar el cáncer en un sujeto mediante la administración al sujeto de una molécula de unión a antígeno biespecífica o un ADC de la misma.

Traducción 10316W001_Sequence_Listing_ST25_2017_11_06
LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Regeneron Pharmaceuticals, Inc.
Babb, Robert
Chen, Gang
Daly, Christopher
DaSilva, John
MacDonald, Douglas

<120> ANTICUERPOS ANTI-MET, MOLECULAS DE UNIÓN A ANTÍGENO BISPECIFICAS QUE SE UNEN A MET Y MÉTODOS DE USO DE LOS MISMOS

<130> 10316wo01

<140> TBD

<141> 2017-11-03

<150> 62/423,068

<151> 2016-11-16

<150> 62/479,516

<151> 2017-03-31

<160> 158

<170> PatentIn version 3.5

 $\langle 210 \rangle$ 1

<211> 372

<212> ADN

<213> Homo sapiens

 $\langle 400 \rangle$ 1

caggtgcagc tgcaggagtc gggcccagga ctggtgaagc cttcggagac cctgtccctc 60

acctgcactg tctctggtga ctccatcagt agttactatt ggacctggat ccggcagccc 120

ccagqqaagg gactggagtg gattgggtat atcttttaca gggggggcac cacctacaac 180

ccctccctca aqaqtcgaqt caccatatca gtagacacgt ccaagaacca gttctccctg 240

aagttgaggt ctgtgaccgc cgcagacacg gccgtgtatt actgtgcgag gggagacgat 300

cttttagtgq tgacaagtgt ctactggtac atcgatctct ggggccgtgg caccctggtc 360

accgtctcct ca 372

$\langle 210 \rangle$ 2

$\langle 211 \rangle$ 124

<212> PRT

<213> Homo sapiens

$\langle 400 \rangle$ 2

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

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Asp Ser Ile Ser Ser Tyr
20 25 30

Traducción 10316W001_Sequence_Listing_ST25_2017_11_06

Tyr Trp Thr Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45

Gly Tyr Ile Phe Tyr Arg Gly Gly Thr Thr Tyr Asn Pro Ser Leu Lys
50 55 60

Ser Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser Leu
65 70 75 80

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

Arg Gly Asp Asp Leu Leu Val Val Thr Ser Val Tyr Trp Tyr Ile Asp
100 105 110

Leu Trp Gly Arg Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 3
<211> 24
<212> ADN
<213> Homo sapiens

<400> 3
ggtgactcca tcagtagtta ctat

24

<210> 4
<211> 8
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 4

Gly Asp Ser Ile Ser Ser Tyr Tyr
1 5

<210> 5
<211> 21
<212> ADN
<213> Homo sapiens

<400> 5
atcttttaca gggggggcac c

21

<210> 6
<211> 7
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 6

Ile Phe Tyr Arg Gly Gly Thr
1 5

Traducción 10316W001_Sequence_Listing_ST25_2017_11_06

<210> 7
 <211> 54
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

<400> 7
 gcgaggggag acgatctttt agtggtgaca agtgtctact ggtacatcga tctc 54

<210> 8
 <211> 18
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 8

Ala Arg Gly Asp Asp Leu Leu Val Val Thr Ser Val Tyr Trp Tyr Ile
 1 5 10 15

Asp Leu

<210> 9
 <211> 360
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

<400> 9
 cagggtgcagc tgggtggagtc tggggggaggc gtgggtccagc ctggggggggtc cctgagactc 60
 tcctgtgcag cgtccggatt caccttcagt ggctatggca tgcactgggt ccgccaggct 120
 ccaggcaagg ggctggagtg gatggcagtt atatggtatg atggaagtaa tgattactat 180
 ccagactccg tgaagggccg attcaccatc tccagagaca attccaagaa cacgctgtat 240
 ctgcaaatga acagcctgag agtcgaggac acggctgtgt attactgtgc gcgagatgcg 300
 tgggacctac tacgttcctt tgactactgg ggccagggaa ccctgggtcac cgtctcctca 360

<210> 10
 <211> 120
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 10

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Gly Tyr
 20 25 30

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

Traducción 10316W001_Sequence_Listing_ST25_2017_11_06

Ala Val Ile Trp Tyr Asp Gly Ser Asn Asp Tyr Tyr Pro Asp Ser Val
50 55 60

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

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

Ala Arg Asp Ala Trp Asp Leu Leu Arg Ser Phe Asp Tyr Trp Gly Gln
100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 11
<211> 24
<212> ADN
<213> Homo sapiens

<400> 11
ggattcacct tcagtggcta tggc

24

<210> 12
<211> 8
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 12

Gly Phe Thr Phe Ser Gly Tyr Gly
1 5

<210> 13
<211> 24
<212> ADN
<213> Homo sapiens

<400> 13
atatggtatg atggaagtaa tgat

24

<210> 14
<211> 8
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 14

Ile Trp Tyr Asp Gly Ser Asn Asp
1 5

<210> 15
<211> 39
<212> ADN

<213> Homo sapiens

<400> 15

gcgcgagatg cgtgggacct actacgttcc tttgactac

39

<210> 16

<211> 13

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 16

Ala Arg Asp Ala Trp Asp Leu Leu Arg Ser Phe Asp Tyr
1 5 10

<210> 17

<211> 363

<212> ADN

<213> Homo sapiens

<400> 17

cagggtgcagc tgggtggagtc tgggggagggc gtgggtccagc ctgggaggtc cctgagagtc 60

tcttgtgtag tgtctggatt caccttcagc agctttggca tgcattgggt ccgccaggct 120

ccagacaagg ggctggagtg ggtggcagtt atatggtatg atggaagtaa tgattactat 180

tcagactccg tgaagggccg attcaccatc tccagagaca attccaagaa cacgctgttt 240

ctacaaatga accgcctgag agccgaagac acggctgttt attactgtgc gcgagctaata 300

aactggaacc gttttgatgc ctttgatctc tggggccaag ggacaatggc caccgtctct 360

tca 363

<210> 18

<211> 121

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 18

Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg
1 5 10 15

Ser Leu Arg Val Ser Cys Val Val Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Phe
20 25 30

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

Ala Val Ile Trp Tyr Asp Gly Ser Asn Asp Tyr Tyr Ser Asp Ser Val
50 55 60

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

Traducción 10316W001_Sequence_Listing_ST25_2017_11_06

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

Ala Arg Ala Asn Asn Trp Asn Arg Phe Asp Ala Phe Asp Leu Trp Gly
100 105 110

Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 19
<211> 24
<212> ADN
<213> Homo sapiens

<400> 19
ggattcacct tcagcagctt tggc 24

<210> 20
<211> 8
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 20

Gly Phe Thr Phe Ser Ser Phe Gly
1 5

<210> 21
<211> 24
<212> ADN
<213> Homo sapiens

<400> 21
atatggtatg atggaagtaa tgat 24

<210> 22
<211> 8
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 22

Ile Trp Tyr Asp Gly Ser Asn Asp
1 5

<210> 23
<211> 42
<212> ADN
<213> Homo sapiens

<400> 23
gcgcgagcta ataactggaa ccgttttgat gcctttgatc tc 42

Traducción 10316W001_Sequence_Listing_ST25_2017_11_06

<210> 24
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 24

Ala Arg Ala Asn Asn Trp Asn Arg Phe Asp Ala Phe Asp Leu
 1 5 10

<210> 25
 <211> 372
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

<400> 25
 gaggtgcagc tgggtggagtc tggggggaggc ttgggttcagc ctggaggggtc cctgagactc 60
 tcctgtgcag cctctggatt catcttcagt aattatgaaa tgaactgggt ccgccaggct 120
 ccagggaagg gactggaatg gatttcatac attactagta gtggaatat gaaatattac 180
 gcagactctg tgaagggccg attcaccatc tccagagaca acgacaagaa ttcactgtat 240
 ctgcaaata gtagtctgag agtcgaggac acggctgttt attattgtgt gagaggaggg 300
 cgatttttgg agtggttgac ctactacgtt atggtcgtct ggggccaagg gaccacggtc 360
 accgtctcct ca 372

<210> 26
 <211> 124
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 26

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Ile Phe Ser Asn Tyr
 20 25 30

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

Ser Tyr Ile Thr Ser Ser Gly Asn Met Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60

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

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

Val Arg Gly Gly Arg Phe Leu Glu Trp Leu Thr Tyr Tyr Val Met Val
100 105 110

Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 27
<211> 24
<212> ADN
<213> Homo sapiens

<400> 27
ggattcatct tcagtaatta tgaa

24

<210> 28
<211> 8
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 28

Gly Phe Ile Phe Ser Asn Tyr Glu
1 5

<210> 29
<211> 24
<212> ADN
<213> Homo sapiens

<400> 29
attactagta gtggtaatat gaaa

24

<210> 30
<211> 8
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 30

Ile Thr Ser Ser Gly Asn Met Lys
1 5

<210> 31
<211> 51
<212> ADN
<213> Homo sapiens

<400> 31
gtgagaggag ggcgattttt ggagtgggtg acctactacg ttatggtcgt c

51

<210> 32
<211> 17
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 32

Traducción 10316W001_Sequence_Listing_ST25_2017_11_06

Val Arg Gly Gly Arg Phe Leu Glu Trp Leu Thr Tyr Tyr Val Met Val
1 5 10 15

Val

<210> 33
<211> 360
<212> ADN
<213> Homo sapiens

<400> 33
caggtgcagc tgggtggagtc tgggggaggc gtgggtccagc ctgggaggtc cctgagactc 60
tcctgtgcag tgtctggatt caccttcagt agctatggca tgcactgggt ccgccaggct 120
ccaggcaagg ggctggagtg ggtggcaaatt atttggatat atggaactaa tgattactat 180
ccatactccg tgaagggccg attcaccatc tccagagaca attcccagaa cacactatat 240
ctgcaaatga acagcctgag agccgaggac acggctgtat attactgtgc gagagaggac 300
ttcattaact accggtcttt tgactattgg ggccagggaa ccctgggtcac cgtctcctca 360

<210> 34
<211> 120
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 34
Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Val Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
20 25 30

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

Ala Asn Ile Trp Tyr Asp Gly Thr Asn Asp Tyr Tyr Pro Tyr Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Gln Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80

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

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

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 35
<211> 24
<212> ADN
<213> Homo sapiens

<400> 35
ggattcacct tcagtagcta tggc

24

<210> 36
<211> 8
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 36

Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr Gly
1 5

<210> 37
<211> 24
<212> ADN
<213> Homo sapiens

<400> 37
atttggtatg atggaactaa tgat

24

<210> 38
<211> 8
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 38

Ile Trp Tyr Asp Gly Thr Asn Asp
1 5

<210> 39
<211> 39
<212> ADN
<213> Homo sapiens

<400> 39
gcgagagagg acttcattaa ctaccggtct tttgactat

39

<210> 40
<211> 13
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 40

Ala Arg Glu Asp Phe Ile Asn Tyr Arg Ser Phe Asp Tyr
1 5 10

Traducción 10316W001_Sequence_Listing_ST25_2017_11_06

<210> 41
 <211> 372
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

<400> 41
 caggtgcagc tgggtggagtc tgggggaggc gtggtccagc cagggacgtc cctgagactc 60
 tcctgtgtcg cgtctggatt caccttcaga aattttggaa tgcactgggt ccgccaggct 120
 ccaggcaagg ggctggagtg ggtggcaaat atatggtttg acggaagtaa tgagaactat 180
 gtcgagtcca ttcagggccg attcaccatc tccagagaca attccaagaa cacactgaat 240
 ctgcagatga acagcctgag agccgaggac tcggctgtct attactgtgt gagagaggga 300
 atcctaggaa ctactaatcc ttatgatgct tttgatgtct ggggccaagg gacaatggtc 360
 accgtctctt ca 372

<210> 42
 <211> 124
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 42
 Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Thr
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Val Ala Ser Gly Phe Thr Phe Arg Asn Phe
 20 25 30
 Gly Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ala Asn Ile Trp Phe Asp Gly Ser Asn Glu Asn Tyr Val Glu Ser Ile
 50 55 60
 Gln Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Asn
 65 70 75 80
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Val Arg Glu Gly Ile Leu Gly Thr Thr Asn Pro Tyr Asp Ala Phe Asp
 100 105 110
 Val Trp Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 43
 <211> 24

Traducción 10316W001_Sequence_Listing_ST25_2017_11_06

<212> ADN
 <213> Homo sapiens
 <400> 43
 ggattcacct tcagaaattt tgga 24

<210> 44
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 44
 Gly Phe Thr Phe Arg Asn Phe Gly
 1 5

<210> 45
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens
 <400> 45
 atatggttg acggaagtaa tgag 24

<210> 46
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 46
 Ile Trp Phe Asp Gly Ser Asn Glu
 1 5

<210> 47
 <211> 51
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens
 <400> 47
 gtgagagagg gaatcctagg aactactaat ccttatgatg cttttgatgt c 51

<210> 48
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 48
 Val Arg Glu Gly Ile Leu Gly Thr Thr Asn Pro Tyr Asp Ala Phe Asp
 1 5 10 15

Val

<210> 49

Traducción 10316W001_Sequence_Listing_ST25_2017_11_06

<211> 378

<212> ADN

<213> Homo sapiens

<400> 49

```
cagggtgcagc tgggtggagtc tggggggaggc gtggtccagc ctgggagggtc cctgagactc      60
tcctgtgcag  cgtctggatt caccttttagt aacttttgaa tgcactgggt  ccgccaggcg      120
ccaggcaagg  gactggagtg ggtggcaggt atatggtttg atggaagtaa taaaaactat      180
atagactccg  tgaagggccg attcaccatc tcaagagaca attccaagaa cacgctgtat      240
ctgcaaataga acagcctgag agccgaggac acggctgtgt attactgtgc gagagagggc      300
tatgattcgg  ggactgatta tatcccctat gatatttttg atatttgggg ccaagggaca      360
atggtcaccg  tctcttca                                     378
```

<210> 50

<211> 126

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 50

```
Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg
1          5          10          15
```

```
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asn Phe
20          25          30
```

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

```
Ala Gly Ile Trp Phe Asp Gly Ser Asn Lys Asn Tyr Ile Asp Ser Val
50          55          60
```

```
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65          70          75          80
```

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

```
Ala Arg Glu Gly Tyr Asp Ser Gly Thr Asp Tyr Ile Pro Tyr Asp Ile
100         105         110
```

```
Phe Asp Ile Trp Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser
115        120        125
```

<210> 51

<211> 24

<212> ADN

<213> Homo sapiens

Traducción 10316W001_Sequence_Listing_ST25_2017_11_06

<400> 51
ggattcacct ttagtaactt tgga 24

<210> 52
<211> 8
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 52
Gly Phe Thr Phe Ser Asn Phe Gly
1 5

<210> 53
<211> 24
<212> ADN
<213> Homo sapiens

<400> 53
atatggtttg atggaagtaa taaa 24

<210> 54
<211> 8
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 54
Ile Trp Phe Asp Gly Ser Asn Lys
1 5

<210> 55
<211> 57
<212> ADN
<213> Homo sapiens

<400> 55
gcgagagagg gctatgattc ggggactgat tatatcccct atgatatttt tgatatt 57

<210> 56
<211> 19
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 56
Ala Arg Glu Gly Tyr Asp Ser Gly Thr Asp Tyr Ile Pro Tyr Asp Ile
1 5 10 15

Phe Asp Ile

<210> 57
<211> 363
<212> ADN

<213> Homo sapiens

<400> 57

```

gaagtgcagc tgggtggagtc tgggggaggc ttggtacagc ctggcacgtc cctgagactc      60
tcctgtgcag cctctggatt cacctttgat gattatgcca tgcactgggt ccggcaagct      120
ccaggggaagg gcctggagtg ggtctcaggt attacttggga atagttataa catagactat      180
gctgactctg tgaagggccg attcaccatc tccagagaca acgccaagaa ctccctgtat      240
ctgcaaatga acagtctgag agctgaggac acggccttgt attactgtgc aaaagatgat      300
gactacagta actacgttta ctttgactac tggggccagg gaaccctggg caccgtctcc      360
tca                                                                    363

```

<210> 58

<211> 121

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 58

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Asp Asp Tyr
20 25 30

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

Ser Gly Ile Thr Trp Asn Ser Tyr Asn Ile Asp Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr
65 70 75 80

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

Ala Lys Asp Asp Asp Tyr Ser Asn Tyr Val Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly
100 105 110

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 59

<211> 24

<212> ADN

<213> Homo sapiens

<400> 59

ggattcacct ttgatgatta tgcc 24

<210> 60
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 60

Gly Phe Thr Phe Asp Asp Tyr Ala
 1 5

<210> 61
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

<400> 61

attacttgga atagttataa cata 24

<210> 62
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 62

Ile Thr Trp Asn Ser Tyr Asn Ile
 1 5

<210> 63
 <211> 42
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

<400> 63

gcaaaagatg atgactacag taactacgtt tactttgact ac 42

<210> 64
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 64

Ala Lys Asp Asp Asp Tyr Ser Asn Tyr Val Tyr Phe Asp Tyr
 1 5 10

<210> 65
 <211> 360
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

<400> 65

caggttcagc tgggtgcagtc cggaactgag gtgaaggagc ctggggcctc agtgaaggtc 60

tcctgtaagg cctctgggta ctcctttacc acctatggta tcagctggct gcgacaggcc 120

Traducción 10316W001_Sequence_Listing_ST25_2017_11_06

cctggacaag gacttgagtg gatgggatgg atcagcactt acaatgggtga cacaatctct	180
gcacagatgc tccaggacag agtcaccctg accgcagaca catccacgcg cacagcctac	240
atggaactga gaagcctgag atctgacgac acggccgtgt attactgtgc gagaggcat	300
gagtatgata gtcttgttta ttcttactgg ggccagggaa ccctgggtcac cgtctcctca	360

<210> 66
 <211> 120
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 66

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

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

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

Gly Trp Ile Ser Thr Tyr Asn Gly Asp Thr Ile Ser Ala Gln Met Leu
 50 55 60

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

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

Ala Arg Gly His Glu Tyr Asp Ser Leu Val Tyr Ser Tyr Trp Gly Gln
 100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 67
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

<400> 67

ggttactcct ttaccaccta tggt 24

<210> 68
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 68

Gly Tyr Ser Phe Thr Thr Tyr Gly
1 5

<210> 69

<211> 24

<212> ADN

<213> Homo sapiens

<400> 69

atcagcactt acaatgggtga caca

24

<210> 70

<211> 8

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 70

Ile Ser Thr Tyr Asn Gly Asp Thr
1 5

<210> 71

<211> 39

<212> ADN

<213> Homo sapiens

<400> 71

gcgagagggtc atgagtatga tagtcttggtt tattctttac

39

<210> 72

<211> 13

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 72

Ala Arg Gly His Glu Tyr Asp Ser Leu Val Tyr Ser Tyr
1 5 10

<210> 73

<211> 360

<212> ADN

<213> Homo sapiens

<400> 73

cagggtgcagc tgggtggagtc tggggggaggc gtgggtccagc ctgggagggtc cctgagactc 60

tcctgtgcag cgtctggatt caccttcagt agttatgcc a tgactgggt ccgccaggct 120

ccaggcaggg ggctggagtg ggtggcgggtt atatggcatg atggagatgt tgaatactat 180

gtagactccg tgaaggaccg attcaccatc tccagagaca attccaagag cacgctgtat 240

ctgcaaatac acagcctgag agccgaagat acggctttat attattgtgc gagagaggcg 300

tggggacctac tacgtcccctt tgactattgg ggccagggaa ccctgggtcac cgtctcctca 360

Traducción 10316W001_Sequence_Listing_ST25_2017_11_06

<210> 74
 <211> 120
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 74

Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg
 1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
 20 25 30

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

Ala Val Ile Trp His Asp Gly Asp Val Glu Tyr Tyr Val Asp Ser Val
 50 55 60

Lys Asp Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Ser Thr Leu Tyr
 65 70 75 80

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

Ala Arg Glu Ala Trp Asp Leu Leu Arg Pro Phe Asp Tyr Trp Gly Gln
 100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 75
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

<400> 75

ggattcacct tcagtagtta tgcc

24

<210> 76
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 76

Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr Ala
 1 5

<210> 77
 <211> 24

Traducción 10316W001_Sequence_Listing_ST25_2017_11_06

<212> ADN
<213> Homo sapiens

<400> 77
atatggcatg atggagatgt tgaa 24

<210> 78
<211> 8
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 78
Ile Trp His Asp Gly Asp Val Glu
1 5

<210> 79
<211> 39
<212> ADN
<213> Homo sapiens

<400> 79
gcgagagagg cgtgggacct actacgtccc ttgactat 39

<210> 80
<211> 13
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 80
Ala Arg Glu Ala Trp Asp Leu Leu Arg Pro Phe Asp Tyr
1 5 10

<210> 81
<211> 351
<212> ADN
<213> Homo sapiens

<400> 81
gagggtgcagc tggaggagtc tggaggagtc ttggtccagc ctgggggggtc cctgagactc 60
tcctgtgcag cctctgggtt catcgtcacc accaactaca tgacctggct ccgccaggct 120
ccagggaagg ggctggagtg ggtctcactt atttatagca gtgggtcacac atactacgca 180
gactccgtga agggccgatt caccatctcc agacacaatt ccaagaacac actgtatcta 240
caaatggaca gcctgagagc tgaggacacg gccgtgtatt actgtgagag tgcttttcgca 300
gcggatgttt ttgatatctg gggccaaggg acaatgggtca ccgtctcttc a 351

<210> 82
<211> 117
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 82

Traducción 10316W001_Sequence_Listing_ST25_2017_11_06

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

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

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

Ser Leu Ile Tyr Ser Ser Gly His Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys
50 55 60

Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg His Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu
65 70 75 80

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

Ser Ala Phe Ala Ala Asp Val Phe Asp Ile Trp Gly Gln Gly Thr Met
100 105 110

Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 83
<211> 24
<212> ADN
<213> Homo sapiens

<400> 83
gggttcacgc tcaccaccaa ctac

24

<210> 84
<211> 8
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 84

Gly Phe Ile Val Thr Thr Asn Tyr
1 5

<210> 85
<211> 21
<212> ADN
<213> Homo sapiens

<400> 85
atattatagca gtggtcacac a

21

<210> 86

Traducción 10316W001_Sequence_Listing_ST25_2017_11_06

<211> 7
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 86

Ile Tyr Ser Ser Gly His Thr
1 5

<210> 87
<211> 33
<212> ADN
<213> Homo sapiens

<400> 87
gcgagtgcctt tcgcagcgga tgtttttgat atc

33

<210> 88
<211> 11
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 88

Ala Ser Ala Phe Ala Ala Asp Val Phe Asp Ile
1 5 10

<210> 89
<211> 372
<212> ADN
<213> Homo sapiens

<400> 89
caggtgcagc tgggtggagtc tgggggaggc gtggtccagc ctgggaggtc cctgagactc 60
tcctgttcag cgtctggatt ctccttcagt cactttggca tgcactgggt ccgccaggtt 120
ccaggcgggg gcctggagtg ggtgacaagt atatggtttg atggaagtaa tagatattat 180
gcagactcct tgaagggccg attcaccatc tccagagaca attccaagaa tactctgtat 240
ctggaaatga acagcctgag agccgaggac acggctgtgt attactgtgt gagagagggg 300
atactgggaa ctactaatcc ttatgatgtt tttgatgtct ggggtcaggg gacaatggtc 360
accgtctctt ca 372

<210> 90
<211> 124
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 90

Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ser Ala Ser Gly Phe Ser Phe Ser His Phe
Página 22

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

Thr Ser Ile Trp Phe Asp Gly Ser Asn Arg Tyr Tyr Ala Asp Ser Leu
50 55 60

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

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

Val Arg Glu Gly Ile Leu Gly Thr Thr Asn Pro Tyr Asp Val Phe Asp
100 105 110

Val Trp Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 91
<211> 24
<212> ADN
<213> Homo sapiens

<400> 91
ggattctcct tcagtcactt tggc

24

<210> 92
<211> 8
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 92

Gly Phe Ser Phe Ser His Phe Gly
1 5

<210> 93
<211> 24
<212> ADN
<213> Homo sapiens

<400> 93
atatggtttg atggaagtaa taga

24

<210> 94
<211> 8
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 94

Ile Trp Phe Asp Gly Ser Asn Arg
 1 5

<210> 95
 <211> 51
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

<400> 95
 gtgagagagg ggatactggg aactactaat ccttatgatg tttttgatgt c 51

<210> 96
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 96
 Val Arg Glu Gly Ile Leu Gly Thr Thr Asn Pro Tyr Asp Val Phe Asp
 1 5 10 15

Val

<210> 97
 <211> 372
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

<400> 97
 gaggtgcagc tgggtggagtc tggggggaggc ttggtacagc cggggggggtc cctgagactc 60
 tcctgtgcag cctctggatt cacctttaga agctatgtca tgagctgggt ccgccaggct 120
 ccagggaagg ggctggagtg ggtctcagga atgagtggga gtggtggaag cacatcctac 180
 gcagactccg tgaagggccg gttcaccatc tccagagaca attcaaagaa tacgctgtat 240
 ctgctaataa acagcctgag aaccgaggac acggccgtat attattgtgc gaaagaaaac 300
 ggggctaact ggaactacgg ctactacggt atggacgtct ggggccaagg gaccacggtc 360
 accgtctcct ca 372

<210> 98
 <211> 124
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 98
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Arg Ser Tyr
 20 25 30

Traducción 10316W001_Sequence_Listing_ST25_2017_11_06

Val Met Ser Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ser Gly Met Ser Gly Ser Gly Gly Ser Thr Ser Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

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

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

Ala Lys Glu Asn Gly Ala Asn Trp Asn Tyr Gly Tyr Tyr Gly Met Asp
100 105 110

Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 99
<211> 24
<212> ADN
<213> Homo sapiens

<400> 99
ggattcacct ttagaagcta tgtc

24

<210> 100
<211> 8
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 100

Gly Phe Thr Phe Arg Ser Tyr Val
1 5

<210> 101
<211> 24
<212> ADN
<213> Homo sapiens

<400> 101
atgagtggga gtggtggaag caca

24

<210> 102
<211> 8
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 102

Met Ser Gly Ser Gly Gly Ser Thr
1 5

Traducción 10316W001_Sequence_Listing_ST25_2017_11_06

<210> 103
 <211> 51
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

<400> 103
 gcgaaagaaa acgggggctaa ctggaactac ggctactacg gtatggacgt c 51

<210> 104
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 104

Ala Lys Glu Asn Gly Ala Asn Trp Asn Tyr Gly Tyr Tyr Gly Met Asp
 1 5 10 15

Val

<210> 105
 <211> 360
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

<400> 105
 cagggtgcagc tgggtggagtc tggggggaggc gtgggtccagc ctggggaggtc cctgagactc 60
 tcctgtgtag cgtctggatt ctcccttcagt aactttggca tgcactgggt ccgccaggct 120
 ccaggcaagg ggctggagtg ggtggcaatt atatggtatg atggaagtaa taaatactat 180
 tcagactccg tgaagggccg cttcaccatc tccagagaca attccaagaa cacgctgtat 240
 ctgcaaatga acagcctgag agtcgacgac acggctgtgt attactgtgc gagattcgat 300
 cgctggaaat ttgacgcttt tgatatctgg ggccaaggga caatgggtcac cgtctcttca 360

<210> 106
 <211> 120
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 106

Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg
 1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Val Ala Ser Gly Phe Ser Phe Ser Asn Phe
 20 25 30

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

Traducción 10316W001_Sequence_Listing_ST25_2017_11_06

Ala Ile Ile Trp Tyr Asp Gly Ser Asn Lys Tyr Tyr Ser Asp Ser Val
50 55 60

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

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

Ala Arg Phe Asp Arg Trp Lys Phe Asp Ala Phe Asp Ile Trp Gly Gln
100 105 110

Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 107
<211> 24
<212> ADN
<213> Homo sapiens

<400> 107
ggattctcct tcagtaactt tggc

24

<210> 108
<211> 8
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 108

Gly Phe Ser Phe Ser Asn Phe Gly
1 5

<210> 109
<211> 24
<212> ADN
<213> Homo sapiens

<400> 109
atatggtatg atggaagtaa taaa

24

<210> 110
<211> 8
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 110

Ile Trp Tyr Asp Gly Ser Asn Lys
1 5

<210> 111
<211> 39

Traducción 10316W001_Sequence_Listing_ST25_2017_11_06

<212> ADN
<213> Homo sapiens

<400> 111
gcgagattcg atcgctggaa atttgacgct tttgatatc

39

<210> 112
<211> 13
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 112
Ala Arg Phe Asp Arg Trp Lys Phe Asp Ala Phe Asp Ile
1 5 10

<210> 113
<211> 360
<212> ADN
<213> Homo sapiens

<400> 113
caggtgcagc tgggtggagtc tggggggaggc gtggtccagc ctgggaggtc cctgagactc 60
tcctgtgcag cgtctggatt caccttcagt agctttgcca tgcactgggt ccgccaggct 120
ccaggcaagg ggctggagtg ggtggcagtt atatggtatg atggaagtaa tgattactat 180
gcagcctccg tgaagggccg tttcaccatc tccagagaca attccaagaa cacgctgtat 240
ctggaaaatga acagactgag agccgaggac acggctgtgt atcactgtgc gagagataac 300
tggaattact ggggggggtat ggacgtctgg ggccaaggga ccacgggtcac cgtctcctca 360

<210> 114
<211> 120
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 114
Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Phe
20 25 30

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

Ala Val Ile Trp Tyr Asp Gly Ser Asn Asp Tyr Tyr Ala Ala Ser Val
50 55 60

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

Traducción 10316W001_Sequence_Listing_ST25_2017_11_06

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

Ala Arg Asp Asn Trp Asn Tyr Trp Gly Gly Met Asp Val Trp Gly Gln
100 105 110

Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 115
<211> 24
<212> ADN
<213> Homo sapiens

<400> 115
ggattcacct tcagtagctt tgcc

24

<210> 116
<211> 8
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 116

Gly Phe Thr Phe Ser Ser Phe Ala
1 5

<210> 117
<211> 24
<212> ADN
<213> Homo sapiens

<400> 117
atatggtatg atggaagtaa tgat

24

<210> 118
<211> 8
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 118

Ile Trp Tyr Asp Gly Ser Asn Asp
1 5

<210> 119
<211> 39
<212> ADN
<213> Homo sapiens

<400> 119
gcgagagata actggaatta ctgggggggt atggacgtc

39

<210> 120

Traducción 10316W001_Sequence_Listing_ST25_2017_11_06

<211> 13
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 120

Ala Arg Asp Asn Trp Asn Tyr Trp Gly Gly Met Asp Val
1 5 10

<210> 121
<211> 375
<212> ADN
<213> Homo sapiens

<400> 121
gaggtgcagc tggtggagtc tgggggagggc tgggtgcagc cggggggggtc cctgagactc 60
tcctgtgcag cctctggatt cgccttttagt aattatgccca tgaactgggt ccgccagact 120
ccaggggaagg ggctggagtg ggtctcagtt attagtagta gtgggtggaaa cacatactac 180
gcagactccg tgaagggccg gttcgccatc tccagagaca attccagggga tacgctgcat 240
ctgcaaatga acagactgag agtcgaggac acggccgtct attactgtgc gaaagaaata 300
cgtccgtatt acgatctttc ctactattac ggtatggacg tctggggcca agggaccacg 360
gtcaccgtct cctca 375

<210> 122
<211> 125
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 122

Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Trp Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Ala Phe Ser Asn Tyr
20 25 30

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

Ser Val Ile Ser Ser Ser Gly Gly Asn Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Ala Ile Ser Arg Asp Asn Ser Arg Asp Thr Leu His
65 70 75 80

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

Ala Lys Glu Ile Arg Pro Tyr Tyr Asp Leu Ser Tyr Tyr Tyr Gly Met
Página 30

Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115 120 125

<210> 123
<211> 24
<212> ADN
<213> Homo sapiens

<400> 123
ggattcgctt ttagtaatta tgcc

24

<210> 124
<211> 8
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 124

Gly Phe Ala Phe Ser Asn Tyr Ala
1 5

<210> 125
<211> 24
<212> ADN
<213> Homo sapiens

<400> 125
attagtagta gtggtggaaa caca

24

<210> 126
<211> 8
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 126

Ile Ser Ser Ser Gly Gly Asn Thr
1 5

<210> 127
<211> 54
<212> ADN
<213> Homo sapiens

<400> 127
gcgaaagaaa tacgtccgta ttacgatctt tcctactatt acggtatgga cgtc

54

<210> 128
<211> 18
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 128

Ala Lys Glu Ile Arg Pro Tyr Tyr Asp Leu Ser Tyr Tyr Tyr Gly Met
 1 5 10 15

Asp Val

<210> 129
 <211> 348
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

<400> 129
 cagggtgcagc tgcaggagtc gggcccagga ctggtgaagt cttcggagac cctgtccctc 60
 acctgcactg tctctggtgg ctccatcaga aatttctact ggagctggct ccggcagccc 120
 ccagggaagg gactagagtg gattggggcac atcaattaca atggggggcac cgactacaac 180
 ccctccctca agagtcgagt caccatatca gtagacacgt ccaagaatca gttctccctg 240
 aatttgaact ctgtgaccgc cgcagacacg gccgtgtatt actgtgcgag acagagattc 300
 tacggtatgg acgtctgggg tccagggacc acggtcaccg tctcctca 348

<210> 130
 <211> 116
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 130

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

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Gly Ser Ile Arg Asn Phe
 20 25 30

Tyr Trp Ser Trp Leu Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile
 35 40 45

Gly His Ile Asn Tyr Asn Gly Gly Thr Asp Tyr Asn Pro Ser Leu Lys
 50 55 60

Ser Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser Leu
 65 70 75 80

Asn Leu Asn Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
 85 90 95

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

Thr Val Ser Ser

115

<210> 131
<211> 24
<212> ADN
<213> Homo sapiens

<400> 131
ggtggctcca tcagaaattt ctac

24

<210> 132
<211> 8
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 132

Gly Gly Ser Ile Arg Asn Phe Tyr
1 5

<210> 133
<211> 21
<212> ADN
<213> Homo sapiens

<400> 133
atcaattaca atgggggcac c

21

<210> 134
<211> 7
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 134

Ile Asn Tyr Asn Gly Gly Thr
1 5

<210> 135
<211> 30
<212> ADN
<213> Homo sapiens

<400> 135
gcgagacaga gattctacgg tatggacgtc

30

<210> 136
<211> 10
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 136

Ala Arg Gln Arg Phe Tyr Gly Met Asp Val
1 5 10

Traducción 10316W001_Sequence_Listing_ST25_2017_11_06

<210> 137
 <211> 324
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

 <400> 137
 gacatccaga tgacccagtc tccatcctcc ctgtctgcat ctgtaggaga cagagtcacc 60
 atcacttgcc gggcaagtca gagcattagc agctatttaa attggtatca gcagaaacca 120
 gggaaagccc ctaagctcct gatctatgct gcatccagtt tgcaaagtgg ggtcccgtca 180
 aggttcagtg gcagtggatc tgggacagat ttactctca ccatcagcag tctgcaacct 240
 gaagattttg caacttacta ctgtcaacag agttacagta cccctccgat caccttcggc 300
 caagggacac gactggagat taaa 324

<210> 138
 <211> 108
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

 <400> 138
 Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15

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

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

 Tyr Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60

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

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

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

<210> 139
 <211> 18
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

 <400> 139
 cagagcatta gcagctat

18

Traducción 10316W001_Sequence_Listing_ST25_2017_11_06

<210> 140
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 140

Gln Ser Ile Ser Ser Tyr
 1 5

<210> 141
 <211> 9
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

<400> 141
 gctgcatcc

9

<210> 142
 <211> 3
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 142

Ala Ala Ser
 1

<210> 143
 <211> 30
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

<400> 143
 caacagagtt acagtacccc tccgatcacc

30

<210> 144
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 144

Gln Gln Ser Tyr Ser Thr Pro Pro Ile Thr
 1 5 10

<210> 145
 <211> 1408
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 145

Met Lys Ala Pro Ala Val Leu Ala Pro Gly Ile Leu Val Leu Leu Phe
 1 5 10 15

Thr Leu Val Gln Arg Ser Asn Gly Glu Cys Lys Glu Ala Leu Ala Lys

Ser Glu Met Asn Val Asn Met Lys Tyr Gln Leu Pro Asn Phe Thr Ala
35 40 45

Glu Thr Pro Ile Gln Asn Val Ile Leu His Glu His His Ile Phe Leu
50 55 60

Gly Ala Thr Asn Tyr Ile Tyr Val Leu Asn Glu Glu Asp Leu Gln Lys
65 70 75 80

Val Ala Glu Tyr Lys Thr Gly Pro Val Leu Glu His Pro Asp Cys Phe
85 90 95

Pro Cys Gln Asp Cys Ser Ser Lys Ala Asn Leu Ser Gly Gly Val Trp
100 105 110

Lys Asp Asn Ile Asn Met Ala Leu Val Val Asp Thr Tyr Tyr Asp Asp
115 120 125

Gln Leu Ile Ser Cys Gly Ser Val Asn Arg Gly Thr Cys Gln Arg His
130 135 140

Val Phe Pro His Asn His Thr Ala Asp Ile Gln Ser Glu Val His Cys
145 150 155 160

Ile Phe Ser Pro Gln Ile Glu Glu Pro Ser Gln Cys Pro Asp Cys Val
165 170 175

Val Ser Ala Leu Gly Ala Lys Val Leu Ser Ser Val Lys Asp Arg Phe
180 185 190

Ile Asn Phe Phe Val Gly Asn Thr Ile Asn Ser Ser Tyr Phe Pro Asp
195 200 205

His Pro Leu His Ser Ile Ser Val Arg Arg Leu Lys Glu Thr Lys Asp
210 215 220

Gly Phe Met Phe Leu Thr Asp Gln Ser Tyr Ile Asp Val Leu Pro Glu
225 230 235 240

Phe Arg Asp Ser Tyr Pro Ile Lys Tyr Val His Ala Phe Glu Ser Asn
245 250 255

Asn Phe Ile Tyr Phe Leu Thr Val Gln Arg Glu Thr Leu Asp Ala Gln
260 265 270

Traducción 10316W001_Sequence_Listing_ST25_2017_11_06

Thr Phe His Thr Arg Ile Ile Arg Phe Cys Ser Ile Asn Ser Gly Leu
275 280 285

His Ser Tyr Met Glu Met Pro Leu Glu Cys Ile Leu Thr Glu Lys Arg
290 295 300

Lys Lys Arg Ser Thr Lys Lys Glu Val Phe Asn Ile Leu Gln Ala Ala
305 310 315 320

Tyr Val Ser Lys Pro Gly Ala Gln Leu Ala Arg Gln Ile Gly Ala Ser
325 330 335

Leu Asn Asp Asp Ile Leu Phe Gly Val Phe Ala Gln Ser Lys Pro Asp
340 345 350

Ser Ala Glu Pro Met Asp Arg Ser Ala Met Cys Ala Phe Pro Ile Lys
355 360 365

Tyr Val Asn Asp Phe Phe Asn Lys Ile Val Asn Lys Asn Asn Val Arg
370 375 380

Cys Leu Gln His Phe Tyr Gly Pro Asn His Glu His Cys Phe Asn Arg
385 390 395 400

Thr Leu Leu Arg Asn Ser Ser Gly Cys Glu Ala Arg Arg Asp Glu Tyr
405 410 415

Arg Thr Glu Phe Thr Thr Ala Leu Gln Arg Val Asp Leu Phe Met Gly
420 425 430

Gln Phe Ser Glu Val Leu Leu Thr Ser Ile Ser Thr Phe Ile Lys Gly
435 440 445

Asp Leu Thr Ile Ala Asn Leu Gly Thr Ser Glu Gly Arg Phe Met Gln
450 455 460

Val Val Val Ser Arg Ser Gly Pro Ser Thr Pro His Val Asn Phe Leu
465 470 475 480

Leu Asp Ser His Pro Val Ser Pro Glu Val Ile Val Glu His Thr Leu
485 490 495

Asn Gln Asn Gly Tyr Thr Leu Val Ile Thr Gly Lys Lys Ile Thr Lys
500 505 510

Ile Pro Leu Asn Gly Leu Gly Cys Arg His Phe Gln Ser Cys Ser Gln
515 520 525

Traducción 10316W001_Sequence_Listing_ST25_2017_11_06

Cys Leu Ser Ala Pro Pro Phe Val Gln Cys Gly Trp Cys His Asp Lys
 530 535 540
 Cys Val Arg Ser Glu Glu Cys Leu Ser Gly Thr Trp Thr Gln Gln Ile
 545 550 555 560
 Cys Leu Pro Ala Ile Tyr Lys Val Phe Pro Asn Ser Ala Pro Leu Glu
 565 570 575
 Gly Gly Thr Arg Leu Thr Ile Cys Gly Trp Asp Phe Gly Phe Arg Arg
 580 585 590
 Asn Asn Lys Phe Asp Leu Lys Lys Thr Arg Val Leu Leu Gly Asn Glu
 595 600 605
 Ser Cys Thr Leu Thr Leu Ser Glu Ser Thr Met Asn Thr Leu Lys Cys
 610 615 620
 Thr Val Gly Pro Ala Met Asn Lys His Phe Asn Met Ser Ile Ile Ile
 625 630 635 640
 Ser Asn Gly His Gly Thr Thr Gln Tyr Ser Thr Phe Ser Tyr Val Asp
 645 650 655
 Pro Val Ile Thr Ser Ile Ser Pro Lys Tyr Gly Pro Met Ala Gly Gly
 660 665 670
 Thr Leu Leu Thr Leu Thr Gly Asn Tyr Leu Asn Ser Gly Asn Ser Arg
 675 680 685
 His Ile Ser Ile Gly Gly Lys Thr Cys Thr Leu Lys Ser Val Ser Asn
 690 695 700
 Ser Ile Leu Glu Cys Tyr Thr Pro Ala Gln Thr Ile Ser Thr Glu Phe
 705 710 715 720
 Ala Val Lys Leu Lys Ile Asp Leu Ala Asn Arg Glu Thr Ser Ile Phe
 725 730 735
 Ser Tyr Arg Glu Asp Pro Ile Val Tyr Glu Ile His Pro Thr Lys Ser
 740 745 750
 Phe Ile Ser Thr Trp Trp Lys Glu Pro Leu Asn Ile Val Ser Phe Leu
 755 760 765
 Phe Cys Phe Ala Ser Gly Gly Ser Thr Ile Thr Gly Val Gly Lys Asn
 770 775 780

Traducción 10316W001_Sequence_Listing_ST25_2017_11_06

Leu Asn Ser Val Ser Val Pro Arg Met Val Ile Asn Val His Glu Ala
785 790 795 800

Gly Arg Asn Phe Thr Val Ala Cys Gln His Arg Ser Asn Ser Glu Ile
805 810 815

Ile Cys Cys Thr Thr Pro Ser Leu Gln Gln Leu Asn Leu Gln Leu Pro
820 825 830

Leu Lys Thr Lys Ala Phe Phe Met Leu Asp Gly Ile Leu Ser Lys Tyr
835 840 845

Phe Asp Leu Ile Tyr Val His Asn Pro Val Phe Lys Pro Phe Glu Lys
850 855 860

Pro Val Met Ile Ser Met Gly Asn Glu Asn Val Leu Glu Ile Lys Gly
865 870 875 880

Asn Asp Ile Asp Pro Glu Ala Val Lys Gly Glu Val Leu Lys Val Gly
885 890 895

Asn Lys Ser Cys Glu Asn Ile His Leu His Ser Glu Ala Val Leu Cys
900 905 910

Thr Val Pro Asn Asp Leu Leu Lys Leu Asn Ser Glu Leu Asn Ile Glu
915 920 925

Trp Lys Gln Ala Ile Ser Ser Thr Val Leu Gly Lys Val Ile Val Gln
930 935 940

Pro Asp Gln Asn Phe Thr Gly Leu Ile Ala Gly Val Val Ser Ile Ser
945 950 955 960

Thr Ala Leu Leu Leu Leu Leu Gly Phe Phe Leu Trp Leu Lys Lys Arg
965 970 975

Lys Gln Ile Lys Asp Leu Gly Ser Glu Leu Val Arg Tyr Asp Ala Arg
980 985 990

Val His Thr Pro His Leu Asp Arg Leu Val Ser Ala Arg Ser Val Ser
995 1000 1005

Pro Thr Thr Glu Met Val Ser Asn Glu Ser Val Asp Tyr Arg Ala
1010 1015 1020

Thr Phe Pro Glu Asp Gln Phe Pro Asn Ser Ser Gln Asn Gly Ser

Traducción 10316W001_Sequence_Listing_ST25_2017_11_06

1025

1030

1035

Cys	Arg	Gln	Val	Gln	Tyr	Pro	Leu	Thr	Asp	Met	Ser	Pro	Ile	Leu
1040						1045					1050			
Thr	Ser	Gly	Asp	Ser	Asp	Ile	Ser	Ser	Pro	Leu	Leu	Gln	Asn	Thr
1055						1060					1065			
Val	His	Ile	Asp	Leu	Ser	Ala	Leu	Asn	Pro	Glu	Leu	Val	Gln	Ala
1070						1075					1080			
Val	Gln	His	Val	Val	Ile	Gly	Pro	Ser	Ser	Leu	Ile	Val	His	Phe
1085						1090					1095			
Asn	Glu	Val	Ile	Gly	Arg	Gly	His	Phe	Gly	Cys	Val	Tyr	His	Gly
1100						1105					1110			
Thr	Leu	Leu	Asp	Asn	Asp	Gly	Lys	Lys	Ile	His	Cys	Ala	Val	Lys
1115						1120					1125			
Ser	Leu	Asn	Arg	Ile	Thr	Asp	Ile	Gly	Glu	Val	Ser	Gln	Phe	Leu
1130						1135					1140			
Thr	Glu	Gly	Ile	Ile	Met	Lys	Asp	Phe	Ser	His	Pro	Asn	Val	Leu
1145						1150					1155			
Ser	Leu	Leu	Gly	Ile	Cys	Leu	Arg	Ser	Glu	Gly	Ser	Pro	Leu	Val
1160						1165					1170			
Val	Leu	Pro	Tyr	Met	Lys	His	Gly	Asp	Leu	Arg	Asn	Phe	Ile	Arg
1175						1180					1185			
Asn	Glu	Thr	His	Asn	Pro	Thr	Val	Lys	Asp	Leu	Ile	Gly	Phe	Gly
1190						1195					1200			
Leu	Gln	Val	Ala	Lys	Gly	Met	Lys	Tyr	Leu	Ala	Ser	Lys	Lys	Phe
1205						1210					1215			
Val	His	Arg	Asp	Leu	Ala	Ala	Arg	Asn	Cys	Met	Leu	Asp	Glu	Lys
1220						1225					1230			
Phe	Thr	Val	Lys	Val	Ala	Asp	Phe	Gly	Leu	Ala	Arg	Asp	Met	Tyr
1235						1240					1245			
Asp	Lys	Glu	Tyr	Tyr	Ser	Val	His	Asn	Lys	Thr	Gly	Ala	Lys	Leu
1250						1255					1260			

Traducción 10316W001_Sequence_Listing_ST25_2017_11_06

Pro Val Lys Trp Met Ala Leu Glu Ser Leu Gln Thr Gln Lys Phe
1265 1270 1275

Thr Thr Lys Ser Asp Val Trp Ser Phe Gly Val Leu Leu Trp Glu
1280 1285 1290

Leu Met Thr Arg Gly Ala Pro Pro Tyr Pro Asp Val Asn Thr Phe
1295 1300 1305

Asp Ile Thr Val Tyr Leu Leu Gln Gly Arg Arg Leu Leu Gln Pro
1310 1315 1320

Glu Tyr Cys Pro Asp Pro Leu Tyr Glu Val Met Leu Lys Cys Trp
1325 1330 1335

His Pro Lys Ala Glu Met Arg Pro Ser Phe Ser Glu Leu Val Ser
1340 1345 1350

Arg Ile Ser Ala Ile Phe Ser Thr Phe Ile Gly Glu His Tyr Val
1355 1360 1365

His Val Asn Ala Thr Tyr Val Asn Val Lys Cys Val Ala Pro Tyr
1370 1375 1380

Pro Ser Leu Leu Ser Ser Glu Asp Asn Ala Asp Asp Glu Val Asp
1385 1390 1395

Thr Arg Pro Ala Ser Phe Trp Glu Thr Ser
1400 1405

<210> 146
<211> 1390
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 146

Met Lys Ala Pro Ala Val Leu Ala Pro Gly Ile Leu Val Leu Leu Phe
1 5 10 15

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

Ser Glu Met Asn Val Asn Met Lys Tyr Gln Leu Pro Asn Phe Thr Ala
35 40 45

Glu Thr Pro Ile Gln Asn Val Ile Leu His Glu His His Ile Phe Leu
50 55 60

Traducción 10316W001_Sequence_Listing_ST25_2017_11_06

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

Traducción 10316W001_Sequence_Listing_ST25_2017_11_06

Tyr Val Ser Lys Pro Gly Ala Gln Leu Ala Arg Gln Ile Gly Ala Ser
 325 330 335

 Leu Asn Asp Asp Ile Leu Phe Gly Val Phe Ala Gln Ser Lys Pro Asp
 340 345 350

 Ser Ala Glu Pro Met Asp Arg Ser Ala Met Cys Ala Phe Pro Ile Lys
 355 360 365

 Tyr Val Asn Asp Phe Phe Asn Lys Ile Val Asn Lys Asn Asn Val Arg
 370 375 380

 Cys Leu Gln His Phe Tyr Gly Pro Asn His Glu His Cys Phe Asn Arg
 385 390 395 400

 Thr Leu Leu Arg Asn Ser Ser Gly Cys Glu Ala Arg Arg Asp Glu Tyr
 405 410 415

 Arg Thr Glu Phe Thr Thr Ala Leu Gln Arg Val Asp Leu Phe Met Gly
 420 425 430

 Gln Phe Ser Glu Val Leu Leu Thr Ser Ile Ser Thr Phe Ile Lys Gly
 435 440 445

 Asp Leu Thr Ile Ala Asn Leu Gly Thr Ser Glu Gly Arg Phe Met Gln
 450 455 460

 Val Val Val Ser Arg Ser Gly Pro Ser Thr Pro His Val Asn Phe Leu
 465 470 475 480

 Leu Asp Ser His Pro Val Ser Pro Glu Val Ile Val Glu His Thr Leu
 485 490 495

 Asn Gln Asn Gly Tyr Thr Leu Val Ile Thr Gly Lys Lys Ile Thr Lys
 500 505 510

 Ile Pro Leu Asn Gly Leu Gly Cys Arg His Phe Gln Ser Cys Ser Gln
 515 520 525

 Cys Leu Ser Ala Pro Pro Phe Val Gln Cys Gly Trp Cys His Asp Lys
 530 535 540

 Cys Val Arg Ser Glu Glu Cys Leu Ser Gly Thr Trp Thr Gln Gln Ile
 545 550 555 560

 Cys Leu Pro Ala Ile Tyr Lys Val Phe Pro Asn Ser Ala Pro Leu Glu
 565 570 575

Traducción 10316W001_Sequence_Listing_ST25_2017_11_06

Gly Gly Thr Arg Leu Thr Ile Cys Gly Trp Asp Phe Gly Phe Arg Arg
580 585 590

Asn Asn Lys Phe Asp Leu Lys Lys Thr Arg Val Leu Leu Gly Asn Glu
595 600 605

Ser Cys Thr Leu Thr Leu Ser Glu Ser Thr Met Asn Thr Leu Lys Cys
610 615 620

Thr Val Gly Pro Ala Met Asn Lys His Phe Asn Met Ser Ile Ile Ile
625 630 635 640

Ser Asn Gly His Gly Thr Thr Gln Tyr Ser Thr Phe Ser Tyr Val Asp
645 650 655

Pro Val Ile Thr Ser Ile Ser Pro Lys Tyr Gly Pro Met Ala Gly Gly
660 665 670

Thr Leu Leu Thr Leu Thr Gly Asn Tyr Leu Asn Ser Gly Asn Ser Arg
675 680 685

His Ile Ser Ile Gly Gly Lys Thr Cys Thr Leu Lys Ser Val Ser Asn
690 695 700

Ser Ile Leu Glu Cys Tyr Thr Pro Ala Gln Thr Ile Ser Thr Glu Phe
705 710 715 720

Ala Val Lys Leu Lys Ile Asp Leu Ala Asn Arg Glu Thr Ser Ile Phe
725 730 735

Ser Tyr Arg Glu Asp Pro Ile Val Tyr Glu Ile His Pro Thr Lys Ser
740 745 750

Phe Ile Ser Gly Gly Ser Thr Ile Thr Gly Val Gly Lys Asn Leu Asn
755 760 765

Ser Val Ser Val Pro Arg Met Val Ile Asn Val His Glu Ala Gly Arg
770 775 780

Asn Phe Thr Val Ala Cys Gln His Arg Ser Asn Ser Glu Ile Ile Cys
785 790 795 800

Cys Thr Thr Pro Ser Leu Gln Gln Leu Asn Leu Gln Leu Pro Leu Lys
805 810 815

Thr Lys Ala Phe Phe Met Leu Asp Gly Ile Leu Ser Lys Tyr Phe Asp

Leu Ile Tyr Val His Asn Pro Val Phe Lys Pro Phe Glu Lys Pro Val
835 840 845

Met Ile Ser Met Gly Asn Glu Asn Val Leu Glu Ile Lys Gly Asn Asp
850 855 860

Ile Asp Pro Glu Ala Val Lys Gly Glu Val Leu Lys Val Gly Asn Lys
865 870 875 880

Ser Cys Glu Asn Ile His Leu His Ser Glu Ala Val Leu Cys Thr Val
885 890 895

Pro Asn Asp Leu Leu Lys Leu Asn Ser Glu Leu Asn Ile Glu Trp Lys
900 905 910

Gln Ala Ile Ser Ser Thr Val Leu Gly Lys Val Ile Val Gln Pro Asp
915 920 925

Gln Asn Phe Thr Gly Leu Ile Ala Gly Val Val Ser Ile Ser Thr Ala
930 935 940

Leu Leu Leu Leu Leu Gly Phe Phe Leu Trp Leu Lys Lys Arg Lys Gln
945 950 955 960

Ile Lys Asp Leu Gly Ser Glu Leu Val Arg Tyr Asp Ala Arg Val His
965 970 975

Thr Pro His Leu Asp Arg Leu Val Ser Ala Arg Ser Val Ser Pro Thr
980 985 990

Thr Glu Met Val Ser Asn Glu Ser Val Asp Tyr Arg Ala Thr Phe Pro
995 1000 1005

Glu Asp Gln Phe Pro Asn Ser Ser Gln Asn Gly Ser Cys Arg Gln
1010 1015 1020

Val Gln Tyr Pro Leu Thr Asp Met Ser Pro Ile Leu Thr Ser Gly
1025 1030 1035

Asp Ser Asp Ile Ser Ser Pro Leu Leu Gln Asn Thr Val His Ile
1040 1045 1050

Asp Leu Ser Ala Leu Asn Pro Glu Leu Val Gln Ala Val Gln His
1055 1060 1065

Traducción 10316W001_Sequence_Listing_ST25_2017_11_06

Val	Val	Ile	Gly	Pro	Ser	Ser	Leu	Ile	Val	His	Phe	Asn	Glu	Val
	1070					1075					1080			
Ile	Gly	Arg	Gly	His	Phe	Gly	Cys	Val	Tyr	His	Gly	Thr	Leu	Leu
	1085					1090					1095			
Asp	Asn	Asp	Gly	Lys	Lys	Ile	His	Cys	Ala	Val	Lys	Ser	Leu	Asn
	1100					1105					1110			
Arg	Ile	Thr	Asp	Ile	Gly	Glu	Val	Ser	Gln	Phe	Leu	Thr	Glu	Gly
	1115					1120					1125			
Ile	Ile	Met	Lys	Asp	Phe	Ser	His	Pro	Asn	Val	Leu	Ser	Leu	Leu
	1130					1135					1140			
Gly	Ile	Cys	Leu	Arg	Ser	Glu	Gly	Ser	Pro	Leu	Val	Val	Leu	Pro
	1145					1150					1155			
Tyr	Met	Lys	His	Gly	Asp	Leu	Arg	Asn	Phe	Ile	Arg	Asn	Glu	Thr
	1160					1165					1170			
His	Asn	Pro	Thr	Val	Lys	Asp	Leu	Ile	Gly	Phe	Gly	Leu	Gln	Val
	1175					1180					1185			
Ala	Lys	Gly	Met	Lys	Tyr	Leu	Ala	Ser	Lys	Lys	Phe	Val	His	Arg
	1190					1195					1200			
Asp	Leu	Ala	Ala	Arg	Asn	Cys	Met	Leu	Asp	Glu	Lys	Phe	Thr	Val
	1205					1210					1215			
Lys	Val	Ala	Asp	Phe	Gly	Leu	Ala	Arg	Asp	Met	Tyr	Asp	Lys	Glu
	1220					1225					1230			
Tyr	Tyr	Ser	Val	His	Asn	Lys	Thr	Gly	Ala	Lys	Leu	Pro	Val	Lys
	1235					1240					1245			
Trp	Met	Ala	Leu	Glu	Ser	Leu	Gln	Thr	Gln	Lys	Phe	Thr	Thr	Lys
	1250					1255					1260			
Ser	Asp	Val	Trp	Ser	Phe	Gly	Val	Leu	Leu	Trp	Glu	Leu	Met	Thr
	1265					1270					1275			
Arg	Gly	Ala	Pro	Pro	Tyr	Pro	Asp	Val	Asn	Thr	Phe	Asp	Ile	Thr
	1280					1285					1290			
Val	Tyr	Leu	Leu	Gln	Gly	Arg	Arg	Leu	Leu	Gln	Pro	Glu	Tyr	Cys
	1295					1300					1305			

Traducción 10316W001_Sequence_Listing_ST25_2017_11_06

Pro Asp Pro Leu Tyr Glu Val Met Leu Lys Cys Trp His Pro Lys
1310 1315 1320

Ala Glu Met Arg Pro Ser Phe Ser Glu Leu Val Ser Arg Ile Ser
1325 1330 1335

Ala Ile Phe Ser Thr Phe Ile Gly Glu His Tyr Val His Val Asn
1340 1345 1350

Ala Thr Tyr Val Asn Val Lys Cys Val Ala Pro Tyr Pro Ser Leu
1355 1360 1365

Leu Ser Ser Glu Asp Asn Ala Asp Asp Glu Val Asp Thr Arg Pro
1370 1375 1380

Ala Ser Phe Trp Glu Thr Ser
1385 1390

<210> 147
<211> 934
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 147

Met Lys Ala Pro Ala Val Leu Ala Pro Gly Ile Leu Val Leu Leu Phe
1 5 10 15

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

Ser Glu Met Asn Val Asn Met Lys Tyr Gln Leu Pro Asn Phe Thr Ala
35 40 45

Glu Thr Pro Ile Gln Asn Val Ile Leu His Glu His His Ile Phe Leu
50 55 60

Gly Ala Thr Asn Tyr Ile Tyr Val Leu Asn Glu Glu Asp Leu Gln Lys
65 70 75 80

Val Ala Glu Tyr Lys Thr Gly Pro Val Leu Glu His Pro Asp Cys Phe
85 90 95

Pro Cys Gln Asp Cys Ser Ser Lys Ala Asn Leu Ser Gly Gly Val Trp
100 105 110

Lys Asp Asn Ile Asn Met Ala Leu Val Val Asp Thr Tyr Tyr Asp Asp
115 120 125

Traducción 10316W001_Sequence_Listing_ST25_2017_11_06

Gln Leu Ile Ser Cys Gly Ser Val Asn Arg Gly Thr Cys Gln Arg His
130 135 140

Val Phe Pro His Asn His Thr Ala Asp Ile Gln Ser Glu Val His Cys
145 150 155 160

Ile Phe Ser Pro Gln Ile Glu Glu Pro Ser Gln Cys Pro Asp Cys Val
165 170 175

Val Ser Ala Leu Gly Ala Lys Val Leu Ser Ser Val Lys Asp Arg Phe
180 185 190

Ile Asn Phe Phe Val Gly Asn Thr Ile Asn Ser Ser Tyr Phe Pro Asp
195 200 205

His Pro Leu His Ser Ile Ser Val Arg Arg Leu Lys Glu Thr Lys Asp
210 215 220

Gly Phe Met Phe Leu Thr Asp Gln Ser Tyr Ile Asp Val Leu Pro Glu
225 230 235 240

Phe Arg Asp Ser Tyr Pro Ile Lys Tyr Val His Ala Phe Glu Ser Asn
245 250 255

Asn Phe Ile Tyr Phe Leu Thr Val Gln Arg Glu Thr Leu Asp Ala Gln
260 265 270

Thr Phe His Thr Arg Ile Ile Arg Phe Cys Ser Ile Asn Ser Gly Leu
275 280 285

His Ser Tyr Met Glu Met Pro Leu Glu Cys Ile Leu Thr Glu Lys Arg
290 295 300

Lys Lys Arg Ser Thr Lys Lys Glu Val Phe Asn Ile Leu Gln Ala Ala
305 310 315 320

Tyr Val Ser Lys Pro Gly Ala Gln Leu Ala Arg Gln Ile Gly Ala Ser
325 330 335

Leu Asn Asp Asp Ile Leu Phe Gly Val Phe Ala Gln Ser Lys Pro Asp
340 345 350

Ser Ala Glu Pro Met Asp Arg Ser Ala Met Cys Ala Phe Pro Ile Lys
355 360 365

Tyr Val Asn Asp Phe Phe Asn Lys Ile Val Asn Lys Asn Asn Val Arg
370 375 380

Traducción 10316W001_Sequence_Listing_ST25_2017_11_06

Cys Leu Gln His Phe Tyr Gly Pro Asn His Glu His Cys Phe Asn Arg
 385 390 395 400
 Thr Leu Leu Arg Asn Ser Ser Gly Cys Glu Ala Arg Arg Asp Glu Tyr
 405 410 415
 Arg Thr Glu Phe Thr Thr Ala Leu Gln Arg Val Asp Leu Phe Met Gly
 420 425 430
 Gln Phe Ser Glu Val Leu Leu Thr Ser Ile Ser Thr Phe Ile Lys Gly
 435 440 445
 Asp Leu Thr Ile Ala Asn Leu Gly Thr Ser Glu Gly Arg Phe Met Gln
 450 455 460
 Val Val Val Ser Arg Ser Gly Pro Ser Thr Pro His Val Asn Phe Leu
 465 470 475 480
 Leu Asp Ser His Pro Val Ser Pro Glu Val Ile Val Glu His Thr Leu
 485 490 495
 Asn Gln Asn Gly Tyr Thr Leu Val Ile Thr Gly Lys Lys Ile Thr Lys
 500 505 510
 Ile Pro Leu Asn Gly Leu Gly Cys Arg His Phe Gln Ser Cys Ser Gln
 515 520 525
 Cys Leu Ser Ala Pro Pro Phe Val Gln Cys Gly Trp Cys His Asp Lys
 530 535 540
 Cys Val Arg Ser Glu Glu Cys Leu Ser Gly Thr Trp Thr Gln Gln Ile
 545 550 555 560
 Cys Leu Pro Ala Ile Tyr Lys Val Phe Pro Asn Ser Ala Pro Leu Glu
 565 570 575
 Gly Gly Thr Arg Leu Thr Ile Cys Gly Trp Asp Phe Gly Phe Arg Arg
 580 585 590
 Asn Asn Lys Phe Asp Leu Lys Lys Thr Arg Val Leu Leu Gly Asn Glu
 595 600 605
 Ser Cys Thr Leu Thr Leu Ser Glu Ser Thr Met Asn Thr Leu Lys Cys
 610 615 620
 Thr Val Gly Pro Ala Met Asn Lys His Phe Asn Met Ser Ile Ile Ile

625 630 635 640
 Ser Asn Gly His Gly Thr Thr Gln Tyr Ser Thr Phe Ser Tyr Val Asp
 645 650 655
 Pro Val Ile Thr Ser Ile Ser Pro Lys Tyr Gly Pro Met Ala Gly Gly
 660 665 670
 Thr Leu Leu Thr Leu Thr Gly Asn Tyr Leu Asn Ser Gly Asn Ser Arg
 675 680 685
 His Ile Ser Ile Gly Gly Lys Thr Cys Thr Leu Lys Ser Val Ser Asn
 690 695 700
 Ser Ile Leu Glu Cys Tyr Thr Pro Ala Gln Thr Ile Ser Thr Glu Phe
 705 710 715 720
 Ala Val Lys Leu Lys Ile Asp Leu Ala Asn Arg Glu Thr Ser Ile Phe
 725 730 735
 Ser Tyr Arg Glu Asp Pro Ile Val Tyr Glu Ile His Pro Thr Lys Ser
 740 745 750
 Phe Ile Ser Gly Gly Ser Thr Ile Thr Gly Val Gly Lys Asn Leu Asn
 755 760 765
 Ser Val Ser Val Pro Arg Met Val Ile Asn Val His Glu Ala Gly Arg
 770 775 780
 Asn Phe Thr Val Ala Cys Gln His Arg Ser Asn Ser Glu Ile Ile Cys
 785 790 795 800
 Cys Thr Thr Pro Ser Leu Gln Gln Leu Asn Leu Gln Leu Pro Leu Lys
 805 810 815
 Thr Lys Ala Phe Phe Met Leu Asp Gly Ile Leu Ser Lys Tyr Phe Asp
 820 825 830
 Leu Ile Tyr Val His Asn Pro Val Phe Lys Pro Phe Glu Lys Pro Val
 835 840 845
 Met Ile Ser Met Gly Asn Glu Asn Val Leu Glu Ile Lys Gly Asn Asp
 850 855 860
 Ile Asp Pro Glu Ala Val Lys Gly Glu Val Leu Lys Val Gly Asn Lys
 865 870 875 880

Traducción 10316W001_Sequence_Listing_ST25_2017_11_06

Ser Cys Glu Asn Ile His Leu His Ser Glu Ala Val Leu Cys Thr Val
885 890 895

Pro Asn Asp Leu Leu Lys Leu Asn Ser Glu Leu Asn Ile Glu Val Gly
900 905 910

Phe Leu His Ser Ser His Asp Val Asn Lys Glu Ala Ser Val Ile Met
915 920 925

Leu Phe Ser Gly Leu Lys
930

<210> 148
<211> 281
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 148

Lys Glu Ala Leu Ala Lys Ser Glu Met Asn Val Asn Met Lys Tyr Gln
1 5 10 15

Leu Pro Asn Phe Thr Ala Glu Thr Pro Ile Gln Asn Val Ile Leu His
20 25 30

Glu His His Ile Phe Leu Gly Ala Thr Asn Tyr Ile Tyr Val Leu Asn
35 40 45

Glu Glu Asp Leu Gln Lys Val Ala Glu Tyr Lys Thr Gly Pro Val Leu
50 55 60

Glu His Pro Asp Cys Phe Pro Cys Gln Asp Cys Ser Ser Lys Ala Asn
65 70 75 80

Leu Ser Gly Gly Val Trp Lys Asp Asn Ile Asn Met Ala Leu Val Val
85 90 95

Asp Thr Tyr Tyr Asp Asp Gln Leu Ile Ser Cys Gly Ser Val Asn Arg
100 105 110

Gly Thr Cys Gln Arg His Val Phe Pro His Asn His Thr Ala Asp Ile
115 120 125

Gln Ser Glu Val His Cys Ile Phe Ser Pro Gln Ile Glu Glu Pro Ser
130 135 140

Gln Cys Pro Asp Cys Val Val Ser Ala Leu Gly Ala Lys Val Leu Ser
145 150 155 160

Traducción 10316w001_Sequence_Listing_ST25_2017_11_06

Ser Val Lys Asp Arg Phe Ile Asn Phe Phe Val Gly Asn Thr Ile Asn
165 170 175

Ser Ser Tyr Phe Pro Asp His Pro Leu His Ser Ile Ser Val Arg Arg
180 185 190

Leu Lys Glu Thr Lys Asp Gly Phe Met Phe Leu Thr Asp Gln Ser Tyr
195 200 205

Ile Asp Val Leu Pro Glu Phe Arg Asp Ser Tyr Pro Ile Lys Tyr Val
210 215 220

His Ala Phe Glu Ser Asn Asn Phe Ile Tyr Phe Leu Thr Val Gln Arg
225 230 235 240

Glu Thr Leu Asp Ala Gln Thr Phe His Thr Arg Ile Ile Arg Phe Cys
245 250 255

Ser Ile Asn Ser Gly Leu His Ser Tyr Met Glu Met Pro Leu Glu Cys
260 265 270

Ile Leu Thr Glu Lys Arg Lys Lys Arg
275 280

<210> 149
<211> 1101
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 149

Ser Thr Lys Lys Glu Val Phe Asn Ile Leu Gln Ala Ala Tyr Val Ser
1 5 10 15

Lys Pro Gly Ala Gln Leu Ala Arg Gln Ile Gly Ala Ser Leu Asn Asp
20 25 30

Asp Ile Leu Phe Gly Val Phe Ala Gln Ser Lys Pro Asp Ser Ala Glu
35 40 45

Pro Met Asp Arg Ser Ala Met Cys Ala Phe Pro Ile Lys Tyr Val Asn
50 55 60

Asp Phe Phe Asn Lys Ile Val Asn Lys Asn Asn Val Arg Cys Leu Gln
65 70 75 80

His Phe Tyr Gly Pro Asn His Glu His Cys Phe Asn Arg Thr Leu Leu
85 90 95

Traducción 10316W001_Sequence_Listing_ST25_2017_11_06

Arg Asn Ser Ser Gly Cys Glu Ala Arg Arg Asp Glu Tyr Arg Thr Glu
100 105 110

Phe Thr Thr Ala Leu Gln Arg Val Asp Leu Phe Met Gly Gln Phe Ser
115 120 125

Glu Val Leu Leu Thr Ser Ile Ser Thr Phe Ile Lys Gly Asp Leu Thr
130 135 140

Ile Ala Asn Leu Gly Thr Ser Glu Gly Arg Phe Met Gln Val Val Val
145 150 155 160

Ser Arg Ser Gly Pro Ser Thr Pro His Val Asn Phe Leu Leu Asp Ser
165 170 175

His Pro Val Ser Pro Glu Val Ile Val Glu His Thr Leu Asn Gln Asn
180 185 190

Gly Tyr Thr Leu Val Ile Thr Gly Lys Lys Ile Thr Lys Ile Pro Leu
195 200 205

Asn Gly Leu Gly Cys Arg His Phe Gln Ser Cys Ser Gln Cys Leu Ser
210 215 220

Ala Pro Pro Phe Val Gln Cys Gly Trp Cys His Asp Lys Cys Val Arg
225 230 235 240

Ser Glu Glu Cys Leu Ser Gly Thr Trp Thr Gln Gln Ile Cys Leu Pro
245 250 255

Ala Ile Tyr Lys Val Phe Pro Asn Ser Ala Pro Leu Glu Gly Gly Thr
260 265 270

Arg Leu Thr Ile Cys Gly Trp Asp Phe Gly Phe Arg Arg Asn Asn Lys
275 280 285

Phe Asp Leu Lys Lys Thr Arg Val Leu Leu Gly Asn Glu Ser Cys Thr
290 295 300

Leu Thr Leu Ser Glu Ser Thr Met Asn Thr Leu Lys Cys Thr Val Gly
305 310 315 320

Pro Ala Met Asn Lys His Phe Asn Met Ser Ile Ile Ile Ser Asn Gly
325 330 335

His Gly Thr Thr Gln Tyr Ser Thr Phe Ser Tyr Val Asp Pro Val Ile
340 345 350

Traducción 10316W001_Sequence_Listing_ST25_2017_11_06

Thr Ser Ile Ser Pro Lys Tyr Gly Pro Met Ala Gly Gly Thr Leu Leu
355 360 365

Thr Leu Thr Gly Asn Tyr Leu Asn Ser Gly Asn Ser Arg His Ile Ser
370 375 380

Ile Gly Gly Lys Thr Cys Thr Leu Lys Ser Val Ser Asn Ser Ile Leu
385 390 395 400

Glu Cys Tyr Thr Pro Ala Gln Thr Ile Ser Thr Glu Phe Ala Val Lys
405 410 415

Leu Lys Ile Asp Leu Ala Asn Arg Glu Thr Ser Ile Phe Ser Tyr Arg
420 425 430

Glu Asp Pro Ile Val Tyr Glu Ile His Pro Thr Lys Ser Phe Ile Ser
435 440 445

Thr Trp Trp Lys Glu Pro Leu Asn Ile Val Ser Phe Leu Phe Cys Phe
450 455 460

Ala Ser Gly Gly Ser Thr Ile Thr Gly Val Gly Lys Asn Leu Asn Ser
465 470 475 480

Val Ser Val Pro Arg Met Val Ile Asn Val His Glu Ala Gly Arg Asn
485 490 495

Phe Thr Val Ala Cys Gln His Arg Ser Asn Ser Glu Ile Ile Cys Cys
500 505 510

Thr Thr Pro Ser Leu Gln Gln Leu Asn Leu Gln Leu Pro Leu Lys Thr
515 520 525

Lys Ala Phe Phe Met Leu Asp Gly Ile Leu Ser Lys Tyr Phe Asp Leu
530 535 540

Ile Tyr Val His Asn Pro Val Phe Lys Pro Phe Glu Lys Pro Val Met
545 550 555 560

Ile Ser Met Gly Asn Glu Asn Val Leu Glu Ile Lys Gly Asn Asp Ile
565 570 575

Asp Pro Glu Ala Val Lys Gly Glu Val Leu Lys Val Gly Asn Lys Ser
580 585 590

Cys Glu Asn Ile His Leu His Ser Glu Ala Val Leu Cys Thr Val Pro
595 600 605

Traducción 10316W001_Sequence_Listing_ST25_2017_11_06

Asn Asp Leu Leu Lys Leu Asn Ser Glu Leu Asn Ile Glu Trp Lys Gln
 610 615 620
 Ala Ile Ser Ser Thr Val Leu Gly Lys Val Ile Val Gln Pro Asp Gln
 625 630 635 640
 Asn Phe Thr Gly Leu Ile Ala Gly Val Val Ser Ile Ser Thr Ala Leu
 645 650 655
 Leu Leu Leu Leu Gly Phe Phe Leu Trp Leu Lys Lys Arg Lys Gln Ile
 660 665 670
 Lys Asp Leu Gly Ser Glu Leu Val Arg Tyr Asp Ala Arg Val His Thr
 675 680 685
 Pro His Leu Asp Arg Leu Val Ser Ala Arg Ser Val Ser Pro Thr Thr
 690 695 700
 Glu Met Val Ser Asn Glu Ser Val Asp Tyr Arg Ala Thr Phe Pro Glu
 705 710 715 720
 Asp Gln Phe Pro Asn Ser Ser Gln Asn Gly Ser Cys Arg Gln Val Gln
 725 730 735
 Tyr Pro Leu Thr Asp Met Ser Pro Ile Leu Thr Ser Gly Asp Ser Asp
 740 745 750
 Ile Ser Ser Pro Leu Leu Gln Asn Thr Val His Ile Asp Leu Ser Ala
 755 760 765
 Leu Asn Pro Glu Leu Val Gln Ala Val Gln His Val Val Ile Gly Pro
 770 775 780
 Ser Ser Leu Ile Val His Phe Asn Glu Val Ile Gly Arg Gly His Phe
 785 790 795 800
 Gly Cys Val Tyr His Gly Thr Leu Leu Asp Asn Asp Gly Lys Lys Ile
 805 810 815
 His Cys Ala Val Lys Ser Leu Asn Arg Ile Thr Asp Ile Gly Glu Val
 820 825 830
 Ser Gln Phe Leu Thr Glu Gly Ile Ile Met Lys Asp Phe Ser His Pro
 835 840 845
 Asn Val Leu Ser Leu Leu Gly Ile Cys Leu Arg Ser Glu Gly Ser Pro

Traducción 10316W001_Sequence_Listing_ST25_2017_11_06

850

855

860

Leu Val Val Leu Pro Tyr Met Lys His Gly Asp Leu Arg Asn Phe Ile
865 870 875 880

Arg Asn Glu Thr His Asn Pro Thr Val Lys Asp Leu Ile Gly Phe Gly
885 890 895

Leu Gln Val Ala Lys Gly Met Lys Tyr Leu Ala Ser Lys Lys Phe Val
900 905 910

His Arg Asp Leu Ala Ala Arg Asn Cys Met Leu Asp Glu Lys Phe Thr
915 920 925

Val Lys Val Ala Asp Phe Gly Leu Ala Arg Asp Met Tyr Asp Lys Glu
930 935 940

Tyr Tyr Ser Val His Asn Lys Thr Gly Ala Lys Leu Pro Val Lys Trp
945 950 955 960

Met Ala Leu Glu Ser Leu Gln Thr Gln Lys Phe Thr Thr Lys Ser Asp
965 970 975

Val Trp Ser Phe Gly Val Leu Leu Trp Glu Leu Met Thr Arg Gly Ala
980 985 990

Pro Pro Tyr Pro Asp Val Asn Thr Phe Asp Ile Thr Val Tyr Leu Leu
995 1000 1005

Gln Gly Arg Arg Leu Leu Gln Pro Glu Tyr Cys Pro Asp Pro Leu
1010 1015 1020

Tyr Glu Val Met Leu Lys Cys Trp His Pro Lys Ala Glu Met Arg
1025 1030 1035

Pro Ser Phe Ser Glu Leu Val Ser Arg Ile Ser Ala Ile Phe Ser
1040 1045 1050

Thr Phe Ile Gly Glu His Tyr Val His Val Asn Ala Thr Tyr Val
1055 1060 1065

Asn Val Lys Cys Val Ala Pro Tyr Pro Ser Leu Leu Ser Ser Glu
1070 1075 1080

Asp Asn Ala Asp Asp Glu Val Asp Thr Arg Pro Ala Ser Phe Trp
1085 1090 1095

Traducción 10316W001_Sequence_Listing_ST25_2017_11_06

Glu Thr Ser
1100

<210> 150
<211> 1082
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 150

Thr Lys Lys Glu Val Phe Asn Ile Leu Gln Ala Ala Tyr Val Ser Lys
1 5 10 15

Pro Gly Ala Gln Leu Ala Arg Gln Ile Gly Ala Ser Leu Asn Asp Asp
20 25 30

Ile Leu Phe Gly Val Phe Ala Gln Ser Lys Pro Asp Ser Ala Glu Pro
35 40 45

Met Asp Arg Ser Ala Met Cys Ala Phe Pro Ile Lys Tyr Val Asn Asp
50 55 60

Phe Phe Asn Lys Ile Val Asn Lys Asn Asn Val Arg Cys Leu Gln His
65 70 75 80

Phe Tyr Gly Pro Asn His Glu His Cys Phe Asn Arg Thr Leu Leu Arg
85 90 95

Asn Ser Ser Gly Cys Glu Ala Arg Arg Asp Glu Tyr Arg Thr Glu Phe
100 105 110

Thr Thr Ala Leu Gln Arg Val Asp Leu Phe Met Gly Gln Phe Ser Glu
115 120 125

Val Leu Leu Thr Ser Ile Ser Thr Phe Ile Lys Gly Asp Leu Thr Ile
130 135 140

Ala Asn Leu Gly Thr Ser Glu Gly Arg Phe Met Gln Val Val Val Ser
145 150 155 160

Arg Ser Gly Pro Ser Thr Pro His Val Asn Phe Leu Leu Asp Ser His
165 170 175

Pro Val Ser Pro Glu Val Ile Val Glu His Thr Leu Asn Gln Asn Gly
180 185 190

Tyr Thr Leu Val Ile Thr Gly Lys Lys Ile Thr Lys Ile Pro Leu Asn
195 200 205

Traducción 10316W001_Sequence_Listing_ST25_2017_11_06

Gly Leu Gly Cys Arg His Phe Gln Ser Cys Ser Gln Cys Leu Ser Ala
 210 215 220
 Pro Pro Phe Val Gln Cys Gly Trp Cys His Asp Lys Cys Val Arg Ser
 225 230 235 240
 Glu Glu Cys Leu Ser Gly Thr Trp Thr Gln Gln Ile Cys Leu Pro Ala
 245 250 255
 Ile Tyr Lys Val Phe Pro Asn Ser Ala Pro Leu Glu Gly Gly Thr Arg
 260 265 270
 Leu Thr Ile Cys Gly Trp Asp Phe Gly Phe Arg Arg Asn Asn Lys Phe
 275 280 285
 Asp Leu Lys Lys Thr Arg Val Leu Leu Gly Asn Glu Ser Cys Thr Leu
 290 295 300
 Thr Leu Ser Glu Ser Thr Met Asn Thr Leu Lys Cys Thr Val Gly Pro
 305 310 315 320
 Ala Met Asn Lys His Phe Asn Met Ser Ile Ile Ile Ser Asn Gly His
 325 330 335
 Gly Thr Thr Gln Tyr Ser Thr Phe Ser Tyr Val Asp Pro Val Ile Thr
 340 345 350
 Ser Ile Ser Pro Lys Tyr Gly Pro Met Ala Gly Gly Thr Leu Leu Thr
 355 360 365
 Leu Thr Gly Asn Tyr Leu Asn Ser Gly Asn Ser Arg His Ile Ser Ile
 370 375 380
 Gly Gly Lys Thr Cys Thr Leu Lys Ser Val Ser Asn Ser Ile Leu Glu
 385 390 395 400
 Cys Tyr Thr Pro Ala Gln Thr Ile Ser Thr Glu Phe Ala Val Lys Leu
 405 410 415
 Lys Ile Asp Leu Ala Asn Arg Glu Thr Ser Ile Phe Ser Tyr Arg Glu
 420 425 430
 Asp Pro Ile Val Tyr Glu Ile His Pro Thr Lys Ser Phe Ile Ser Gly
 435 440 445
 Gly Ser Thr Ile Thr Gly Val Gly Lys Asn Leu Asn Ser Val Ser Val
 450 455 460

Traducción 10316W001_Sequence_Listing_ST25_2017_11_06

Pro Arg Met Val Ile Asn Val His Glu Ala Gly Arg Asn Phe Thr Val
465 470 475 480

Ala Cys Gln His Arg Ser Asn Ser Glu Ile Ile Cys Cys Thr Thr Pro
485 490 495

Ser Leu Gln Gln Leu Asn Leu Gln Leu Pro Leu Lys Thr Lys Ala Phe
500 505 510

Phe Met Leu Asp Gly Ile Leu Ser Lys Tyr Phe Asp Leu Ile Tyr Val
515 520 525

His Asn Pro Val Phe Lys Pro Phe Glu Lys Pro Val Met Ile Ser Met
530 535 540

Gly Asn Glu Asn Val Leu Glu Ile Lys Gly Asn Asp Ile Asp Pro Glu
545 550 555 560

Ala Val Lys Gly Glu Val Leu Lys Val Gly Asn Lys Ser Cys Glu Asn
565 570 575

Ile His Leu His Ser Glu Ala Val Leu Cys Thr Val Pro Asn Asp Leu
580 585 590

Leu Lys Leu Asn Ser Glu Leu Asn Ile Glu Trp Lys Gln Ala Ile Ser
595 600 605

Ser Thr Val Leu Gly Lys Val Ile Val Gln Pro Asp Gln Asn Phe Thr
610 615 620

Gly Leu Ile Ala Gly Val Val Ser Ile Ser Thr Ala Leu Leu Leu Leu
625 630 635 640

Leu Gly Phe Phe Leu Trp Leu Lys Lys Arg Lys Gln Ile Lys Asp Leu
645 650 655

Gly Ser Glu Leu Val Arg Tyr Asp Ala Arg Val His Thr Pro His Leu
660 665 670

Asp Arg Leu Val Ser Ala Arg Ser Val Ser Pro Thr Thr Glu Met Val
675 680 685

Ser Asn Glu Ser Val Asp Tyr Arg Ala Thr Phe Pro Glu Asp Gln Phe
690 695 700

Pro Asn Ser Ser Gln Asn Gly Ser Cys Arg Gln Val Gln Tyr Pro Leu
705 710 715 720

Traducción 10316W001_Sequence_Listing_ST25_2017_11_06

Thr Asp Met Ser Pro Ile Leu Thr Ser Gly Asp Ser Asp Ile Ser Ser
725 730 735

Pro Leu Leu Gln Asn Thr Val His Ile Asp Leu Ser Ala Leu Asn Pro
740 745 750

Glu Leu Val Gln Ala Val Gln His Val Val Ile Gly Pro Ser Ser Leu
755 760 765

Ile Val His Phe Asn Glu Val Ile Gly Arg Gly His Phe Gly Cys Val
770 775 780

Tyr His Gly Thr Leu Leu Asp Asn Asp Gly Lys Lys Ile His Cys Ala
785 790 795 800

Val Lys Ser Leu Asn Arg Ile Thr Asp Ile Gly Glu Val Ser Gln Phe
805 810 815

Leu Thr Glu Gly Ile Ile Met Lys Asp Phe Ser His Pro Asn Val Leu
820 825 830

Ser Leu Leu Gly Ile Cys Leu Arg Ser Glu Gly Ser Pro Leu Val Val
835 840 845

Leu Pro Tyr Met Lys His Gly Asp Leu Arg Asn Phe Ile Arg Asn Glu
850 855 860

Thr His Asn Pro Thr Val Lys Asp Leu Ile Gly Phe Gly Leu Gln Val
865 870 875 880

Ala Lys Gly Met Lys Tyr Leu Ala Ser Lys Lys Phe Val His Arg Asp
885 890 895

Leu Ala Ala Arg Asn Cys Met Leu Asp Glu Lys Phe Thr Val Lys Val
900 905 910

Ala Asp Phe Gly Leu Ala Arg Asp Met Tyr Asp Lys Glu Tyr Tyr Ser
915 920 925

Val His Asn Lys Thr Gly Ala Lys Leu Pro Val Lys Trp Met Ala Leu
930 935 940

Glu Ser Leu Gln Thr Gln Lys Phe Thr Thr Lys Ser Asp Val Trp Ser
945 950 955 960

Phe Gly Val Leu Leu Trp Glu Leu Met Thr Arg Gly Ala Pro Pro Tyr

Pro Asp Val Asn Thr Phe Asp Ile Thr Val Tyr Leu Leu Gln Gly Arg
980 985 990

Arg Leu Leu Gln Pro Glu Tyr Cys Pro Asp Pro Leu Tyr Glu Val Met
995 1000 1005

Leu Lys Cys Trp His Pro Lys Ala Glu Met Arg Pro Ser Phe Ser
1010 1015 1020

Glu Leu Val Ser Arg Ile Ser Ala Ile Phe Ser Thr Phe Ile Gly
1025 1030 1035

Glu His Tyr Val His Val Asn Ala Thr Tyr Val Asn Val Lys Cys
1040 1045 1050

Val Ala Pro Tyr Pro Ser Leu Leu Ser Ser Glu Asp Asn Ala Asp
1055 1060 1065

Asp Glu Val Asp Thr Arg Pro Ala Ser Phe Trp Glu Thr Ser
1070 1075 1080

<210> 151
<211> 626
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 151

Thr Lys Lys Glu Val Phe Asn Ile Leu Gln Ala Ala Tyr Val Ser Lys
1 5 10 15

Pro Gly Ala Gln Leu Ala Arg Gln Ile Gly Ala Ser Leu Asn Asp Asp
20 25 30

Ile Leu Phe Gly Val Phe Ala Gln Ser Lys Pro Asp Ser Ala Glu Pro
35 40 45

Met Asp Arg Ser Ala Met Cys Ala Phe Pro Ile Lys Tyr Val Asn Asp
50 55 60

Phe Phe Asn Lys Ile Val Asn Lys Asn Asn Val Arg Cys Leu Gln His
65 70 75 80

Phe Tyr Gly Pro Asn His Glu His Cys Phe Asn Arg Thr Leu Leu Arg
85 90 95

Asn Ser Ser Gly Cys Glu Ala Arg Arg Asp Glu Tyr Arg Thr Glu Phe
Página 61

Thr Thr Ala Leu Gln Arg Val Asp Leu Phe Met Gly Gln Phe Ser Glu
115 120 125

Val Leu Leu Thr Ser Ile Ser Thr Phe Ile Lys Gly Asp Leu Thr Ile
130 135 140

Ala Asn Leu Gly Thr Ser Glu Gly Arg Phe Met Gln Val Val Val Ser
145 150 155 160

Arg Ser Gly Pro Ser Thr Pro His Val Asn Phe Leu Leu Asp Ser His
165 170 175

Pro Val Ser Pro Glu Val Ile Val Glu His Thr Leu Asn Gln Asn Gly
180 185 190

Tyr Thr Leu Val Ile Thr Gly Lys Lys Ile Thr Lys Ile Pro Leu Asn
195 200 205

Gly Leu Gly Cys Arg His Phe Gln Ser Cys Ser Gln Cys Leu Ser Ala
210 215 220

Pro Pro Phe Val Gln Cys Gly Trp Cys His Asp Lys Cys Val Arg Ser
225 230 235 240

Glu Glu Cys Leu Ser Gly Thr Trp Thr Gln Gln Ile Cys Leu Pro Ala
245 250 255

Ile Tyr Lys Val Phe Pro Asn Ser Ala Pro Leu Glu Gly Gly Thr Arg
260 265 270

Leu Thr Ile Cys Gly Trp Asp Phe Gly Phe Arg Arg Asn Asn Lys Phe
275 280 285

Asp Leu Lys Lys Thr Arg Val Leu Leu Gly Asn Glu Ser Cys Thr Leu
290 295 300

Thr Leu Ser Glu Ser Thr Met Asn Thr Leu Lys Cys Thr Val Gly Pro
305 310 315 320

Ala Met Asn Lys His Phe Asn Met Ser Ile Ile Ile Ser Asn Gly His
325 330 335

Gly Thr Thr Gln Tyr Ser Thr Phe Ser Tyr Val Asp Pro Val Ile Thr
340 345 350

Traducción 10316W001_Sequence_Listing_ST25_2017_11_06

Ser Ile Ser Pro Lys Tyr Gly Pro Met Ala Gly Gly Thr Leu Leu Thr
355 360 365

Leu Thr Gly Asn Tyr Leu Asn Ser Gly Asn Ser Arg His Ile Ser Ile
370 375 380

Gly Gly Lys Thr Cys Thr Leu Lys Ser Val Ser Asn Ser Ile Leu Glu
385 390 395 400

Cys Tyr Thr Pro Ala Gln Thr Ile Ser Thr Glu Phe Ala Val Lys Leu
405 410 415

Lys Ile Asp Leu Ala Asn Arg Glu Thr Ser Ile Phe Ser Tyr Arg Glu
420 425 430

Asp Pro Ile Val Tyr Glu Ile His Pro Thr Lys Ser Phe Ile Ser Gly
435 440 445

Gly Ser Thr Ile Thr Gly Val Gly Lys Asn Leu Asn Ser Val Ser Val
450 455 460

Pro Arg Met Val Ile Asn Val His Glu Ala Gly Arg Asn Phe Thr Val
465 470 475 480

Ala Cys Gln His Arg Ser Asn Ser Glu Ile Ile Cys Cys Thr Thr Pro
485 490 495

Ser Leu Gln Gln Leu Asn Leu Gln Leu Pro Leu Lys Thr Lys Ala Phe
500 505 510

Phe Met Leu Asp Gly Ile Leu Ser Lys Tyr Phe Asp Leu Ile Tyr Val
515 520 525

His Asn Pro Val Phe Lys Pro Phe Glu Lys Pro Val Met Ile Ser Met
530 535 540

Gly Asn Glu Asn Val Leu Glu Ile Lys Gly Asn Asp Ile Asp Pro Glu
545 550 555 560

Ala Val Lys Gly Glu Val Leu Lys Val Gly Asn Lys Ser Cys Glu Asn
565 570 575

Ile His Leu His Ser Glu Ala Val Leu Cys Thr Val Pro Asn Asp Leu
580 585 590

Leu Lys Leu Asn Ser Glu Leu Asn Ile Glu Val Gly Phe Leu His Ser
595 600 605

Traducción 10316W001_Sequence_Listing_ST25_2017_11_06

Ser His Asp Val Asn Lys Glu Ala Ser Val Ile Met Leu Phe Ser Gly
610 615 620

Leu Lys
625

<210> 152
<211> 650
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> sintética

<400> 152

Thr Lys Lys Glu Val Phe Asn Ile Leu Gln Ala Ala Tyr Val Ser Lys
1 5 10 15

Pro Gly Ala Gln Leu Ala Arg Gln Ile Gly Ala Ser Leu Asn Asp Asp
20 25 30

Ile Leu Phe Gly Val Phe Ala Gln Ser Lys Pro Asp Ser Ala Glu Pro
35 40 45

Met Asp Arg Ser Ala Met Cys Ala Phe Pro Ile Lys Tyr Val Asn Asp
50 55 60

Phe Phe Asn Lys Ile Val Asn Lys Asn Asn Val Arg Cys Leu Gln His
65 70 75 80

Phe Tyr Gly Pro Asn His Glu His Cys Phe Asn Arg Thr Leu Leu Arg
85 90 95

Asn Ser Ser Gly Cys Glu Ala Arg Arg Asp Glu Tyr Arg Thr Glu Phe
100 105 110

Thr Thr Ala Leu Gln Arg Val Asp Leu Phe Met Gly Gln Phe Ser Glu
115 120 125

Val Leu Leu Thr Ser Ile Ser Thr Phe Ile Lys Gly Asp Leu Thr Ile
130 135 140

Ala Asn Leu Gly Thr Ser Glu Gly Arg Phe Met Gln Val Val Val Ser
145 150 155 160

Arg Ser Gly Pro Ser Thr Pro His Val Asn Phe Leu Leu Asp Ser His
165 170 175

Traducción 10316W001_Sequence_Listing_ST25_2017_11_06

Pro Val Ser Pro Glu Val Ile Val Glu His Thr Leu Asn Gln Asn Gly
180 185 190

Tyr Thr Leu Val Ile Thr Gly Lys Lys Ile Thr Lys Ile Pro Leu Asn
195 200 205

Gly Leu Gly Cys Arg His Phe Gln Ser Cys Ser Gln Cys Leu Ser Ala
210 215 220

Pro Pro Phe Val Gln Cys Gly Trp Cys His Asp Lys Cys Val Arg Ser
225 230 235 240

Glu Glu Cys Leu Ser Gly Thr Trp Thr Gln Gln Ile Cys Leu Pro Ala
245 250 255

Ile Tyr Lys Val Phe Pro Asn Ser Ala Pro Leu Glu Gly Gly Thr Arg
260 265 270

Leu Thr Ile Cys Gly Trp Asp Phe Gly Phe Arg Arg Asn Asn Lys Phe
275 280 285

Asp Leu Lys Lys Thr Arg Val Leu Leu Gly Asn Glu Ser Cys Thr Leu
290 295 300

Thr Leu Ser Glu Ser Thr Met Asn Thr Leu Lys Cys Thr Val Gly Pro
305 310 315 320

Ala Met Asn Lys His Phe Asn Met Ser Ile Ile Ile Ser Asn Gly His
325 330 335

Gly Thr Thr Gln Tyr Ser Thr Phe Ser Tyr Val Asp Pro Val Ile Thr
340 345 350

Ser Ile Ser Pro Lys Tyr Gly Pro Met Ala Gly Gly Thr Leu Leu Thr
355 360 365

Leu Thr Gly Asn Tyr Leu Asn Ser Gly Asn Ser Arg His Ile Ser Ile
370 375 380

Gly Gly Lys Thr Cys Thr Leu Lys Ser Val Ser Asn Ser Ile Leu Glu
385 390 395 400

Cys Tyr Thr Pro Ala Gln Thr Ile Ser Thr Glu Phe Ala Val Lys Leu
405 410 415

Lys Ile Asp Leu Ala Asn Arg Glu Thr Ser Ile Phe Ser Tyr Arg Glu
420 425 430

Traducción 10316W001_Sequence_Listing_ST25_2017_11_06

Asp Pro Ile Val Tyr Glu Ile His Pro Thr Lys Ser Phe Ile Ser Thr
435 440 445

Trp Trp Lys Glu Pro Leu Asn Ile Val Ser Phe Leu Phe Cys Phe Ala
450 455 460

Ser Gly Gly Ser Thr Ile Thr Gly Val Gly Lys Asn Leu Asn Ser Val
465 470 475 480

Ser Val Pro Arg Met Val Ile Asn Val His Glu Ala Gly Arg Asn Phe
485 490 495

Thr Val Ala Cys Gln His Arg Ser Asn Ser Glu Ile Ile Cys Cys Thr
500 505 510

Thr Pro Ser Leu Gln Gln Leu Asn Leu Gln Leu Pro Leu Lys Thr Lys
515 520 525

Ala Phe Phe Met Leu Asp Gly Ile Leu Ser Lys Tyr Phe Asp Leu Ile
530 535 540

Tyr Val His Asn Pro Val Phe Lys Pro Phe Glu Lys Pro Val Met Ile
545 550 555 560

Ser Met Gly Asn Glu Asn Val Leu Glu Ile Lys Gly Asn Asp Ile Asp
565 570 575

Pro Glu Ala Val Lys Gly Glu Val Leu Lys Val Gly Asn Lys Ser Cys
580 585 590

Glu Asn Ile His Leu His Ser Glu Ala Val Leu Cys Thr Val Pro Asn
595 600 605

Asp Leu Leu Lys Leu Asn Ser Glu Leu Asn Ile Glu Trp Lys Gln Ala
610 615 620

Glu Gln Lys Leu Ile Ser Glu Glu Asp Leu Glu Gln Lys Leu Ile Ser
625 630 635 640

Glu Glu Asp Leu His His His His His His
645 650

<210> 153
<211> 838
<212> PRT
<213> Artificial

<220>

<223> sintética

<400> 153

Thr Lys Lys Glu Val Phe Asn Ile Leu Gln Ala Ala Tyr Val Ser Lys
1 5 10 15

Pro Gly Ala Gln Leu Ala Arg Gln Ile Gly Ala Ser Leu Asn Asp Asp
20 25 30

Ile Leu Phe Gly Val Phe Ala Gln Ser Lys Pro Asp Ser Ala Glu Pro
35 40 45

Met Asp Arg Ser Ala Met Cys Ala Phe Pro Ile Lys Tyr Val Asn Asp
50 55 60

Phe Phe Asn Lys Ile Val Asn Lys Asn Asn Val Arg Cys Leu Gln His
65 70 75 80

Phe Tyr Gly Pro Asn His Glu His Cys Phe Asn Arg Thr Leu Leu Arg
85 90 95

Asn Ser Ser Gly Cys Glu Ala Arg Arg Asp Glu Tyr Arg Thr Glu Phe
100 105 110

Thr Thr Ala Leu Gln Arg Val Asp Leu Phe Met Gly Gln Phe Ser Glu
115 120 125

Val Leu Leu Thr Ser Ile Ser Thr Phe Ile Lys Gly Asp Leu Thr Ile
130 135 140

Ala Asn Leu Gly Thr Ser Glu Gly Arg Phe Met Gln Val Val Val Ser
145 150 155 160

Arg Ser Gly Pro Ser Thr Pro His Val Asn Phe Leu Leu Asp Ser His
165 170 175

Pro Val Ser Pro Glu Val Ile Val Glu His Thr Leu Asn Gln Asn Gly
180 185 190

Tyr Thr Leu Val Ile Thr Gly Lys Lys Ile Thr Lys Ile Pro Leu Asn
195 200 205

Gly Leu Gly Cys Arg His Phe Gln Ser Cys Ser Gln Cys Leu Ser Ala
210 215 220

Pro Pro Phe Val Gln Cys Gly Trp Cys His Asp Lys Cys Val Arg Ser
225 230 235 240

Traducción 10316W001_Sequence_Listing_ST25_2017_11_06

Glu Glu Cys Leu Ser Gly Thr Trp Thr Gln Gln Ile Cys Leu Pro Ala
 245 250 255

 Ile Tyr Lys Val Phe Pro Asn Ser Ala Pro Leu Glu Gly Gly Thr Arg
 260 265 270

 Leu Thr Ile Cys Gly Trp Asp Phe Gly Phe Arg Arg Asn Asn Lys Phe
 275 280 285

 Asp Leu Lys Lys Thr Arg Val Leu Leu Gly Asn Glu Ser Cys Thr Leu
 290 295 300

 Thr Leu Ser Glu Ser Thr Met Asn Thr Leu Lys Cys Thr Val Gly Pro
 305 310 315 320

 Ala Met Asn Lys His Phe Asn Met Ser Ile Ile Ile Ser Asn Gly His
 325 330 335

 Gly Thr Thr Gln Tyr Ser Thr Phe Ser Tyr Val Asp Pro Val Ile Thr
 340 345 350

 Ser Ile Ser Pro Lys Tyr Gly Pro Met Ala Gly Gly Thr Leu Leu Thr
 355 360 365

 Leu Thr Gly Asn Tyr Leu Asn Ser Gly Asn Ser Arg His Ile Ser Ile
 370 375 380

 Gly Gly Lys Thr Cys Thr Leu Lys Ser Val Ser Asn Ser Ile Leu Glu
 385 390 395 400

 Cys Tyr Thr Pro Ala Gln Thr Ile Ser Thr Glu Phe Ala Val Lys Leu
 405 410 415

 Lys Ile Asp Leu Ala Asn Arg Glu Thr Ser Ile Phe Ser Tyr Arg Glu
 420 425 430

 Asp Pro Ile Val Tyr Glu Ile His Pro Thr Lys Ser Phe Ile Ser Thr
 435 440 445

 Trp Trp Lys Glu Pro Leu Asn Ile Val Ser Phe Leu Phe Cys Phe Ala
 450 455 460

 Ser Gly Gly Ser Thr Ile Thr Gly Val Gly Lys Asn Leu Asn Ser Val
 465 470 475 480

 Ser Val Pro Arg Met Val Ile Asn Val His Glu Ala Gly Arg Asn Phe
 485 490 495

Traducción 10316W001_Sequence_Listing_ST25_2017_11_06

Thr Val Ala Cys Gln His Arg Ser Asn Ser Glu Ile Ile Cys Cys Thr
500 505 510

Thr Pro Ser Leu Gln Gln Leu Asn Leu Gln Leu Pro Leu Lys Thr Lys
515 520 525

Ala Phe Phe Met Leu Asp Gly Ile Leu Ser Lys Tyr Phe Asp Leu Ile
530 535 540

Tyr Val His Asn Pro Val Phe Lys Pro Phe Glu Lys Pro Val Met Ile
545 550 555 560

Ser Met Gly Asn Glu Asn Val Leu Glu Ile Lys Gly Asn Asp Ile Asp
565 570 575

Pro Glu Ala Val Lys Gly Glu Val Leu Lys Val Gly Asn Lys Ser Cys
580 585 590

Glu Asn Ile His Leu His Ser Glu Ala Val Leu Cys Thr Val Pro Asn
595 600 605

Asp Leu Leu Lys Leu Asn Ser Glu Leu Asn Ile Glu Trp Lys Gln Ala
610 615 620

Met Glu Val Ser Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Val
625 630 635 640

Leu Thr Ile Thr Leu Thr Pro Lys Val Thr Cys Val Val Val Asp Ile
645 650 655

Ser Lys Asp Asp Pro Glu Val Gln Phe Ser Trp Phe Val Asp Asp Val
660 665 670

Glu Val His Thr Ala Gln Thr Gln Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser
675 680 685

Thr Phe Arg Ser Val Ser Glu Leu Pro Ile Met His Gln Asp Trp Leu
690 695 700

Asn Gly Lys Glu Phe Lys Cys Arg Val Asn Ser Ala Ala Phe Pro Ala
705 710 715 720

Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Thr Lys Gly Arg Pro Lys Ala Pro
725 730 735

Gln Val Tyr Thr Ile Pro Pro Pro Lys Glu Gln Met Ala Lys Asp Lys

Val Ser Leu Thr Cys Met Ile Thr Asp Phe Phe Pro Glu Asp Ile Thr
755 760 765

Val Glu Trp Gln Trp Asn Gly Gln Pro Ala Glu Asn Tyr Lys Asn Thr
770 775 780

Gln Pro Ile Met Asp Thr Asp Gly Ser Tyr Phe Val Tyr Ser Lys Leu
785 790 795 800

Asn Val Gln Lys Ser Asn Trp Glu Ala Gly Asn Thr Phe Thr Cys Ser
805 810 815

Val Leu His Glu Gly Leu His Asn His His Thr Glu Lys Ser Leu Ser
820 825 830

His Ser Pro Gly Lys Glu
835

<210> 154
<211> 1100
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> sintética

<400> 154

Ser Thr Lys Lys Glu Val Phe Asn Ile Leu Gln Ala Ala Tyr Val Ser
1 5 10 15

Lys Pro Gly Ala Gln Leu Ala Arg Gln Ile Gly Ala Ser Leu Asn Asp
20 25 30

Asp Ile Leu Phe Gly Val Phe Ala Gln Ser Lys Pro Asp Ser Ala Glu
35 40 45

Pro Met Asp Arg Ser Ala Met Cys Ala Phe Pro Ile Lys Tyr Val Asn
50 55 60

Asp Phe Phe Asn Lys Ile Val Asn Lys Asn Asn Val Arg Cys Leu Gln
65 70 75 80

His Phe Tyr Gly Pro Asn His Glu His Cys Phe Asn Arg Thr Leu Leu
85 90 95

Arg Asn Ser Ser Gly Cys Glu Ala Arg Arg Asp Glu Tyr Arg Ala Glu
100 105 110

Traducción 10316W001_Sequence_Listing_ST25_2017_11_06

Phe Thr Thr Ala Leu Gln Arg Val Asp Leu Phe Met Gly Gln Phe Ser
 115 120 125
 Glu Val Leu Leu Thr Ser Ile Ser Thr Phe Val Lys Gly Asp Leu Thr
 130 135 140
 Ile Ala Asn Leu Gly Thr Ser Glu Gly Arg Phe Met Gln Val Val Val
 145 150 155 160
 Ser Arg Ser Gly Pro Ser Thr Pro His Val Asn Phe Leu Leu Asp Ser
 165 170 175
 His Pro Val Ser Pro Glu Val Ile Val Glu His Pro Leu Asn Gln Asn
 180 185 190
 Gly Tyr Thr Leu Val Val Thr Gly Lys Lys Ile Thr Lys Ile Pro Leu
 195 200 205
 Asn Gly Leu Gly Cys Arg His Phe Gln Ser Cys Ser Gln Cys Leu Ser
 210 215 220
 Ala Pro Pro Phe Val Gln Cys Gly Trp Cys His Asp Lys Cys Val Arg
 225 230 235 240
 Ser Glu Glu Cys Pro Ser Gly Thr Trp Thr Gln Gln Ile Cys Leu Pro
 245 250 255
 Ala Ile Tyr Lys Val Phe Pro Thr Ser Ala Pro Leu Glu Gly Gly Thr
 260 265 270
 Arg Leu Thr Ile Cys Gly Trp Asp Phe Gly Phe Arg Arg Asn Asn Lys
 275 280 285
 Phe Asp Leu Lys Lys Thr Arg Val Leu Leu Gly Asn Glu Ser Cys Thr
 290 295 300
 Leu Thr Leu Ser Glu Ser Thr Met Asn Thr Leu Lys Cys Thr Val Gly
 305 310 315 320
 Pro Ala Met Asn Lys His Phe Asn Met Ser Ile Ile Ile Ser Asn Gly
 325 330 335
 His Gly Thr Thr Gln Tyr Ser Thr Phe Ser Tyr Val Asp Pro Ile Ile
 340 345 350
 Thr Ser Ile Ser Pro Lys Tyr Gly Pro Met Ala Gly Gly Thr Leu Leu

355

360

365

Thr Leu Thr Gly Asn Tyr Leu Asn Ser Gly Asn Ser Arg His Ile Ser
 370 375 380

Ile Gly Gly Lys Thr Cys Thr Leu Lys Ser Val Ser Asn Ser Ile Leu
 385 390 395 400

Glu Cys Tyr Thr Pro Ala Gln Thr Ile Ser Thr Glu Phe Ala Val Lys
 405 410 415

Leu Lys Ile Asp Leu Ala Asn Arg Glu Thr Ser Ile Phe Ser Tyr Arg
 420 425 430

Glu Asp Pro Ile Val Tyr Glu Ile His Pro Thr Lys Ser Phe Ile Ser
 435 440 445

Gly Gly Ser Thr Ile Thr Gly Val Gly Lys Asn Leu His Ser Val Ser
 450 455 460

Val Pro Arg Met Val Ile Asn Val His Glu Ala Gly Arg Asn Phe Thr
 465 470 475 480

Val Ala Cys Gln His Arg Ser Asn Ser Glu Ile Ile Cys Cys Thr Thr
 485 490 495

Pro Ser Leu Gln Gln Leu Asn Leu Gln Leu Pro Leu Lys Thr Lys Ala
 500 505 510

Phe Phe Met Leu Asp Gly Ile Leu Ser Lys Tyr Phe Asp Leu Ile Tyr
 515 520 525

Val His Asn Pro Val Phe Lys Pro Phe Glu Lys Pro Val Met Ile Ser
 530 535 540

Met Gly Asn Glu Asn Val Leu Glu Ile Lys Gly Asn Asp Ile Asp Pro
 545 550 555 560

Glu Ala Val Lys Gly Glu Val Leu Lys Val Gly Asn Lys Ser Cys Glu
 565 570 575

Asn Ile His Leu His Ser Glu Ala Val Leu Cys Thr Val Pro Asn Asp
 580 585 590

Leu Leu Lys Leu Asn Ser Glu Leu Asn Ile Glu Trp Lys Gln Ala Ile
 595 600 605

Traducción 10316W001_Sequence_Listing_ST25_2017_11_06

Ser Ser Thr Val Leu Gly Lys Val Ile Val Gln Pro Asp Gln Asn Phe
610 615 620

Thr Gly Leu Ile Ala Gly Val Val Ser Ile Ser Ile Ala Leu Leu Leu
625 630 635 640

Leu Leu Gly Leu Phe Leu Trp Leu Lys Lys Arg Lys Gln Ile Lys Asp
645 650 655

Leu Gly Ser Glu Leu Val Arg Tyr Asp Ala Arg Val His Thr Pro His
660 665 670

Leu Asp Arg Leu Val Ser Ala Arg Ser Val Ser Pro Thr Thr Glu Met
675 680 685

Val Ser Asn Glu Ser Val Asp Tyr Arg Ala Thr Phe Pro Glu Asp Gln
690 695 700

Phe Pro Asn Ser Ser Gln Asn Gly Ser Cys Arg Gln Val Gln Tyr Pro
705 710 715 720

Leu Thr Asp Met Ser Pro Ile Leu Thr Ser Gly Asp Ser Asp Ile Ser
725 730 735

Ser Pro Leu Leu Gln Asn Thr Val His Ile Asp Leu Ser Ala Leu Asn
740 745 750

Pro Glu Leu Val Gln Ala Val Gln His Val Val Ile Gly Pro Ser Ser
755 760 765

Leu Ile Val His Phe Asn Glu Val Ile Gly Arg Gly His Phe Gly Cys
770 775 780

Val Tyr His Gly Thr Leu Leu Asp Asn Asp Gly Lys Lys Ile His Cys
785 790 795 800

Ala Val Lys Ser Leu Asn Arg Ile Thr Asp Ile Gly Glu Val Ser Gln
805 810 815

Phe Leu Thr Glu Gly Ile Ile Met Lys Asp Phe Ser His Pro Asn Val
820 825 830

Leu Ser Leu Leu Gly Ile Cys Leu Arg Ser Glu Gly Ser Pro Leu Val
835 840 845

Val Leu Pro Tyr Met Lys His Gly Asp Leu Arg Asn Phe Ile Arg Asn
850 855 860

Traducción 10316W001_Sequence_Listing_ST25_2017_11_06

Glu Thr His Asn Pro Thr Val Lys Asp Leu Ile Gly Phe Gly Leu Gln
 865 870 875 880
 Val Ala Lys Gly Met Lys Tyr Leu Ala Ser Lys Lys Phe Val His Arg
 885 890 895
 Asp Leu Ala Ala Arg Asn Cys Met Leu Asp Glu Lys Phe Thr Val Lys
 900 905 910
 Val Ala Asp Phe Gly Leu Ala Arg Asp Met Tyr Asp Lys Glu Tyr Tyr
 915 920 925
 Ser Val His Asn Lys Thr Gly Ala Lys Leu Pro Val Lys Trp Met Ala
 930 935 940
 Leu Glu Ser Leu Gln Thr Gln Lys Phe Thr Thr Lys Ser Asp Val Trp
 945 950 955 960
 Ser Phe Gly Val Leu Leu Trp Glu Leu Met Thr Arg Gly Ala Pro Pro
 965 970 975
 Tyr Pro Asp Val Asn Thr Phe Asp Ile Thr Val Tyr Leu Leu Gln Gly
 980 985 990
 Arg Arg Leu Leu Gln Pro Glu Tyr Cys Pro Asp Pro Leu Tyr Glu Val
 995 1000 1005
 Met Leu Lys Cys Trp His Pro Lys Ala Glu Met Arg Pro Ser Phe
 1010 1015 1020
 Ser Glu Leu Val Ser Arg Ile Ser Ala Ile Phe Ser Thr Phe Ile
 1025 1030 1035
 Gly Glu His Tyr Val His Val Asn Ala Thr Tyr Val Asn Val Lys
 1040 1045 1050
 Cys Val Ala Pro Tyr Pro Ser Leu Leu Ser Ser Glu Asp Asn Ala
 1055 1060 1065
 Asp Asp Glu Val Asp Thr Glu Gln Lys Leu Ile Ser Glu Glu Asp
 1070 1075 1080
 Leu Glu Gln Lys Leu Ile Ser Glu Glu Asp Leu His His His His
 1085 1090 1095
 His His
 1100

Traducción 10316W001_Sequence_Listing_ST25_2017_11_06

<210> 155
 <211> 936
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 155

Glu Cys Lys Glu Ala Leu Ala Lys Ser Glu Met Asn Val Asn Met Lys
 1 5 10 15

Tyr Gln Leu Pro Asn Phe Thr Ala Glu Thr Pro Ile Gln Asn Val Ile
 20 25 30

Leu His Glu His His Ile Phe Leu Gly Ala Thr Asn Tyr Ile Tyr Val
 35 40 45

Leu Asn Glu Glu Asp Leu Gln Lys Val Ala Glu Tyr Lys Thr Gly Pro
 50 55 60

Val Leu Glu His Pro Asp Cys Phe Pro Cys Gln Asp Cys Ser Ser Lys
 65 70 75 80

Ala Asn Leu Ser Gly Gly Val Trp Lys Asp Asn Ile Asn Met Ala Leu
 85 90 95

Val Val Asp Thr Tyr Tyr Asp Asp Gln Leu Ile Ser Cys Gly Ser Val
 100 105 110

Asn Arg Gly Thr Cys Gln Arg His Val Phe Pro His Asn His Thr Ala
 115 120 125

Asp Ile Gln Ser Glu Val His Cys Ile Phe Ser Pro Gln Ile Glu Glu
 130 135 140

Pro Ser Gln Cys Pro Asp Cys Val Val Ser Ala Leu Gly Ala Lys Val
 145 150 155 160

Leu Ser Ser Val Lys Asp Arg Phe Ile Asn Phe Phe Val Gly Asn Thr
 165 170 175

Ile Asn Ser Ser Tyr Phe Pro Asp His Pro Leu His Ser Ile Ser Val
 180 185 190

Arg Arg Leu Lys Glu Thr Lys Asp Gly Phe Met Phe Leu Thr Asp Gln
 195 200 205

Ser Tyr Ile Asp Val Leu Pro Glu Phe Arg Asp Ser Tyr Pro Ile Lys
 210 215 220

Traducción 10316W001_Sequence_Listing_ST25_2017_11_06

Tyr Val His Ala Phe Glu Ser Asn Asn Phe Ile Tyr Phe Leu Thr Val
 225 230 235 240
 Gln Arg Glu Thr Leu Asp Ala Gln Thr Phe His Thr Arg Ile Ile Arg
 245 250 255
 Phe Cys Ser Ile Asn Ser Gly Leu His Ser Tyr Met Glu Met Pro Leu
 260 265 270
 Glu Cys Ile Leu Thr Glu Lys Arg Lys Lys Arg Ser Thr Lys Lys Glu
 275 280 285
 Val Phe Asn Ile Leu Gln Ala Ala Tyr Val Ser Lys Pro Gly Ala Gln
 290 295 300
 Leu Ala Arg Gln Ile Gly Ala Ser Leu Asn Asp Asp Ile Leu Phe Gly
 305 310 315 320
 Val Phe Ala Gln Ser Lys Pro Asp Ser Ala Glu Pro Met Asp Arg Ser
 325 330 335
 Ala Met Cys Ala Phe Pro Ile Lys Tyr Val Asn Asp Phe Phe Asn Lys
 340 345 350
 Ile Val Asn Lys Asn Asn Val Arg Cys Leu Gln His Phe Tyr Gly Pro
 355 360 365
 Asn His Glu His Cys Phe Asn Arg Thr Leu Leu Arg Asn Ser Ser Gly
 370 375 380
 Cys Glu Ala Arg Arg Asp Glu Tyr Arg Thr Glu Phe Thr Thr Ala Leu
 385 390 395 400
 Gln Arg Val Asp Leu Phe Met Gly Gln Phe Ser Glu Val Leu Leu Thr
 405 410 415
 Ser Ile Ser Thr Phe Ile Lys Gly Asp Leu Thr Ile Ala Asn Leu Gly
 420 425 430
 Thr Ser Glu Gly Arg Phe Met Gln Val Val Val Ser Arg Ser Gly Pro
 435 440 445
 Ser Thr Pro His Val Asn Phe Leu Leu Asp Ser His Pro Val Ser Pro
 450 455 460
 Glu Val Ile Val Glu His Thr Leu Asn Gln Asn Gly Tyr Thr Leu Val

465 470 475 480
 Ile Thr Gly Lys Lys Ile Thr Lys Ile Pro Leu Asn Gly Leu Gly Cys
 485 490 495
 Arg His Phe Gln Ser Cys Ser Gln Cys Leu Ser Ala Pro Pro Phe Val
 500 505 510
 Gln Cys Gly Trp Cys His Asp Lys Cys Val Arg Ser Glu Glu Cys Leu
 515 520 525
 Ser Gly Thr Trp Thr Gln Gln Ile Cys Leu Pro Ala Ile Tyr Lys Val
 530 535 540
 Phe Pro Asn Ser Ala Pro Leu Glu Gly Gly Thr Arg Leu Thr Ile Cys
 545 550 555 560
 Gly Trp Asp Phe Gly Phe Arg Arg Asn Asn Lys Phe Asp Leu Lys Lys
 565 570 575
 Thr Arg Val Leu Leu Gly Asn Glu Ser Cys Thr Leu Thr Leu Ser Glu
 580 585 590
 Ser Thr Met Asn Thr Leu Lys Cys Thr Val Gly Pro Ala Met Asn Lys
 595 600 605
 His Phe Asn Met Ser Ile Ile Ile Ser Asn Gly His Gly Thr Thr Gln
 610 615 620
 Tyr Ser Thr Phe Ser Tyr Val Asp Pro Val Ile Thr Ser Ile Ser Pro
 625 630 635 640
 Lys Tyr Gly Pro Met Ala Gly Gly Thr Leu Leu Thr Leu Thr Gly Asn
 645 650 655
 Tyr Leu Asn Ser Gly Asn Ser Arg His Ile Ser Ile Gly Gly Lys Thr
 660 665 670
 Cys Thr Leu Lys Ser Val Ser Asn Ser Ile Leu Glu Cys Tyr Thr Pro
 675 680 685
 Ala Gln Thr Ile Ser Thr Glu Phe Ala Val Lys Leu Lys Ile Asp Leu
 690 695 700
 Ala Asn Arg Glu Thr Ser Ile Phe Ser Tyr Arg Glu Asp Pro Ile Val
 705 710 715 720

Traducción 10316W001_Sequence_Listing_ST25_2017_11_06

Tyr Glu Ile His Pro Thr Lys Ser Phe Ile Ser Gly Gly Ser Thr Ile
725 730 735

Thr Gly Val Gly Lys Asn Leu Asn Ser Val Ser Val Pro Arg Met Val
740 745 750

Ile Asn Val His Glu Ala Gly Arg Asn Phe Thr Val Ala Cys Gln His
755 760 765

Arg Ser Asn Ser Glu Ile Ile Cys Cys Thr Thr Pro Ser Leu Gln Gln
770 775 780

Leu Asn Leu Gln Leu Pro Leu Lys Thr Lys Ala Phe Phe Met Leu Asp
785 790 795 800

Gly Ile Leu Ser Lys Tyr Phe Asp Leu Ile Tyr Val His Asn Pro Val
805 810 815

Phe Lys Pro Phe Glu Lys Pro Val Met Ile Ser Met Gly Asn Glu Asn
820 825 830

Val Leu Glu Ile Lys Gly Asn Asp Ile Asp Pro Glu Ala Val Lys Gly
835 840 845

Glu Val Leu Lys Val Gly Asn Lys Ser Cys Glu Asn Ile His Leu His
850 855 860

Ser Glu Ala Val Leu Cys Thr Val Pro Asn Asp Leu Leu Lys Leu Asn
865 870 875 880

Ser Glu Leu Asn Ile Glu Trp Lys Gln Ala Ile Ser Ser Thr Val Leu
885 890 895

Gly Lys Val Ile Val Gln Pro Asp Gln Asn Phe Thr Glu Gln Lys Leu
900 905 910

Ile Ser Glu Glu Asp Leu Gly Gly Glu Gln Lys Leu Ile Ser Glu Glu
915 920 925

Asp Leu His His His His His His
930 935

<210> 156
<211> 13
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 156

Traducción 10316W001_Sequence_Listing_ST25_2017_11_06

Val Arg Arg Leu Lys Glu Thr Lys Asp Gly Phe Met Phe
1 5 10

<210> 157
<211> 11
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 157

Leu Ala Arg Gln Ile Gly Ala Ser Leu Asn Asp
1 5 10

<210> 158
<211> 35
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 158

Phe Ile Lys Gly Asp Leu Thr Ile Ala Asn Leu Gly Thr Ser Glu Gly
1 5 10 15

Arg Phe Met Gln Val Val Val Ser Arg Ser Gly Pro Ser Thr Pro His
20 25 30

Val Asn Phe
35

H4H13290P2	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16
H4H13291P2	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32
H4H13295P2	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48
H4H13300P2	49	50	51	52	53	54	55	56	57	58	59	60	61	62	63	64
H4H13299P2	65	66	67	68	69	70	71	72	73	74	75	76	77	78	79	80
H4H13301P2	81	82	83	84	85	86	87	88	89	90	91	92	93	94	95	96
H4H13302P2	97	98	99	100	101	102	103	104	105	106	107	108	109	110	111	112
H4H13306P2	113	114	115	116	117	118	119	120	121	122	123	124	125	126	127	128
H4H13309P2	129	130	131	132	133	134	135	136	137	138	139	140	141	142	143	144
H4H13311P2	145	146	147	148	149	150	151	152	153	154	155	156	157	158	159	160
H4H13312P2	161	162	163	164	165	166	167	168	169	170	171	172	173	174	175	176
H4H13313P2	177	178	179	180	181	182	183	184	185	186	187	188	189	190	191	192
H4H13316P2	193	194	195	196	197	198	199	200	201	202	203	204	205	206	207	208
H4H13318P2	209	210	211	212	213	214	215	216	217	218	219	220	221	222	223	224
H4H13319P2	225	226	227	228	229	230	231	232	233	234	235	236	237	238	239	240
H4H13325P2	241	242	243	244	245	246	247	248	249	250	251	252	253	254	255	256
H4H13331P2	257	258	259	260	261	262	263	264	265	266	267	268	269	270	271	272

FIG. 1

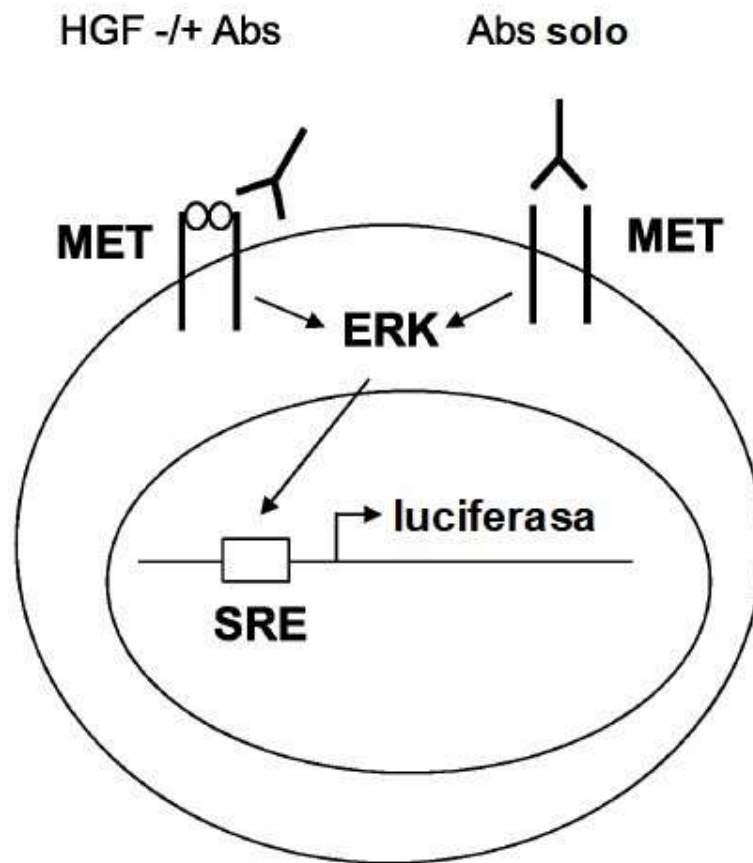


FIG. 2

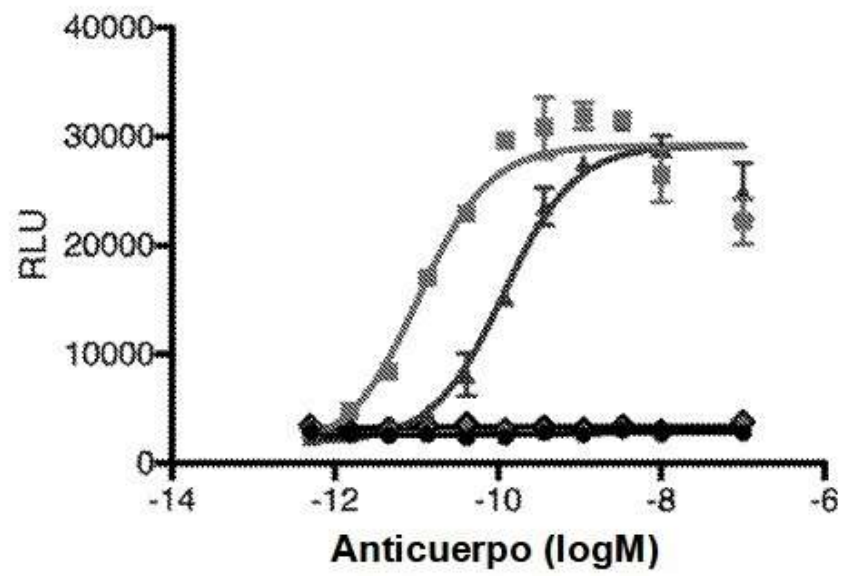


FIG. 3A

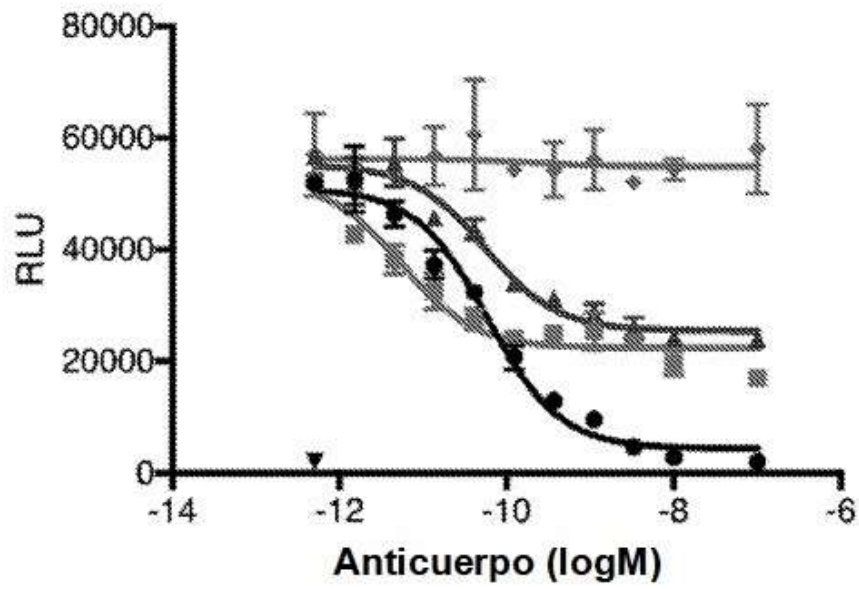


FIG. 3B

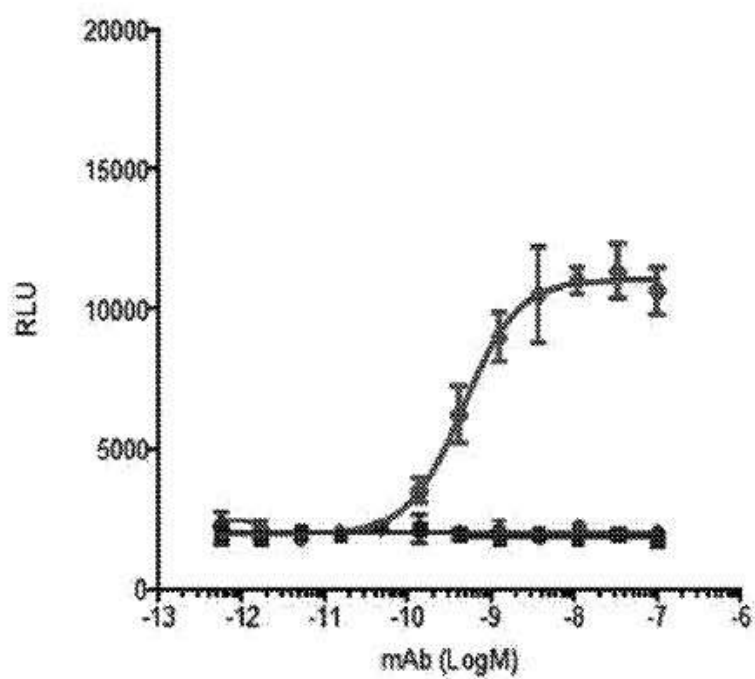


FIG. 4A

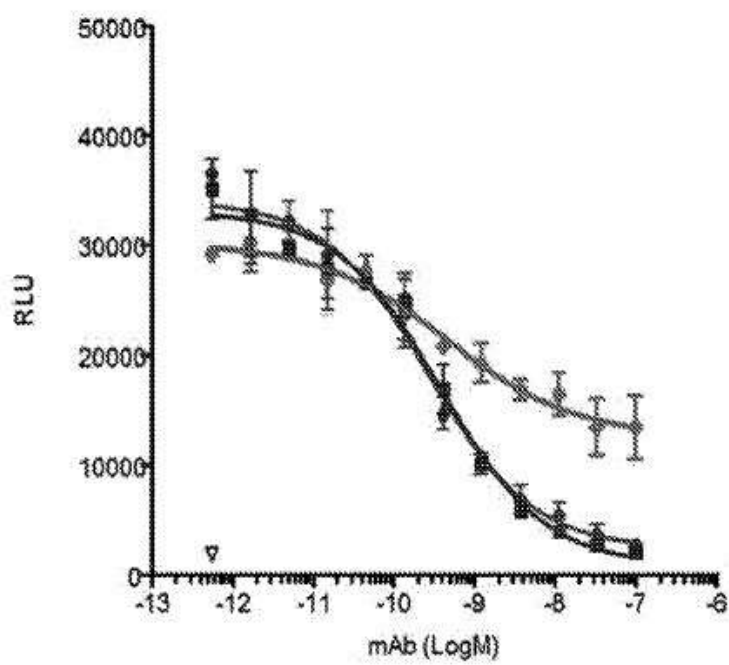
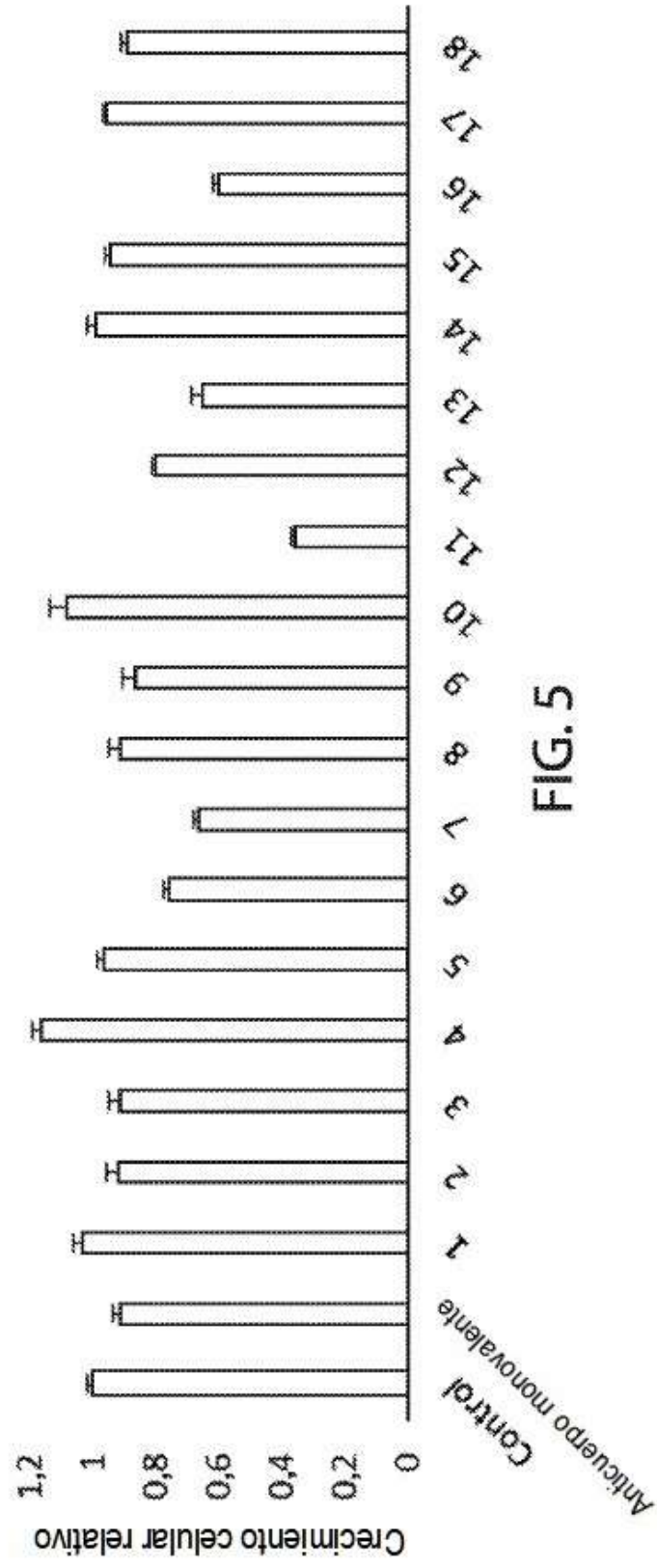


FIG. 4B



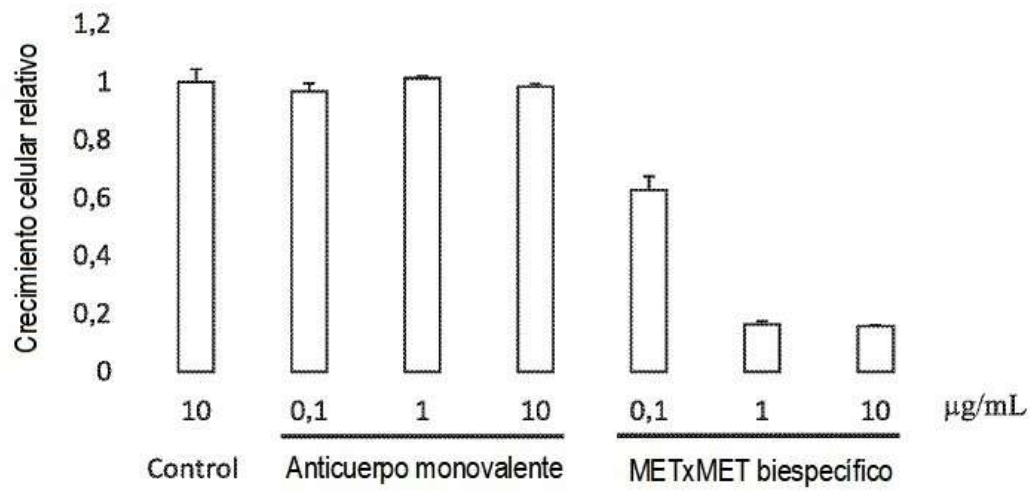


FIG. 6A

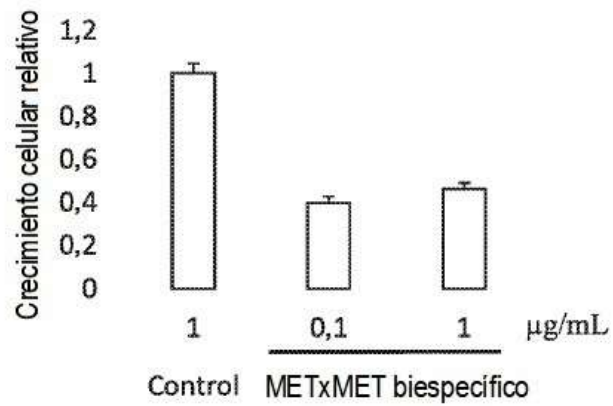


FIG. 6B

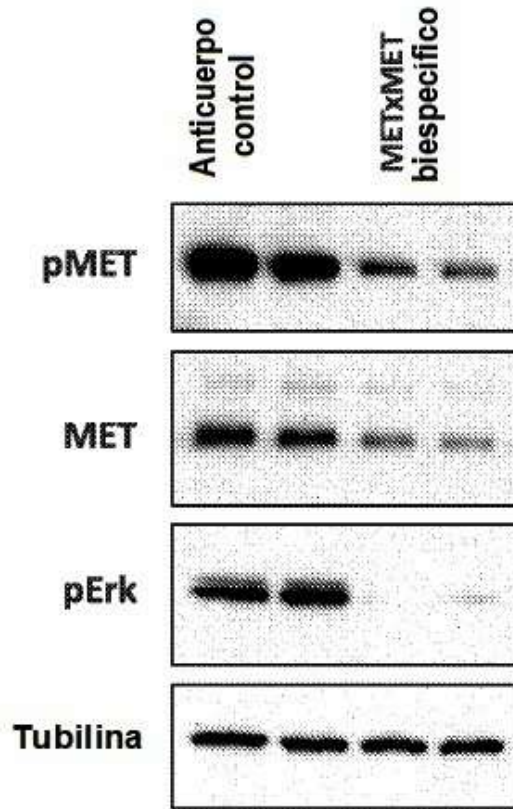


FIG. 7A

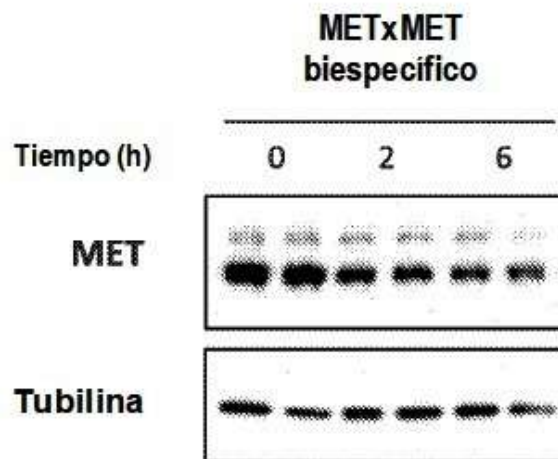


FIG. 7B

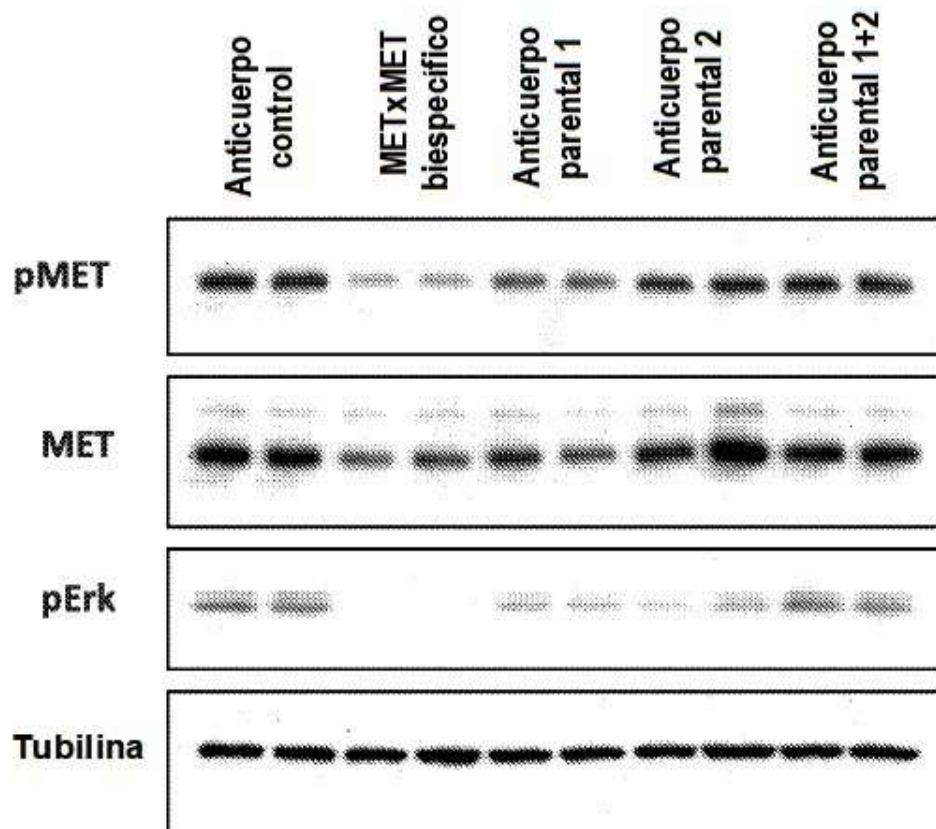


FIG. 8

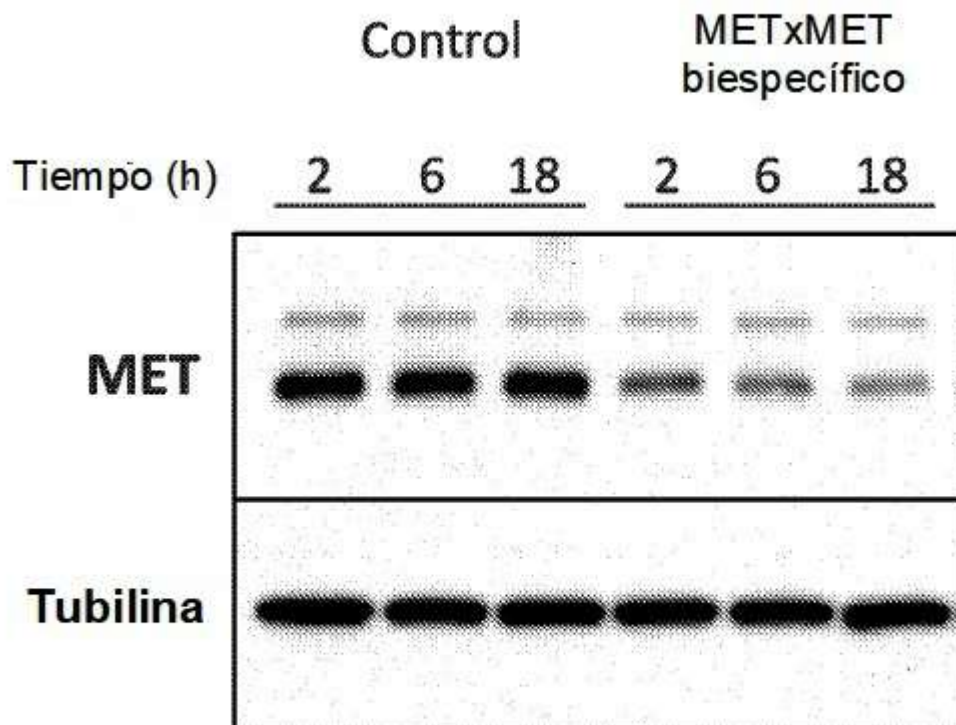


FIG. 9

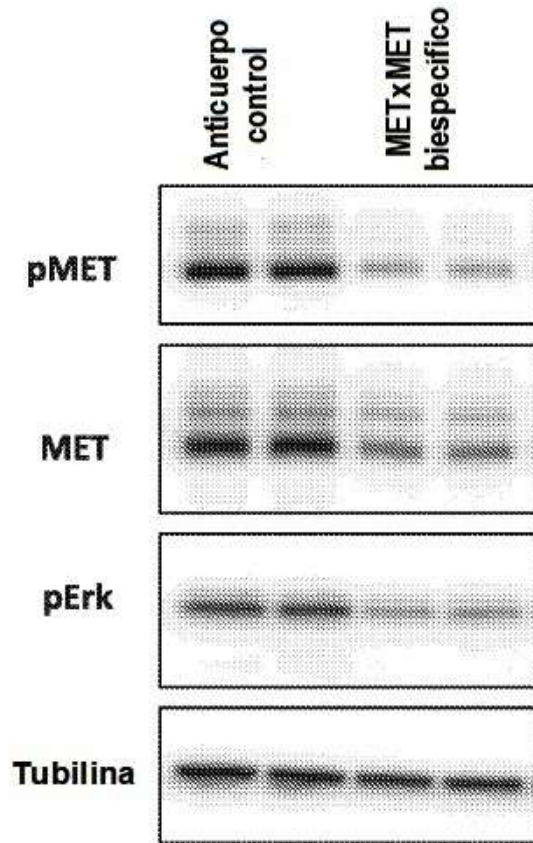


FIG. 10A

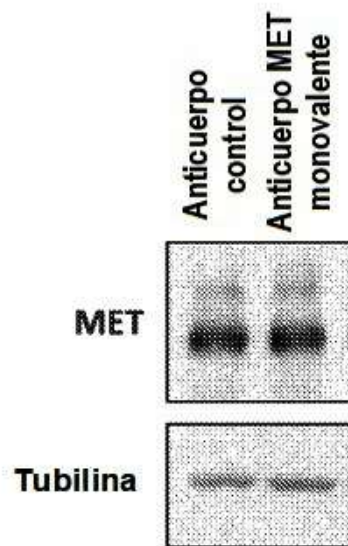


FIG. 10B

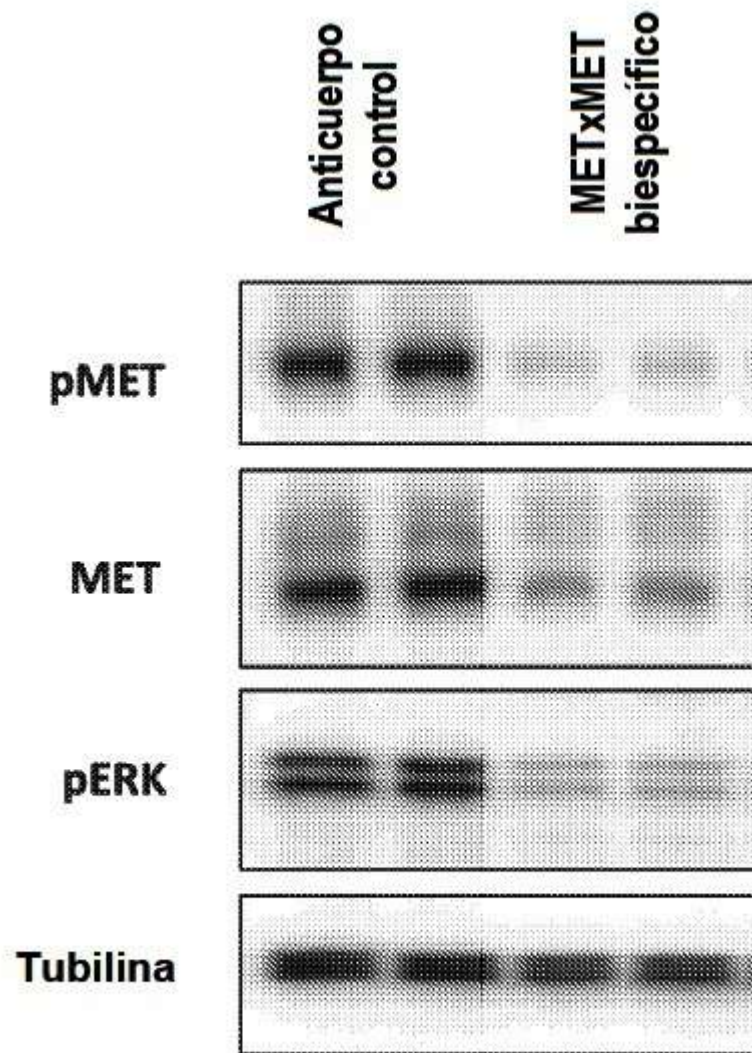


FIG. 11

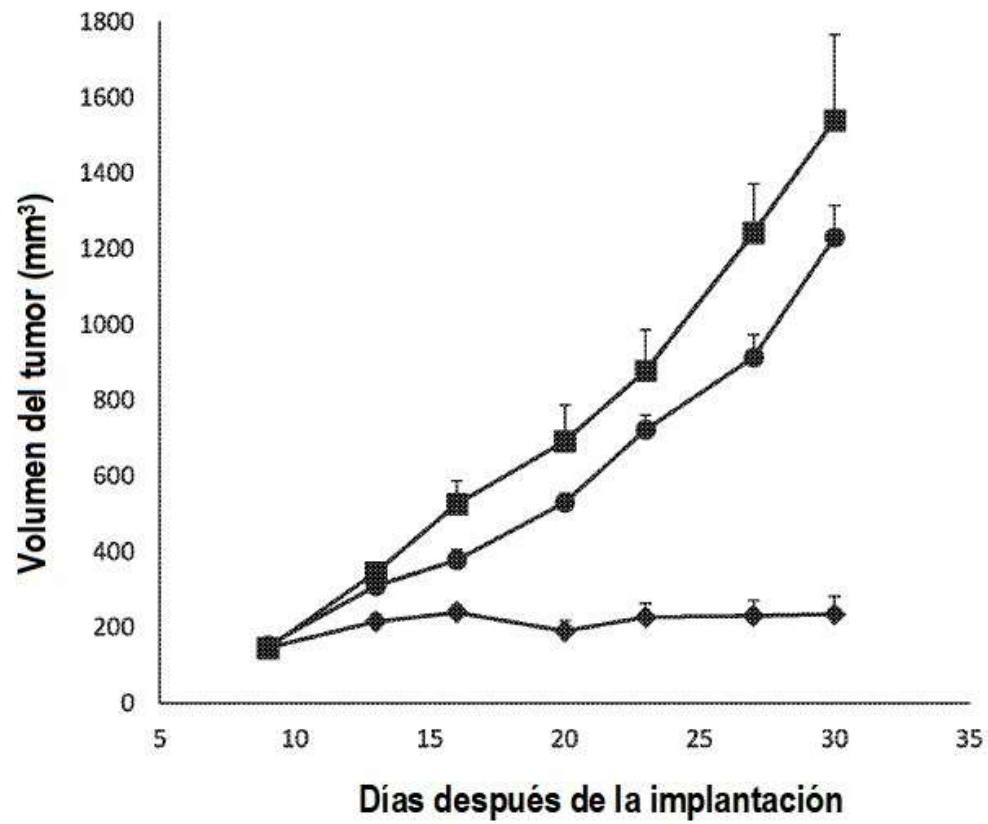


FIG. 12

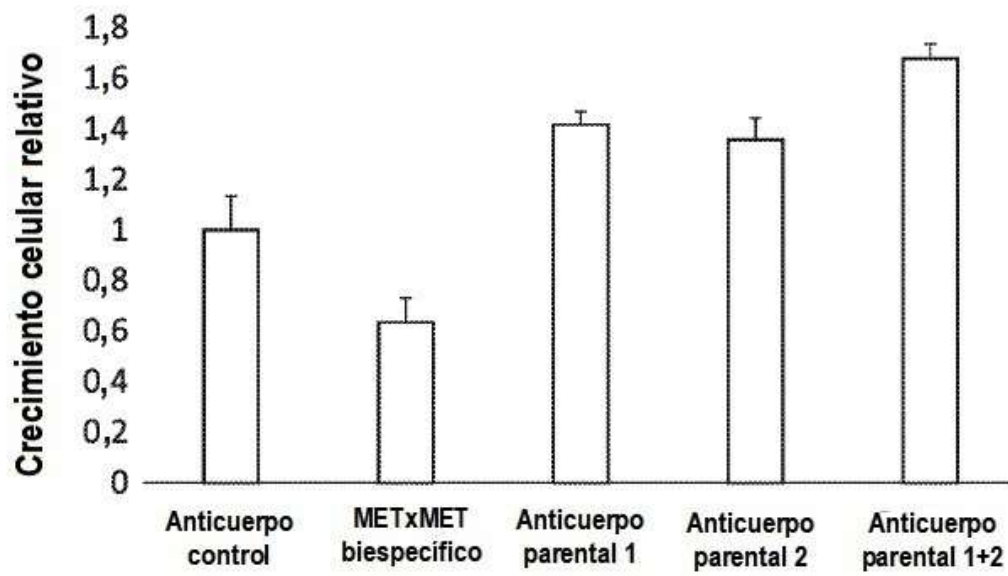


FIG. 13A

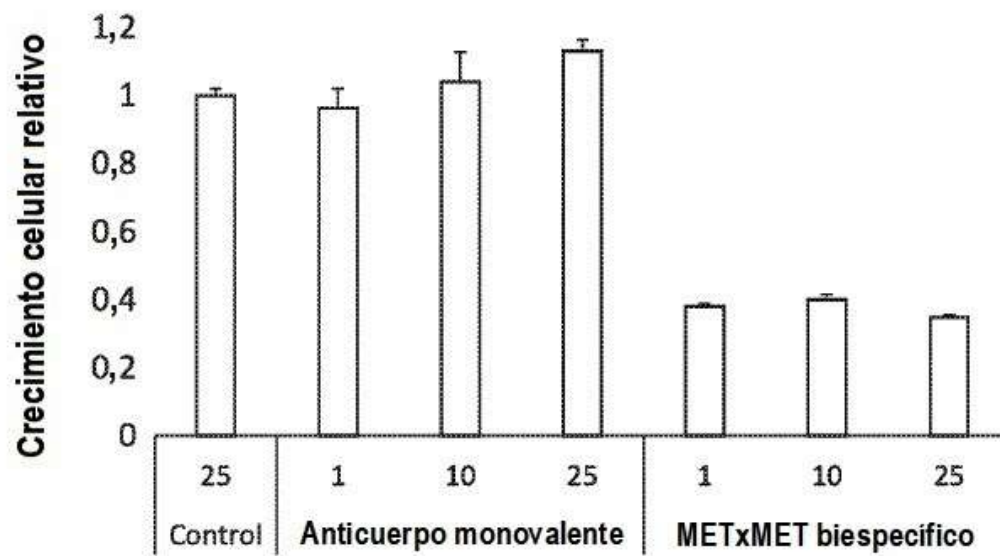


FIG. 13B

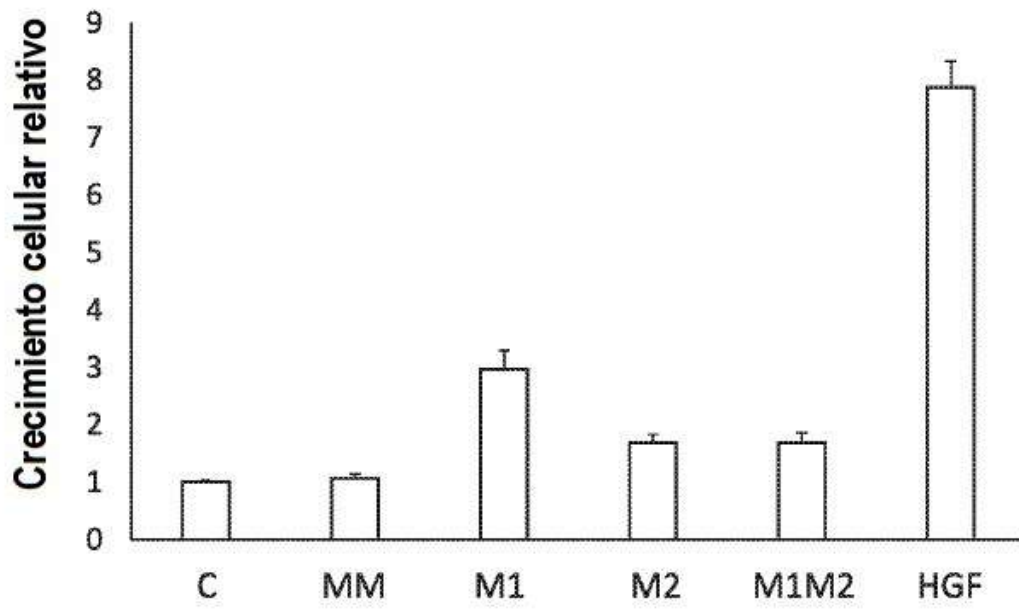


FIG. 14

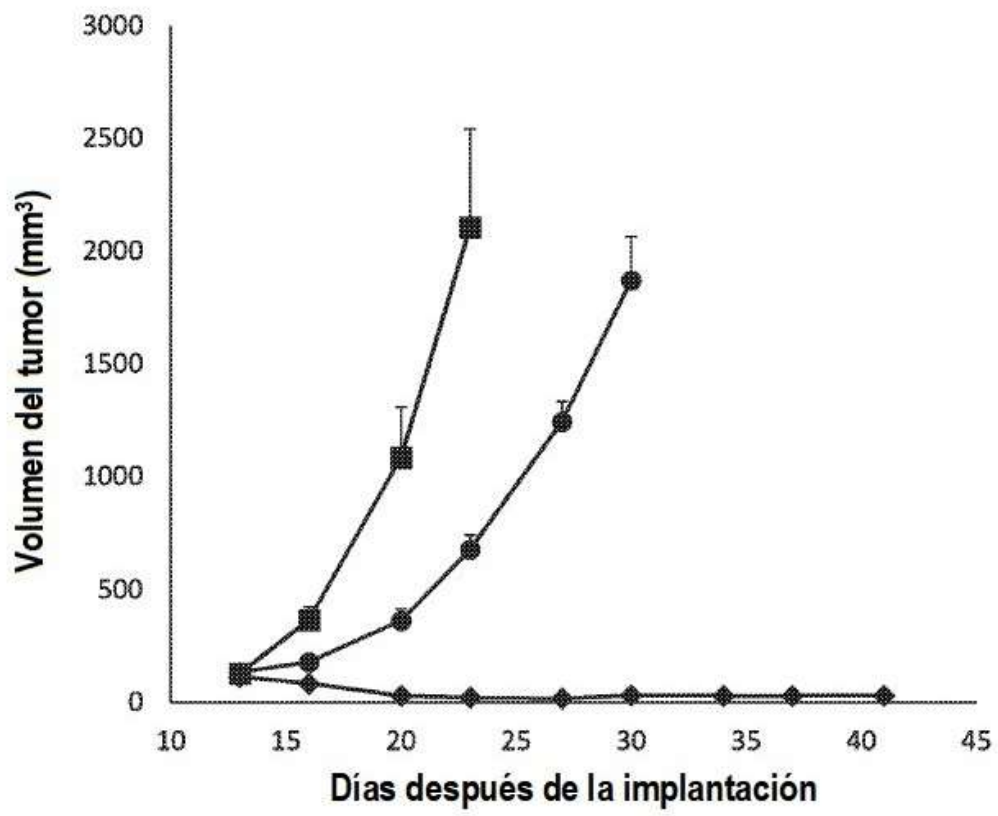


FIG. 15

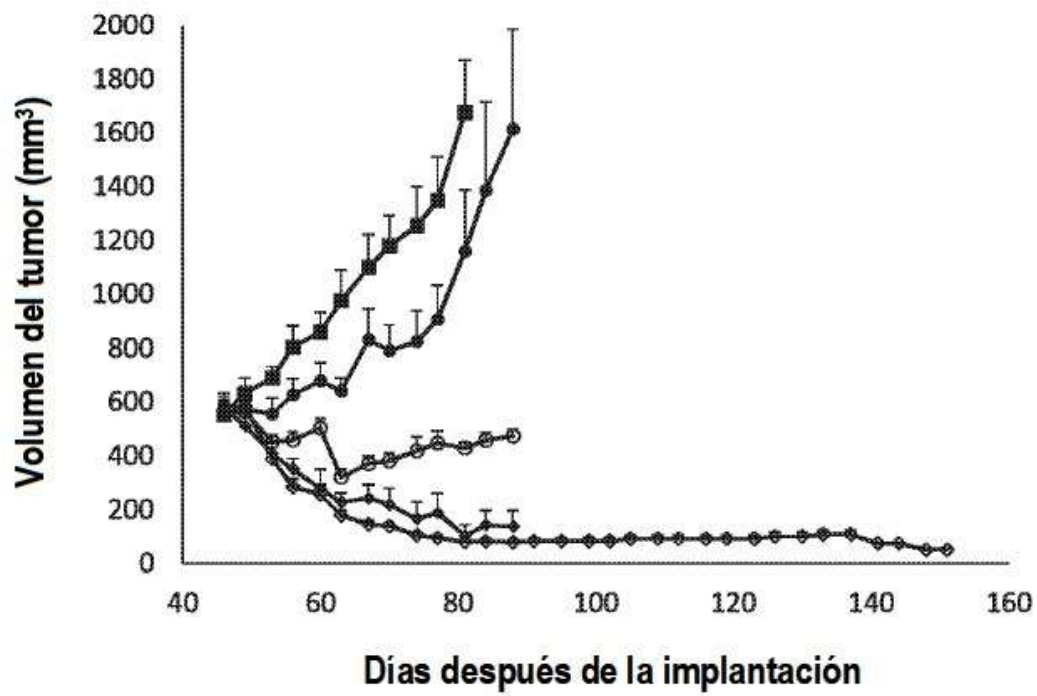


FIG. 16A

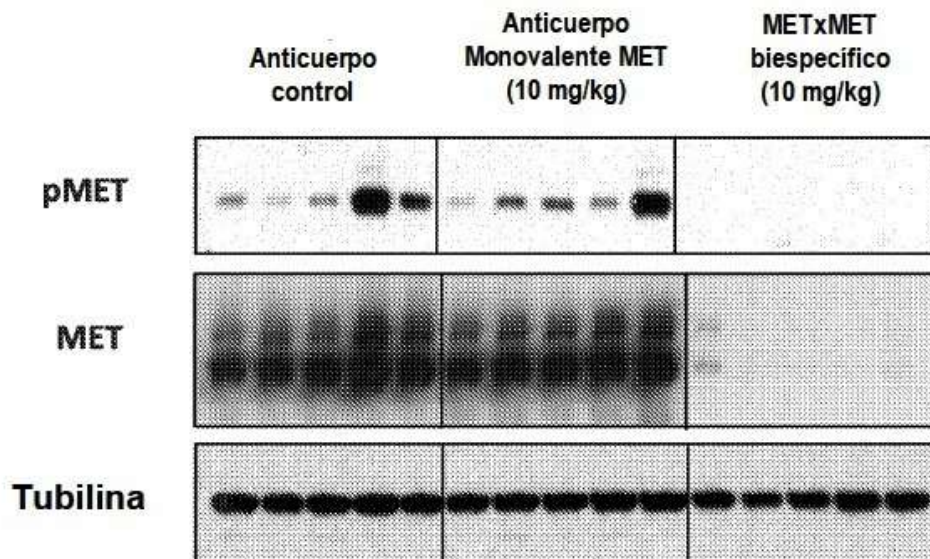


FIG. 16B

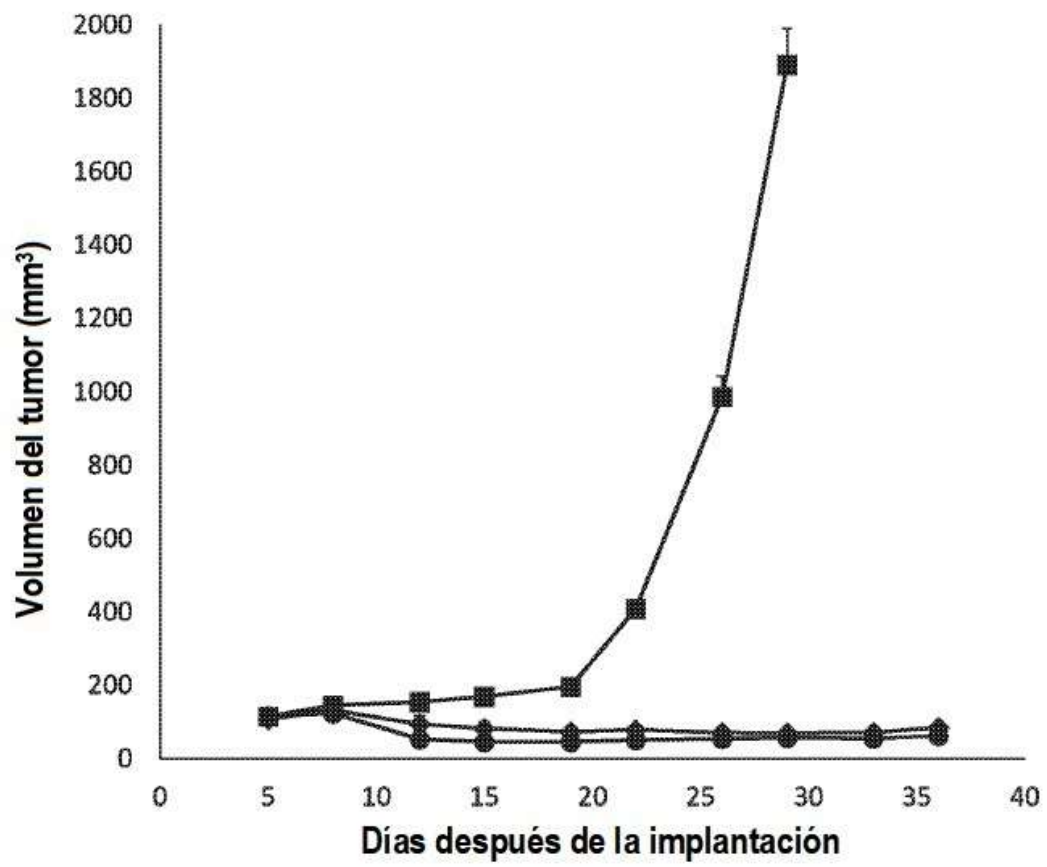


FIG. 17

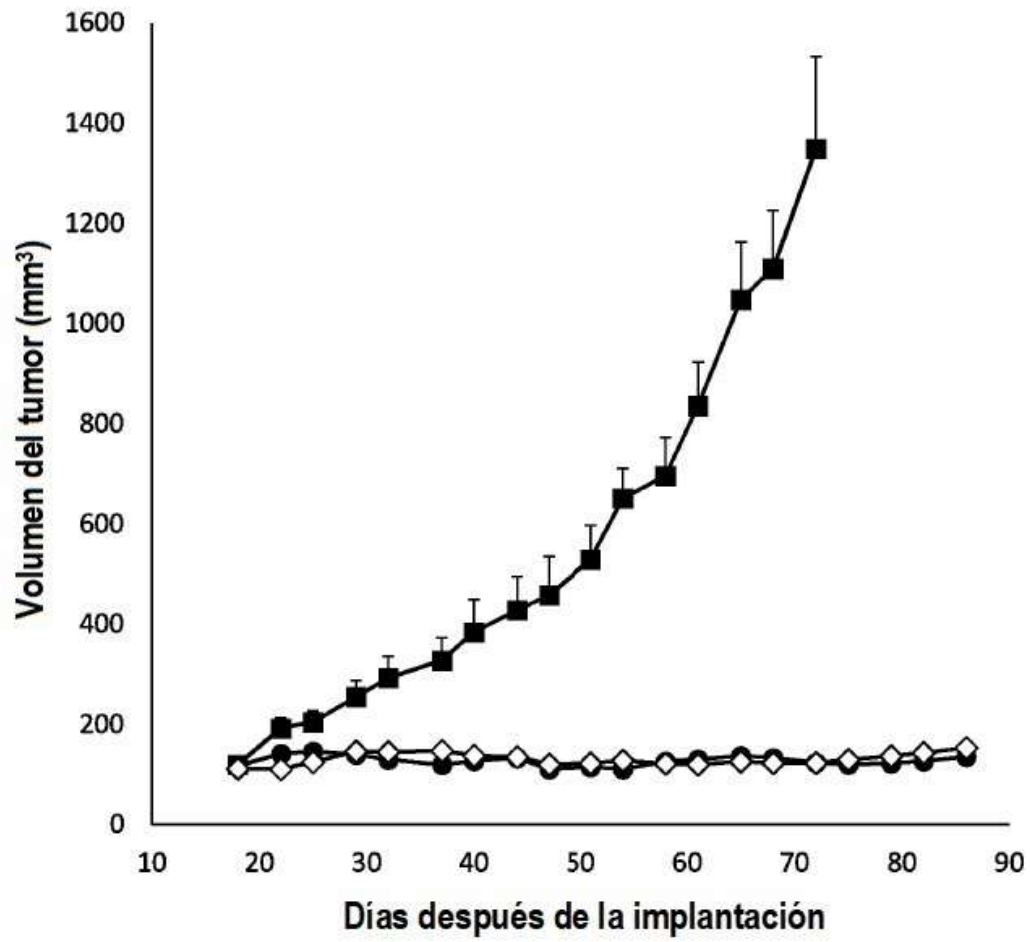


FIG. 18

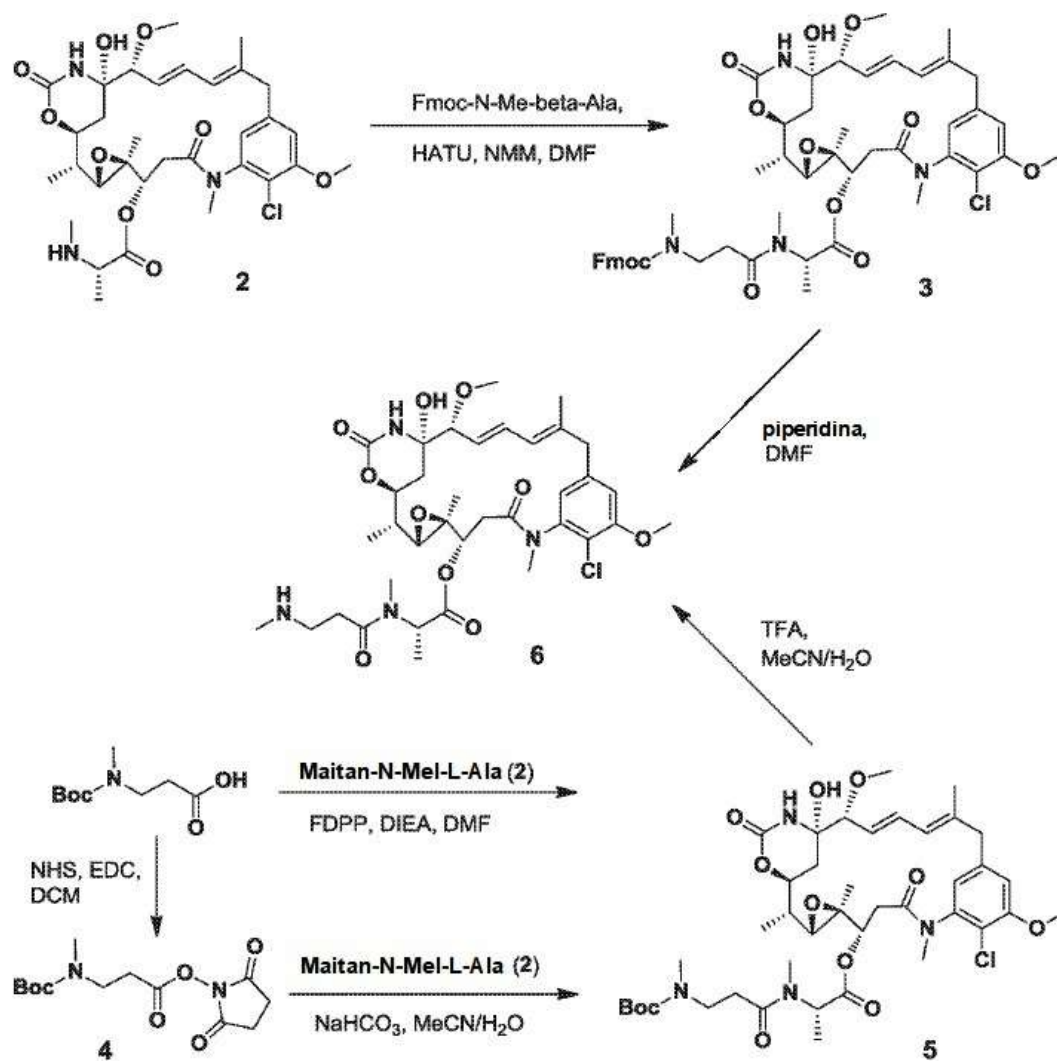


FIG. 19

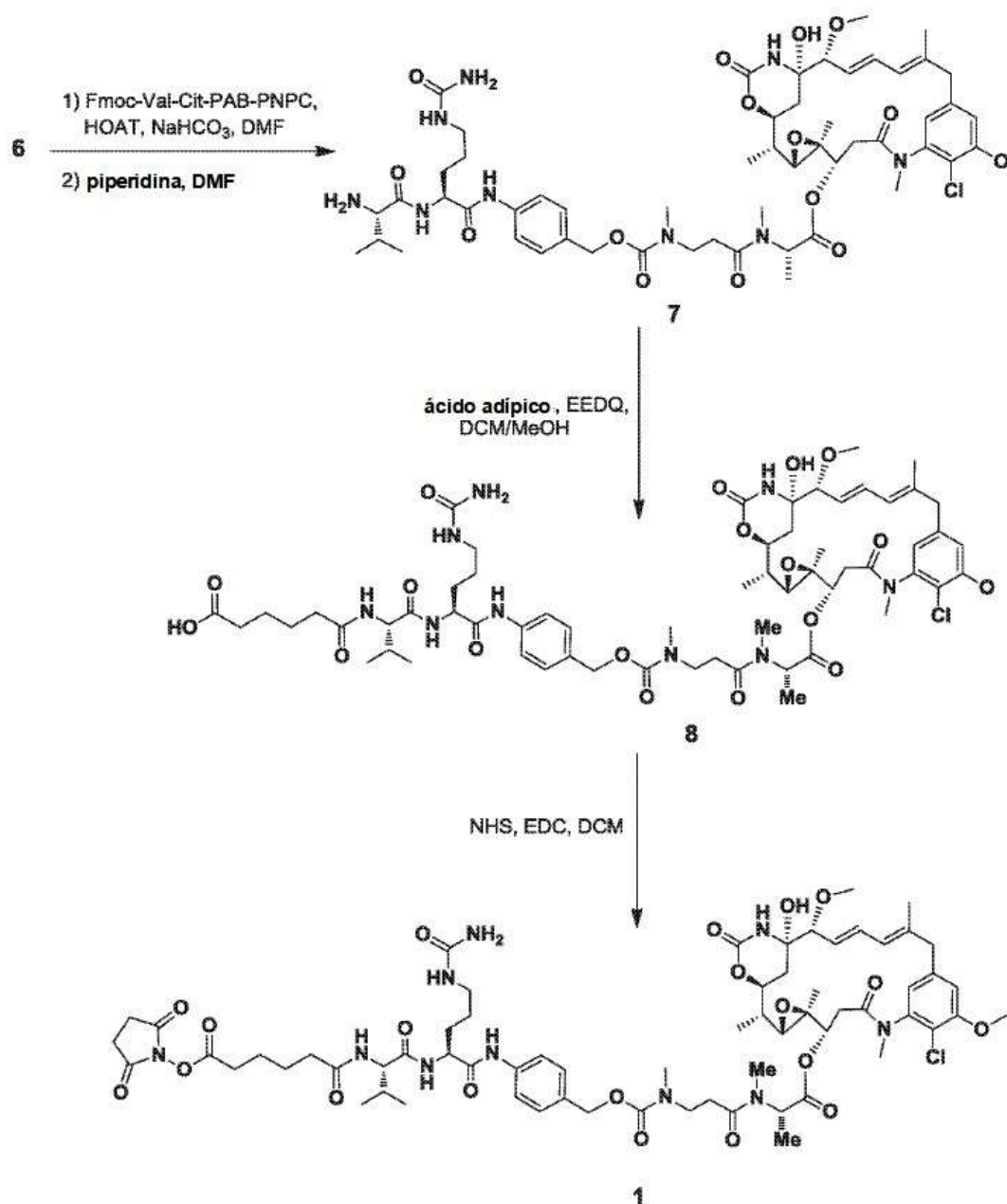


FIG. 20