



19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 346 205**

51 Int. Cl.:

**C07K 16/30** (2006.01) **C12N 15/13** (2006.01)

**C12N 5/10** (2006.01) **C07K 19/00** (2006.01)

**A61K 39/395** (2006.01) **C07K 16/46** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **03795898 .0**

96 Fecha de presentación : **16.12.2003**

97 Número de publicación de la solicitud: **1572748**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **14.09.2005**

54 Título: **Anticuerpo humanizado (h14.18) del anticuerpo 14.18 de ratón que se enlaza con GD2 y su fusión con la IL-2.**

30 Prioridad: **17.12.2002 US 433945 P**

73 Titular/es: **MERCK PATENT GmbH**  
**Frankfurter Strasse 250**  
**64293 Darmstadt, DE**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**13.10.2010**

72 Inventor/es: **Gillies, Stephen, D. y**  
**Lo, Kin-Ming**

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**13.10.2010**

74 Agente: **Carvajal y Urquijo, Isabel**

ES 2 346 205 T3

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

**DESCRIPCIÓN**

Anticuerpo humanizado (h14.18) del anticuerpo 14.18 de ratón que se enlaza con GD2 y su fusión con la IL-2.

Esta invención se refiere, de forma general, a anticuerpos modificados. De una manera más particular, la invención se refiere a anticuerpos modificados con una inmunogenicidad reducida, que se enlazan de manera específica con el glicosfingolípido GD2 de la superficie de las células humanas, y a su uso como agentes terapéuticos.

**Fundamento de la invención**

Durante años ha habido progresos significativos en el desarrollo de terapias basadas en anticuerpos. Por ejemplo, los investigadores han identificado, no solamente una variedad de marcadores específicos del cáncer, sino que, también, han identificado una variedad de anticuerpos, que se enlazan de manera específica con dichos marcadores. Los anticuerpos pueden ser usados para suministrar ciertas moléculas, por ejemplo una toxina o una mitad inmunoestimulante, por ejemplo, una citocina, a una célula cancerosa, que exprese el marcador, con el fin de destruir selectivamente a la célula cancerosa.

El anticuerpo 14.18 es un anticuerpo monoclonal derivado del ratón, que está dirigido contra el glicosfingolípido GD2 de la superficie celular. El GD2 es un disialogangliósido, que es expresado normalmente solo a un nivel significativo sobre las membranas de la superficie externa de las células neuronales, en la que su exposición al sistema inmune está limitada por medio de la barrera hematoencefálica.

Por el contrario, numerosas células tumorales tienen niveles anormales de expresión de glicosfingolípido en la superficie celular. Por ejemplo, el GD2 es expresado en las superficies de una gran variedad de células tumorales, con inclusión de los neuroblastomas, de los blastomas medulares, de los astrocitomas, de los melanomas, del cáncer pulmonar microcítico, de los osteosarcomas y de otros sarcomas del tejido blando. De este modo, el GD2 es un marcador específico de los tumores conveniente para dirigir a las células tumorales dominios proteicos inmunoestimulantes, con objeto de provocar una respuesta inmune efectiva contra las células tumorales para llevar a cabo su destrucción. Aún cuando el anticuerpo de ratón 14.18 (anticuerpo m14.18) puede contribuir a dirigir a estos dominios proteicos hacia las células tumorales, sus secuencias de aminoácido, derivadas del ratón, pueden menoscabar el deseado efecto terapéutico.

Cuando son administrados a un paciente, los anticuerpos pueden tener una inmunogenicidad asociada en el mamífero huésped. Esto es más probable que ocurra cuando los anticuerpos no son autólogos. Como consecuencia, la eficacia de las terapias basadas en anticuerpos está frecuentemente limitada por una respuesta inmunogénica dirigida contra el anticuerpo terapéutico. Esta respuesta inmunogénica queda acrecentada, de forma típica, cuando el anticuerpo se derive en su totalidad, o en parte, de un mamífero diferente del mamífero huésped, por ejemplo cuando el anticuerpo se derive de un ratón y el receptor sea un ser humano.

Para el uso clínico en seres humanos podría ser adecuado llevar a cabo una modificación de los anticuerpos derivados del ratón para proporcionar anticuerpos que se parezcan más a los humanos de tal manera, que se reduzca o que se minimice la inmunogenicidad del anticuerpo derivado del ratón. La inmunogenicidad del anticuerpo derivado del ratón puede ser reducida por medio de la generación de un anticuerpo quimérico, en el que las regiones constantes de un anticuerpo humano estén fusionadas con los dominios variables del ratón. Sin embargo, los dominios variables del ratón, remanentes, siguen siendo generalmente todavía inmunogénicos en los seres humanos y, por consiguiente, pueden menoscabar la eficacia de una terapia basada en anticuerpos.

Algunos intentos destinados a reducir la inmunogenicidad, tales como el "chapeado" y la "humanización" comprenden la introducción de un gran número de substituciones de aminoácidos y pueden interrumpir el enlace de un anticuerpo con un antígeno. El anticuerpo m14.18 se enlaza con el GD2 con una afinidad moderada. Por consiguiente, se espera que las mutaciones que disminuyan de manera significativa la afinidad del m14.18 con respecto al GD2, hagan que este sea menos efectivo para finalidades terapéuticas en seres humanos. Por lo tanto, existe una necesidad en el estado de la técnica de anticuerpos terapéuticos, que puedan hacer blanco de manera efectiva en el GD2 y que tengan una inmunogenicidad reducida cuando sean administrados a seres humanos.

La publicación WO 01/23573 y las publicaciones Derwent AN 2001-266163 XP002280627 (Kyowa Hakko Kogyo KK) describen un anticuerpo anti-GD2 quimérico recombinante específico con baja inmunoantigenicidad.

La publicación WO 02/066514 (Merck Patent GmbH) describe numerosas versiones del mAb 14.18, que han sido desinmunizadas por medio de la eliminación de epitopos de células T a partir del anticuerpo parental murino, de conformidad con un método informático específico. La solicitud de patente describe, sin indicación de datos biológicos, proteínas de fusión respectivas de anticuerpos 14.18 desinmunizados con la IL-2.

**Breve descripción de la invención**

De manera general, la presente invención proporciona una proteína de fusión, que comprende una forma modificada del anticuerpo m14.18, que es menos inmunogénica en los seres humanos pero que todavía mantiene la afinidad de enlace del m 14.18 con el GD2 humano.

De una manera más particular, la invención proporciona una proteína de fusión, que comprende una forma humanizada del anticuerpo m14.18 (anticuerpo hu14.18) en el que han sido substituidos varios aminoácidos específicos del ratón, en una o en varias regiones marco, por diversos aminoácidos con objeto de reducir su inmunogenicidad en los seres humanos. La invención proporciona fusiones del anticuerpo hu14.18 con una o más mitades no inmunoglobulina, preferentemente con la IL-2 para reforzar los efectos de la terapia inmune dirigida.

En un aspecto, la presente invención proporciona una región variable de anticuerpo, que incluye la secuencia de aminoácidos indicada en la SEQ ID NO: 1, que define una región variable de la cadena ligera de inmunoglobulina (región V<sub>L</sub>). En otro aspecto, la invención se refiere a una región variable de anticuerpo, que incluye la secuencia de aminoácidos indicada en la SEQ ID NO: 2, que define una región variable de la cadena pesada de inmunoglobulina (región V<sub>H</sub>). En una realización, la invención proporciona una región variable de anticuerpo, en la que la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1 está enlazada con la secuencia de aminoácidos indicada en la SEQ ID NO: 2. Las secuencias de aminoácidos pueden estar enlazadas, tal como por medio de un enlace de disulfuro o por medio de un enlace peptídico.

En otro aspecto, la invención se refiere a una región variable de anticuerpo, se que enlaza de manera específica con el GD2 y que incluye, al menos, los aminoácidos 1-23 de la SEQ ID NO: 1, los aminoácidos 1-25 de la SEQ ID NO: 2, o los aminoácidos 67-98 de la SEQ ID NO: 2. Estas secuencias definen regiones marco en las regiones variables de inmunoglobulina del anticuerpo hu14.18. Las regiones marco están descritas con mayor detalle más adelante.

Un aspecto de la invención se refiere a un método para dirigir una célula con GD2 en su superficie e incluye la administración a un paciente de una región variable de anticuerpo de la presente invención. En una realización, la célula diana es una célula tumoral. Otros aspectos de la invención incluyen un ácido nucleico, que codifica la región variable del anticuerpo o una célula, que incluye este ácido nucleico, que puede ser administrado a un paciente o bien que puede ser utilizado para una producción de proteínas *in vitro*.

De la misma manera, la invención proporciona un polipéptido, que incluye una región variable de anticuerpo de la invención y una porción Fc, que comprende, al menos, un dominio CH<sub>2</sub>, ácidos nucleicos, que codifican al polipéptido, células, que incluyen los ácidos nucleicos, y métodos para dirigir una célula con GD2 en su superficie por medio de la administración a un paciente del polipéptido, del ácido nucleico o de la célula. En algunas realizaciones de la invención, la porción Fc se deriva de la IgG1.

La región variable del anticuerpo está enlazada, con o sin una porción Fc interviniente, con una mitad no inmunoglobulina. De manera específica, la mitad no inmunoglobulina es una citocina.

Debe entenderse que las características de las diversas realizaciones aquí descritas no son mutuamente excluyentes y que pueden existir en diversas combinaciones y permutaciones.

## Descripción de los dibujos

La figura 1A muestra la secuencia de aminoácidos de una región variable de cadena ligera de inmunoglobulina, de conformidad con la invención.

La figura 1B muestra la secuencia de aminoácidos de una región variable de cadena pesada de inmunoglobulina, de conformidad con la invención.

Las figuras 2A-D muestran la secuencia de nucleótidos de un vector de expresión, que incluye los constructos de ácido nucleico, que codifican una proteína de fusión de una cadena ligera de inmunoglobulina y de una cadena pesada de inmunoglobulina-IL-2, de conformidad con la invención.

La figura 3A muestra la secuencia de aminoácidos de una cadena ligera de inmunoglobulina, de conformidad con la invención.

La figura 3B muestra la secuencia de aminoácidos de una cadena pesada de inmunoglobulina, de conformidad con la invención.

## Descripción detallada de la invención

La presente invención proporciona una proteína de fusión, que comprende una forma modificada del anticuerpo m14.18, que es menos inmunogénica en seres humanos, pero que todavía es capaz de enlazarse de forma específica con el GD2 humano. La inmunogenicidad reducida es proporcionada por uno o varias secuencias alteradas de aminoácidos en los dominios variables de la inmunoglobulina. El anticuerpo es adecuado para llevar a cabo el tratamiento de tumores positivos al GD2, de manera particular cuando esté fusionado con una citocina o con otro inmunomodulador.

Se entenderá que los términos “anticuerpo” e “inmunoglobulina”, tal como son usados aquí, quieren indicar (i) un anticuerpo intacto (por ejemplo, un anticuerpo monoclonal o un anticuerpo policlonal), (ii) porciones de los mismos que se enlazan con el antígeno, con inclusión, por ejemplo, de un fragmento Fab, un fragmento Fab', un fragmento (Fab')<sub>2</sub>, de un fragmento Fv, de un locus de enlace del anticuerpo monocatenario, de un sFv, (iii) anticuerpos biespecíficos y porciones de enlace los antígenos de los mismos, y (iv) anticuerpos multiespecíficos y porciones de enlace de los antígenos de los mismos.

Se entenderá que los términos “se enlaza de manera específica”, “enlaza de forma específica” y “de enlace específico”, tal como se utilizan aquí, quieren indicar que el anticuerpo tiene una afinidad de enlace para un antígeno particular de, al menos, aproximadamente  $10^6 \text{ M}^{-1}$ , de una manera preferente de, al menos, aproximadamente  $10^7 \text{ M}^{-1}$ , de una manera más preferente de, al menos, aproximadamente  $10^8 \text{ M}^{-1}$  y, en el caso más preferente, de, al menos, aproximadamente  $10^{10} \text{ M}^{-1}$ .

Se entenderá que los términos “regiones marco” y “FRs”, tal como son usados aquí, quieren indicar las regiones de una región variable de inmunoglobulina adyacente a las Regiones que Determinan la Complementaridad (Complementarity-Determining Regions CDRs). Las CDRs son las porciones de una región variable de inmunoglobulina, que interactúa fundamentalmente con un antígeno. Tal como se muestra en la figura 1, ambas regiones V<sub>H</sub> y V<sub>L</sub> contienen cuatro FRs y están localizadas dentro de las porciones recuadradas de las secuencias de aminoácidos.

De forma particular, con referencia a la secuencia de aminoácidos, que está mostrada en la figura 1A (SEQ ID NO: 1), las FRs de cadena ligera están definidas por las secuencias de aminoácidos desde Asp1 hasta Cys23 (huV<sub>L</sub>FR1), desde His39 hasta His54 (huV<sub>L</sub>FR2), desde Gly62 hasta Cys93 (huV<sub>L</sub>FR3), y desde Phe104 hasta Lys113 (huV<sub>L</sub>FR4). Con referencia a la secuencia de aminoácidos, que está mostrada en la figura 1B (SEQ ID NO: 2), las FRs de cadena pesada están definidas por las secuencias de aminoácidos desde Glu1 hasta Ser25 (huV<sub>H</sub>FR1), desde Trp36 hasta Gly49 (huV<sub>H</sub>FR2), desde Arg67 hasta Ser98 (huV<sub>H</sub>FR3), y desde Trp103 hasta Ser113 (huV<sub>H</sub>FR4).

### 30 *Secuencias de proteínas de la invención*

La presente invención caracteriza anticuerpos que se enlazan, preferentemente de forma específica, con el glicosíngolípido GD2 de la superficie de las células humanas y que tienen regiones modificadas, que se derivan del anticuerpo m14.18. Las secuencias de aminoácidos V<sub>H</sub> o V<sub>L</sub> (o ambas) están modificadas o humanizadas con objeto de reducir su inmunogenicidad cuando son administradas a un ser humano. De conformidad con la invención, el anticuerpo m14.18 puede ser humanizado, por ejemplo, por medio de la utilización de métodos de desinmunización en los que son eliminados los epitopos potenciales de las células T o son debilitados por medio de la introducción de mutaciones, que reduzcan el enlace de un epitopo peptídico con una molécula MHC clase II (véanse, por ejemplo, las publicaciones WO98/52976 y WO00/34317). De manera alternativa, los epitopos no humanos de las células T son mutados de manera que correspondan a los epitopos propios humanos, que están presentes en los anticuerpos humanos (véase, por ejemplo, la patente norteamericana U.S. No. 5,712,120). La presente invención proporciona anticuerpos del GD2 que tienen regiones V<sub>L</sub> y V<sub>H</sub>, que incluyen, al menos, una secuencia FR humanizada, con lo que se reduce la inmunogenicidad cuando son administrados a un ser humano.

#### 45 *I. Regiones variables de cadena pesada y de cadena ligera*

Tal como se ha mencionado precedentemente, el hu14.18 incluye regiones variables humanizadas, que se derivan del anticuerpo m14.18, que mantiene el enlace específico con el antígeno GD2 humano. En algunas realizaciones de la invención, la región V<sub>L</sub> del anticuerpo hu14.18 incluye el siguiente polipéptido:

55 **D-V-V-M-T-Q-T-P-L-S-L-P-V-T-P-G-E-P-A-S-I-S-C-R-S-S-Q-S-L-V-H-R-  
N-G-N-T-Y-L-H-W-Y-L-Q-K-P-G-Q-S-P-K-L-L-I-H-K-V-S-N-R-F-S-G-V-P-  
D-R-F-S-G-S-G-S-G-T-D-F-T-L-K-I-S-R-V-E-A-E-D-L-G-V-Y-F-C-S-Q-S-  
T-H-V-P-P-L-T-F-G-A-G-T-K-L-E-L-K (SEQ ID NO: 1).**

En realizaciones particulares, el anticuerpo hu14.18 incluye una FR1 de cadena ligera, que está definida por los residuos 1 hasta 23 de la SEQ ID NO: 1, concretamente definida por D-V-V-M-T-Q-T-P-L-S-L-P-V-T-P-G-E-P-A-S-I-S-C(huV<sub>L</sub>FR1).

En otras realizaciones de la invención, la región V<sub>H</sub> del anticuerpo hu14.18 incluye el siguiente polipéptido:

**E-V-Q-L-V-Q-S-G-A-E-V-E-K-P-G-A-S-V-K-I-S-C-K-A-S-G-S-S-F-T-G-Y-**  
**N-M-N-W-V-R-Q-N-I-G-K-S-L-E-W-I-G-A-I-D-P-Y-Y-G-G-T-S-Y-N-Q-K-F-**

**K-G-R-A-T-L-T-V-D-K-S-T-S-T-A-Y-M-H-L-K-S-L-R-S-E-D-T-A-V-Y-Y-C-**  
**V-S-G-M-E-Y-W-G-Q-G-T-S-V-T-V-S-S (SEQ ID NO: 2).**

En realizaciones particulares, el anticuerpo hu14.18 incluye una FR1 de cadena pesada, que está definida por los residuos 1 hasta 25 de la SEQ ID NO: 2, concretamente definida por E-V-Q-L-V-Q-S-G-A-E-V-E-K-P-G-A-S-V-K-I-S-C-K-A-S (huV<sub>H</sub>FR1).

En otras realizaciones de la invención, el anticuerpo hu14.18 incluye una FR3 de cadena pesada, que está representada por los residuos 67 hasta 98 de la SEQ ID NO: 2, concretamente definida por R-A-T-L-T-V-D-K-S-T-S-T-A-Y-M-H-L-K-S-L-R-S-E-D-T-A-V-Y-Y-C-V-S (huV<sub>H</sub>FR3).

De igual modo, quedan abarcadas en el ámbito de la presente invención diversas combinaciones de las realizaciones precedentes. Por ejemplo, el anticuerpo hu14.18 puede incluir la secuencia V<sub>L</sub> indicada en la SEQ ID NO: 1 y la secuencia V<sub>H</sub> indicada en la SEQ ID NO: 2. Las regiones V<sub>L</sub> y V<sub>H</sub> pueden estar enlazadas por medio de un enlace de disulfuro o por medio de un enlace peptídico, en función del modo en que estén construidas sus secuencias de ácidos nucleicos. En general, las regiones V están enlazadas por medio de un enlace de disulfuro cuando sus secuencias sean codificadas en constructos de ADN independientes. Por el contrario, las regiones V están enlazadas de forma típica por medio de un enlace peptídico cuando sus secuencias sean codificadas en un constructo de ADN monocatenario.

De la misma manera, la presente invención propone un anticuerpo, que se enlaza de forma específica con el GD2 y que incluye, al menos, una porción de las regiones V humanizadas. Por ejemplo, el anticuerpo hu14.18 puede incluir una región V<sub>L</sub>, tal como se ha definido por medio de la SEQ ID NO:1 y una región V<sub>H</sub>, que tenga, al menos, una FR humanizada, tal como la huV<sub>H</sub>FR o la huV<sub>H</sub>FR2. De manera alternativa, el anticuerpo de la presente invención puede incluir una región V<sub>H</sub>, tal como se ha definido por medio de la SEQ ID NO: 2 y una región V<sub>L</sub>, que tenga, al menos, una FR humanizada, tal como la huV<sub>L</sub>FR1. De la misma manera, el anticuerpo hu14.18 puede incluir una región V<sub>H</sub>, que tenga, al menos, una FR humanizada y/o una región V<sub>L</sub>, que tenga, al menos, una FR humanizada.

En ciertas realizaciones de la invención, la región variable de cadena ligera y la región variable de cadena pesada pueden estar acopladas, respectivamente, con una región constante de cadena ligera y con una región constante de cadena pesada de una inmunoglobulina. Las cadenas ligeras de inmunoglobulina tienen regiones constantes, que se denominan cadenas kappa o cadenas lambda. En una realización particular de la invención, la región constante de cadena ligera es una cadena kappa. Las regiones constantes de cadena pesada, y diversas modificaciones y combinaciones de las mismas están tratadas en detalle a continuación

## II. Porción Fc

Los dominios variables del anticuerpo de la presente invención están fusionados, de manera opcional, con una porción Fc. Tal como se utiliza aquí, la porción Fc comprende dominios, que se derivan de la región constante de cadena pesada de una inmunoglobulina, de manera preferente de una inmunoglobulina humana, que incluye un fragmento, análogo, variante, mutante o derivado de la región constante. La región constante de una cadena pesada de inmunoglobulina está definida como un polipéptido, que se produce de forma natural o que se produce por vía sintética, homólogo con, al menos, una porción de una región C-terminal de la cadena pesada, que incluye los dominios CH1, bisagra, CH2, CH3, y, para algunas clases de cadena pesada, los dominios CH4. La región "bisagra" une al dominio CH1 con la región CH2-CH3 de una porción Fc. La región constante de las cadenas pesadas de todas las inmunoglobulinas de mamíferos presenta una gran similitud en la secuencia de aminoácidos. Las secuencias de ADN para estas regiones de inmunoglobulina son perfectamente conocidas en el estado de la técnica. (Véase, por ejemplo, la publicación de los autores Gillies *et al.* (1989) J. Immunol. Meth. 125:191).

En la presente invención, la porción Fc incluye, de forma típica, al menos un dominio CH2. Por ejemplo, la porción Fc puede incluir toda la región constante de cadena pesada de inmunoglobulina (CH1-bisagra-CH2-CH3). De manera alternativa, la porción Fc puede incluir la totalidad o una porción de la región bisagra, el dominio CH2 y el dominio CH3.

La región constante de una inmunoglobulina es responsable de un gran número de importantes funciones efectoras de anticuerpos, con inclusión del enlace del receptor Fc (FcR) y la fijación del complemento. Existen cinco clases

principales de regiones constantes de cadena pesada, clasificadas como IgA, IgG, IgD, IgE, y IgM, cada una de las cuales con funciones efectoras características designadas por isotipo.

Así por ejemplo, la IgG se subdivide en cuatro isotipos  $\gamma$ :  $\gamma 1$ ,  $\gamma 2$ ,  $\gamma 3$  y  $\gamma 4$ , que se conocen también como IgG1, IgG2, IgG3, y IgG4, respectivamente. Las moléculas IgG pueden interactuar con un gran número de clases de receptores celulares con inclusión de tres clases de receptores Fc $\gamma$  (Fc $\gamma$ R) específicos de la clase IgG del anticuerpo, concretamente Fc $\gamma$ RI, Fc $\gamma$ RII, y Fc $\gamma$ RIII. Se ha descrito que las secuencias importantes para el enlace de IgG con los receptores Fc $\gamma$ R se encuentran en los dominios CH2 y CH3.

La semivida en suero de un anticuerpo está influenciada por la capacidad que tiene de dicho anticuerpo para enlazarse con un receptor Fc (FcR). De manera similar, la semivida en suero de las proteínas de fusión de inmunoglobulina está igualmente influenciada por la capacidad que tienen para enlazarse con dichos receptores (Gillies *et al.*, Cáncer Research (1999) 59:2159-66). Los dominios CH2 y CH3 de la IgG2 y de la IgG4 tienen una afinidad de enlace indetectable o disminuida con los receptores Fc, en comparación con la afinidad de enlace de la IgG1. Por lo tanto, la semivida en suero del anticuerpo considerado puede ser aumentada por medio del uso del dominio CH2 y/o CH3 procedente de los isotipos IgG2 o IgG4. De manera alternativa, el anticuerpo puede incluir un dominio CH2 y/o CH3 procedente de la IgG1 o de la IgG3 con modificación en uno o varios aminoácidos en estos dominios, con objeto de reducir la afinidad de enlace con los receptores Fc (véase, por ejemplo, la solicitud de patente norteamericana U.S. 09/256,156, publicada como publicación de solicitud de patente U.S. 2003-0105294-A1).

Normalmente, la región bisagra de la porción Fc es adyacente al extremo C del dominio CH1 de la región constante de cadena pesada. Cuando se encuentra incluida en las proteínas de la presente invención, la bisagra es homóloga de una región de inmunoglobulina de origen natural y, de forma típica, incluye residuos de cisteína, que enlazan dos cadenas pesadas por medio de enlaces de disulfuro, como ocurre en las inmunoglobulinas naturales. Secuencias representativas de regiones bisagra para inmunoglobulina humana y de ratón, pueden encontrarse en la publicación INGENIERÍA DE ANTICUERPOS una GUÍA PRÁCTICA -ANTIBODY ENGINEERING, a PRACTICAL GUIDE-, (Borrebaeck, ed., W. H. Freeman and Co., 1992).

Las regiones bisagra adecuadas para la presente invención pueden derivarse de las IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, y de otros isotipos de inmunoglobulina. El isotipo IgG1 tiene dos enlaces de disulfuro en la región bisagra, que permiten la formación eficiente y consistente del enlace de disulfuro. Por lo tanto, una región bisagra preferente de la presente invención se deriva de la IgG1. De manera opcional, la primera cisteína, en la mayoría de los casos N-terminal, de una bisagra IgG1 está mutada con objeto de reforzar la expresión y el ensamblaje de anticuerpos o de proteínas de fusión de anticuerpos de la invención (véase, por ejemplo, la solicitud de patente norteamericana U.S. 10/093,958, publicada como publicación de solicitud de patente U.S. 2003-0044423-A1).

En contra de lo que ocurre en el caso de la IgG1, se sabe que la región bisagra de la IgG4 forma de manera ineficiente enlaces de disulfuro intercatenarios (Angal *et al.*, (1993), Mol. Immunol. 30:105-8). De la misma manera, la región bisagra de la IgG2 tiene cuatro enlaces de disulfuro que tienden a favorecer la oligomerización y, posiblemente, el enlace de disulfuro incorrecto durante la secreción en sistemas recombinantes. Una región bisagra adecuada para la presente invención puede derivarse de la región bisagra de la IgG4, que contiene, de manera preferente, una mutación que refuerza la formación correcta de los enlaces de disulfuro entre las mitades derivadas de cadena pesada (Angal *et al.*, (1993), Mol. Immunol. 30(1):105-8). Otra región bisagra preferente se deriva de una bisagra de la IgG2, en la que las dos primeras cisteínas están respectivamente mutadas en otro aminoácido, tal como, en orden de preferencia general, serina, alanina, treonina, prolina, ácido glutámico, glutamina, lisina, histidina, arginina, asparagina, ácido aspártico, glicina, metionina, valina, isoleucina, leucina, tirosina, fenilalanina, triptofano o selenocisteína (véase, por ejemplo, la publicación de la solicitud de patente norteamericana U.S. 2003-0044423-A1).

Una porción Fc fusionada con una región variable del anticuerpo de la invención puede contener los dominios CH2 y/o CH3 y una región bisagra, que se derivan de diversos isotipos de anticuerpos. Por ejemplo, la porción Fc puede contener los dominios CH2 y/o CH3 de la IgG2 o de la IgG4 y una región bisagra de la IgG1. El ensamblaje de tales porciones Fc híbridas ha sido descrito en la publicación de la solicitud de patente norteamericana U.S. 2003-0044423-A1.

Cuando se fusiona con una región variable del anticuerpo de la invención, la porción Fc contiene, de manera preferente, una o varias modificaciones de aminoácidos, que aumentan, por regla general, la semivida en suero de una proteína de fusión Fc. Tales modificaciones de aminoácidos incluyen mutaciones que substancialmente disminuyen o eliminan el enlace con el receptor Fc o la actividad de fijación del complemento. Por ejemplo, un tipo de dicha mutación elimina el locus de glicosilación de la porción Fc de una cadena pesada de inmunoglobulina. En la IgG1, el locus de glicosilación es Asn297 (véase, por ejemplo, la solicitud de patente norteamericana U.S. 10/310,719, publicada como publicación de solicitud de patente norteamericana U.S. 2003-0166163-A1).

### III. Región de acoplamiento por fusión

Las regiones variables del anticuerpo de la presente invención pueden ser opcionalmente enlazadas o fusionadas con una mitad no inmunoglobulina de forma directa o indirecta, tal como a través de un péptido enlazante (por ejemplo (Gly<sub>4</sub>-Ser)<sub>3</sub> (SEQ ID NO: 3)). La inmunogenicidad de las proteínas de fusión descritas puede ser reducida si se

menoscaba la capacidad del acoplamiento por fusión o del epitopo de acoplamiento para interactuar con el receptor de las células T, tal como se ha descrito en la publicación de solicitud de patente norteamericana U.S. 2003-0166877-A1. Precisamente en una fusión entre dos proteínas humanas, por ejemplo la Fc humana y la IL-2 humana, la región que rodea al acoplamiento por fusión o al epitopo de acoplamiento incluye una secuencia peptídica que normalmente no está presente en el cuerpo humano y que, por consiguiente, puede ser inmunogénica. La inmunogenicidad del epitopo de acoplamiento puede ser reducida, por ejemplo, por medio de la introducción de uno o varios locus de glicosilación cerca del acoplamiento por fusión, o por medio de la identificación de un epitopo candidato de las células T que puentee al acoplamiento tal como se ha descrito en la publicación de la solicitud de patente norteamericana U.S. 2003-0166877-A1 y que cambie un aminoácido cerca del acoplamiento con objeto de reducir la capacidad que tiene el epitopo candidato de las células T para interactuar con un receptor de las células T.

Por lo tanto, la semivida en suero de la proteína puede ser acrecentada por medio de la introducción de mutaciones en la región de acoplamiento por fusión. Por ejemplo, en una proteína que incluya un dominio CH3 fusionado con una mitad no inmunoglobulina, la lisina C-terminal del dominio CH3 puede ser cambiada por otro aminoácido, tal como por alanina, que puede proporcionar un aumento substancial de la semivida en suero de la proteína de fusión resultante.

En ciertas realizaciones, es deseable una escisión proteolítica del acoplamiento por fusión. Por lo tanto, la región intergénica puede incluir una secuencia de nucleótido que codifique un locus de escisión proteolítica. Este locus, que está interpuesto entre la inmunoglobulina y la citocina, puede estar diseñado para que proporcione el desprendimiento proteolítico de la citocina en el locus diana. Por ejemplo, se sabe perfectamente que la plasmina y la tripsina se escinden después de los residuos de lisina y de arginina en los loci que son accesibles a las proteasas. Se conocen perfectamente otras endoproteasas específicas del locus y las secuencias de aminoácidos que son reconocidas por las mismas.

#### IV. Tratamiento de enfermedades humanas con las proteínas de fusión de anticuerpo hu14.18

Las regiones variables del anticuerpo de la invención están enlazadas con una citocina. De manera preferente, la proteína de fusión de anticuerpo y de citocina o el inmunoconjugado presenta actividad biológica de citocina. En la realización preferente, el dominio variable del anticuerpo está fusionado con la IL-2. De manera preferente, varios aminoácidos están mutados dentro de la mitad IL-2 con objeto de reducir la toxicidad, como se ha descrito en la publicación de la solicitud de patente norteamericana U.S. 2003-0166163-A1.

Por ejemplo, las figuras 3A y 3B muestran las secuencias de aminoácidos de una realización particular de una proteína de fusión del anticuerpo de conformidad con la invención. De manera específica, la figura 3A muestra la secuencia peptídica de una cadena ligera de inmunoglobulina humanizada, que incluye una región variable y una región constante. La figura 3B muestra la secuencia peptídica de una cadena pesada de inmunoglobulina humanizada enlazada con la IL-2. Los polipéptidos proporcionan una proteína de fusión de anticuerpo humanizado, capaz de enlazarse de manera específica con el GD2 y de estimular al sistema inmune.

De manera opcional, los complejos proteicos pueden incluir, así mismo, un segundo agente, tal como una segunda citocina. En una realización, una proteína de fusión de anticuerpo hu14.18 incluye la IL-12 y la IL-2. La construcción de los complejos proteicos, que contienen un dominio de inmunoglobulina y dos citocinas diferentes, está descrita en detalle en la patente norteamericana U.S. No. 6,617,135.

Las proteínas de fusión de la presente invención son adecuadas para el tratamiento de enfermedades en los seres humanos, tal como el cáncer. Cuando se tratan tumores humanos, es particularmente adecuado administrar una proteína de fusión de anticuerpo y de IL-2, que comprenda las regiones V de la invención, por medio de una infusión o por medio de una inyección subcutánea, empleándose dosis comprendidas entre 0,1 y 100 miligramos/metro<sup>2</sup>/paciente. En una realización preferente, es particularmente adecuado administrar una proteína de fusión de anticuerpo y de IL-2, que comprenda las regiones V de la invención, por medio de infusión o de inyección subcutánea, empleándose dosis comprendidas entre 1 y 10 miligramos/metro<sup>2</sup>/paciente y, de una manera más preferente, comprendida entre aproximadamente 3 y 6 miligramos/metro<sup>2</sup>/paciente.

Se ha puesto de manifiesto por medio de estudios clínicos que, después de la administración de la hu14.18-IL-2, la proteína de fusión conserva su capacidad para llevar a cabo la activación de las células sensibles a la IL-2 por medio del receptor de la IL-2 y que conserva su capacidad para enlazarse con las células tumorales positivas al GD2 y para suministrar la IL-2 en su superficie. Por otra parte, la administración de la proteína de fusión hu14.18-IL-2 a un paciente canceroso da como resultado la estabilización de la progresión de la enfermedad en un número sorprendentemente amplio de pacientes (véase el ejemplo 1).

Las composiciones farmacéuticas de la invención pueden ser empleadas en formas de dosificación sólidas, semi-sólidas o líquidas, tales como, por ejemplo, píldoras, cápsulas, polvos, líquidos, suspensiones o similares, de manera preferente en formas de dosificación unitaria, adecuadas para llevar a cabo la administración de dosis precisas. Las composiciones incluyen un vehículo o excipiente farmacéuticamente convencional, de manera adicional pueden incluir otros agentes medicinales, agentes farmacéuticos, soportes, adyuvantes, etc. Tales excipientes pueden incluir otras proteínas, tales como, por ejemplo, albúmina de suero humano o proteínas de plasma. Los métodos actuales para

llevar a cabo la preparación de tales formas de dosificación son conocidos o son aparentes para los técnicos en la materia. La composición o la formulación, que debe ser administrada, deberán contener, en cualquier caso, una cantidad de uno o de varios componentes activos en una cantidad efectiva con objeto de conseguir el efecto deseado en el sujeto sometido al tratamiento.

La administración de las composiciones correspondientes puede efectuarse por vía de cualquier modo aceptado para llevar a cabo la administración de agentes que muestren dicha actividad. Estos métodos incluyen la administración oral, parenteral o tópica y formas sistémicas de otro tipo. La inyección intravenosa en un vehículo farmacéuticamente aceptable es un método preferido para llevar a cabo la administración (véase el ejemplo 1).

La cantidad del compuesto activo administrada dependerá, naturalmente, del sujeto que sometido al tratamiento, de la gravedad de la afección, de la forma de administración, y de la opinión del médico que lleva a cabo la prescripción.

## Ácidos nucleicos de la invención

### I. Constructos de anticuerpo hu14.18

La invención se refiere, así mismo, a ácidos nucleicos capaces de expresar cada uno de los tipos de proteínas precedentes. Estos incluyen, por ejemplo, ácidos nucleicos que codifican la secuencia de aminoácidos indicada en la SEQ ID NO: 1; la secuencia de aminoácidos indicada en la SEQ ID NO: 2; una región  $V_L$  de anticuerpo hu14.18, que incluye la secuencia de aminoácidos hu $V_L$ FR1; una región  $V_H$  de anticuerpo hu14.18, que incluye la secuencia de aminoácidos hu $V_H$ FR1; una región  $V_H$  de anticuerpo hu14.18, que incluye la secuencia de aminoácidos hu $V_H$ FR3; y proteínas de fusión, que comprenden un anticuerpo hu14.18, que incluye, al menos, una de las secuencias FR humanizadas precedentes y uno o varios agentes terapéuticos.

Los anticuerpos hu14.18 de esta invención pueden ser producidos por medio de técnicas de ingeniería genética; por ejemplo por medio de la formación de un constructo de ácido nucleico, que codifique un anticuerpo específico del GD2, que contenga las FRs deseadas de la presente invención. En una realización, el constructo génico, que codifica el anticuerpo considerado, incluye un segmento de ADN, en el sentido 5' hacia 3', que codifica una región variable de cadena pesada, que incluye en la misma, al menos, una FR humanizada y un segmento de ADN, que codifica una región constante de cadena pesada. En otra realización, otro segmento de ADN, que codifica una citosina, está fusionado con el extremo 3' del segmento de ADN, que codifica la región constante de cadena pesada. En una realización diferente, el constructo génico incluye, en el sentido 5' hacia 3', un segmento de ADN, que codifica una región variable de cadena pesada, que incluye, al menos, una FR humanizada y un segmento de ADN, que codifica una citocina. De manera alternativa, un ácido nucleico de la invención puede incluir, en el sentido 5' hacia 3', un segmento de ADN, que codifica una región variable de cadena ligera, que incluye en la misma, al menos, una FR humanizada y un segmento de ADN, que codifica una citocina. En algunas realizaciones, un ácido nucleico, que codifica una citosina, está ensamblado en el marco del extremo 3' de un gen, que codifica una región constante (por ejemplo, exon CH3), bien directamente o bien a través de una región intergénica (por ejemplo por medio de segmentos enlazadores apropiados, tales como por ejemplo el ADN, que codifica (Gly<sub>4</sub>-Ser)<sub>3</sub> (SEQ ID NO: 3)).

### II. Expresión de constructos de anticuerpo hu 14.18

El ácido nucleico, que codifica las proteínas de la presente invención, puede ser ensamblado con, o puede ser insertado en, uno o en varios vectores de expresión para llevar a cabo la introducción en una célula receptora adecuada, en la que es expresado. La introducción de ácidos nucleicos en vectores de expresión puede ser llevada a cabo según técnicas estándar de la biología molecular. Los vectores de expresión preferidos incluyen aquellos, a partir de los cuales, puede ser expresada la proteína codificada bien en bacterias o bien en células de mamíferos.

De conformidad con la invención, una cadena pesada de una región variable de anticuerpo es preferentemente coexpresada en la misma célula con una cadena ligera correspondiente. Para las proteínas de fusión, que comprendan múltiples cadenas polipeptídicas, puede ser empleado más de un vector de expresión. Los métodos de cotransfección que utilizan, por ejemplo, dos vectores de expresión, frecuentemente dan como resultado el que ambos vectores sean suministrados a una célula diana. De manera alternativa, a veces es conveniente emplear un vector único, que codifique una pluralidad de polipéptidos para la coexpresión en la misma célula.

De forma ejemplificativa, las figuras 2A-D muestran la secuencia de ácidos nucleicos de un vector único, que codifica tanto la cadena pesada así como la cadenas ligera de una inmunoglobulina de conformidad con la invención. Por lo tanto, el vector incluye un ácido nucleico, que codifica la IL-2 fusionada con el extremo 3' de la cadena pesada de inmunoglobulina. De este modo, cuando se introduce en una célula, este vector puede proporcionar, por sí solo, una proteína de fusión de anticuerpo humanizado y de IL-2, que se enlaza de manera específica con el GD2 y que estimula la inmunofunción.

Por otra parte, puede ser conveniente llevar a cabo la expresión de las proteínas de la presente invención en forma de moléculas monocatenarias. De manera ejemplificativa, una región variable de anticuerpo puede ser expresada como un



anticuerpo monocatenario o sFv opcionalmente fusionado con una proteína no inmunoglobulina. En otra realización, una cadena pesada (con o sin una citocina fusionada) está combinada con un complemento de cadena ligera (o pesada) (con o sin citocina fusionada) para formar inmunconjugados monovalentes y divalentes.

5 Las líneas de células receptores son, de manera preferente, células linfoides, tales como un mieloma (o hibridoma). Los mielomas pueden sintetizar, ensamblar y secretar inmunoglobulinas codificadas por genes transfectados y pueden llevar a cabo la glicosilación de proteínas. Una célula receptora particularmente preferente es el mieloma Sp2/0, que normalmente no produce inmunoglobulina endógena. Cuando es transfectada, la célula produce únicamente inmunoglobulinas codificadas por los constructos génicos transfectados. Los mielomas transfectados pueden hacerse crecer en cultivos o en el peritoneo de ratones, del que pueden ser recuperados los inmunconjugados secretados a partir del fluido ascítico. De la misma manera, pueden ser empleadas como células receptoras otras células linfoides tales como los linfocitos B.

15 Existen diversos métodos para llevar a cabo la transfección de las células linfoides con vectores, que contengan constructos de ácido nucleico, que codifiquen la cadena Ig quimérica. Una vía preferente para llevar a cabo la introducción de un vector en las células linfoides consiste en la fusión de esferoblastos (véase por ejemplo la publicación de los autores Gillies *et al.* (1989) *Biotechnol.* 7:798-804). Métodos alternativos incluyen la electroporación o la precipitación con fosfato de calcio. Otros métodos adecuados para llevar a cabo la producción de los inmunconjugados incluyen la preparación de una secuencia de ARN, que codifique el constructo y su traducción en un sistema apropiado *in vivo* o *in vitro*. Una vez expresadas, las proteínas de la invención pueden ser recogidas por medio de procedimientos estándar para la purificación de proteínas (véase, por ejemplo, la patente norteamericana U.S. No. 5,650,150).

### III. Tratamiento de cáncer por medio de terapia génica

25 Los ácidos nucleicos de la invención pueden ser empleados como agentes de terapia génica para llevar a cabo el tratamiento de cáncer o de otras enfermedades en las que sea deseable dirigir al sistema inmune hacia un tipo celular específico. Por ejemplo, pueden ser eliminadas células a partir de un ser humano o de un animal, y pueden ser transfectados en las células uno o varios ácidos nucleicos, que codifican un anticuerpo de la presente invención. Las células son reintroducidas a continuación en el ser humano o en el animal. Las células transfectadas pueden ser células normales o células cancerosas. De manera alternativa, puede ser introducido *in situ* un ácido nucleico en células. Entonces el ser humano o el animal produce una respuesta inmune a las células cancerosas, que puede curar o reducir la gravedad del cáncer. Una región variable del anticuerpo de la invención, acoplada con elementos reguladores apropiados para fomentar la expresión en células de mamíferos, puede ser transfectada en las células por cualquiera de las diversas técnicas, que incluyen la vía del fosfato de calcio, un cañón génico "gene gun", vectores de adenovirus, liposomas catiónicos, vectores retrovirales, o cualquier otro método de transfección eficiente.

40 En una realización particular de la invención, un anticuerpo hu 14.18 es empleado para suministrar de forma selectiva una citocina a una célula diana *in vivo* de tal forma que la citocina pueda ejercer un efecto biológico localizado tal como una respuesta inflamatoria localizada, una estimulación del crecimiento y de la activación de las células T, o una actividad ADCC. Una cantidad terapéuticamente efectiva del anticuerpo es administrada en el sistema circulatorio de un sujeto que alberga la célula diana.

45 La invención está ilustrada con mayor detalle por medio de los ejemplos no limitativos.

### Ejemplos

#### 50 Ejemplo 1

##### *Purificación y formulación de la hu14.18-IL2*

55 Se llevó a cabo, en un estudio, la expresión de la hu14.18-IL2 a partir de células NS/0, se recogió el sobrenadante de cultivo tisular, y la proteína hul 4.18-IL2 se purificó por medio del empleo, en el orden indicado, de cromatografía en columna con resina Abx Mixed, cromatografía con proteína A recombinante, y cromatografía en columna de Q Sepharose, seguido por una diafiltración con flujo tangencial Pellicon 2 para cambiar el tampón por el tampón de la formulación. Los detalles de estas etapas de esta purificación están descritos más adelante. La inactivación de los virus y las etapas de eliminación fueron interdigitalizadas en estas etapas como se ha descrito más adelante. La inactivación de los virus y las etapas de eliminación no eran necesarias para llevar a cabo la purificación *per se*, pero se utilizaron para satisfacer consideraciones reglamentarias.

65 Se ajustó a 5,9 el pH de dos litros de sobrenadante de cultivo tisular NS/0, en los que estaba contenida la hu14.18-IL2, con ácido acético 1M y se cargaron en una columna Abx (J. T. Baker); se lavaron con MES 10 mM, acetato de sodio 100 mM a pH 6,2; y se eluyeron con acetato de sodio 500 mM a pH 7. Este material se cargó en una columna de proteína A recombinante (Pharmacia); se lavó con fosfato de sodio 100 mM, NaCl 150 mM a pH 7; se lavó con fosfato de sodio 100 mM, NaCl 150 mM a pH 6; se lavó con fosfato de sodio 10 mM a pH 7; y se eluyó con fosfato de sodio 100 mM, NaCl 150 mM a pH 3,5. El pH del material eluido era de 4,2. Para fomentar la inactivación de los

## ES 2 346 205 T3

virus, este pH se redujo a 3,8 y la preparación se incubó durante 30 minutos, después de lo cual se neutralizó el pH a 7 con NaOH 1M. Para retirar el ácido nucleico, este material se cargó en una columna de Q sepharose (Pharmacia) y se lavó con fosfato de sodio 100 mM, NaCl 150 mM a pH 7. El ácido nucleico se enlazó con la columna, mientras que la proteína fue encontrada en la corriente de salida y en los lavados, que se repitieron hasta que el A280 retornó a la línea de referencia. Se llevó a cabo una diafiltración Pellicon 2 (Millipore) de conformidad con las instrucciones del fabricante de tal manera, que el material final, constituido por la hu14.18-IL2, fue colocado en la siguiente formulación.

1.	Manitol	4 %
2.	Hidrocloreuro de arginina USP/NF	100 mM
3.	Ácido cítrico USP-FCC	5 Mm
4.	Polisorbato 80	0,01 % (p.v)

El pH del tampón de la formulación se ajustó a 7 con NaOH 1 M.

A modo de etapa final, la preparación fue filtrada a través de una membrana Viresolve 180 (Millipore), que tenía un peso molecular redondeado hacia abajo de 180.000 Daltons. Esto tenía el efecto de "rectificación" del material de tal manera, que fueron eliminados, como resultado, los dímeros agregados y los oligómeros de orden superior.

### Ejemplo 2

#### Actividad antitumoral de la proteína de fusión hu14.18-IL-2

##### Observada en los ensayos clínicos en fase I

Para llevar a cabo la evaluación de la seguridad y de la eficacia del hu14.18-IL-2, se llevó a cabo un ensayo clínico en fase I. Los pacientes elegibles tenían melanoma histológicamente confirmado, que estaba considerado como incurable desde el punto de vista quirúrgico y médico. Estos pacientes podían tener o bien enfermedades medibles o evaluables desde el punto de vista metastático o bien podían no tener evidencia de enfermedad como consecuencia de la resección quirúrgica bien de metástasis distante o bien de enfermedad regionalmente recurrente. Los pacientes con recurrencias locales o regionales múltiples (dos o más) fueron incluidos únicamente si habían tenido previamente evidencia de implicación de nódulo linfático y si cada recurrencia estuvo espaciada en el tiempo por, al menos, 2 meses. Todos los pacientes debían tener una función adecuada de la médula ósea (definida por el número total en leucocitos (WBC) > 3.500/ml, o por el total de granulocitos > 2.000/ml, de plaquetas > 100.000/ml, y de hemoglobina > 10,0 g/dl), una función hepática adecuada [definida por una aspartatoaminotransferasa (AST) < 3 x normal y un total en bilirrubina < 2,0 mg/dl], y una función renal adecuada (definida por creatinina en suero < 2,0 mg/dl o un aclaramiento de la creatinina > 60 ml/minuto). Todos los pacientes tenían un estado general según la electrocorticografía (ECOG) de 0 o de 1 y tenían una esperanza de vida 12 semanas como mínimo. Se excluyeron aquellos pacientes que habían recibido previamente quimioterapia, terapia por radiación, u otra terapia inmunosupresora dentro de las 4 semanas previas al estudio. Los pacientes podían haber tenido previamente metástasis en el sistema nervioso central (CNS) si habían sido tratadas y eran estables durante, al menos, 4 semanas antes del inicio del estudio. Se obtuvo consentimiento informado de todos los pacientes.

Este ensayo en fase I se diseñó como un estudio de ensayo abierto con escalación de la dosis no aleatoria, en el que grupos de 3 hasta 6 pacientes recibieron la hu14.18-IL-2 en uno de los niveles de dosificación siguientes: 0,8, 1,6, 3,2, 4,8, 6,0 o 7,5 mg/m<sup>2</sup>/día. La hu14.18-IL-2 fue administrada en una base hospitalaria en forma de una infusión intravenosa (IV) durante 4 horas (IV), a lo largo de 3 días consecutivos durante la primera semana de cada sesión. La proteína de fusión hu14.18-IL-2 fue administrada a los pacientes en una formulación, que comprendía un 4% de manitol; arginina HCl, 100 mM; citrato, 5 mM; y un 0,01% de Tween 80, a pH 7. Los pacientes fueron dados de alta del hospital, si se encontraban estables, aproximadamente 24 horas después de haberse completado la tercera infusión. Los episodios adversos y las toxicidades fueron clasificados de conformidad con los criterios de toxicidad común -NCI Common Toxicity Criteria- (versión 2.0) y de conformidad con la escala de clasificación de la toxicidad del centro integral del cáncer de la universidad de Wisconsin -University of Wisconsin Comprehensive Cancer Center Toxicity Grading Scale- para la IL-2 (estado general, ganancia de peso, y temperatura). La toxicidad limitadora de la dosis (DLT) se definió como la aparición de toxicidad de grado 3 o 4 distinta de linfopenia, de hiperbilirrubinemia, de hipofosfatemia o de hiperglicemia, de grado 3. La dosis máxima tolerada (MTD) se definió como el nivel de dosificación con el que dos de seis pacientes tuvieron DLT durante la primera sesión. Pacientes con toxicidades relacionadas con el tratamiento de grado 3 fueron requeridos para recuperar, al menos, el grado 1 antes de

que pudiesen reanudar el tratamiento con una reducción de la dosis del 50% para la segunda sesión. Los pacientes con una progresión de la enfermedad  $\geq 25\%$  fueron retirados del estudio. Los pacientes con enfermedad estable recibieron la administración en la segunda sesión.

Se evaluaron en los pacientes las propiedades farmacocinéticas del hu14.18-IL-2. Cuando los niveles en hu14.18-IL-2 fueron evaluados en series de muestras procedentes del conjunto de los 33 pacientes inmediatamente después de la primera infusión durante 4 horas (primer día, primera sesión), se encontró que la semivida era de 3,7 horas ( $\pm$  desviación estándar SD de 0,9 h). Esta es intermedia entre las semividas de sus 2 componentes (aproximadamente 45 minutos para la IL-2 y de 3 días para el anticuerpo quimérico m14.18), y es comparable con lo que se observó con respecto a la semivida de la m14.18-IL-2 quimérica en ratones. Como consecuencia del aclaramiento de la hu14.18-IL-2 a partir del suero de estos pacientes, no pudieron ser detectados los componentes correspondientes a la IL-2 ni al anticuerpo hu14.18. La cresta en suero y el área situada por debajo de la curva (AUC) durante la primera sesión mostró un aumento significativamente dependiente de la dosis ( $p < 0,001$ ).

En este estudio fueron tratados treinta y tres pacientes en este estudio. La tabla 1 enumera los resultados clínicos. Únicamente dos pacientes (6%) completaron los 2 primeros días de los 3 días de la primera sesión. Uno de estos pacientes (nivel de dosis 3) tenía un grado 3 de hiperbilirubinemia al segundo día del tratamiento, y el otro paciente (nivel de dosis 6) tenía un grado 3 de hipoxia y de hipotensión, que requirió tratamiento para llevar a cabo su contención. Dos de estos pacientes tuvieron progresión de la enfermedad y no recibieron una segunda sesión de terapia. Diecinueve pacientes (58%) tenían enfermedad estable después de la primera sesión de terapia y recibieron una segunda sesión de terapia. Cinco pacientes (15% de todos los pacientes) requirieron una reducción de la dosis al 50% para la segunda sesión como consecuencia de eventos adversos en la primera sesión. Diecisiete pacientes (52% de todos los pacientes) completaron la segunda sesión. Un paciente (nivel de dosis 4) declinó recibir la infusión final durante la segunda sesión y un paciente (nivel de dosis 6) interrumpió la infusión final durante la segunda sesión debido a una hipotensión. Ocho pacientes (24% de todos los pacientes) tenían enfermedad estable después de la segunda sesión de tratamiento. Los resultados indican que la hu14.18-IL-2 ha provocado la estabilización de la progresión de la enfermedad en un número sorprendentemente elevado de pacientes.

Ocho de los 33 pacientes mantuvieron la enfermedad estable después de 2 sesiones de terapia, y 4 de estos 8 pacientes siguieron sin tener evidencia de la progresión de la enfermedad (1 con enfermedad estable y 3 con ausencia de evidencia de enfermedad) durante 20-52 meses desde que se completó el protocolo de terapia.

Cinco de los 33 pacientes iniciaron el estudio con enfermedad no mensurable como consecuencia de una resección quirúrgica de recurrencias o de metástasis. Dos de estos cinco pacientes tuvieron progresión de la enfermedad, mientras que los 3 pacientes restantes continuaron sin tener evidencia de la enfermedad (20-52 meses). Estos hallazgos son consistentes con la hipótesis de que el beneficio clínico procedente de una intervención inmunoterapéutica es más probable en un paciente con una baja carga tumoral. Un paciente adicional tuvo un descenso objetivo en un nódulo pulmonar después de dos sesiones de terapia, pero la respuesta global de la enfermedad fue puntuada como progresión de la enfermedad debido al crecimiento en un nódulo distante. El nódulo fue extirpado después de la terapia con la hu14.18-IL-2 y el paciente permaneció libre de progresión de la enfermedad durante más de 3 años.

TABLA 1

Resultados clínicos	
	Número de pacientes
Pacientes que completan la primera sesión	31
Enfermedad estable después de la primera sesión	19
Reducción del 50 % de la dosis para la segunda sesión	5
Pacientes que completan la segunda sesión	17
Enfermedad estable después de la segunda sesión	8

Inmunoestimulación *in vivo* por medio de la hu14.18-IL-2 en un ensayo clínico en fase I.

De la misma manera, los pacientes tratados con la hu14.18-IL-2 fueron examinados con respecto a las indicaciones de inmunoestimulación. A los 2-4 días se produjo una linfopenia de sangre periférica, y esto fue seguido por un rebrote de linfocitosis los días 5-22. Estos dos cambios eran dependientes de la dosis ( $p < 0,01$  y  $p < 0,05$ , respectivamente). Los recuentos de linfocitos en los días 5, 8, 15 y 22 fueron significativamente mayores que la línea de referencia de la primera sesión. El recuento de linfocitos de la línea de referencia para la segunda sesión (día 29 de la primera sesión) creció por encima del recuento de linfocitos de la línea de referencia para la primera sesión, lo que indica que efectos de la primera sesión de tratamiento están presentes todavía en el día 29. De manera adicional, los recuentos de linfocitos durante la segunda sesión en los días 5, 8 y 15 son mayores que los valores correspondientes para los días 5, 8 y 15 durante la primera sesión para estos 12 pacientes.

El fenotipo de la superficie celular de los linfocitos mostró una expansión de CD16+ y de linfocitos CD56+ (marcadores de células asesinas naturales (NK)) después de la primera semana de terapia con la hu14.18-IL-2. Este efecto estaba presente todavía el día 29 de la primera sesión (día 1, segunda sesión). Se determinó en los días 15 y 22 el fenotipo de la superficie celular de los linfocitos para los pacientes 19-33 (que recibieron 4,8-7,5 mg/m<sup>2</sup>/día), además de hacerse en los días 1 y 8. Este análisis demostró que el aumento de CD56 y de las células de coexpresión CD56/CD16 permaneció significativamente elevado ( $p < 0,01$ ) los días 8, 15 y 22.

A título de una medida de la inmunoactivación, se obtuvieron niveles de la proteína C-reactiva (CRP) para los pacientes 13-33 y niveles del receptor de la IL-2 soluble (sIL-2R) para los 31 pacientes que completaron la primera sesión. Tanto en la primera sesión así como en la segunda sesión estaba presente un aumento significativo en promedio de la CRP en el tratamiento los días 3-5 en comparación con la línea de referencia para cada sesión. Este aumento de la CRP retornó a los niveles de la línea de referencia al 8º día de cada sesión de tratamiento. El nivel del sIL-2R se encontraba significativamente acrecentado por encima de la línea de referencia comenzándose a las 24 horas después de la infusión de la hu14.18-IL-2 tanto durante la primera sesión así como durante la segunda sesión, que persistió hasta el 8º día. Se encontró que el aumento del sIL-2R dependía de la dosis ( $p = 0,014$ ), los valores del sIL-2R de la segunda sesión estaban acrecentados en comparación con los valores correspondientes en la primera sesión en los días 1-5 para pacientes que recibieron la misma dosis en ambas sesiones ( $p < 0,05$ ).

Para llevar a cabo la evaluación de la función NK activada con la IL-2 y de la citotoxicidad celular dependiente del anticuerpo (ADCC) en células mononucleares de sangre periférica (PBMC) procedente de 31 pacientes, que completaron la primera sesión, se empleó la línea celular de neuroblastoma LA-N-5, que expresa al GD2 y que se enlaza con la hu14.18-IL-2. Se presentó un aumento significativo en la destrucción inducida por los linfocitos a partir del 8º día, en comparación con el 1er día para estos dos ensayos. Los 12 pacientes que recibieron la segunda sesión con la misma dosis que en la primera sesión, mostraron resultados de ADCC, que eran muy similares a los que se obtuvieron durante la primera sesión. El único parámetro, que se encontró diferente para la segunda sesión con respecto a la primera sesión, fue la destrucción acrecentada en presencia de la IL-2 el 1er día, lo que indica que la destrucción aumentada en este ensayo permanece elevada en el 29º día (1er día, segunda sesión).

Puesto que la diana LA-N-5 es relativamente resistente a las células NK frescas, ésta es adecuada para llevar a cabo la medición de la destrucción aumentada por la IL-2, y la ADCC. Sin embargo, la débil destrucción de la LA-N-5 inducida con ayuda de la PBMC fresca en medio (sin suplemento de IL-2 *in vitro*) no era al 8º día significativamente mayor que la del 1er día.

Se llevaron a cabo ensayos NK estándar para los pacientes 19-33 los días 1, 8, 15 y 22, empleándose la línea celular diana K562 susceptible a la NK. Se observó un aumento significativo en la lisis por NK de las células diana K562, cuando fueron ensayadas bien en medio o bien en presencia de la IL-2, en los días 8º y 22º, en comparación con el 1er día. De la misma manera, se llevaron a cabo evaluaciones de muestras de suero procedentes de pacientes seleccionados con objeto de determinar la actividad de la IL-2 funcional y el anticuerpo anti-GD2 funcional.

La línea celular Tf-1b sensible a la IL-2 demostró una proliferación inducida por la IL-2 con suero de pacientes obtenido después de la infusión de la hu14.18-IL-2. Se observó un aumento progresivo de la proliferación durante las primeras 4 horas después de la infusión durante 4 horas. Los valores volvieron a la línea de referencia al cabo de 16 horas después de esta infusión, lo que es consistente con la semivida en suero para la hu14.18-IL-2 de aproximadamente 4 horas. De la misma manera, se examinaron muestras de suero procedentes de estos períodos de tiempo por medio de citometría de flujo con respecto a la presencia de la inmunocitocina hu14.18-IL-2 (IC) intacta, que conserva su componente IL-2 y su actividad anticuerpo anti-GD2. La hu14.18-IL-2 capaz de enlazarse con la línea celular M21 (positiva al GD2) era detectable en muestras de suero de pacientes después de una infusión de IC. La cantidad de IC capaz de enlazarse con la M21 aumentó progresivamente durante las primeras 4 horas después de la infusión durante 4 horas y disminuyó después de esto, nuevamente de forma consistente con la semivida de aproximadamente 4 horas.

Por último, se llevaron a cabo ensayos *in vitro* con muestras procedentes de pacientes, con objeto de determinar si la administración de la hu14.18-IL-2 daba como resultado condiciones *in vivo* consistentes con las que son necesarias para alcanzar la ADCC. Las PBMCs procedentes del 8º día mostraron un aumento de la ADCC sobre células diana GD2+ cuando se añadió la hu14.18-IL-2 al ensayo citotóxico. Se llevó a cabo este mismo ensayo de ADCC con la PBMC procedente del 8º día, sin embargo, en lugar de añadirse la hu14.18-IL-2 al ensayo, se añadió suero procedente del paciente, obtenido antes o después de la administración de la hu14.18-IL-2. Las PBMC obtenidas a partir de pacientes en el 8º día de la segunda sesión eran capaces de favorecer la destrucción acrecentada de la línea celular

## ES 2 346 205 T3

LA-N-5 en presencia de suero obtenido después de la administración de la hu14.18-IL-2, en comparación con lo que se observa con el suero obtenido antes de la infusión. De este modo, la hu14.18-IL-2, que circula en los pacientes, después de la administración IV, es capaz de facilitar la ADCC con las PBMCs activadas *in vivo* por medio de la hu14.18-IL-2, procedente del mismo paciente.

En resumen, estos resultados indican que existían cambios inmunológicos asociados con esta terapia por medio de la hu14.18-IL-2 con inclusión de un aumento en el recuento de linfocitos, de un aumento en el porcentaje de CD16+ y de CD56+ PBMC, de un aumento en la lisis de NK y de un aumento en la ADCC. Una prueba adicional de la inmunoactivación incluía un aumento en niveles en suero de la CRP y del sIL-2R. Análisis de laboratorio de suero y de PBMC mostraron que la molécula de hu14.18-IL-2, que circula en el suero del paciente después de la administración IV conservaba su capacidad para activar a las células sensibles a la IL-2 por medio del receptor de la IL-2 y que conservaban su capacidad para enlazarse con las células tumorales positivas al GD2, y para suministrar la IL-2 en su superficie, como se ha detectado por medio de citometría de flujo. Las células NK fueron activadas *in vivo* en base a su capacidad para favorecer la función NK y ADCC *in vitro*. Por otra parte, las células NK activadas *in vivo* por medio de la hu14.18-IL-2 administrada a estos pacientes, eran capaces de inducir la ADCC facilitada por medio de la hu14.18-IL-2, que circula en el suero de estos mismos pacientes. Por lo tanto, se alcanzaron condiciones para lograr una inmunoactivación en todos los pacientes en este estudio.

**REIVINDICACIONES**

5 1. Una proteína de fusión de anticuerpo humanizado y de IL-2, designada como hu14.18-IL2, que se enlaza de manera específica con el GD2 y que estimula una inmunofunción, que comprende la cadena ligera de la SEQ ID No. 5 y la cadena pesada de la SEQ ID No. 6.

10 2. Un vector que comprende la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID No. 4, que contiene las secuencias de ácido nucleico que codifican la proteína de fusión de la reivindicación 1.

15 3. Composición farmacéutica que comprende la proteína de fusión de la reivindicación 1 y un vehículo o excipiente farmacéutico.

20 4. Uso de la proteína de fusión de la reivindicación 1 para la fabricación de un medicamento destinado a la estabilización de la progresión de enfermedades en pacientes con cáncer positivo al GD2.

25 5. Uso de la proteína de fusión de la reivindicación 1 para la fabricación de un medicamento destinado a acrecentar la actividad ADCC y la lisis de NK en pacientes con cáncer positivo al GD2.

30

35

40

45

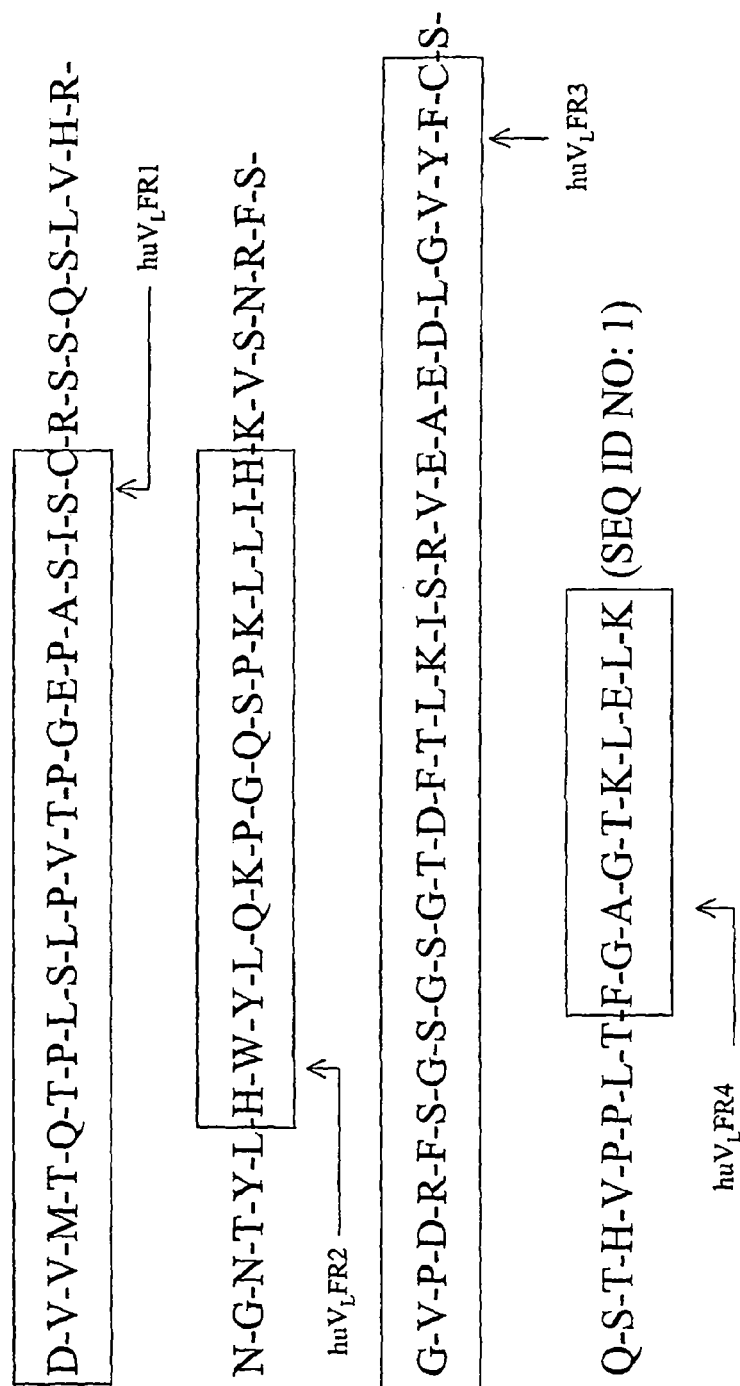
50

55

60

65

**Región variable de cadena ligera de inmunoglobulina humanizada**



**FIG. 1A**

Región variable de cadena pesada de inmunoglobulina humanizada

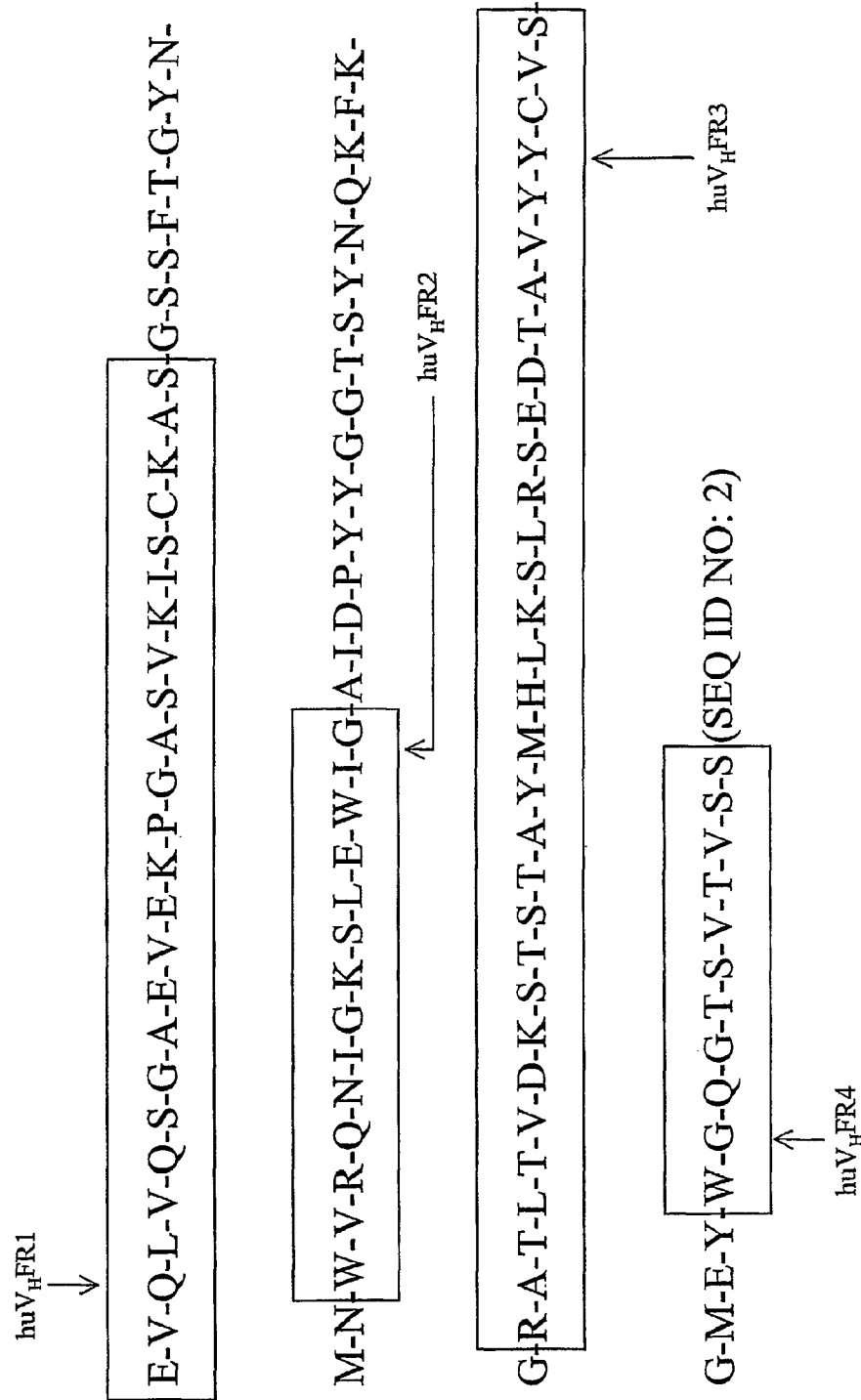


FIG. 1B



## Secuencia de nucleótidos del vector de expresión

GTCGACATTGATTATTGACTAGTTATTAATAGTAATCAATTACGGGGTCATTAGTTTCATAGCCCAT  
 ATATGGAGTTCGCGGTTACATAAATTACGGTAAATGGCCCGCCTGGCTGACCGCCCAACGACCCCC  
 GCCCATTGACGTCAATAATGACGTATGTTCCCATAGTAACGCCAATAGGGACTTTCCATTGACGTC  
 AATGGGTGGAGTATTTACGGTAAACTGCCCACTTGGCAGTACATCAAGTGTATCATATGCCAAGTA  
 CGCCCCCTATTGACGTCAATGACGGTAAATGGCCCGCCTGGCATTATGCCCAGTACATGACCTTAT  
 GGGACTTTCCTACTTGGCAGTACATCTACGTATTAGTCATCGCTATTACCATGGTGATGCGGTTTTG  
 GCAGTACATCAATGGGCGTGGATAGCGGTTTGACTCACGGGGATTTCGAAGTCTCCACCCCATTTGA  
 CGTCAATGGGAGTTTGTGTTTGGCACCAAAATCAACGGGACTTTCCAAAATGTGCGTAACAACTCCGC  
 CCCATTGACGCAAAATGGGCGGTAGGCGTGTACGGTGGGAGGTCTATATAAGCAGAGCTCTCTGGC  
 TAACTACAGAACCCACTGCTTAACTGGCTTATCGAAATTAATACGACTCACTATAGGGAGACCCCTC  
 TAGAATGAAGTTGCCTGTTAGGCTGTTGGTGCTGATGTTCTGGATTCTGGTGAGGAGAGAGGGAA  
 GTGAGGGAGGAGAATGGACAGGGAGCAGGAGCACTGAATCCATTGCTCATTCCATGTATCTGGC  
 ATGGGTGAGAAGATGGGTCTTATCCTCCAGCATGGGGCCTCTGGGGTGAATACTTGTAGAGGGA  
 GGTTCAGATGGGAACATGTGCTATAATGAAGATTATGAAATGGATGCCTGGGATGGTCTAAGTA  
 ATGCCTTAGAAGTGACTAGACACTTGCAATTCATTTTTTTGGTAAGAAGAGATTTTTAGGCTATA  
 AAAAAATGTTATGTAAAAATAAACGATCACAGTTGAAATAAAAAAAAAAATATAAGGATGTTTCATG  
 AATTTTGTGTATAACTATGTATTTCTCTCATTGTTTCAGCTTCCTTAAGCGACGTGGTGATGACC  
 CAGACCCCCCTGTCCCTGCCGTGACCCCGGCGAGCCCGCCTCCATCTCCTGCAGATCTAGTCAG  
 AGTCTTGTACACCGTAATGGAAACACCTATTTACATTGGTACCTGCAGAAGCCAGGCCAGTCTCCA  
 AAGCTCCTGATTACAAAGTTTCCAACCGATTTCTGGGGTCCAGACAGGTTCAAGTGGCAGTGGA  
 TCAGGGACAGATTTCACTCAAGATCAGCAGAGTGGAGGCTGAGGATCTGGGAGTTTATTTCTGT  
 TCTCAAAGTACACATGTTCTCCGCTCACGTTCCGTGCTGGGACCAAGCTGGAGCTGAAACGTATT  
 AGTGTGTCAAGGTTTCAAGAGGGACTAAAGACATGTACGCTATGTGTGACTAATGGTAATGTC  
 ACTAAGCTGCGGGATCCCGCAATTCTAACTCTGAGGGGGTCCGATGACGTGGCCATTCTTTGCCCT  
 AAAGCATTGAGTTTACTGCAAGGTCAGAAAAGCATGCAAGGCCCTCAGAATGGCTGCAAGAGCT  
 CCAACAAAAACAATTTAGAACTTTATTAAGGAATAGGGGGAAGCTAGGAAGAACTCAAAACATCA  
 AGATTTTAAATACGCTTCTTGGTCTCCTTGTCTATAATATCTGGGATAAGCATGCTGTTTTCTGTCT  
 GTCCCTAACATGCCCTGTGATTATCCGCAAAACACACACCCCAAGGGCAGAACTTTGTTACTTAAAC  
 ACCATCCTGTTTGTCTTCTTCTCAGGAACGTGTGGCTGCACCATCTGTCTTCATCTTCCCGCCATCTG  
 ATGAGCAGTTGAAATCTGGAACCTGCTCTGTTGTGTGCTGCTGAATAACTTCTATCCCAGAGAGG  
 CCAAAGTACAGTGGAAGGTGGATAACGCCCTCCAATCGGGTAACTCCCAGGAGAGTGTACAGAG  
 CAGGACAGCAAGGACAGCACCTACAGCCTCAGCAGCACCTGACGCTGAGCAAAGCAGACTACG  
 AGAAACACAAAGTCTACGCCCTGCGAAGTCAACCCATCAGGGCCTGAGCTCGCCCGTCACAAAGAGC  
 TTCAACAGGGGAGAGTGTTAGAGGGAGAAGTGCCCCCACTGCTCCTCAGTTCCAGCCTGACCCCC  
 TCCCATCCTTTGGCCTCTGACCCCTTTTCCACAGGGGACCTACCCCTATTGCGGTCTCCAGCTCAT  
 CTTTCACCTCACCCCCCTCCTCCTTGGCTTAATTATGCTAATGTTGGAGGAGAATGAATAAAT  
 AAAGTGAATCTTTGCACCTGTGGTTTCTCTTTCTCAATTTAATAATTATTATCTGTTGTTTACCA  
 ACTACTCAATTTCTCTTATAAGGGACTAAATATGTAGTCATCCTAAGGCGCATAACCATTATATAAA  
 AATCATCCTTCATTCTATTTTACCCTATCATCCTCTGCAAGACAGTCCTCCCTCAAACCCACAAGCC  
 TTCTGTCTCACAGTCCCCTGGGCCATGGTAGGAGAGACTTGCTTCTTGTGTTTCCCCTCCTCAGCA  
 AGCCCTCATAGTCCTTTTAAAGGTGACAGGTCTTACGGTCAATATCCTTTGATTCAATTCCCTGG  
 GAATCAACCAAGGCAAAATTTTCAAAAGAAGAAACCTGCTATAAAGAGAATCATTATTGCAACA  
 TGATATAAAATAACAACACAATAAAAGCAATTAATAAACAACAATAAGGGAAATGTTTAAAGTTC  
 ATCATGGTACTTAGACTTAATGGAATGTCATGCCTTATTTACATTTTAAACAGGTACTGAGGGAC  
 TCCTGTCTGCCAAGGGCCGTATTGAGTACTTTCCACAACCTAATTTAATCCACACTATACTGTGAG  
 ATTAATAAACATTCAATTAATGTTGCAAGGTTCTATAAAGCTGAGAGACAAATATATTCTATAAC  
 TCAGCAATCCCCTTCTAGGGTCGATCGAGCTTGACATTGATTATTGACTAGTTATTAATAGTAATC  
 AATTACGGGGTCATTAGTTTCATAGCCCATATATGGAGTTCGCGGTTACATAACTTACGGTAAATGG  
 CCGCCTGGCTGACCGCCCAACGACCCCGCCCATTGACGTCAATAATGACGTATGTTCCCATAGT  
 AACGCCAATAGGGACTTTCCATTGACGTCAATGGGTGGAGTATTTACGGTAAACTGCCCACTTGGC  
 AGTACATCAAGTGTATCATATGCCAAGTACGCCCCCTATTGACGTCAATGACGGTAAATGGCCCGC

FIG. 2A

CTGGCATTATGCCAGTACATGACCTTATGGGACTTTCCTACTTGGCAGTACATCTACGTATTAGTC  
 ATCGCTATTACCATGGTGATGCGGTTTTGGCAGTACATCAATGGGCGTGGATAGCGGTTTGACTCA  
 CGGGGATTTCCAAGTCTCCACCCCATTTGACGTCAATGGGAGTTTGTGTTGGCACCAAAATCAACGG  
 GACTTTCCAAAATGTCGTAACAACCTCCGCCCATTTGACGCAAATGGGCGGTAGGCGTGACGGTG  
 GGAGGTCTATATAAGCAGAGCTCTCTGGCTAACTACAGAACCCACTGCTTAACTGGCTTATCGAAA  
 TTAATACGACTCACTATAGGGAGACCCAAGCTCCTCGAGGCTAGAATGAAGTTGCCTGTTAGGCTG  
 TTGGTGCTGATGTTCTGGATTCTGGTGAGGAGAGAGGGAAGTGAGGGAGGAGAATGGACAGGGA  
 GCAGGAGCACTGAATCCCATTGCTCATTCCATGTATCTGGCATGGGTGAGAAGATGGGTCTTATCC  
 TCCAGCATGGGGCCTCTGGGGTGAATACTTGTAGAGGGAGGTTCCAGATGGGAACATGTGCTAT  
 AATGAAGATTATGAAATGGATGCCTGGGATGGTCTAAGTAATGCCTTAGAAGTGACTAGACACTT  
 GCAATTCACCTTTTTTGGTAAGAAGAGATTTTTAGGCTATAAAAAAATGTTATGTAAAAATAAACG  
 ATCAGATTGAAATAAAAAAATAAAGGATGTTTCATGAATTTTGTGTATAACTATGTATTCT  
 CTCTCATTGTTTCAGCTTCTTAAGCGAGGTGCAGCTGGTGCAGTCCGGCGCCGAGGTGGAGAAGC  
 CCGGCGCCTCCGTGAAGATCTCCTGCAAGGCCTCCGGCTCCTCCTTCACCGGCTACAAATGAAC  
 GGGTGCGCCAGAACATCGGCAAGTCCCTGGAGTGGATCGGCGCCATCGACCCCTACTACGGCGGC  
 ACCTCCTACAACCAGAAAGTTCAAGGGCGCGCCACCCTGACCGTGACAAAGTCCACCTCCACCGC  
 CTACATGCACCTGAAGTCCCTGCGCTCCGAGGACACCGCCGTGTAATACTGCGTGTCCGGCATGGA  
 GTACTGGGGCCAGGGCACCTCCGTGACCGTGTCTCCGTAAAGCTTTTCTGGGGCAGGCCAGGCCT  
 GACCTTGGCTTTGGGGCAGGGAGGGGGCTAAGGTGAGGCAGGTGGCGCCAGCCAGGTGCACACCC  
 AATGCCCATGAGCCAGACACTGGACGCTGAACCTCGCGGACAGTTAAGAACCAGGGGCCTCTG  
 CGCCCTGGGGCCAGCTCTGTCCACACCGCGGTACATGGCACCACTCTCTTGACAGCTCCACCA  
 AGGGCCCATCGGTCTTCCCCCTGGCACCCCTCCTCCAAGAGCACCTCTGGGGGCACAGCGGCCCTGG  
 GCTGCGTGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGTCTGTGAACTCAGGCGCCCTGACCA  
 GCGGCGTGACACCTTCCCGGCTGTCTACAGTCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGA  
 CCGTGCCCTCCAGCAGCTTGGGCACCCAGACTACATCTGCAACGTGAATCACAAGCCAGCAAC  
 ACCAAGGTGGACAAGAGAGTTGGTGAGAGGCCAGCACAGGGAGGGAGGGTGTCTGCTGGAAGCC  
 AGGCTCAGCGTCTCTGCTGGACGCATCCCGGCTATGCAGTCCCAGTCCAGGGCAGCAAGGCAGG  
 CCCCCGTCTGCTCTTCAACCGGAGGGCTCTGCCCGCCCCACTCATGCTCAGGGAGAGGGTCTTCTG  
 GCTTTTTCCCAGGCTCTGGGCAGGCACAGGCTAGGTGCCCTAACCAGGCCCTGCACACAAAGG  
 GGCAGGTGCTGGGCTCAGACCTGCCAAGAGCCATATCCGGGAGGACCCTGCCCTGAACCTAAGCC  
 CACCCCAAAGGCCAACTCTCCACTCCCTCAGCTCGGACACCTTCTCTCTCCAGATTCCAGTAA  
 CTCCCAATCTTCTCTCTGACAGGCCCAAATCTTGTGACAAAACCTCACACATGCCACCGTGCCAG  
 GTAAGCCAGGCCAGGCCCTGCCCTCCAGCTCAAGGCGGGACAGGTGCCCTAGAGTAGCCTGCATC  
 CAGGGACAGGCCCCAGCCGGGTGCTGACAGTCCACCTCCATCTCTTCTCAGCACCTGAACCTCT  
 GGGGGGACCGTCAGTCTTCTCTTCCCCCAAAACCCAAAGGACACCTCATGATCTCCCGGACCCC  
 TGAGGTACATGCGTGGTGGTGACGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACG  
 TGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTA  
 CCGTGTGGTCAAGCTCTCACCCTGCTGCAACAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCA  
 AGGTCTCCAACAAAGCCCTCCAGCCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAGGCCAAAGGTGGGACC  
 CGTGGGGTGGCAGGGGCCACATGGACAGAGGCCCGGCTCGGCCACCCCTCTGCCCTGAGAGTGACCG  
 CTGTACCAACCTCTGTCCCTACAGGGCAGCCCCGAGAACACAGGTGTACACCCTGCCCCATCAC  
 GGGAGGAGATGACCAAGAACCAGGTGACGCTGACCTGGTCAAAGGCTTCTATCCAGCGAC  
 ATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCGACCCGGAGAACTACAAGACCACGCCTCCCGTGCT  
 GGACTCCGACGGCTCCTTCTTCTCTATAGCAAGCTCACCCTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAG  
 GGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAAGGCCTCT  
 CCCTGTCCCCGGGTAAAGCCCCAACTTCAAGTTCTACAAAGAAAAACAGCTGCAACTGGAGCAT  
 CTCCTGCTGGATCTCCAGATGATTCTGAATGGAATTAACAACCTACAAGAATCCCAAACCTACACAG  
 ATGCTCACATTCAAGTTCTACATGCCCAAGAGGCCACAGAGCTCAACATCTCCAGTGTCTAGAG  
 GAGGAACTCAAACCTCTGGAGGAAGTGCTAAACCTCGCTCAGAGCAAAAACCTTCACTTAAGACC  
 TAGGGACTTAATCAGCAATATCAACGTAATAGTTCTGGAACTAAAGGGATCCGAAACAACATTCA  
 TGTGTGAATATGCTGATGAGACAGCAACCATTTGTAGAATTTCTGAACAGATGGATTACCTTTTGT

FIG. 2B

AAAGCATCATCTCAACACTAAGTGTGATAATTAAGTGTCTCGAGGGATCCAGACATGATAAGATACA  
 TTGATGAGTTTGGACAAACCACAACCTAGAAATGCAGTGAAAAAAATGCTTTATTTGTGAAATTTGTG  
 ATGCTATTGCTTTATTTGTAACCATAGAAAGCTGCAATAAACAAAGTTAACAACAACAATTGCATT  
 ATTTTATGTTTTCAGGTTTCAGGGGAGGTGTGGGAGGTTTTAAAGCAAGTAAACCTCTACAAAT  
 GTGGTATGGCTGATTATGATCCTGCCTCGCGCGTTTCGGTGATGACGGTGAAAACTCTGACACAT  
 GCAGTCCCGGAGACGGTCACAGCTTGTCTGTAAGCGGATGCCGGGAGCAGACAAGCCCGTCAGG  
 GCGCTCAGCGGGTGTGGCGGGTGTGGGGGCGCAGCCATGACCCAGTCACGTAGCGATAGCGGA  
 GTGTATACTGGCTTAAGTATGCGGCATCAGAGCAGATTGTACTGAGAGTGACCCATATGCGGTGTG  
 AAATACCGCATCAGATGCGTAAGGAGAAAAATACCGCATCAGGCGCTCTCCGCTTCTCGCTCACTG  
 ACTCGCTGCGCTCGGTCTCGGCTGCGGCGAGCGGTATCAGCTCACTCAAAGGCGGTAATACGGT  
 TATCCACAGAATCAGGGGATAACGCAGGAAAGAACATGTGAGCAAAAGGCCAGCAAAAGGCCAG  
 GAACCGTAAAAAGGCGCGTGTGCTGGCGTTTTCATAGGCTCCGCCCCCTGACGAGCATCAAA  
 AAATCGACGCTCAAGTCAGAGGTGGCGAAACCCGACAGGACTATAAAGATACCAGGCGTTTCCCC  
 CTGGAAGCTCCCTCGTGGCTCTCTGTTCCGACCCCTGCGGCTTACCGGATACCTGTCCGCTTCT  
 CCCTTCGGAAGCGTGGCGCTTCTCAATGCTCAGCTGTAGGTATCTCAGTTCGGTGTAGGTGCTT  
 CGCTCCAAGCTGGGCTGTGTGCAGAACCCCGCTTACGCCGACCGCTGCGCTTATCCGGTAAC  
 TATCGTCTTGAGTCCAACCCGTAAGACACGACTTATCGCCACTGGCAGCAGCCACTGGTAACAGG  
 ATTAGCAGAGCGAGGTATGTAGGCGGTGCTACAGAGTCTTGAAGTGGTGGCCTAACTACGGCTA  
 CACTAGAAGGACAGTATTTGGTATCTGCGCTGTGCTGAAGCCAGTTACCTTCGGAAAAAGAGTTGG  
 TAGCTCTTGATCCGGCAAAACAAACCCGCTGGTAGCGGTGGTTTTTTTGTGTTGCAAGCAGCAGAT  
 TACGCGCAGAAAAAAGGATCTCAAGAAGATCCTTTGATCTTTTCTACGGGTCTGACGCTCAGTG  
 GAACGAAAACTCAGTTAAGGGATTTTGGTCATGAGATTATCAAAAAGGATCTTCACCTAGATCCT  
 TTTAAATAAAAATGAAGTTTAAATCAATCTAAAGTATATAGATAACTTGGTCTGACAGTTA  
 CCAATGCTTAATCAGTGAGGCACCTATCTCAGCGATCTGTCTATTTTCGTTTCATCCATGTGCTGA  
 CTCCCCGTCGTGTAGATAACTACGATACGGGAGGGCTTACCATCTGGCCCCAGTGCTGCAATGATA  
 CCGCGAGACCCACGCTCACCGGCTCCAGATTTATCAGCAATAAACAGCCAGCCGGAAGGGCCGA  
 GCGCAGAAGTGGTCTGCAACTTTATCCGCTCCATCCAGTCTATTAATTGTTGCCGGGAAGCTAG  
 AGTAAGTATGTCGCGAGTTAATAGTTTGCACAAGTGTGTCATGTCAGGCACTCGTGGTGTG  
 ACGCTCGTGTGTTGGTATGGCTTATTACAGCTCCGCTTCCCAACGATCAAGGCGAGTTACATGATC  
 CCCCATGTTGTGCAAAAAAGCGGTTAGTCTCTCGGTCTCCGATCGTTGTGAGAAGTAAGTTGGC  
 CGCAGTGTATCACTCATGGTTATGGCAGCACTGCATAATTCTCTTACTGTATGCCATCCGTAAGA  
 TGCTTTTCTGTGACTGGTGAGTACTCAACCAAGTCATTCTGAGAATAGTGTATGCGGCGACCGAGT  
 TGCTCTGCCCCGGCTCAACACGGGATAATACCGCGCACATAGCAGAACTTTAAAGTGCTCATC  
 ATTGGAAGACGTTCTTCGGGGCGAAAACTCTCAAGGATCTTACCGCTGTTGAGATCCAGTTCGATG  
 TAACCCACTCGTGACCCCACTGATCTTCAGCATCTTTTACTTTTACCAGCGTTTCTGGGTGAGCAA  
 AAACAGGAAGGCAAAATGCCGCAAAAAAGGGAATAAGGGCGACACGGAATGTTGAATACTCAT  
 ACTCTCTCTTTTCAATATTATTGAAGCATTTATCAGGGTTATTGTCTCATGAGCGGATACATATT  
 GAATGTATTAGAAAAATAACAAATAGGGGTTCCGCGCACATTTCCCCGAAAAGTGCCACCTGA  
 CGTCTAAGAAACCATTTATCATGACATTAACTATAAAAAATAGGCGTATCACGAGGCCCTTTCG  
 TCTTCAAGAATCCGATCCAGACATGATAAGATACATTGATGAGTTTGGACAAACCACAACCTAGA  
 ATGCAAGTAAAAAATGCTTTATTTGTGAAATTTGTGATGCTATTGCTTTATTTGTAACCATAGAA  
 GCTGCAATAAACAAAGTTAACAACAACAATTGCATTCATTTTATGTTTCAGGTTTCAGGGGAGGTGT  
 GGGAGGTTTTTAAAGCAAGTAAACCTCTACAAATGTGGTATGGCTGATTATGATCTAAAGCCAG  
 CAAAAGTCCCATGGTCTTATAAAAAATGCATAGCAATTTCCGAGGGGAGCAGAGAATGAAAGCATC  
 TTCTGTAGTCTTTCTCTCGTAGACCTTAAATTCATACTTGATTCTTTTCTCTGACCTCAG  
 AGAGGACGCTGGGTATTCTGGGAGAAAGTTTATTTCCCAAATCAATTTCTGGGAAAAACGTGT  
 CACTTTCAAAATCCTGCATGATCCTTGTCAAAAGAGTCTGAGGTGGCCTGGTTGATTTCATGGCTTC  
 CTGGTAAACAGAACTGCCTCCGACTATCCAAACCATGTCTACTTTACTTGCCAATTCGGTGTGTCA  
 ATAAGTCTTAAGGCATCATCCAAACTTTTGGCAAGAAAAATGAGCTCCTCGTGGTGTCTTTGAGT  
 TCTCTACTGAGAACTATATTAATTCTGTCTTTAAAGGTCGATTCTTCTCAGGAATGGAGAACCAG

FIG. 2C

GTTTTCTACCCATAATCACCAGATTCTGTTTACCTTCCACTGAAGAGGTTGTGGTCATTCTTTGGA  
AGTACTTGAACTCGTTCTCTGAGCGGAGGCCAGGGTCGGTCTCCGTTCTTGCCAATCCCCATATTTG  
GGACACGGCGACGATGCAGTTCAATGGTCTGAACCATGAGGGCACCAAGCTAGCTTTTTGCAAAAG  
CCTAGGCCTCCAAAAAGCCTCCTCACTACTTCTGGAATAGCTCAGAGGCCGAGGCGGCCTCGGCC  
TCTGCATAAAATAAAAAAATTAGTCAGCCATGGGGCGGAGAATGGGCGGAACTGGGCGGAGTTAG  
GGGCGGGATGGGCGGAGTTAGGGGCGGGACTATGGTTGCTGACTAATTGAGATGCATGCTTTGCA  
TACTTCTGCCTGCTGGGGAGCCTGGGGACTTTCCACACCTGGTTGCTGACTAATTGAGATGCATGC  
TTTGCATACTTCTGCCTGCTGGGGAGCCTGGGGACTTTCCACACCCTAACTGACACACATTCCACA  
(SEQ ID NO: 4)

FIG. 2D

Cadena ligera de inmunoglobulina humanizada

D-V-V-M-T-Q-T-P-L-S-L-P-V-T-P-G-E-P-A-S-I-S-C-R-S-S-Q-S-L-V-H-R-N-G-N-T-Y-  
L-H-W-Y-L-Q-K-P-G-Q-S-P-K-L-L-I-H-K-V-S-N-R-F-S-G-V-P-D-R-F-S-G-S-G-S-G-T-  
D-F-T-L-K-I-S-R-V-E-A-E-D-L-G-V-Y-F-C-S-Q-S-T-H-V-P-P-L-T-F-G-A-G-T-K-L-E-  
L-K-R-T-V-A-A-P-S-V-F-I-F-P-P-S-D-E-Q-L-K-S-G-T-A-S-V-V-C-L-L-N-N-F-Y-P-R-  
E-A-K-V-Q-W-K-V-D-N-A-L-Q-S-S-G-N-S-Q-E-S-V-T-E-Q-D-S-K-D-S-T-Y-S-L-S-S-T-  
L-T-L-S-K-A-D-Y-E-K-H-K-V-Y-A-C-E-V-T-H-Q-G-L-S-S-P-V-T-K-S-F-N-R-G-E-C

(SEQ ID NO: 5)

FIG. 3A

## Cadena pesada de inmunoglobulina humanizada-IL-2

E-V-Q-L-V-Q-S-G-A-E-V-E-K-P-G-A-S-V-K-I-S-C-K-A-S-G-S-S-F-T-G-Y-N-M-N-W-V-R-Q-N-I-G-K-S-L-E-W-I-G-  
A-I-D-P-Y-Y-G-G-T-S-Y-N-Q-K-F-K-G-R-A-T-L-T-V-D-K-S-T-S-T-A-Y-M-H-L-K-S-L-R-S-E-D-T-A-V-Y-Y-C-V-S-  
G-M-E-Y-W-G-Q-G-T-S-V-T-V-S-S-A-S-T-K-G-P-S-V-F-P-L-A-P-S-S-K-S-T-S-G-G-T-A-A-L-G-C-L-V-K-D-Y-F-P-  
E-P-V-T-V-S-W-N-S-G-A-L-T-S-G-V-H-T-F-P-A-V-L-Q-S-S-G-L-Y-S-L-S-S-V-V-T-V-P-S-S-S-L-G-T-Q-T-Y-I-C-N-  
V-N-H-K-P-S-N-T-K-V-D-K-R-V-E-P-K-S-C-D-K-T-H-T-C-P-P-C-P-A-P-E-L-L-G-G-P-S-V-F-L-F-P-P-K-P-K-D-T-L-  
M-I-S-R-T-P-E-V-T-C-V-V-D-V-S-H-E-D-P-E-V-K-F-N-W-Y-Y-D-G-V-E-V-H-N-A-K-T-K-P-R-E-E-Q-Y-N-S-T-Y-  
R-V-V-S-V-L-T-V-L-H-Q-D-W-L-N-G-K-E-Y-K-C-K-V-S-N-K-A-L-P-A-P-I-E-K-T-I-S-K-A-K-G-Q-P-R-E-P-Q-V-Y-  
T-L-P-P-S-R-E-M-T-K-N-Q-V-S-L-T-C-L-V-K-G-F-Y-P-S-D-I-A-V-E-W-E-S-N-G-Q-P-E-N-N-Y-K-T-T-P-P-V-L-D-  
S-D-G-S-F-F-L-Y-S-K-L-T-V-D-K-S-R-W-Q-Q-G-N-V-F-S-C-S-V-M-H-E-A-L-H-N-H-Y-T-Q-K-S-L-S-L-S-P-G-A-P-  
T-S-S-S-T-K-K-T-Q-L-Q-L-E-H-L-L-D-L-Q-M-I-L-N-G-I-N-N-Y-K-N-P-K-L-T-R-M-L-T-T-F-K-F-Y-M-P-K-K-A-T-  
E-L-K-H-L-Q-C-L-E-E-E-L-K-P-L-E-E-V-L-N-L-A-Q-S-K-N-F-H-L-R-P-R-D-L-I-S-N-I-N-V-I-V-L-E-L-K-G-S-E-T-T-  
F-M-C-E-Y-A-D-E-T-A-T-I-V-E-F-L-N-R-W-I-T-F-C-Q-S-I-S-T-L-T (SEQ ID NO: 6)

**FIG. 3B**

ES 2 346 205 T3

# ES 2 346 205 T3

## LISTA DE SECUENCIAS

<110> Gillies, Stephen D.  
 Lo, Kin-Ming  
 5 <120> Secuencias de inmunocitocinas y usos de las mismas  
 <130> LEX-023  
 <150> US 60/433,945  
 10 <151> 2002-12-17  
 <160> 6  
 <170> PatentIn versión 3.1  
 <210> 1  
 15 <211> 113  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial  
 20 <220>  
 <223> Región variable de cadena ligera de inmunoglobulina humanizada  
 <400> 1  
 25  
 Asp Val Val Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Pro Gly  
 1 5 10 15  
 30  
 Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val His Arg  
 20 25 30  
 35  
 Asn Gly Asn Thr Tyr Leu His Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser  
 35 40 45  
 40  
 Pro Lys Leu Leu Ile His Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro  
 50 55 60  
 45  
 Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile  
 65 70 75 80  
 50  
 Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Val Tyr Phe Cys Ser Gln Ser  
 85 90 95  
 55  
 Thr His Val Pro Pro Leu Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu  
 100 105 110  
 55  
 Lys  
 60  
 <210> 2  
 <211> 113  
 <212> PRT  
 65 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> Región variable de cadena pesada de inmunoglobulina humanizada

# ES 2 346 205 T3

<400> 2

```

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

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

15     Asn Met Asn Trp Val Arg Gln Asn Ile Gly Lys Ser Leu Glu Trp Ile
      35          40          45

20     Gly Ala Ile Asp Pro Tyr Tyr Gly Gly Thr Ser Tyr Asn Gln Lys Phe
      50          55          60

25     Lys Gly Arg Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
      65          70          75          80

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

35     Val Ser Gly Met Glu Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser
      100         105         110

      Ser
35

```

<210> 3

<211> 15

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia enlazante

<400> 3

```

50     Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
      1          5          10          15

55

60     <210> 4
      <211> 10531
      <212> DNA
      <213> Secuencia artificial
      <220>
      <223> Vector que contiene la cadena ligera y pesada de inmunoglobulina humanizada y IL-2
65

```

# ES 2 346 205 T3

<400> 4

```

5      gtcgacattg attattgact agttattaat agtaatcaat tacgggggtca ttagttcata
      60
      gcccatatat ggagttccgc gttacataac ttacggtaaa tggcccgccct ggctgaccgc
      120
10     ccaacgaccc ccgcccattg acgtcaataa tgacgtatgt tcccatagta acgccaatag
      180
      ggactttcca ttgacgtcaa tgggtggagt atttacggta aactgccac ttggcagtac
      240
15     atcaagtga tcatatgcca agtacgcccc ctattgacgt caatgacggt aaatggcccc
      300
      cctggcatta tgccnagtac atgaccttat gggactttcc tacttggcag tacatctacg
      360
      tattagtcac cgctattacc atggtgatgc gggtttggca gtacatcaat gggcgtggat
      420
25     agcggtttga ctacgggga tttccaagtc tccaccccat tgacgtcaat gggagtctgt
      480
      tttggcacca aaatcaacgg gactttccaa aatgtcgtaa caactccgcc ccattgacgc
      540
      aaatgggcgg taggcgtgta cgggtgggagg cctatataag cagagctctc tggctaacta
      600
35     cagaaccac tgcttaactg gcttatcgaa attaatacga ctcactatag ggagacctc
      660
40
45
50
55
60
65

```



# ES 2 346 205 T3

660

tagaatgaag ttgcctgtta ggctgttggg gctgatgttc tggattcctg gtgaggagag  
720

5

aggggaagtga gggaggagaa tggacagggg gcaggagcac tgaatcccat tgctcattcc  
780

10

atgtatctgg catgggtgag aagatgggtc ttatcctcca gcatggggcc tctgggggtga  
840

atacttggtta gagggagggt ccagatggga acatgtgcta taatgaagat tatgaaatgg  
900

15

atgcctggga tgggtctaagt aatgccttag aagtgaactg acacttgcaa ttcacttttt  
960

20

ttggtaagaa gagattttta ggctataaaa aaatgttatg taaaaataaa cgatcacagt  
1020

tgaataaaaa aaaaaatata aggatgttca tgaattttct gtataactat gtattttctct  
1080

25

ctcattgttt cagcttctct aagcgacgtg gtgatgacct agaccccccct gtccctgccc  
1140

gtgacccccc gcgagcccgc ctccatctcc tgcagatcta gtcagagtct tgtacaccgt  
1200

30

aatggaaaca cctatttaca ttggtaacctg cagaagccag gccagtctcc aaagctcctg  
1260

attcacaag tttccaaccg atttctctgg gtcccagaca ggttcagtgg cagtggatca  
1320

35

gggacagatt tcacactcaa gatcagcaga gtggaggctg aggatctggg agtttatttc  
1380

40

tgtttcctaaa gtacacatgt tcttcgctc acgttcggtg ctgggaccaa gctggagctg  
1440

aaacgtatta gtgtgtcagg gtttcacaag agggactaaa gacatgtcag ctatgtgtga  
1500

45

ctaattggtta tgtcactaag ctgcgggac cgcgaattct aaactctgag ggggtcggat  
1560

gacgtggcca ttctttgcct aaagcattga gtttactgca aggtcagaaa agcatgcaaa  
1620

50

gccctcagaa tggctgcaaa gagctccaac aaaacaattt agaactttat taaggaatag  
1680

55

60

65

## ES 2 346 205 T3

ggggaagcta ggaagaaact caaaacatca agatttttaa tacgcttctt ggtctccttg  
 1740  
 ctataattat ctgggataag catgctgttt tctgtctgtc cctaacatgc cctgtgatta  
 5 1800  
 tccgcaaaca acacacccaa gggcagaact ttgttactta aacaccatcc tgtttgcttc  
 1860  
 tttcttcagg aactgtggct gcaccatctg tcttcattct cccgccatct gatgagcagt  
 10 1920  
 tgaaatctgg aantgcctct gttgtgtgct tgetgaataa ctctatccc agagaggcca  
 1980  
 aagtacagtg gaaggaggat aacgcctccc aatcgggtaa ctcccaggag agtgtcacag  
 2040  
 agcaggacag caaggacagc acctacagcc tcagcagcac cctgacgctg agcaaagcag  
 2100  
 actaccagaa acacaaagtc tacgcctgct aagtcaccca tcagggcctg agctcgccc  
 2160  
 tcacaaagag ctccaacagg ggagagtgtt agaggagaaa gtgccccac ctgctcctca  
 2220  
 gttccagcct gacccccctc catcctttgg cctctgaccc tttttccaca ggggacctac  
 2280  
 ccctattgct gtctccagc tcatttttca cctcaccccc ctctctctcc ttggctttaa  
 2340  
 tcatgctaatt gttggaggag aatgaataaa taaagtgaat ctttgacct gtggtttctc  
 2400  
 tctttcttca atttaataat tattatctgt tgtttaccaa ctactcaatt tctcttataa  
 2460  
 gggactaaat atgtagtcat cctaaggcgc ataaccattt ataaaaatca tcttcattc  
 2520  
 tattttaccc tatcatctct tgcaagacag tcttccctca aaccacaag ccttctgtcc  
 2580  
 tcacagtccc ctggggcatg gtaggagaga cttgcttctt tgttttcccc tctcagcaa  
 2640  
 gccctcatag tcttttttaa cgggtgacagg tcttcagggtc atatatactt tgattcaatt  
 2700

## ES 2 346 205 T3

cctggggaat caaccaaggc aaatttttca aaagaagaaa cctgctataa agagaatcat  
 2760  
 5      tcattgcaac atgatataaa ataacaacac aataaaagca attaaataaa caaacaatag  
 2820  
 ggaaatgttt aagttcatca tggacttag actlaatgga atgtcatgcc ttatttacat  
 2880  
 10      ttttaaacag gtactgaggg actcctgtct gccaaaggcc gtattgagta ctttccacaa  
 2940  
 cctaatttaa tccacactat actgtgagat taaaaacatt cattaaaatg ttgcaaaggc  
 3000  
 15      tctataaagc tgagagacaa atatattcta taactcagca atcccacttc tagggtcgat  
 3060  
 cgacgttgac attgattatt gactagttat taatagtaat caattacggg gtcattagtt  
 3120  
 20      catagcccat atatggagtt ccgcgttaca taacttacgg taaatggccc gcctgggtga  
 3180  
 ccgcccacg acccccgcgc attgacgtca ataatgacgt atgttcccat agtaacgcca  
 3240  
 25      atagggactt tccattgacg tcaatgggtg gagtatttac ggtaaactgc ccacttggca  
 3300  
 30      gtacatcaag tgtatcatat gccaaagtacg cccctattg acgtcaatga cggtaaatgg  
 3360  
 cccgcctggc attatgccc gtacatgacc ttatgggact ttctactty gcaglacatc  
 3420  
 35      tacgtattag tcatcgctat taccatgggtg atgcggtttt ggcagranat caatggggct  
 3480  
 ggatagcggc ttgactcagc gggatttcca agtctccacc ccattgacgt caatgggagt  
 3540  
 40      ttgttttggc accaaaatca acgggacttt ccaaaatgtc gtaacaactc cgtcccattg  
 3600  
 45      acgcaaattg gcggtagggc tgtacgggtg gaggtctata taagcagagc tctctgcta  
 3660  
 actacagaac ccactgctta actggcttat cgaaattaat acgactcact atagggagac  
 3720  
 50      ccaagctcct cgaggctaga atgaagttgc ctgttaggct gttgggtgctg atgttctgga

55

60

65

# ES 2 346 205 T3

3780

ttcctgggtga ggagagaggg aagtgagggg ggagaatgga cagggagcag gagcactgaa  
3840

5 tcccatcgct cattccatgt atctggcatg ggtgagaaga tgggtcttat cctccagcat  
3900

10 ggggcctctg gggatgaatac ttgttagagg gaggttccag atgggaacat gtgctataat  
3960

gaagattatg aaatggatgc ctgggatggc ctaagtaatg ccttaqaagt gactagacac  
4020

15 ttgcaattca ctttttttgg taagaagaga tttttaggct aaaaaaaat gttatgtaaa  
4080

aataaacgat cacagttgaa ataaaaaaaa aatataagga tgttcattgaa ttttgtgtat  
4140

20 aactatgtat ttctctctca ttgtttcagc ttctttaagc gaggtgcagc tgggtgcagtc  
4200

25 cggcgccgag gtggagaagc cggcgccctc cgtgaagatc tcttgcaagg cctccggctc  
4260

ctccttcacc ggetacaaca tgaactgggt gcgccagaac atcggcaagt ccttgagtg  
4320

30 gatcggcgcc atcgacccct actacggcgg caectctac aaccagaagt tcaagggccg  
4380

cgcacccctg accgtggaca agtccacctc caecgcctac atgcacctga agtcctcgcg  
4440

35 ctccgaggac accgccgtgt actactgcgt gtccggcatg gagtaactggg gccagggcac  
4500

40 ctccgtgacc gtgtcctccg gtaagctttt ctggggcagg ccaggcctga ccttggtctt  
4560

ggggcagggg gggggctaag gtgaggcagg tggcgccagc caggtgcaca cccaatgcc  
4620

45 atgagccag aactggacg ctgaacctcg cggacagtta agaaccaggg ggctctgcg  
4680

cctggggccc agctctgtcc cacaccgcgg tcacatggca ccacctctct tgcagcctcc  
4740

50 accaagggcc catcggtctt ccccttgga cctctctca agagcacctc tgggggcaca  
4800

55

60

65

## ES 2 346 205 T3

ggggcccctgg gctgcctggc caaggactac ttccccgaac cggtgacggg gtcgtggaac  
 4860

5      tcaggcgccc tgaccagcgg cgtgcacacc ttccccgctg tcctacagtc ctcaggactc  
 4920

tactccctca gcagcgtggc gaccgtgcc ttccagcagct tgggcaccca gacctacatc  
 4980

10     tgcaacgtga atcacaagcc cagcaacacc aagggtggaca agagagttgg tgagaggcca  
 5040

gcacagggag ggagggtgtc tgcctggaagc caggctcagc gctcctgcct ggacgcatec  
 5100

15     cggctatgca gtcccagtc caggnagcaa ggcaggcccc gtctgcctct tcacccggag  
 5160

20     gccctgccc gccccactca tgcctcaggga gagggtcttc tggctttttc cccaggctct  
 5220

gggcaggcac aggcctaggct cccctaacc aggccctgca cacaaggagg caggctgctgg  
 5280

25     gctcagacct gccaaagacc atatccggga ggaccctgcc cctgacctaa gccacccca  
 5340

aaggccaaac tctccactcc ctcagctcgg acaccttctc tcctcccaga ttccagtaac  
 5400

30     tcccaatctt ctctctgcag agcccaaacc ttgtgacaaa actcacacat gccacccgtg  
 5460

35     cccaggtaag ccagcccagg cctcgccctc cagctcaagg cgggacaggg gccctagagt  
 5520

agcctgcate caggggacagg ccccagccgg gtgctgacac gtccacctcc atctcttctc  
 5580

40     cagcacctga actcctgggg ggaccgtcag tcttctcttt cccccaaaa cccaaggaca  
 5640

cctcatgat ctcccggacc cctgagggtca catgcgtggg ggtggacgtg agccacgaag  
 5700

accctgaggc caagttcaac tggtagctgg acggcgtgga ggtgcataat gccaaagaca  
 5760

50     agccgcggga ggagcagtac aacagcacgt accgtgtggg cagcgtctct accgtcctgc  
 5820

## ES 2 346 205 T3

accaggactg gctgaatggc aaggagtaca agtgcaaaggc ctccaacaaa gccctcccag  
5880

5 ccccratcga gaaaaccatc tccaaagcca aagggtgggac ccgtggggtg cgaggggccac  
5940

atggacagag gccggctcgg ccacccctct gccctgagag tgaccgctgt accaacctct  
6000

10 gtccctarag ggcagccccg agaaccacag gtgtacaccc tgcccccatc acggggaggag  
6060

atgaccaaga accaggctcag cctgacctgc ctgggtcaaag gcttctatcc cagcgacatc  
6120

15 gccgtggagt gggagagcaa tgggcagccg gagaacaact acaagaccac gccctcccgtg  
6180

20 ctggaactcg acggctcctt ctccctctat agcaagctca ccgtggacaa gagcaggtgg  
6240

cagcagggga acgtcttctc atgctccgtg atgcatgagg ctctgcacaa ccactacacg  
6300

25 cagaagagcc tctccctgtc cccgggtaaa gccccaactt caagttctac aaagaaaaca  
6360

cagctgcaac tggagcatct cctgctggat ctccagatga ttctgaatgg aattaacaac  
6420

30 tacaagaatc ccaactcac caggatgctc acattcaagt tctacatgcc caagaaggcc  
6480

35 acagagctca aacatctcca gtgtctagag gaggaactca aacctctgga ggaagtgcct  
6540

aacctcgctc agagcaaaaa ctccactta agacctaggg acctaatcag caatatcaac  
6600

40 gtaatagttc tggaactaaa gggatccgaa acaacattca tgtgtgaata tgctgatgag  
6660

acagcaacca ttgtagaatt tctgaacaga tggattacct ttgtcaaag catcatctca  
6720

45 acactaactt gataattaag tgctcgaggg atccagacat gataagatac attgatgagt  
6780

50 ttggacaaac cacaactaga atgcagtga aaaaatgctt tatttgtgaa atttgtgatg  
6840

ctattgcttt atttgtaac attagaagct gcaataaaca agttaacaac cacaattgca

55

60

65

# ES 2 346 205 T3

6900

ttcattttrt gtttcagggt cagggggagg tgtgggaggt tttttaagc aagtaaaacc  
6960

5

tctacaaatg tggatatggc gattatgata ctgcctcgcg cgtttcgggt atyacgggtga  
7020

10

aaacctctga cacatgcagc tcccggagac ggtcacagct tgtctgtaag cggatgccgg  
7080

gagcagacaa gcccgtcagg gcgcgtcagc ggggtgttggc ggggtgtcggg gcgcagccat  
7140

15

gacccagtca cgtagcgata gcggagtgta tactggotta actatcgggc atcagagcag  
7200

attglactga gagtgcacca tatgcgggtgt gaaataccgc atagatgcgt aaggagaaaa  
7260

20

taccgcatca ggcgctcttc cgcttcctcg ctcaactgact cgctgcgctc ggtcgttcyg  
7320

25

ctgcggcgag cggtatcagc tcaactcaaag gcggtaatac ggttatccac agaatacggg  
7380

gataacgcag gaaagaacat gtgagcaaaa ggcagcaaaa aggccaggaa ccgtaaaaag  
7440

30

gccgcgttgc tggcgttttt ccataggctc cgccccctg acgagcatca caaaaatcga  
7500

cgtcaagtc agaggcggcg aaacccgaca ggactataaa gataccaggc gttccccct  
7560

35

ggaagctccc tegtgcgctc tctgttccg acctgcgcg ttaccggata cctgtccgce  
7620

40

tttctccctt cgggaagcgt ggcgttttct caatgctcac gctgtaggta tctcagttcg  
7680

gtgtaggctg ttcgctccaa gctgggctgt gtgcaogaac cccccgttca gcccgaccgc  
7740

45

tgcgccttat ccggtaacta tcgtcttgag tccaacccgg taagacacga cttatcgcca  
7800

ctggcagcag ccactggtaa caggattagc agagcgaggt atgtaggcgg tgctacagag  
7860

50

ttcttgaagt ggtggcctaa ctacggctac actagaagga cagtatttgg tatctgcgct  
7920

55

60

65

# ES 2 346 205 T3

ctgctgaagc cagttacctt cggaaaaaga gttggtagct cttgatccgg caaacaaccc  
 7980  
 5 accgctggta gcggtgggtt ttttgtttgc aagcagcaga ttacgcgcag aaaaaaagga  
 8040  
 totcaagaag atcccttgat cttttctacg gggctctgacg ctcagtggaa cgaaaactca  
 8100  
 10 cgtaaagga ttttggtcac gagattatca aaaaggatct tcacctagat ccttttaaat  
 8160  
 taaaaatgaa gttttaaatc aatctaaagt atatatgagt aaacttggtc tgacagttac  
 8220  
 15 caatgcttaa tcagtgaggc acctatctca gcatctgtc tatctcgctc atccatagtt  
 8280  
 gctgactcc ccgtcgtgta gataactacg atacgggagg gcttaccatc tggcccagtc  
 8340  
 20 gctgcaatga taccgcgaga cccacgctca ccggctccag atttatcagc aataaaccag  
 8400  
 ccagccggaa gggccgagcg cagaagtggc cctgcaactt tatccgcctc catccagttc  
 8460  
 25 attaatgtt gccgggaagc tagagtaagt agtccgccag ttaatatgtt gcgcaacggt  
 8520  
 30 gttgccattg ctgcaggcat cgtggtgtca cgtccgtcgt ttggtatggc ttcattcagc  
 8580  
 tccggttccc aacgatcaag gcgagttaca tcatccccc tgttgtgcaa aaaagcgggt  
 8640  
 35 agtcccttcg gtccctcgat cgttgtcaga agtaagttgg ccgcagtgtt atcaactcatg  
 8700  
 gttatggcag cactgcataa ttctcttact gtcatgccat ccgtaagatg cttttctgtg  
 8760  
 actggtgagt acctcaaccaa gtcattctga gaatagtgtg tgcggcgacc gagttgctct  
 8820  
 45 tgcggcggt caacacggga taataccgcg ccacatagca gaactttaaz agtgcctac  
 8880  
 attggaaaac gttcttcggg gcgaaaaacc taaaggatct taccgctgtt gagatccagt  
 8940  
 50

55

60

65



# ES 2 346 205 T3

tcgatgtaac ccactcgtgc acccaactga tottoagcat cttttacttt caccagcgtt  
9000

5 tctgggtgag caaaaacagg aaggcaaaat gccgcacaaa agggaataag ggcgacargg  
9060

aaatgttgaa tactcatact cttccttttt caatattatt gaagcattta tcagggttat  
9120

10 tgtctcatga gcggatacat atttgaatgt atttagaaaa ataaacaaat aggggttccg  
9180

rgcaratttc ccgcacaaag gccacctgac gtctaagaaa ccattattat catgacatta  
9240

15 acctataaaa ataggcgcat cagcaggccc ttctgttttc aagaattccg atccagacat  
9300

gataagatac attgatgagr ttggacaaac cacaactaga atgcagtga aaaaatgctt  
9360

20 tatttgtgaa atttgtgatg ctattgcttt atttgaacc attagaagct gcaataaaca  
9420

25 agttaacaac aacaattgca ttcattttat gtttcaggtt cagggggagg tctgggaggt  
9480

tttttaagc aagtaaaacc tctacaaatg tggatatggc gattatgatc taaagccagc  
9540

30 aaaagtcca tggctctata aaaatgcata gctttccgag gggagcagag aatttgaaag  
9600

catcttcttg ttagctcttc ttctcgtaga ccttaaatte atacttgatt ccttttctt  
9660

35 cctggacctc agagaggacg cctgggtatt ctgggagaag ttatatattc ccacaaatcaa  
9720

40 tttctgggaa aaacgtgtca ctttcaaatt cctgcattgat ccttgtcaca aagagtctga  
9780

ggtggccttg ttgattcatg gcttcctggt aaacagaact gcttcgact atccaaacca  
9840

45 tgtctacttt acctgccaat tccggttgtt caalaagtct taaggcatca tccaaacttt  
9900

50 tggcaagaaa atgagctcct cgtgggtggt ctttgagttc tctactgaga actatattaa  
9960

ttctgtcctt taaaggctga ttctttctcag gaatggagaa ccaggttttc ctaccataa

55

60

65

## ES 2 346 205 T3

10020

tcaccagatt ctgtttacct tccactgaag aggttggtgt cttcttttgg aagtacttga  
10080

actcgttcct gagcggaggc cagggtcggt ctccgttctt gccaatcccc atattttggg  
10140

acacggcgac gatgcagttc aatggtcgaa ccatgagggc accaagctag ctttttgcaa  
10200

aagcctaggg ctccaaaaaa gcctcctcac tacttctgga atagctcaga ggcggaggcg  
10260

gcctcggcct ctgcataaat aaaaaaaatt aqtcagccat ggggcggaga atgggcggaa  
10320

ctgggcggag ttaggggcgg gatgggcgga gtaggggcg ggactatggt tgctgactaa  
10380

ttgagatgca tgctttgcat acttctgcct gctggggagc ctggggactt tccacacctg  
10440

gttgctgact aattgagatg catgctttgc ataactctgc ctgctgggga gcctggggac  
10500

tttccacacc ctaactgaca cacattccac a  
10531

<210> 5

<211> 220

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Cadena ligera de inmunoglobulina humanizada

<400> 5

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

Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val His Arg  
20 25 30

Asn Gly Asn Thr Tyr Leu His Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser  
35 40 45

# ES 2 346 205 T3

Pro Lys Leu Leu Ile His Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro  
50 55 60

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

10 Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Val Tyr Phe Cys Ser Gln Ser  
85 90 95

15 Thr His Val Pro Pro Leu Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu  
100 105 110

20 Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp  
115 120 125

25 Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn  
130 135 140

30 Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu  
145 150 155 160

35 Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp  
165 170 175

40 Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr  
180 185 190

45 Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser  
195 200 205

50 Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys  
210 215 220

<210> 6

<211> 575

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Cadena pesada de inmunoglobulina humanizada y IL-2

# ES 2 346 205 T3

<400> 6

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

# ES 2 346 205 T3

	Lys	Arg	Val	Glu	Pro	Lys	Ser	Cys	Asp	Lys	Thr	His	Thr	Cys	Pro	Pro	
	210						215					220					
5	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu	Leu	Leu	Gly	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	
	225					230					235					240	
10	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	
					245					250					255		
15	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	His	Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Lys	Phe	Asn	
				260					265					270			
20	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	
			275				280						285				
25	Glu	Glu	Gln	Tyr	Asn	Ser	Thr	Tyr	Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	
	290						295					300					
30	Leu	His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	
	305					310					315					320	
35	Asn	Lys	Ala	Leu	Pro	Ala	Pro	Ile	Glu	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	
					325					330					335		
40	Gly	Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro	Ser	Arg	Glu	
				340					345					350			
45	Glu	Met	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser	Leu	Thr	Cys	Leu	Val	Lys	Gly	Phe	
		355						360					365				
50	Tyr	Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	Val	Glu	Trp	Glu	Ser	Asn	Gly	Gln	Pro	Glu	
	370					375					380						
55	Asn	Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro	Pro	Val	Leu	Asp	Ser	Asp	Gly	Ser	Phe	
	385					390					395					400	
60	Phe	Leu	Tyr	Ser	Lys	Leu	Thr	Val	Asp	Lys	Ser	Arg	Trp	Gln	Gln	Gly	
					405					410					415		

# ES 2 346 205 T3

	Asn	Val	Phe	Ser	Cys	Ser	Val	Met	His	Glu	Ala	Leu	His	Asn	His	Tyr
				420					425					430		
5	Thr	Gln	Lys	Ser	Leu	Ser	Leu	Ser	Pro	Gly	Ala	Pro	Thr	Ser	Ser	Ser
			435					440					445			
10	Thr	Lys	Lys	Thr	Gln	Leu	Gln	Leu	Glu	His	Leu	Leu	Leu	Asp	Leu	Gln
		450					455						460			
15	Met	Ile	Leu	Asn	Gly	Ile	Asn	Asn	Tyr	Lys	Asn	Pro	Lys	Leu	Thr	Arg
	465						470				475					480
20	Met	Leu	Thr	Phe	Lys	Phe	Tyr	Met	Pro	Lys	Lys	Ala	Thr	Glu	Leu	Lys
					485					490					495	
25	His	Leu	Gln	Cys	Leu	Glu	Glu	Glu	Leu	Lys	Pro	Leu	Glu	Glu	Val	Leu
				500					505					510		
30	Asn	Leu	Ala	Gln	Ser	Lys	Asn	Phe	His	Leu	Arg	Pro	Arg	Asp	Leu	Ile
			515					520					525			
35	Ser	Asn	Ile	Asn	Val	Ile	Val	Leu	Glu	Leu	Lys	Gly	Ser	Glu	Thr	Thr
		530					535					540				
40	Phe	Met	Cys	Glu	Tyr	Ala	Asp	Glu	Thr	Ala	Thr	Ile	Val	Glu	Phe	Leu
	545					550					555					560
45	Asn	Arg	Trp	Ile	Thr	Phe	Cys	Gln	Ser	Ile	Ile	Ser	Thr	Leu	Thr	
					565					570					575	
50																
55																
60																
65																