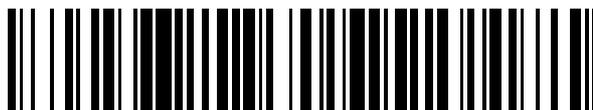


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 370 250**

51 Int. Cl.:
C12N 15/09 (2006.01)
C07K 16/46 (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01)
A61P 7/04 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **04792180 .4**
96 Fecha de presentación: **08.10.2004**
97 Número de publicación de la solicitud: **1688488**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **09.08.2006**

54 Título: **ANTICUERPO BIESPECÍFICO QUE SUSTITUYE AL FACTOR VIII.**

30 Prioridad:
10.10.2003 WO PCT/JP03/13062
14.10.2003 WO PCT/JP03/13123

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
13.12.2011

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
13.12.2011

73 Titular/es:
CHUGAI SEIYAKU KABUSHIKI KAISHA
5-1, UKIMA 5-CHOME, KITA-KU
TOKYO, 115-8543, JP

72 Inventor/es:
HATTORI, Kunihiro;
KOJIMA, Tetsuo;
MIYAZAKI, Taro y
SOEDA, Tetsuhiro

74 Agente: **Curell Aguilá, Marcelino**

ES 2 370 250 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 biespecífico que sustituye al factor VIII.

5 **Campo técnico**

La presente invención se refiere a los anticuerpos biespecíficos que sustituyen funcionalmente a los cofactores que potencian reacciones enzimáticas, y a las composiciones farmacéuticas que comprenden el anticuerpo como principio activo.

10

Antecedentes de la técnica

Los anticuerpos han recibido mucha atención como medicina debido a su estabilidad en sangre elevada y su antigenicidad baja. Los anticuerpos biespecíficos pueden reconocer simultáneamente dos tipos de antígeno. Los anticuerpos biespecíficos han sido propuestos durante cierto tiempo; sin embargo, sólo se ha informado de anticuerpos que conectan simplemente dos tipos de antígeno, tales como aquellos para el redireccionamiento de las células NK, macrófagos y células T (ver el documento no de patente nº 7). Por ejemplo, MDX-210, que actualmente se encuentra bajo estudio clínico, es un anticuerpo biespecífico que únicamente dirige los monocitos que expresan FcγRI y similares a células de cáncer que expresan HER-2/neu. De esta manera, no existe ningún ejemplo hasta el momento que utilice un anticuerpo biespecífico como medios alternativos para sustituir funcionalmente el cofactor que potencia las reacciones enzimáticas.

15

20

Son ejemplos de factores el factor tisular (TF), el factor V de coagulación sanguínea (F.V), el factor V activado de coagulación sanguínea (F.Va), el factor VIII de coagulación sanguínea (F.VIII), el factor VIII activado de coagulación sanguínea (F.VIIIa), la trombosmodulina (TM), la proteína S (PS), la proteína Z (PZ), la heparina, el complemento C4b, el factor H regulador del complemento, la proteína cofactor de membrana (MCP) y el receptor 1 del complemento (CR1).

25

De ellos, el F.VIII/F.VIIIa es un cofactor necesario para una expresión suficiente de actividad del factor IX activado de coagulación sanguínea (F.IXa). Scheifflinger F. *et al.* descubrieron que un determinado anticuerpo anti-F.IX/F.IXa actúa estimulando la activación del factor X de coagulación sanguínea (F.X) por parte de F.IXa en un ensayo cromogénico (documento de patente nº 1). Sin embargo, en un ensayo que examina la capacidad de recuperación de la coagulación en plasma deficiente en F.VIII, se observó capacidad de recuperación de la coagulación únicamente al añadir exógenamente F.IXa, pero no en el caso de que se utilizase este anticuerpo por sí solo.

30

35

Es conocido que F.VIIIa interactúa no sólo con F.IXa sino también con F.X (ver los documentos no de patente nº 5 y 6). A este respecto, el anticuerpo de Scheifflinger F. *et al.* no puede considerarse un sustituto suficiente para la función de F.VIII/F.VIIIa, y su actividad aparentemente también resulta insuficiente.

40

A partir de la investigación específica, se ha conseguido la producción de anticuerpos biespecíficos que sustituyen funcionalmente los factores que potencian la actividad enzimática, y de esta manera han completado la presente invención.

45

[Documento de patente 1] WO 01/19992

[Documento de patente 2] Patente US nº 4. 474.893

[Documento de patente 3] EP 404 097

50

[Documento de patente 4] WO 93/11161

[Documento de patente 5] Solicitud de patente japonesa: 2002-112369

[Documento de patente 6] Solicitud de patente japonesa: 2003-012648

55

[Documento de patente 7] Solicitud de patente japonesa Kokai Publicación nº (JP-A) H5-304992 (sin examinar, solicitud de patente japonesa publicada)

[Documento de patente 8] JP-A H2-145187

60

[Documento de patente 9] JP-A H5-213775

[Documento de patente 10] JP-A H10-165184

65

[Documento de patente 11] JP-A H11-71288

ES 2 370 250 T3

- [Documento de patente 12] JP-A 2002-518041
- [Documento de patente 13] JP-A H11-506310
- 5 [Documento de patente 14] JP-A H5-199894
- [Documento de patente 15] JP-A H10-511085
- [Documento de patente 16] JP-A H5-184383
- 10 [Documento no de patente 1] Nilsson IM *et al.*, "J. Intern. Med." 1992, Vol.235, p.25-32
- [Documento no de patente 2] Lofqvist T *et al.*, "J. Intern. Med" 1997, Vol.241, p.395-400 (the "o" of Lofqvist is written with an umlaut)
- 15 [Documento no de patente 3] 24th Meeting of The Japanese Society on Thrombosis and Hematosis, Special Committee on Examining Hemophilia Standardization, Mini-symposium, 2001, <http://www.jsth.org>
- [Documento no de patente 4] Medical Bulletin #193 1994
- 20 [Documento no de patente 5] Mertens K *et al.*, "Thromb. Haemost." 1999, Vol.82, p.209-217
- [Documento no de patente 6] Lapan KA *et al.*, "Thromb. Haemost." 1998, Vol.80, p.418-422
- 25 [Documento no de patente 7] Segal DM *et al.*, "Journal of Immunological Methods" 2001, Vol.248, p.1-6
- [Documento no de patente 8] Bos R y Nieuwenhuizen W, "Hybridoma" 1992, Vol.11, nº 1, p.41-51
- [Documento no de patente 9] Brennan M *et al.*, "Science" 1985, Vol.229, nº 1708, p.81-3
- 30 [Documento no de patente 10] Karpovsky B *et al.*, "J. Exp. Med." 1984, Vol. 160, nº 6, p.1686-701 1
- [Documento no de patente 11] Suresh MR *et al.*, "Methods Enzymol." 1986, Vol.121, p. 210-28
- 35 [Documento no de patente 12] Massimo YS *et al.*, "J. Immunol. Methods" 1997, Vol.201, p.57-66
- [Documento no de patente 13] Brennan M *et al.*, "Science" 1985, Vol.229, p. 81
- [Documento no de patente 14] Shalaby MR *et al.*, "J. Exp. Med." 1992, Vol.175, p.217-25 '
- 40 [Documento no de patente 15] Holliner P *et al.*, "Proc. Natl. Acad. Sci. USA" 1993, Vol.90, p. 6444-8
- [Documento no de patente 16] Ridgway JB *et al.*, "Protein Eng." 1996, Vol.9, p. 617-21
- 45 [Documento no de patente 17] Hammerling U *et al.*, "J. Exp. Med." 1968, Vol.128, p.1461-73
- [Documento no de patente 18] Kurokawa T *et al.*, "Bio/Technology" 1989, Vol.7, p.1163
- [Documento no de patente 19] Link BK *et al.*, "Blood" 1993, Vol.81, p.3343
- 50 [Documento no de patente 20] Nitta T *et al.*, "Lancet" 1990, Vol.335, p.368-71
- [Documento no de patente 21] deLeij L *et al.*, "Foundation Nationale de Transfusion Sanguine, Les Ulis France" 1990, p.249-53
- 55 [Documento no de patente 22] Le Doussal JM *et al.*, "J. Nucl. Med." 1993, Vol.34, p. 1662-71 1
- [Documento no de patente 23] Stickney DR *et al.*, "Cancer Res." 1991, Vol.51, p.6650-5
- 60 [Documento no de patente 24] Weiner LM *et al.*, "Cancer Res." 1993, Vol.53, p.94-100
- [Documento no de patente 25] Kroesen BJ *et al.*, "Br. J. Cancer" 1994, Vol.70, p.652-61
- [Documento no de patente 26] Weiner GJ *et al.*, "J. Immunol." 1994, Vol.152, p.2385
- 65 [Documento no de patente 27] Suresh MR *et al.*, "Proc. Natl. Acad. Sci. USA" 1986, Vol.83, p.7989-93

[Documento no de patente 28] Milstein C y Cuello AC, "Nature" 1983, Vol.305, p.537

[Documento no de patente 29] Xiang J *et al.*, "Mol. Immunol." 1990, Vol.27, p.809

[Documento no de patente 30] Bebbington CR *et al.*, "Bio/Technology" 1992, Vol.10, p. 169

[Documento no de patente 31] Huse WD *et al.*, "Science" 1989, Vol. 246, p.1275

[Documento no de patente 32] McCafferty J *et al.*, "Nature" 1990, Vol.348, p.552

[Documento no de patente 33] Kang AS *et al.*, "Proc. Natl. Acad. Sci. USA" 1991, Vol.88, p. 4363

Ruef *et al.* (Thromb. Haemost. 82:109-114, 1990) dan a conocer un constructo de anticuerpo biespecífico que consiste de dos Fab que dirigen la uroquinasa a epítomos de fibrina y de plaquetas.

Exposición de la invención

Un objetivo de la presente invención consiste en proporcionar anticuerpos biespecíficos que sustituyan funcionalmente a los cofactores que potencian las reacciones enzimáticas.

A partir de la investigación específica, se han podido descubrir anticuerpos biespecíficos que se unen específicamente tanto a F.IX/F.IXa como a F.X y sustituyen la función del cofactor F.VIIIa (es decir, una función de estimulación de la activación de F.X por parte de F.IXa). Es decir, se han podido producir anticuerpos biespecíficos que reconocen tanto un enzima como su sustrato y que sustituyen funcionalmente los cofactores del enzima.

La presente invención se refiere a anticuerpos biespecíficos que sustituyen funcionalmente los cofactores que potencian las reacciones enzimáticas, y más concretamente a:

[1] un anticuerpo que reconoce tanto un enzima como un sustrato del mismo, en el que dicho anticuerpo es un anticuerpo biespecífico que sustituye funcionalmente un cofactor que potencia las reacciones enzimáticas,

en el que dicho enzima es un enzima proteolítico, y

en el que dichos enzima proteolítico y cofactor son factores asociados a la coagulación sanguínea/fibrinólisis y

en el que el enzima de un factor de coagulación sanguínea/fibrinólisis es el factor IX de coagulación sanguínea y/o el factor IX activado de coagulación sanguínea; el sustrato es el factor X de coagulación sanguínea y el cofactor es el factor VIII de coagulación sanguínea y/o el factor VIII activado de coagulación sanguínea.

[2] El anticuerpo según [1], en el que dicho anticuerpo comprende una región determinante de complementariedad que comprende la secuencia de aminoácidos de la CDR3 del anticuerpo anti-factor de coagulación sanguínea IX/IXa de los siguientes (a1) o (a2) o una región determinante de complementariedad equivalente funcionalmente a la misma, y una región determinante de complementariedad que comprende la secuencia de aminoácidos de la CR3 del anticuerpo anti-factor de coagulación sanguínea X en cualquiera de los siguientes (b1) a (b9) o una región determinante de complementariedad equivalente funcionalmente a la misma:

(a1) secuencia de aminoácidos de la CDR3 de la cadena H descrita en SEC ID nº 16,

(a2) secuencia de aminoácidos de la CDR3 de la cadena H descrita en SEC ID nº 20,

(b1) secuencia de aminoácidos de la CDR3 de la cadena H descrita en SEC ID nº 24,

(b2) secuencia de aminoácidos de la CDR3 de la cadena H descrita en SEC ID nº 28,

(b3) secuencia de aminoácidos de la CDR3 de la cadena H descrita en SEC ID nº 32,

(b4) secuencia de aminoácidos de la CDR3 de la cadena H descrita en SEC ID nº 3b,

(b5) secuencia de aminoácidos de la CDR3 de la cadena H descrita en SEC ID nº 40,

(b6) secuencia de aminoácidos de la CDR3 de la cadena H descrita en SEC ID nº 44,

(b7) secuencia de aminoácidos de la CDR3 de la cadena H descrita en SEC ID nº 48,

(b8) secuencia de aminoácidos de la CDR3 de la cadena H descrita en SEC ID nº 52,

(b9) secuencia de aminoácidos de la CDR3 de la cadena H descrita en SEC ID nº 56.

[3] El anticuerpo según cualquiera de entre [1] y [2], en el que dicho anticuerpo comprende una región determinante de complementariedad que comprende la secuencia de aminoácidos de la CDR del anticuerpo anti-factor de coagulación sanguínea IX/IXa de los siguientes (a1) o (a2) o una región determinante de complementariedad equivalente funcionalmente a la misma, y una región determinante de complementariedad que comprende la secuencia de aminoácidos de la CDR del anticuerpo anti-factor de coagulación sanguínea X descrita en cualquiera de los siguientes (b1) a (b9) o una región determinante de complementariedad equivalente funcionalmente a la misma:

- (a1) secuencias de aminoácidos de las CDR 1, 2 y 3 de la cadena H descritas en SEC ID nº 14, 15 y 16, respectivamente,
- 5 (a2) secuencias de aminoácidos de las CDR 1, 2 y 3 de la cadena H descritas en SEC ID nº 18, 19 y 20, respectivamente,
- (b1) secuencias de aminoácidos de las CDR 1, 2 y 3 de la cadena H descritas en SEC ID nº 22, 23 y 24, respectivamente,
- 10 (b2) secuencias de aminoácidos de las CDR 1, 2 y 3 de la cadena H descritas en SEC ID nº 26, 27 y 28, respectivamente,
- (b3) secuencias de aminoácidos de las CDR 1, 2 y 3 de la cadena H descritas en SEC ID nº 30, 31 y 32, respectivamente,
- 15 (b4) secuencias de aminoácidos de las CDR 1, 2 y 3 de la cadena H descritas en SEC ID nº 34, 35 y 36, respectivamente,
- (b5) secuencias de aminoácidos de las CDR 1, 2 y 3 de la cadena H descritas en SEC ID nº 38, 39 y 40, respectivamente,
- (b6) secuencias de aminoácidos de las CDR 1, 2 y 3 de la cadena H descritas en SEC ID nº 42, 43 y 44, respectivamente,
- 25 (b7) secuencias de aminoácidos de las CDR 1, 2 y 3 de la cadena H descritas en SEC ID nº 46, 47 y 48, respectivamente,
- (b8) secuencias de aminoácidos de las CDR 1, 2 y 3 de la cadena H descritas en SEC ID nº 50, 51 y 52, respectivamente,
- 30 (b9) secuencias de aminoácidos de las CDR 1, 2 y 3 de la cadena H descritas en SEC ID nº 54, 55 y 56, respectivamente.
- 35 [4] Una composición que comprende el anticuerpo según cualquiera de entre [1] y [3] y un portador farmacéuticamente aceptable.
- [5] La composición según [4], en la que dicha composición es una composición farmacéutica utilizada para prevenir y/o tratar el sangrado, un trastorno acompañado de sangrado, o un trastorno provocado por el sangrado.
- 40 [6] La composición según [5], en la que el sangrado, un trastorno acompañado de sangrado, o un trastorno provocado por sangrado es un trastorno que aparece y/o progresa como resultado de una reducción o deficiencia de actividad del factor VIII de coagulación sanguínea o del factor VIII activado de coagulación sanguínea.
- 45 [7] La composición según [6], en la que el trastorno que aparece y/o progresa como resultado de una reducción o deficiencia de actividad del factor VIII de coagulación sanguínea y/o del factor VIII activado de coagulación sanguínea es la hemofilia A.
- 50 [8] La composición según [6], en la que el trastorno que aparece y/o progresa como resultado de una reducción o deficiencia de actividad del factor VIII de coagulación sanguínea y/o del factor VIII activado de coagulación sanguínea es un trastorno en el que se genera un inhibidor del factor VIII de coagulación sanguínea y/o del factor VIII activado de coagulación sanguínea.
- 55 [9] La composición según [6], en la que el trastorno que aparece y/o progresa como resultado de una reducción o deficiencia de actividad del factor VIII de coagulación sanguínea y/o del factor VIII activado de coagulación sanguínea es la hemofilia adquirida.
- 60 [10] La composición según [6], en la que el trastorno que aparece y/o progresa como resultado de una reducción o deficiencia de actividad del factor VIII de coagulación sanguínea y/o del factor VIII activado de coagulación sanguínea es la enfermedad de von Willebrand.
- 65 [11] Un método para la prevención y/o tratamiento del sangrado, de un trastorno acompañado de sangrado, o de un trastorno provocado por el sangrado, en el que dicho método comprende la etapa de administrar el anticuerpo según cualquiera de entre [1] y [3], o la composición según cualquiera de entre [4] y [10].

[12] Utilización del anticuerpo según cualquiera de entre [1] y [3] para la preparación de la composición según cualquiera de entre [4] y [10].

5 [13] Kit utilizado en el método de prevención y/o tratamiento de trastornos según [11], en el que dicho kit comprende por lo menos el anticuerpo según cualquiera de entre [1] y [3] o la composición según [4].

10 [14] Método para prevenir y/o tratar el sangrado, un trastorno acompañado de sangrado, o un trastorno provocado por sangrado, en el que dicho método comprende la etapa de administrar el anticuerpo según cualquiera de entre [1] y [3] o la composición según cualquiera de entre [4] y [10] en combinación con el factor VIII de coagulación sanguínea.

15 [15] Kit utilizado en el método de prevención y/o tratamiento del sangrado, de un trastorno acompañado de sangrado o de un trastorno provocado por el sangrado, según [14], en el que dicho kit comprende por lo menos el anticuerpo según cualquiera de entre [1] y [3], o la composición según [4], y el factor VIII de coagulación sanguínea.

Breve descripción de los dibujos

20 La figura 1 ilustra la región de inserción de pcDNA4-g4H.

La figura 2 ilustra las regiones de inserción de pcDNA4-g4L y pIND-g4L.

25 La figura 3 ilustra la región de inserción de pIND-g4H.

La figura 4 ilustra los resultados de la medición de la actividad mimética de F.VIIIa de un anticuerpo biespecífico anti-F.IXa/anti-F.X, generado a partir del anticuerpo XB12 anti-F.IXa y los anticuerpos anti-F.X SB04, SB21, SB42, SB38, SB30, SB07, SB05, SB06 o SB34. La concentración de las soluciones de anticuerpos era 10 µg/ml (concentración final: 1 µg/ml). El resultado fueron nueve tipos de anticuerpos biespecíficos que mostraban un incremento de la actividad mimética de F.VIIIa: XB12/SB04, XB12/SB21, XB12/SB42, XB12/SB38, XB12/SB30, XB12/SB07, XB12/SB05, XB12/SB06 y XB12/SB34, en orden de intensidad de la actividad.

30

La figura 5 ilustra los resultados de la medición de la actividad mimética de F.VIIIa de un anticuerpo biespecífico anti-F.IXa/anti-F.X generado a partir del anticuerpo XT04 anti-F.IXa y anticuerpos anti-F.X SB04, SB21, SB42, SB38, SB30, SB07, SB05, SB06 o SB34. La concentración de las soluciones de anticuerpo era 10 µg/ml (concentración final: 1 µg/ml). En consecuencia, XT04/SB04, XT04/SB21, XT04/SB42, XT04/SB38, XT04/SB30, XT04/SB07, XT04/SB05, XT04/SB06 y XT04/SB34 mostraron un incremento de la actividad mimética de F.VIIIa.

35

La figura 6 ilustra los resultados de la medición de la actividad mimética de F.VIIIa de diversas concentraciones de XB12/SB04, que mostraban la actividad más alta en la figura 4. En consecuencia, XB12/SB04 mostró un incremento dependiente de la concentración de la actividad mimética de F.VIIIa.

40

La figura 7 ilustra los resultados de la medición del tiempo de coagulación plasmática (APTT) en presencia de XB12/SB04, XB12/SB21, XB12/SB42, XB12/SB38, XB12/SB30, XB12/SB07, XB12/SB05, XB12/SB06 o XB12/SB34. La concentración de las soluciones de anticuerpo mezclas con plasma deficiente en F.VIII era de 1,7 µg/ml para XB12/SB06 y de 10 µg/ml para el resto. En consecuencia, XB12/SB04, XB12/SB21, XB12/SB42, XB12/SB38, XB12/SB30, XB12/SB07, XB12/SB05, XB12/SB06 y XB12/SB34 mostraron un efecto de acortamiento del tiempo de coagulación en comparación con la ausencia de los anticuerpos.

45

La figura 8 ilustra los resultados de la medición del tiempo de coagulación plasmática (APTT) en presencia de XT04/SB04, XT04/SB21, XT04/SB42, XT04/SB38, XT04/SB30, XT04/SB07, XT04/SB05, XT04/SB06 y XT04/SB34. La concentración de las soluciones de anticuerpo mezcladas con plasma deficiente en F.VIII era de 5 µg/ml para XT04/SB34 y de 10 µg/ml para el resto. En consecuencia, XT04/SB04, XT04/SB21, XT04/SB42, XT04/SB38, XT04/SB30, XT04/SB07, XT04/SB05 y XT04/SB06 mostraron un efecto de acortamiento del tiempo de coagulación en comparación con la ausencia de los anticuerpos. XT04/SB34 no mostró ningún efecto de acortamiento del tiempo de coagulación.

50

55

La figura 9 ilustra los resultados de la medición del tiempo de coagulación con diversas concentraciones de XB12/SB04, que mostró el efecto de acortamiento del tiempo de coagulación (APTT) más alto en las figuras 7 y 8. En consecuencia, XB12/SB04 mostró un efecto dependiente del tiempo de coagulación dependiente de la concentración. La concentración de anticuerpo en la figura muestra valores de la solución de anticuerpo mezclados con plasma deficiente en F.VIII.

60

La figura 10 ilustra los resultados de la transferencia *western* de GST-AP de SB04 o SB06, en donde 1), 2) y 3) son los resultados de hacer reaccionar GST-AP transcrito con SB04, SB06 y una muestra que no contenía anticuerpo, respectivamente. Los resultados muestran la detección de únicamente la reacción de unión de SB04 y GST-AP.

65

La figura 11 ilustra un vector pELBGlacl. ColE1ori: la región del origen de replicación de la serie de plásmidos ColE1; f1 ori: región del origen de replicación del fago f1; lacl: región codificante de la proteína represora de la lactosa; P_{lac}: promotor lactosa; pelBss: secuencia de señal de la proteína PelB de *E. coli*; scFv: región codificante de la molécula monocatenaria de anticuerpo; gen III (gen3): región codificante de la proteína del gen III del fago f1; Amp^r: gen de resistencia a la ampicilina, y Sfil: sitio de corte del enzima de restricción Sfil.

La figura 12 ilustra los resultados de la medición de la actividad mimética de F.VIIIa utilizando sobrenadantes de cultivo de los anticuerpos biespecíficos expresados, que son combinaciones de un anticuerpo anti-F.IXa (A19, A25, A31, A38, A39, A40, A41, A44, A50, A69 o XB12) y un anticuerpo anti-F.X (B2, B5, B9, B10, B11, B12, B13, B14, B15, B16, B18, B19, B20, B21, B23, B25, B26, B27, B31, B34-1, B34-2, B35, B36, B38, B42, SB04, SB15 o SB27). "+" representa casos en los que la actividad mimética de F.VIIIa es 0,1 o superior.

La figura 13 ilustra los resultados de un ensayo de coagulación plasmática realizado utilizando preparaciones purificadas de anticuerpos biespecíficos expresados, que se combinan a partir de un anticuerpo anti-F.IXa (A19, A25, A31, A38, A39, A40, A41, A44, A50, A69 o XB12) y un anticuerpo anti-F.X (B2, B5, B9, B10, B11, B12, B13, B14, B15, B16, B18, B19, B20, B21, B23, B25, B26, B27, B31, B34-1, B34-2, B35, B36, B38, B42, SB04, SB15 o SB27). El tiempo de coagulación se acortó en 10 a 20 segundos ("+"), en 20 a 40 segundos ("++"), en 40 a 50 segundos ("+++") o en 50 segundos ("++++") o más con la adición del anticuerpo en comparación con la no adición de los anticuerpos.

La figura 14 ilustra los resultados de la medición del tiempo de coagulación en diversas concentraciones de A44/B26, que presentaba un efecto de acortamiento elevado del tiempo de coagulación (APTT) en la figura 13. El tiempo de coagulación era de 113 segundos en el caso de no adición de anticuerpo. En consecuencia, A44/B26 mostró un efecto dependiente de la concentración de acortamiento del tiempo de coagulación. La concentración de anticuerpo en la figura muestra valores de la solución de anticuerpo mezclada con plasma deficiente en F.VIII.

La figura 15 ilustra los resultados de la medición del tiempo de coagulación a diversas concentraciones de A69/B26, que presentaba un efecto de acortamiento elevado del tiempo de coagulación (APTT) en la figura 13. El tiempo de coagulación era de 109,6 segundos en el caso de no adición del anticuerpo. En consecuencia, A69/B26 mostró un efecto dependiente de la concentración de acortamiento del tiempo de coagulación. La concentración de anticuerpo en la figura muestra valores de la solución de anticuerpo mezclada con plasma deficiente en F.VIII.

La figura 16 ilustra los resultados de la medición del tiempo de coagulación (APTT) en la coexistencia de A44/B26 o XB12/SB04 con F.VIII. En consecuencia, en comparación con F.VIII solo, una solución mixta de A44/B26 o XB12/SB04 con F.VIII mostró un efecto de acortamiento del tiempo de coagulación.

La figura 17 ilustra los resultados de la medición del tiempo de coagulación (APTT) en plasma inhibidor bajo la presencia de A44/B26 o XB12/SB04. En consecuencia, A44/B26 o XB12/SB04 mostraron un efecto de acortamiento del tiempo de coagulación en comparación con la ausencia de anticuerpos.

La figura 18 ilustra los resultados de la medición del tiempo de coagulación a diversas concentraciones de XB12/SB04 humanizado y de XB12/SB04 humanizado. El tiempo de coagulación era de 111,3 segundos en el caso de no adición de anticuerpo. Como consecuencia de la medición, XB12 humanizado/SB04 humanizado mostró un efecto de acortamiento del tiempo de coagulación similar al de XB12/SB04. La concentración de anticuerpo en la figura muestra los valores de las soluciones de anticuerpo mezclas con plasma deficiente en F.VIII.

Mejor modo de poner en práctica la invención

Un anticuerpo biespecíficos según la presente invención es una molécula que comprende dos tipos de anticuerpo o de fragmentos de anticuerpo que presentan especificidades para diferentes antígenos. El anticuerpo biespecífico es, sin limitación particular aunque preferentemente, monoclonal.

Los anticuerpos biespecíficos de la presente invención son preferentemente anticuerpos recombinantes, generados utilizando técnicas de recombinación génica (ver, por ejemplo, Borrebaeck C.A.K. y Larrick J.W., *Therapeutic monoclonal antibodies*, publicado en el Reino Unido por MacMillan Publishers Ltd., 1990). Puede obtenerse un anticuerpo recombinante mediante clonación de un ADN codificante de anticuerpo a partir de células productoras de anticuerpos, tales como hibridomas o linfocitos sensibilizados, que incorporan el ADN en un vector apropiado, e introducir el vector en un huésped para la producción de anticuerpos.

Además, los anticuerpos de la presente invención pueden ser fragmentos de anticuerpo o anticuerpos modificados. Los fragmentos de anticuerpo comprenden los diacuerpos (Db), los anticuerpos lineales, las moléculas de anticuerpo monocatenario (en adelante también denominados scFv), etc. En la presente memoria, un fragmento "Fv" representa el fragmento de anticuerpo más pequeño que comprende sitios completos de reconocimiento de antígeno y de unión. Un fragmento "Fv" es un dímero (dímero V_H-V_L) en el que una región variable de cadena pesada (H) (V_H) y una región variable de cadena ligera (L) (V_L) se encuentran fuertemente conectados mediante un enlace no

covalente. Tres regiones determinantes de complementariedad (CDR) de cada región variable interactúan formando un sitio de unión a antígeno sobre la superficie de un dímero V_H-V_L . Seis CDR proporcionan un sitio de unión a antígeno sobre un anticuerpo. Sin embargo, incluso una región variable (o la mitad de un Fv que contiene únicamente tres CDR específicos de antígeno) es capaz de reconocer un antígeno y la unión al mismo, aunque su afinidad es inferior a la del sitio de unión completo.

Además, el fragmento Fab (también denominado F(ab)) contiene además una región constante de cadena L y una región constante de cadena H (CH1). Un fragmento Fab' difiere de un fragmento Fab en que el primero contiene varios residuos adicionales derivados del extremo carboxilo-terminal una región CH1 de cadena H, que comprende una o más cisteínas de la región bisagra de un anticuerpo. Fab'-SH se refiere a Fab' que presenta un grupo tiol libre en uno o más residuos cisteína de la región constante. Los fragmentos F(ab') se generan mediante corte del enlace disulfuro en las cisteínas de la parte bisagra de un dímero con pepsina de F(ab')₂. El experto en la materia también conocerá otros fragmentos de anticuerpo unidos químicamente.

Diacuerpo se refiere a un fragmento bivalente de anticuerpo construido mediante fusión génica (Holliger P. *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:6444-6448, 1993; documento EP 404 097, documento WO 93/11161, etc.). Un diacuerpo es un dímero que comprende dos cadenas peptídicas; en cada cadena polipeptídica, una región variable de cadena L (V_L) se encuentra conectada a una región variable de cadena H (V_H) en la misma cadena mediante una molécula conectora que es excesivamente corta para permitir el apareamiento entre las dos regiones (por ejemplo aproximadamente 5 residuos). V_L y V_H codificados en la misma cadena polipeptídica forman un dímero debido a que no pueden formar un fragmento monocatenario de región variable debido a que la molécula conectora entre ellas es corta. De esta manera, un diacuerpo acaba presentando dos sitios de unión a antígeno.

Un anticuerpo monocatenario o fragmento scFv contiene las regiones V_H y V_L de un anticuerpo, y estas regiones existen en una única cadena polipeptídica. En general, un polipéptido Fv contiene además un polipéptido conector entre las regiones V_H y V_L , de manera que scFv puede formar una estructura que resulta necesaria para la unión de antígeno (ver Pluckthun, "The Pharmacology of Monoclonal Antibodies", vol. 113 (Rosenburg y Moore, editores (Springer Verlag, New York), páginas 269 a 315, 1994, para comentarios generales sobre scFv). Las moléculas conectoras de la presente invención no se encuentran particularmente limitadas, con la condición de que no inhiban la expresión de las regiones variables de anticuerpo conectadas a ambos extremos de una molécula conectora.

Un anticuerpo biespecífico de tipo IgG puede ser secretado por un hibridoma híbrido (un cuadroma) formado mediante la fusión de dos tipos de hibridoma que producen anticuerpos IgG (Milstein C. *et al.*, Nature 305:537-540, 1983). También puede ser secretado mediante la introducción en las células de genes de las cadenas L y H que constituyen las dos IgG de interés (un total de cuatro tipos de genes) para la coexpresión.

Sin embargo, en teoría, existen hasta diez combinaciones de cadenas H y L en las IgG producidas mediante estos métodos. Resulta difícil purificar una IgG que comprenda la combinación deseada de cadenas H y L de diez tipos diferentes de IgG. Además, en teoría, se reduce drásticamente la cantidad de la combinación de interés, y de esta manera, resulta necesario el cultivo celular a gran escala, lo que conduce a un incremento adicional del coste de fabricación.

En este caso, mediante la sustitución apropiada del aminoácido o aminoácidos en la región CH3 de una cadena H, resulta posible secretar preferentemente las IgG que presentan una combinación heteróloga de cadenas H (Ridgway J.B. *et al.*, Protein Engineering 9:617-621, 1996; Merchant A.M. *et al.*, Nature Biotechnology 16:677-681, 1998).

Respecto a las cadenas L, una región variable de cadena L es menos diversa en comparación con una región variable de cadena H; por lo tanto, podría esperarse la adquisición de una cadena L común que proporcione actividades de unión con dos cadenas H. La expresión eficiente de una IgG biespecífica resulta posible al introducir genes de esta cadena L común y ambas cadenas H en una célula para la expresión de IgG (Nature Biotechnology 16:677-681, 1998). Sin embargo, la posibilidad de tipos seleccionados aleatoriamente de anticuerpos que contengan la misma cadena L es baja; de esta manera, resulta difícil poner en práctica la idea mencionada anteriormente. A este respecto, se ha propuesto un método para la selección de una cadena L común adaptadora de cadenas H arbitrariamente diferentes con el fin de mostrar una capacidad de unión elevada (documento WO 2004/065611). Una cadena H que presente la variante de CH3 indicada anteriormente (Nature Biotechnology 16:677-681, 1998) resulta raramente secretada en ausencia de la otra cadena H. Mediante la utilización de esta característica para inducir en primer lugar la expresión de las cadenas L y H del brazo derecho y detener la expresión, y después inducir la expresión de las cadenas L y H del brazo izquierdo, puede incrementarse la proporción de IgG expresadas en la combinación de interés (documento PCT JP2004/008585).

También puede prepararse un anticuerpo biespecífico mediante el entrecruzamiento químico de Fabs. Puede producirse un F(ab')₂ biespecífico, por ejemplo, mediante maleimidación de un Fab' preparado a partir de un anticuerpo con o-PDM (orto-fenilendimaleimida) y haciendo reaccionar el producto con un Fab' preparado a partir de otro anticuerpo, de manera que se entrecrucen los Fabs derivados de diferentes anticuerpos (Keler T. *et al.*, Cancer Research 57:4008-4014, 1997). Además, también se conoce un método para conectar químicamente fragmentos de anticuerpo tales como un ácido Fab'-tionitrobenzoico (TNB) y Fab'-tiol (SH) (Brennan M. *et al.*, Science 229:81-

83, 1985).

En lugar del entrecruzamiento, puede utilizarse una cremallera de leucinas derivada de Fos y Jun o similar. Aunque Fos y Jun también forman un homodímero, se utiliza su preferencia de formación del heterodímero. Para la preparación se expresan un Fab' con adición de una cremallera de leucinas Fos y un segundo Fab' con adición de una cremallera de leucinas Jun. Mediante la mezcla y reacción de Fab'-Fos monomérico y Fab' Jun, que han sido reducidos bajo condiciones suaves, puede formarse un F(ab')₂ biespecífico (Kostelny S.A. *et al.*, J. of Immunology 148:1547-53, 1992). Este método no se encuentra limitado a Fab' y también puede aplicarse a scFv, Fv, etc.

También puede prepararse un anticuerpo biespecífico en una forma de diacuerpo. Un diacuerpo biespecífico es un heterodímero que comprende dos fragmentos scFv entrecruzados. Es decir, puede prepararse un anticuerpo biespecífico mediante la construcción de un heterodímero utilizando V_H(A)-V_L(B) y V_H(B)-V_L(A), que se han formado mediante la conexión de V_H y V_L derivados de dos tipos de anticuerpo: A y B, con una molécula conectora relativamente corta, de aproximadamente 5 residuos aminoácidos (Holliger P. *et al.*, Proc. of the National Academy of Sciences of the USA 90:6444-6448, 1993).

En este caso, puede estimularse la construcción de un diacuerpo biespecífico de interés llevando a cabo sustituciones apropiadas de aminoácidos (botón-en-ochal: Zhu Z. *et al.*, Protein Science 6:781-788, 1997), de manera que se unan dos tipos de scFv con una molécula conectora flexible y relativamente larga, de aproximadamente 15 residuos aminoácidos (un diacuerpo monocatenario: Kipriyanov S.M. *et al.*, J. of Molecular Biology 293:41-56, 1999).

El fragmento sc(Fv)₂, que puede prepararse mediante la unión de dos tipos de scFv con una molécula conectora flexible y relativamente larga, de aproximadamente 15 residuos aminoácidos, también puede convertirse en un anticuerpo biespecífico (Mallender W.D. *et al.*, J. of Biological Chemistry 269:199-206, 1994).

Un anticuerpo modificado puede ser, por ejemplo, un anticuerpo que se una a diversas moléculas, tales como polietilenglicol (PEG). En los anticuerpos modificados de la presente invención, no existe limitación respecto a las sustancias que pueden unirse. Dichos anticuerpos modificados pueden obtenerse modificando químicamente los anticuerpos obtenidos. Estos métodos ya se encuentran establecidos en el presente campo.

Entre los anticuerpos de la presente invención se incluyen anticuerpos humanos, de ratón, de rata y similares, sin ninguna limitación respecto a su origen, y pueden ser anticuerpos genéticamente modificados, tales como un anticuerpo quimérico y un anticuerpo humanizado.

Los métodos para obtener anticuerpos humanos son conocidos, y puede obtenerse un anticuerpo humano de interés, por ejemplo, mediante la inmunización de un animal transgénico que presente todos los repertorios de genes de anticuerpo humano con un antígeno de interés (ver los documentos WO 93/12227, 92/03918, 94/02602, 94/25585, 96/34096 y 96/33735).

Pueden producirse anticuerpos genéticamente modificados mediante métodos conocidos. Específicamente, por ejemplo, un anticuerpo quimérico comprende regiones variables de las cadenas H y L de un anticuerpo procedentes de animales inmunizados, y regiones constantes de las cadenas H y L de un anticuerpo humano. Puede obtenerse un anticuerpo quimérico mediante unión de un ADN codificante de la región variable de un anticuerpo derivado de animales inmunizados con un ADN codificante de la región constante de un anticuerpo humano, insertando el ADN resultante en un vector de expresión, e introduciendo el vector recombinante en un huésped para la producción.

Un anticuerpo humanizado es un anticuerpo modificado también denominado anticuerpo humano reformado. Un anticuerpo humanizado se construye mediante injerto de la región determinante de complementariedad (CDR) de un anticuerpo derivado de animales inmunizados en la CDR de un anticuerpo humano. También son conocidas las tecnologías generales de ingeniería genética.

Concretamente, se sintetiza mediante PCR una secuencia de ADN diseñada para unir la CDR de un anticuerpo de ratón a la región marco (FR) de un anticuerpo humano, utilizando varios oligonucleótidos que han sido preparados para que contengan partes solapantes en sus regiones terminales. Tras unir el ADN obtenido a un ADN codificante de la región constante de un anticuerpo humano, el ADN resultante se incorpora en un vector de expresión y se introduce en un huésped para producir un anticuerpo humanizado (ver los documentos EP 239 400 y WO 96/02576). A modo de FR de anticuerpo humano para la unión mediante CDR, se selecciona uno que pueda formar un sitio de unión a antígeno con una buena región determinante de complementariedad. Pueden sustituirse aminoácidos de la región marco en una región variable de anticuerpo según resulte necesario, de manera que la región determinante de complementariedad de un anticuerpo humano reformado forme un sitio de unión a antígeno apropiado (Sato K. *et al.*, Cancer Research 53:851-856, 1993). La región marco puede sustituirse con regiones marco derivadas de diversos anticuerpos humanos (ver el documento WO 99/51743).

La presente invención proporciona anticuerpos biespecíficos que sustituyen funcionalmente los cofactores que reconocen tanto un enzima como su sustrato.

Los cofactores de la presente invención no se encuentran particularmente limitados, con la condición de que puedan actuar sobre un enzima potenciando la reacción enzimática. Un cofactor de la presente invención es, por ejemplo, un cofactor de un enzima proteolítico. Son ejemplos específicos de un cofactor de un enzima proteolítico, los cofactores para la coagulación sanguínea y los factores asociados a la fibrinólisis (F.VIII/F.VIIIa, F.V/F.Va, PZ, TM, sistema TM/PS), los cofactores de reacciones del complemento (C4b, MCP, CR1, factor H) y similares.

Las combinaciones siguientes pueden proporcionarse como ejemplos específicos de enzima y sustrato del enzima, así como cofactores enzimáticos.

10 (a) Cofactor de la coagulación sanguínea y factor asociado a la fibrinólisis (ejemplo 1).

Enzima: F.IXa
Sustrato: F.X
Cofactor: F.VIII/F.VIIIa

15 El cofactor F.VIIIa se une tanto a F.IXa como a F.X y potencia la activación del F.X por parte de F.IXa. Entre los anticuerpos biespecíficos que reconocen los mencionados anteriormente enzima F.IXa y sustrato F.X, algunos presentan un efecto potenciador de la activación de F.X. Algunos de estos anticuerpos se cree que presentan un efecto de sustitución de la función del cofactor F.VI-II/F.VIIIa.

20 (b) Cofactor de la coagulación sanguínea y factor asociado a la fibrinólisis (ejemplo 2).

Enzima : ZPI
Sustrato: F.X/F.Xa
Cofactor: PZ

25 El cofactor PZ se une a ZPI de la familia de la serpina y al factor X activado de coagulación sanguínea (F.Xa) potenciando la actividad inhibidora de F.Xa del ZPI. Concretamente, algunos anticuerpos biespecíficos que reconocen tanto ZPI como F.X/F.Xa se cree que presentan un efecto de sustitución de la función de PC.

30 (c) Cofactor de la coagulación sanguínea y factor asociado a la fibrinólisis (ejemplo 3).

Enzima: trombina
Sustrato: TAFI
Cofactor: TM

35 El cofactor TM potencia la activación de TAFI por parte de la trombina. Concretamente, algunos anticuerpos biespecíficos que reconocen tanto la trombina como TAFI se cree que presentan un efecto de sustitución de la función de TM.

40 (d) Cofactor de la coagulación sanguínea y factor asociado a la fibrinólisis (ejemplo 4).

Enzima: trombina
Sustrato: PC
Cofactores: TM/PS

45 El sistema TM/PS potencia la activación de PC por parte de la trombina. Concretamente, algunos anticuerpos biespecíficos que reconocen tanto la trombina como PC se cree que sustituyen funcionalmente al sistema TM/PS.

50 (e) Cofactor de la coagulación sanguínea y factor asociado a la fibrinólisis (ejemplo 5)

Enzima: F.Xa
Sustrato: protrombina
Cofactor: F.V/F.Va

55 El cofactor F.Va se une tanto a F.Xa como a la protrombina, potenciando la activación de la protrombina por parte de F.Xa. Entre los anticuerpos biespecíficos que reconocen tanto el enzima mencionado anteriormente F.Xa como su sustrato protrombina, algunos presentan efectos potenciadores de la activación de la protrombina. Algunos de estos anticuerpos se cree que presentan una función que sustituye a la función del cofactor F.V/F.Va.

60 (f) Cofactor de la reacción del complemento (ejemplo 1).

Enzima: C1s
Sustrato: C2
Cofactor: C4b

65

C4b presenta el efecto estimulador de C1s sobre la descomposición de C2. Concretamente, algunos anticuerpos biespecíficos que reconocen tanto los C1s como C2 se cree que sustituyen funcionalmente a C4b.

(g) Cofactores de la reacción del complemento (ejemplo 2).

5 Enzima: factor I regulador del complemento
 Sustrato: C3b
 Cofactores: factor H regulador del complemento
 10 Proteína cofactor membranal (MCP), y
 Receptor 1 del complemento (CR1)

15 Los factores reguladores del complemento H, MCP y CR1 presentan el efecto estimulador del factor regulador del complemento 1 sobre la degradación de C3b. Concretamente, entre los anticuerpos biespecíficos que reconocen tanto el factor 1 regulador del complemento y C3b, se cree que algunos sustituyen funcionalmente a los factores reguladores del complemento H, MCP y CR1.

Entre los cofactores mencionados anteriormente, resulta particularmente preferido el F.VIII/F.VIIIa.

20 Aunque F.VIII/F.VIIIa experimenta una proteólisis limitada por parte de enzimas proteolíticas tales como la trombina, con la condición de que presente actividad de F.VI-II/F.VIIIa, no es importante la forma que presente. Además, las variantes de F.VIII/F.VIIIa y F.VIII/F.VIIIa que han sido modificadas artificialmente mediante técnicas de combinación génica también se incluyen en F.VIII/F.VIIIa, con la condición de que conserven actividad de cofactor F.VIII/F.VIIIa.

25 Los métodos para obtener anticuerpos biespecíficos que sustituyan funcionalmente a cofactores de la presente invención no se encuentran particularmente limitados y pueden obtenerse mediante cualquier método. Por ejemplo, al obtener un anticuerpo biespecífico que sustituya funcionalmente al enzima A y al sustrato B, son inmunizados en un animal tanto el enzima A como el sustrato B con el fin de obtener anticuerpo anti enzima A y anticuerpo anti sustrato B. A continuación, se produce un anticuerpo biespecífico que comprende las cadenas H y L del anticuerpo anti enzima A y las cadenas H y L del anticuerpo anti sustrato B. En la presente memoria resulta deseable obtener varios tipos de cada uno de los anticuerpos anti enzima A y anti sustrato B, de manera que estos anticuerpos puedan utilizarse preferentemente para producir el máximo número posible de combinaciones de anticuerpos biespecíficos. Tras producir los anticuerpos biespecíficos, se seleccionan los anticuerpos que presentan una actividad que sustituya a la función del cofactor.

35 Los anticuerpos contra un enzima o un sustrato pueden obtenerse mediante métodos conocidos por el experto en la materia. Por ejemplo, pueden prepararse anticuerpos mediante la inmunización de animales con antígenos. Los antígenos para inmunizar animales son, por ejemplo, antígenos completos que presenten inmunogenicidad y antígenos incompletos (que incluyan los haptenos) sin inmunogenicidad. En la presente invención, se utiliza un enzima cuyo cofactor pueda sustituirse funcionalmente por un anticuerpo de la presente invención que actúa como cofactor, o un sustrato del enzima, a modo del antígeno (inmunógeno) mencionado anteriormente. Como animales que deben inmunizarse pueden utilizarse, por ejemplo, el ratón, la rata, el hámster, el cobaya, el conejo, el pollo, el mono *rhesus* y similares. La inmunización de estos animales con antígenos puede llevarse a cabo mediante métodos conocidos por el experto en la materia. En la presente invención, las regiones variables de las cadenas L y H de anticuerpo se recogen preferentemente de animales inmunizados o de células de los mismos. Este procedimiento puede ser llevado a cabo por un experto en la materia utilizando métodos generalmente conocidos. Los animales inmunizados con antígenos expresan anticuerpos contra el antígeno, especialmente en las células del bazo. Por lo tanto, puede prepararse, por ejemplo, ARNm a partir de las células del bazo de un animal inmunizado, y recuperarse regiones variables de las cadenas L y H mediante RT-PCR utilizando cebadores de las regiones variables del animal.

50 Concretamente, se inmunizan animales con un enzima o un sustrato. El enzima y el sustrato utilizados como inmunógeno pueden ser proteínas completas o péptidos parciales de las mismas. Además, dependiendo de las circunstancias, puede utilizarse un antígeno candidato unido a otra molécula para formar un antígeno soluble, o fragmentos del mismo, como inmunógeno para la inmunización de animales

55 Se aíslan células del bazo de ratones inmunizados, y se fusionan con células de mieloma de ratón con el fin de producir hibridomas. Tras seleccionar los hibridomas que se unen a los antígenos respectivos, se recuperan las regiones variables de las cadenas H y L mediante RT-PCR, utilizando, por ejemplo, cebadores correspondientes a las regiones variables. También pueden utilizarse cebadores de la CDR, cebadores de regiones marco que se encuentran menos diversificadas que la CDR, o cebadores de secuencias de señal y CH1 o región constante de cadena L (C_L).

60 Alternativamente, se extrae el ARNm de las células de bazo de animales inmunizados y los ADNc de las regiones variables de las cadenas L y H se recuperan mediante RT-PCR utilizando cebadores de la región próxima a las regiones variables. Además, también pueden inmunizarse linfocitos *in vitro* y utilizarse para construir bibliotecas que presentan scFv o Fab. Las regiones variables pueden obtenerse concentrando y clonando un clon de anticuerpos

ligantes de antígeno mediante adsorción (*panning*). En este caso, también puede llevarse a cabo el cribado utilizando bibliotecas similares construidas a partir de ARNm derivados de monocitos de sangre periférica, bazo, amígdala y similares, procedentes de seres humanos y animales no humanizados.

5 A continuación, se utilizan las regiones variables para preparar vectores de expresión de anticuerpos. Mediante la introducción de un vector de expresión de anticuerpo antienzima y un vector de expresión de anticuerpo antisustrato en una misma célula y la expresión de los anticuerpos puede obtenerse un anticuerpo biespecífico.

10 Pueden seleccionarse los anticuerpos que presentan una actividad de sustitución de la función del cofactor, por ejemplo mediante los métodos descritos a continuación.

(1) En un sistema de reacción que comprende el enzima y el sustrato, se lleva a cabo la selección utilizando la elevación de la actividad enzimática (capacidad de degradación del sustrato) como índice, en el que la elevación de la actividad enzimática es un resultado de la adición de anticuerpos.

15 (2) En un sistema para la medición o simulación de las funciones biológicas en las que se encuentran implicados el enzima, el sustrato y cofactor (por ejemplo un sistema para medir la coagulación plasmática), la selección se lleva a cabo utilizando la actividad de recuperación funcional como índice, en la que la actividad de recuperación funcional es un resultado de la adición del anticuerpo en ausencia del cofactor.

20 El anticuerpo así obtenido puede purificarse hasta la homogeneidad. La separación y purificación del anticuerpo pueden llevarse a cabo mediante métodos de separación y purificación utilizados para las proteínas generales. Por ejemplo, pueden separarse y purificarse anticuerpos mediante la selección y combinación apropiadas de columnas de cromatografía tal como la cromatografía de afinidad, la filtración, la ultrafiltración, la precipitación salina, la diálisis, la electroforesis en gel de SDS-poliacrilamida, la electroforesis isoelectrica y similares (Antibodies: A Laboratory Manual, Ed. Harlow y David Lane, Cold Spring Harbor Laboratory, 1988), aunque los métodos no se encuentran limitados a los mismos. Una columna utilizada en la cromatografía de afinidad es, por ejemplo, la columna de proteína A, la columna de proteína G y similares.

25 Por ejemplo, en el caso de que F.VIII/F.VIIIa sea el cofactor sustituto, es decir, en el caso de que la combinación de enzima y sustrato sean los factores de coagulación plasmática y asociado a fibrinólisis F.IXa y F.X, el anticuerpo biespecífico de la presente invención preferentemente presenta una estructura que comprende la región variable de un anticuerpo anti-F.IXa y la región variable de un anticuerpo anti-F.X.

30 Los anticuerpos biespecíficos de la presente invención que sustituyen funcionalmente a F.VIII/F.VIIIa se generaron mediante el método siguiente. Se inmunizaron subcutáneamente ratones con F.IXa o F.X comercial. Se aislaron células de bazo a partir de bazos de los ratones inmunizados con un título elevado de anticuerpos, y se fusionaron con células de mieloma de ratón para formar hibridomas. Se seleccionaron los hibridomas que se unían al antígeno F.IXa o F.X, y se recuperaron las regiones variables de las cadenas L y H mediante RT-PCR utilizando cebadores de las regiones variables. Se incorporó la región variable de la cadena L en un vector de expresión de cadena L que contenía C_L y se insertó la región variable de cadena H en un vector de expresión de cadena H que contenía una región constante de cadena H. Además, se extrajo el ARNm a partir de los bazos de estos ratones inmunizados y cada ADNc de las regiones variables de las cadenas L y H se recuperó mediante RT-PCR utilizando cebadores de la región variable respectiva. Utilizando estas regiones variables, se construyó una biblioteca fágica que presenta scFv. Se concentraron los clones de anticuerpo ligantes de antígeno y se clonaron mediante adsorción (*panning*) y se formaron los vectores de expresión de anticuerpos utilizando la región variable de los mismos. Se introdujeron el anticuerpo anti-F.IXa (cadena H, cadena L) y los vectores de expresión del anticuerpo anti-F.X (cadena H, cadena L) en las mismas células para la expresión de anticuerpos y se obtuvieron anticuerpos biespecíficos.

35 Los anticuerpos biespecíficos así obtenidos se evaluaron para sus efectos de sustitución funcional de F.VIII/F.VIIIa (cofactores para la activación de F.X por parte de F.IXa) en un sistema de ensayo que comprendía F.XIa (enzima activador de F.IX), F.IX, F.X, un sustrato sintético (S-2222) de F.Xa y fosfolípido. En principio, como anticuerpo biespecífico con actividad de sustitución funcional de F.VIII/F.VIIIa, se seleccionaron los anticuerpos biespecíficos que mostraban una actividad mimética de F.VIIIa de 0,1 o superior en este sistema de ensayo basándose en los resultados de ensayo. La actividad mimética de F.VIIIa a la que se hace referencia en la presente memoria es un valor obtenido durante 30 ó 60 minutos restando el valor de cambio de absorbancia de un solvente o sobrenadante de cultivo que no expresa el anticuerpo respecto al valor de cambio de absorbancia de una solución de anticuerpos o de un sobrenadante de cultivo que expresa el anticuerpo.

40 Los anticuerpos biespecíficos seleccionados anteriormente o los anticuerpos biespecíficos estrechamente relacionados con los mismos se midieron para su capacidad de restituir la coagulación en un sistema de ensayo de tiempo de coagulación que utiliza plasma deficiente en F.VIII. En consecuencia, se obtuvieron los anticuerpos biespecíficos capaces de acortar el tiempo de coagulación en comparación con el caso de no adición. El tiempo de coagulación al que se hace referencia en la presente memoria es, tal como se muestra en el ejemplo 7, el tiempo activado parcial de tromboplastina medido utilizando plasma humano deficiente en F.VIII. Entre estos anticuerpos biespecíficos, los anticuerpos biespecíficos preferidos presentan la capacidad de acortar el tiempo de coagulación

10 segundos o más, más preferentemente 20 segundos o más, todavía más preferentemente 40 segundos o más, y con todavía más preferentemente, 50 segundos o más.

La CDR3 de cadena H de los anticuerpos de la presente invención no se encuentra particularmente limitada, pero específicamente presenta una región determinante de complementariedad que comprende una secuencia de aminoácidos, indicada en cualquiera de entre las secuencias de CDR3 de cadena H (SEC ID nº 16, 20, 60, 64, 68, 72, 76, 80, 84, 88, 92 y 96) de XB12, XT04, A19, A25, A31, A38, A39, A40, A41, A44, A50 y A69, indicadas en los ejemplos descritos posteriormente o las equivalentes funcionalmente a las mismas, y la región determinante de complementariedad que comprende una secuencia de aminoácidos indicada en cualquiera de entre las secuencias de CDR3 de cadena H (SEC ID nº 24, 28, 32, 36, 40, 44, 48, 52, 56, 100, 104, 108, 112, 116, 120, 124, 128, 132, 136, 140, 144, 148, 152, 156, 160, 164, 168, 172, 176, 180, 184, 188, 192, 196, 200 y 204) en SB04, SB05, SB06, SB07, SB21, SB30, SB34, SB38, SB42, B2, B5, B9, B10, B11, B12, B13, B14, B15, B16, B18, B19, B20, B21, B23, B25, B26, B27, B31, B34-1, B34-2, B35, B36, B38, B42, SB15 y SB27, respectivamente, o las equivalentes funcionalmente a las mismas.

Además, un ejemplo específico de los anticuerpos mencionados anteriormente se combina preferentemente a partir de un anticuerpo que presenta una región determinante de complementariedad que comprende cualquiera de entre las secuencias de aminoácidos de la CDR de cadena H de XB12, XT04, A19, A25, A31, A38, A39, A40, A41, A44, A50 y A69 (SEC ID nº 14-16, 18-20, 58-60, 62-64, 66-68, 70-72, 74-76, 78-80, 82-84, 86-88, 90-92 y 94-96) o una región determinante de complementariedad equivalente funcionalmente a la misma, y un anticuerpo que presenta una región determinante de complementariedad que comprende cualquiera de entre las secuencias de aminoácidos de la CDR de cadena H (SEC ID nº 22-24, 26-28, 30-32, 34-36, 38-40, 42-44, 46-48, 50-52, 54-56, 98-100, 102-104, 106-108, 110-112, 114-116, 118-120, 122-124, 126-128, 130-132, 134-136, 138-140, 142-144, 146-148, 150-152, 154-156, 158-160, 162-164, 166-168, 170-172, 174-176, 178-180, 182-184, 186-188, 190-192, 194-196, 198-200 y 202-204) en SB04, SB05, SB06, SB07, SB21, SB30, SB34, SB38, SB42, B2, B5, B9, B10, B11, B12, B13, B14, B15, B16, B18, B19, B20, B21, B23, B25, B26, B27, B31, B34-1, B34-2, B35, B36, B38, B42, SB15 y SB27) o una región determinante de complementariedad equivalente funcionalmente a las mismas.

Las secuencias de aminoácidos de las regiones variables de cadena H de XB12, XT04, A19, A25, A31, A38, A39, A40, A41, A44, A50, A69, SB04, SB05, SB06, SB07, SB21, SB30, SB34, SB38, SB42, B2, B5, B9, B10, B11, B12, B13, B14, B15, B16, B18, B19, B20, B21, B23, B25, B26, B27, B31, B34-1, B34-2, B35, B36, B38, B42, SB15 y SB27 dados a conocer en la presente invención se muestran como las SEC ID nº 13, 17, 57, 61, 65, 69, 73, 77, 81, 85, 89, 93, 21, 25, 29, 33, 37, 41, 45, 49, 53, 97, 101, 105, 109, 113, 117, 121, 125, 129, 133, 137, 141, 145, 149, 153, 157, 161, 165, 169, 173, 177, 181, 185, 189, 193, 197 y 201.

Las secuencias de aminoácidos de las regiones variables de cadena L de A44, B26, XB12 y SB04 dadas a conocer en la presente invención se muestran como SEC ID nº 205, 209, 213 y 217. Las secuencias de CDR de cadena L de A44, B26, XB12 y SB04 se muestran como las SEC ID nº 206-208, 210-212, 214-216 y 218-220. Las secuencias de nucleótidos de la CDR de cadena H de XB12, SB04, A44 y B26 se muestran como las SEC ID nº 221 (222), 223 (224), 225 (226), 233 (234), 235 (236), 237 (238), 245 (246), 247 (248), 249 (250), 257 (258), 259 (260) y 261 (262) (las secuencias entre paréntesis son secuencias de aminoácidos codificadas por los ácidos nucleicos respectivos) y sus secuencias de nucleótidos de la CDR de cadena L se muestran como SEC ID nº 227 (228), 229 (230), 231 z (240), 241 (242), 243 (244), 251 (252), 253 (254), 255 (256), 263 (264), 265 (266) y 267 (268).

Las SEC ID nº 58, 62, 66, 70, 74, 78, 82, 86, 90, 94, 98, 102, 106, 110, 114, 118, 122, 126, 130, 134, 138, 142, 146, 150, 154, 158, 162, 166, 170, 174, 178, 182, 186, 190, 194, 198, 202, 206, 210, 214, 218, 222, 228, 234, 240, 246, 252, 258 y 264 representan CDR1.

Las SEC ID nº 59, 63, 67, 71, 75, 79, 83, 87, 91, 95, 99, 103, 107, 111, 115, 119, 123, 127, 131, 135, 139, 143, 147, 151, 155, 159, 163, 167, 171, 175, 179, 183, 187, 191, 195, 199, 203, 207, 211, 215, 219, 224, 230, 236, 242, 248, 254, 260 y 266 representan CDR2.

Las SEC ID nº 60, 64, 68, 72, 76, 80, 84, 88, 92, 96, 100, 104, 108, 112, 116, 120, 124, 128, 132, 136, 140, 144, 148, 152, 156, 160, 164, 168, 172, 176, 180, 184, 188, 192, 196, 200, 204, 208, 212, 216, 220, 226, 232, 238, 244, 250, 256, 262 y 268 representan CDR3.

Los anticuerpos de la presente invención son preferentemente, aunque sin limitación particular, los anticuerpos biespecíficos combinados a partir de un anticuerpo anti-factor IXa y un anticuerpo anti-factor X, que presentan los mismos epítomos que los anticuerpos mencionados anteriormente o epítomos estrechamente relacionados con los mismos. Los anticuerpos que presentan un epítomo igual o estrechamente relacionado se refieren en la presente invención, por ejemplo, a los que compiten entre sí para la unión a antígenos en una ELISA competitiva, etc. Sin limitación a la misma, en este método de ELISA competitiva, se inmoviliza factor IX/IXa o factor X en una placa MicroWell de 96 pocillos, y se añaden simultáneamente un anticuerpo apropiadamente marcado y un anticuerpo que debe evaluarse, y se detecta el anticuerpo unido mediante la utilización del marcaje. Este marcaje no se encuentra particularmente limitado e incluye marcaje de fosfatasa alcalina, marcaje peroxidasa, enzima de unión a estreptavidina marcada con biotina (fosfatasa alcalina, peroxidasa y similares), FITC y similares. Existe un

solapamiento de epítomos en el caso de que se observe una competición de por lo menos 50% al encontrarse presente el anticuerpo a una concentración en exceso de hasta 100.000 veces respecto al anticuerpo que debe evaluarse.

5 Al preparar un anticuerpo de longitud completa utilizando las regiones variables dadas a conocer en la presente invención, las regiones constantes del anticuerpo no se encuentran particularmente limitadas, y pueden utilizarse las conocidas por el experto en la materia, por ejemplo las indicadas en "Sequences of proteins of immunological interest", U.S. Department of Health and Human Services, Public Health Service National Institutes of Health, 1991 y en "An efficient route to human bispecific IgG", Nature Biotechnology 16:677-681, 1998, y similares.

10 En una forma de realización de los anticuerpos de la presente invención, los anticuerpos presentan el efecto de sustituir funcionalmente los cofactores, y de esta manera se espera que resulten fármacos efectivos para enfermedades causadas por la reducción de la actividad (función) de dichos cofactores. En los casos en los que el cofactor funcionalmente sustituido por un anticuerpo de la presente invención sea un factor de coagulación sanguínea y asociado a la fibrinólisis, las enfermedades mencionadas anteriormente son, por ejemplo, el sangrado, 15 las enfermedades acompañadas de sangrado, las enfermedades causadas por el sangrado, y similares. En particular, es conocido que la reducción y deficiencia funcionales de F.VIII/F.VIIIa, F.IX/F.IXa y F.XI/F.XIa provocan hemorragias anormales conocidas como hemofilia.

20 De entre las hemofilias, la hemorragia anormal debida a una hipofunción congénita de F.VIII/F.VIIIa o una deficiencia de F.VIII/F.VIIIa se denomina hemofilia A. En el caso de que un paciente de hemofilia A sangre, se lleva a cabo una terapia de sustitución con una formulación de F.VIII. Además, puede llevarse a cabo la administración preventiva de una formulación de F.VIII (ver los documentos no de patente nº 1 y nº 2) los días en que se realicen ejercicios vigorosos o excursiones, cuando con frecuencia se produce sangrado intraarticular o en el caso de que el paciente se encuentre clasificado como de hemofilia severa. Debido a que esta administración preventiva de formulación de 25 F.VIII reduce notablemente los episodios de hemorragia de los pacientes con hemofilia A, recientemente ha gozado de amplia popularidad. La reducción de los episodios de sangrado no sólo reduce los riesgos de sangrado letal y no letal y los dolores que la acompañan, sino que también previene la artropatía hemofílica causada por las frecuentes hemorragias intraarticulares. En consecuencia, contribuye en gran medida a la mejora de la calidad de vida de los 30 pacientes de hemofilia A.

La vida media de una formulación de F.VIII en el flujo sanguínea es de tan sólo aproximadamente 12 a 16 horas. Por lo tanto, para una prevención continua, resulta necesario administrar una formulación de F.VIII aproximadamente tres veces a la semana. Esto equivale a mantener una actividad de F.VIII de aproximadamente 1% o superior (ver 35 documentos no de patente nº 3 y nº 4). Además, en las terapias de sustitución de los episodios de sangrado resulta necesario administrar periódicamente formulaciones de F.VIII de refuerzo durante un determinado periodo de tiempo, excepto en el caso de que el sangrado sea leve, con el fin de prevenir el nuevo sangrado y establecer una hemostasis completa.

40 Además, las formulaciones de F.VIII se administran por vía intravenosa. Existen dificultades técnicas durante la realización de la administración intravenosa y resulta todavía más difícil, en particular al realizar la administración en pacientes jóvenes de venas delgadas.

45 En la administración preventiva mencionada anteriormente de la formulación de F.VIII y en la administración de urgencia de la misma en el caso de un episodio de sangrado, en la mayoría de casos se utiliza el tratamiento en casa y la autoinyección. La necesidad de una administración frecuente y las dificultades técnicas que supone no sólo provocan dolor, sino que también se convierten en un motivo que dificulta la popularización del tratamiento en casa y de la autoinyección.

50 Por lo tanto, ha existido una demanda fuerte, en comparación con las formulaciones actuales de factor VIII de coagulación sanguínea, de fármacos que presenten intervalos de administración más prolongados y de fármacos que puedan administrarse fácilmente.

55 Además, en los pacientes de hemofilia A pueden generarse anticuerpos anti-FVIII denominados inhibidores, particularmente en los pacientes de hemofilia A severa. En el caso de que se genere un inhibidor, los efectos de la formulación de F.VIII resultan dificultados por el inhibidor. En consecuencia, resulta muy complicado el control de la hemostasis en estos pacientes.

60 En el caso de que sangre uno de estos pacientes de hemofilia A con inhibidor, habitualmente se lleva a cabo la terapia de neutralización utilizando una dosis masiva de formulación de F.VIII o la terapia de derivación utilizando un complejo concentrado o formulación de F.VIIa. Sin embargo, en la terapia de neutralización, la administración de una dosis masiva de formulación de F.VIII puede incrementar adversamente el título de inhibidor (el anticuerpo anti-F.VIII). Además, en la terapia de derivación, las vidas medias relativamente cortas (aproximadamente 2 a 8 horas) de los concentrados de complejo y de la formulación de F.VIIa resultan problemáticas. Adicionalmente, debido a que 65 sus mecanismos de acción son independientes de la función de F.VIII/F.VIIIa, es decir, una función que cataliza la activación de F.X por parte de F.IXa, el mecanismo hemostático puede no funcionar bien y perder sensibilidad. Por

lo tanto, en muchos casos de pacientes de hemofilia A con inhibidor, no se obtienen efectos hemostáticos suficientes en comparación con los pacientes de hemofilia A sin inhibidor.

5 Por lo tanto, ha existido una fuerte demanda de fármacos que no resulten afectados por la presencia de inhibidores y que puedan sustituir funcionalmente a F.VIII/F.VIIIa.

10 Además de la hemofilia y hemofilia adquirida causada por un autoanticuerpo anti-F.VIII, la enfermedad de von Willebrand, causada por la anormalidad o deficiencia funcional del vWF se conoce como trastorno de sangrado anormal asociado a F.VIII/F.VIIIa. El vWF resulta necesario no sólo para la adhesión normal de las plaquetas a los tejidos subendoteliales en los sitios de daño a la pared vascular, sino también para la formación de complejos con F.VIII para mantener un nivel plasmático normal de F.VIII. En los pacientes con enfermedad de von Willebrand, estas funciones caen y se produce la anormalidad funcional de la hemostasis.

15 En los aspectos mencionados anteriormente, pueden considerarse los métodos que utilizan anticuerpos para la creación de fármacos que: (i) presenten intervalos de administración prolongados, (ii) se administren con facilidad, e (iii) no resulten afectados por la presencia de inhibidores, y (iv) puedan sustituir funcionalmente a F.VIII/F.VIIIa de modo independiente de F.VIII/F.VIIIa. Generalmente, las vidas medias de los anticuerpos en el flujo sanguíneo son relativamente largos, de varios días a varias semanas. Además, es conocida la migración de los anticuerpos al flujo sanguíneo tras la administración subcutánea. Es decir, los fármacos anticuerpos en general cumplen los requisitos
20 mencionados anteriormente de (i) e (ii).

25 La presente invención proporciona composiciones farmacéuticas que comprenden un anticuerpo de la presente invención como principio activo. Por ejemplo, en el caso de un anticuerpo de la presente invención sea uno de los anticuerpos que reconocen tanto F.IX/F.IXa como F.X, y puedan sustituir funcionalmente a F.VIIIa, se espera que el anticuerpo se convierta en un producto farmacéutico (composición farmacéutica) o fármaco para prevenir o tratar el sangrado, los trastornos acompañados de sangrado, o los trastornos causados por el sangrado. Además, en el caso de que un anticuerpo de la presente invención sea uno de los anticuerpos que reconocen tanto F.X/F.Xa como la protrombina y pueda sustituir funcionalmente a F.Va, se espera que el anticuerpo se convierta en un producto farmacéutico (composición farmacéutica) o fármaco que prevenga o trate el sangrado, los trastornos acompañados
30 de sangrado o los trastornos causados por el sangrado.

35 Simultáneamente, se espera que un anticuerpo que se una a ZPI y F.X y sustituya funcionalmente a PZ se convierta en un producto farmacéutico (composición farmacéutica) o fármaco con acción antitrombótica, que un anticuerpo que se una a la trombina y a TAFI y sustituya funcionalmente a TM se convierta en un producto farmacéutico (composición farmacéutica) o fármaco con un efecto estimulante de la hemostasis, y que un anticuerpo que se una a la trombina y a PC y sustituya funcionalmente al sistema PS/TM se convierta en un producto farmacéutico (composición farmacéutica) o fármaco con un efecto modulador de la coagulación.

40 Además, debido a que la deficiencia del complemento C4 provoca el lupus eritematoso sistémico (SLE), se espera que un anticuerpo que sustituya funcionalmente a C4b se convierta en un producto farmacéutico (composición farmacéutica) o fármaco con un efecto que suprima la incidencia de SLE. Debido a que la deficiencia del factor H causa infección supurativa y glomerulonefritis autoinmunitaria, un anticuerpo que sustituya funcionalmente al factor H se espera que se convierta en un producto farmacéutico (composición farmacéutica) o fármaco con un efecto de supresión de la aparición de estas enfermedades.
45

50 Para la formulación de los farmacéuticos, las composiciones farmacéuticas que comprenden un anticuerpo de la presente invención utilizado para el tratamiento o prevención a modo de principio activo pueden mezclarse con un portador farmacéuticamente aceptable apropiado, un medio y similares que sean inertes frente al mismo, en caso necesario. Por ejemplo, pueden mencionarse el agua estéril o la solución salina fisiológica, estabilizador, excipiente, antioxidante (ácido ascórbico, etc.), tampón (ácido fosfórico, ácido cítrico, otros ácidos orgánicos, etc.), antiséptico, surfactante (PEG, Tween, etc.), agente quelante (EDTA, etc.), agente ligante y similares. Las composiciones farmacéuticas también pueden contener otros polipéptidos de bajo peso molecular, proteínas tales como albúmina sérica, gelatina e inmunoglobulinas, aminoácidos tales como glicina, glutamina, asparagina, arginina y lisina, azúcares tales como polisacáridos y monosacáridos y carbohidratos, y alcoholes de azúcares, tales como manitol y sorbitol. Durante la preparación de soluciones acuosas para inyección, por ejemplo, entre los agentes solubilizadores se incluyen solución salina fisiológica, soluciones isotónicas que contiene glucosa y otros agentes adyuvantes tales como D-sorbitol, D-manosa, D-manitol y cloruro sódico, y pueden utilizarse en combinación con agentes solubilizadores apropiados tales como alcohol (etanol, etc.), polialcohol (propilenglicol, PEG, etc.) y surfactante no iónico (polisorbato 80, HCO-50, etc.).
60

65 Además, en caso necesario, pueden encapsularse anticuerpos de la presente invención en microcápsulas (microcápsulas de hidroximetilcelulosa, gelatina, poli(metacrilato de metilo), etc.) o incluirse en un sistema de administración coloidal de fármaco (liposomas, microesferas de albúmina, microemulsión, nanopartículas y nanocápsulas, etc.) (ver "Remington's Pharmaceutical Science", 16ª edición, Oslo, editor, 1980, etc.). También son conocidos métodos para formular fármacos de liberación sostenida, y pueden aplicarse a anticuerpos de la presente invención (Langer *et al.*, J. Biomed. Mater. Res. 15:267-277, 1981; Langer, Chemtech. 12:98-105, 1982; patente US

nº 3.773.919; solicitud de patente europea (EP) 58 481; Sidman *et al.*, *Biopolymers* 22:547-556, 1983; documento EP 133 988).

Los anticuerpos o composiciones farmacéuticas de la presente invención pueden utilizarse en combinación con el factor VIII de coagulación sanguínea. Los anticuerpos o las composiciones farmacéuticas de la presente invención pueden administrarse con factor VIII de coagulación sanguínea o simultáneamente o cierto intervalo entre ellos. La administración puede llevarse a cabo en un kit que combine un anticuerpo o composición farmacéutica de la presente invención con factor VIII de coagulación sanguínea. En el caso de que se utilice un anticuerpo o composición farmacéutica de la presente invención en combinación con factor VIII de coagulación sanguínea, si se desea también resulta posible utilizar dosis más bajas que en el caso de que se utilicen separadamente.

Aunque la dosis de las composiciones farmacéuticas de la presente invención se determina apropiadamente considerando el tipo de formulación, método de administración, edad y peso corporal de los pacientes, síntomas de los pacientes, tipo y avance de la enfermedad, etc., y finalmente según el criterio del médico, generalmente las dosis de entre 0,1 y 2.000 mg/día pueden dividirse en una a varias administraciones en el caso de un adulto. La dosis preferentemente es de entre 1 y 1.000 mg/día, más preferentemente de entre 5 y 500 mg/día, y todavía más preferentemente de entre 100 y 300 mg/día. Aunque la dosis varía según el peso corporal y edad de los pacientes, métodos de administración y similares, el experto en la materia podrá seleccionar convenientemente una dosis apropiada. Preferentemente, el periodo de dosificación también se determina apropiadamente según, por ejemplo, el proceso de cicatrización del paciente.

Además, también resulta posible llevar a cabo terapia génica mediante inserción de un gen codificante de un anticuerpo de la presente invención en vectores de terapia génica. Como método de administración aparte de la administración directa de plásmidos desnudos, los genes pueden administrarse mediante empaquetamiento en liposomas y similares, o mediante la inserción en diversos vectores víricos, tales como vectores retrovíricos, vectores adenovíricos, vectores de virus Vaccinia, vectores de poxvirus, vectores de virus adenoasociados y vectores HVJ (ver Adolph, "Virus Genome Method", CRC Press, Florida, 1996), o mediante recubrimiento sobre perlas portadoras tales como partículas coloidales de oro (documento WO 93/17706, etc.). Sin embargo, el gen puede administrarse mediante cualquier método, con la condición de que el anticuerpo pueda expresarse *in vivo* para ejercer su acción. Preferentemente, se administra una dosis suficiente mediante una vía parenteral apropiada, tal como intravenosa, intraperitoneal, subcutánea, intracutánea, tejido intraadiposo, intramamaria y la inyección intramuscular e infusión, inhalación, método de bombardeo con partículas inducible con gas (con una pistola de electrones y similares) o vía mucosal utilizando gotas nasales. Los genes codificantes de un anticuerpo de la presente invención pueden administrarse mediante la introducción del gen en las células sanguíneas, en células derivadas de la médula ósea y similares, utilizando la transfección *ex vivo* de liposomas, el método de bombardeo de partículas (patente US nº 4.945.050) o la infección vírica, y la reintroducción de estas células en animales. En la terapia génica, puede utilizarse cualquier gen codificante de un anticuerpo de la presente invención, por ejemplo genes que comprenden secuencias de nucleótidos de las CDR de los mencionados anteriormente XB12, SB04, A44 y B26.

La presente invención también proporciona métodos para prevenir y/o tratar el sangrado, los trastornos acompañados de sangrado o los trastornos causados por el sangrado, que comprende las etapas que consisten en administrar un anticuerpo o composición de la presente invención. Los anticuerpos o composiciones pueden administrarse, por ejemplo, mediante los métodos mencionados anteriormente.

La presente invención también se refiere a la utilización de los anticuerpos de la presente invención para preparar composiciones (farmacéuticas) de la presente invención.

Además, la presente invención proporciona kits que comprenden por lo menos un anticuerpo o composición de la presente invención que debe utilizarse en los métodos mencionados anteriormente. Las jeringas de vidrio, agujas de inyección, medio farmacéuticamente aceptable, alcohol, algodón, vendajes, manual de instrucciones que describe la utilización, o similares, también pueden empaquetarse opcionalmente en los kits.

Todos los documentos de la técnica anterior en la presente memoria se incorporan como referencia en la presente memoria.

A continuación en la presente memoria se describe en mayor detalle la presente invención haciendo referencia a los ejemplos no limitativos de la misma.

[Ejemplo 1]. Preparación de anticuerpo no neutralizador contra el factor IXa (F.IXa)

1.1 Inmunización y preparación de hibridomas

Se inmunizaron ocho ratones BALB/c (macho, de 6 semanas de edad al iniciar la inmunización (Charles River, Japón)) y cinco ratones MRL/lpr (macho, de 6 semanas edad al iniciar la inmunización (Charles River, Japón)) con factor IXa β humano (Enzyme Research Laboratories, Inc.) tal como se describe a continuación. A modo de inmunización inicial se administró por vía subcutánea factor IXa β (40 μ g/cabeza) emulsionado con FCA (adyuvante

completo de Freund H37 Ra (Difco Laboratories)). Dos semanas después, se administró por vía subcutánea factor IXa β (40 μ g/cabeza) emulsionado con FIA (adyuvante incompleto de Freund (Difco Laboratories)). A continuación, se llevaron a cabo tres a siete inmunizaciones de refuerzo a intervalos de una semana. Tras confirmar que el título de un anticuerpo plasmático contra el factor IXa β se encontraba elevado mediante ELISA (ensayo de inmunosorción ligada a enzima), descrita en 1-2, se administró por vía intravenosa como inmunización final factor IXa β (40 μ g/cabeza) diluido en PBS(-) (solución salina tamponada con fosfato libre de iones calcio y magnesio). Tres días después de la inmunización final, se extirparon los bazo de los ratones. Aunque una parte de los mismos se utilizó en el ejemplo 10.2, las células de bazo restantes se fusionaron con células de mieloma de ratón P3X63Ag8U.1 (denominadas P3U1, ATCC nº CRL-1597) mediante un método estándar utilizando PEG1500 (Roche Diagnostics). Se sembraron células fusionadas suspendidas en medio RPMI1640 (Invitrogen) que contenían FBS al 10% (Invitrogen) (en adelante denominado FBS al 10%/RPMI1640) en una placa de cultivo de 96 pocillos y 1, 2, 3 y 5 días después de la fusión se sustituyó el medio por un medio de selección HAT (FBS al 10%/RPMI1640/concentrado 50x de HAT al 2% (Dainippon Pharmaceutical Co. Ltd)/BM-Condimed H1 al 5% (Roche Diagnostics) para cultivar selectivamente los hibridomas. Utilizando los sobrenadantes recogidos los días 8 ó 9 después de la fusión, se midió la actividad de unión a factor IXa mediante la ELISA descrita en 1-2 para seleccionar los hibridomas que presentaban actividad de unión a factor IXa. A continuación, se midió la actividad enzimática de factor IXa neutralizador mediante el método descrito en 1-3, con el fin de seleccionar los hibridomas que no presentaban actividad neutralizadora del factor IXa. Se clonaron dos veces los hibridomas llevando a cabo diluciones limitantes en las que se sembraba una célula en cada pocillo de una placa de cultivo de 96 pocillos. Se sometieron las células de colonias individuales confirmadas mediante observación microscópica a ELISA y se llevó a cabo un ensayo de actividad de neutralización tal como se describe en 1-2 y 1-3 para la selección de clones. El ascites que contenía el anticuerpo clonado se preparó mediante el método descrito en 1-4, y se purificó el anticuerpo a partir del ascites. El anticuerpo purificado no pudo ampliar el APTT (tiempo de tromboplastina parcial activado) y esto se confirmó mediante el método descrito en 1-5.

1.2 ELISA del factor IXa

Se diluyó factor IXa β hasta 1 μ g/ml con un tampón de recubrimiento (bicarbonato sódico 100 mM, pH 9,6, azida sódica al 0,02%) y se distribuyó en una placa Nunc-Immuno (placas Nunc-Immuno™ 96 MicroWell™ MaxiSorp™ (Nalge Nunc International)) a razón de 100 μ l/pocillo. A continuación, se incubó la placa a 4°C durante la noche. Tras lavar la placa con PBS(-) que contenía Tween® 20 tres veces, se bloqueó con un tampón diluyente (Tris-HCl 50 mM, pH 8,1, albúmina de suero bovino al 1%, MgCl₂ 1 mM, NaCl 0,15 M, Tween 20 al 0,05%, azida sódica al 0,02%) a temperatura ambiente durante 2 horas. Tras eliminar el tampón, se añadió un antisuero de ratón diluido con tampón diluyente o sobrenadante de cultivo de hibridoma hasta 100 μ l/pocillo y se incubó a temperatura ambiente durante 1 hora. Tras lavar la placa tres veces, se añadió IgG de cabra anti-ratón (H+L) marcado con fosfatasa alcalina (Zymed Laboratories) hasta 1/2.000 con el tampón diluyente hasta 100 μ l/pocillo y se incubó a temperatura ambiente durante 1 hora. Tras lavar la placa seis veces, se añadió un sustrato colorimétrico de fosfato Blue-Phos™ (Kirkegaard & Perry Laboratories) hasta 100 μ l/pocillo y se incubó a temperatura ambiente durante 20 minutos. Tras añadir la solución de parada Blue-Phos™ (Kirkegaard & Perry Laboratories) (100 μ l/pocillo), se leyó la absorbancia a 595 nm con un lector de microplacas modelo 3550 (Bio-Rad Laboratories).

1.3 Medición de la actividad neutralizadora del factor IXa

Se disolvió fosfolípido (Sigma-Aldrich) en agua destilada para inyección, y se ultrasonicó para preparar una solución de fosfolípido (400 μ g/ml). Se mezclaron solución salina tamponada con Tris que contenía albúmina de suero bovino al 0,1% (en adelante abreviada como TBSB) (40 μ l), 30 ng/ml de factor IXa β (Enzyme Research Laboratories) (10 μ l), 400 μ g/ml de solución de fosfolípido (5 μ l), TBSB que contenía CaCl₂ 100 mM y MgCl₂ 20 mM (5 μ l) y sobrenadante de cultivo de hibridoma (10 μ l) en una placa de 96 pocillos, y se incubaron a temperatura ambiente durante 1 hora. A esta solución mezclada se le añadieron 50 μ g/ml de factor X (Enzyme Research Laboratories) (20 μ l) y 3 U/ml de factor VIIIa (American Diagnostica) (10 μ l) y se hicieron reaccionar a temperatura ambiente durante 30 minutos. La reacción se detuvo mediante la adición de EDTA 0,5 M (10 μ l). Tras la adición de una solución de S-2222 (50 μ l, Chromogenix) y la incubación a temperatura ambiente durante 30 minutos, se midió la absorbancia a una longitud de onda de medición de 405 nm y a una longitud de onda de referencia de 655 nm en un lector de microplacas modelo 3550 (Bio-Rad Laboratories, Inc.).

1.4 Preparación de ascites y purificación de anticuerpos

Se produjo ascites de los hibridomas establecidos, según procedimientos estándares. Es decir, se cultivó el hibridoma *in vitro* (2×10^6) y se trasplantó a la cavidad peritoneal de un ratón BALB/c (macho, de 5 a 7 semanas de edad al iniciar el experimento, Japan Charles River) o de un ratón BALB/c desnudo (hembra, de 5 a 6 semanas de edad al iniciar el experimento, Japan Charles River y Japan CLEA), que había sido administrado intraperitonealmente dos veces con pristano (2,6,10,14-tetrametilpentadecano, WAKO Pure Chemical Industries) previamente. Una a cuatro semanas después del trasplante se recogió el ascites del ratón con un abdomen hinchado.

Se purificó el anticuerpo a partir del ascites utilizando una columna de proteína G Sepharose™ 4 Fast Flow

(Amersham Biosciences). Se diluyó el ascites 2 veces con un tampón de unión (acetato sódico 20 mM, pH 5,0) y se aplicó a la columna, que se había lavado con 10 volúmenes de columna del tampón de unión. Se eluyó el anticuerpo con 5 volúmenes de columna de un tampón de elución (glicina-HCl 0,1 M, pH 2,5) y se neutralizó con un tampón neutralizador (Tris-HCl 1 M, pH 9,0). La solución resultante se concentró utilizando Centriprep™ 10 (Millipore) y se sustituyó el solvente con TBS (solución salina tamponada con Tris 50 mM). Se calculó la concentración de anticuerpo a partir de la absorbancia a 280 nm con A (al 1%, 1 cm)=13,5. Se midió la absorbancia con un DU-650 (Beckman Coulter).

1.5 Medición del APTT (tiempo de tromboplastina parcial activado)

Se midió el APTT con un analizador KC10A (Amelung) conectado a CR-A (Amelung). Se calentó una mezcla de la solución de anticuerpo diluida con TBSB (50 µl), plasma humano estándar (Dade Behring) (50 µl) y reactivo de APTT (Dade Behring) (50 µl) a 37°C durante 3 minutos. A esta mezcla se añadió CaCl₂ 20 mM (Dade Behring) (50 µl) para iniciar una reacción de coagulación y se midió el tiempo de coagulación.

[Ejemplo 2]. Preparación de anticuerpo no neutralizador de factor X (F.X)

2.1 Inmunización y preparación de hibridomas

Se inmunizaron ocho ratones BALB/c (macho, 6 semanas de edad al iniciar la inmunización, Japan Charles River) y cinco ratones MRL/lpr (macho, 6 semanas de edad al iniciar la inmunización, Japan Charles River) con factor X humano (Enzyme Research Laboratories) tal como se describe posteriormente. A modo de inmunización inicial, se administró por vía subcutánea factor X (40 µg/cabeza) emulsionado con FCA. Dos semanas después, se administró por vía subcutánea factor X (20 ó 40 µg/cabeza) emulsionado con FIA. Posteriormente, se administraron tres a seis inmunizaciones de refuerzo a intervalos de una semana. Tras confirmar mediante ELISA tal como se describe en 2.2 que el título de un anticuerpo plasmático contra el factor X se encontraba elevado, se administró por vía intravenosa factor X (20 ó 40 µg/cabeza) diluido en PBS(-) a modo de inmunización final. Tres días después de la inmunización final, se extirparon los bazo de ratón. Aunque se utilizó una parte de los mismos en el ejemplo 10-2, las células de bazo restantes se fusionaron con células P3U1 de mieloma de ratón siguiendo un método estándar utilizando PEG1500. Las células fusionadas suspendidas en FBS al 10%/RPMI1640 se sembraron en una placa de cultivo de 96 pocillos y se cultivaron selectivamente los hibridomas mediante sustitución del medio por un medio de selección HAT transcurridos 1, 2, 3 y 5 días de la fusión. Se midió la actividad de unión al factor X mediante la ELISA descrita en 2-2, utilizando el sobrenadante de cultivo recogido el octavo día después de la fusión. Se seleccionaron los hibridomas que presentaban actividad de unión al factor X y se midieron sus actividades de neutralización de la actividad enzimática de factor Xa mediante el método descrito en 2.3. Los hibridomas que no presentaban una actividad de neutralización del factor Xa se clonaron llevando a cabo una dilución limitante dos veces. El ascites que contenía el anticuerpo clonado se preparó mediante el método descrito en 1.4, y se purificó el anticuerpo a partir del ascites. El anticuerpo purificado no podía ampliar el APTT y esto se confirmó mediante el método descrito en 1.5.

2.2 ELISA del factor X

Se diluyó factor X hasta 1 µg/ml con un tampón de recubrimiento y se dispersó en una placa inmunológica Nunc a razón de 100 µl/pocillo. A continuación, la placa se incubó a 4°C durante la noche. Tras lavar la placa con PBS (-) que contenía Tween® 20 tres veces, se bloqueó con un tampón diluyente a temperatura ambiente durante 2 horas. Tras eliminar el tampón, se añadió a la placa un antisuero de ratón diluido con tampón diluyente o sobrenadante de cultivo de hibridoma, y se incubó a temperatura ambiente durante 1 hora. Tras lavar la placa tres veces, se añadió anticuerpo de cabra anti-IgG de ratón (H+L) marcado con fosfatasa alcalina que había sido diluido 1/2.000 con tampón diluyente, y se incubó a temperatura ambiente durante 1 hora. Tras lavar la placa seis veces, se añadió un sustrato colorimétrico de fosfato Blue-Phos™ (Kirkegaard & Perry Laboratories) a razón de 100 µl/pocillo y se incubó a temperatura ambiente durante 20 minutos. Tras añadir la solución de parada Blue-Phos™ (Kirkegaard & Perry Laboratories) (100 µl/pocillo), se midió la absorbancia a 595 nm con un lector de microplacas modelo 3550 (Bio-Rad Laboratories).

2.3 Medición de la actividad neutralizadora de factor Xa

Se mezcló el sobrenadante de cultivo de hibridoma diluido a 1/5 con TBSB (10 µl) con 40 µl de TBCP (TBSB que contenía CaCl₂ 2,78 mM y fosfolípidos 22,2 µM (fosfatidilcolina:fosfatidilserina=75:25, Sigma-Aldrich) que contenía 250 pg/ml de factor Xa (Enzyme Research Laboratories) y se incubó a temperatura ambiente durante 1 hora. A esta solución mezclada se le añadieron TBCP (50 µl) que contenía protrombina (Enzyme Research Laboratories) (20 µg/ml) y 100 ng/ml de factor V activado de coagulación (factor Va (Haematologic Technologies)), y se hizo reaccionar a temperatura ambiente durante 10 minutos. Se detuvo la reacción mediante adición de EDTA 0,5 M (10 µl). A esta solución de reacción se añadió solución S-2238 1 mM (Chromogenix) (50 µl) y tras la incubación a temperatura ambiente durante 30 minutos, se midió la absorbancia a 405 nm con un lector de microplacas modelo 3550 (Bio-Rad Laboratories).

[Ejemplo 3]. Construcción de vector de expresión de anticuerpo biespecífico quimérico.

3.1 Preparación de fragmentos de ADN codificantes de región variable de anticuerpo a partir de hibridomas.

5 A partir de los hibridomas que producían anticuerpo anti-F.IXa o anticuerpo anti-F.X, se extrajo el ARN total utilizando el minikit QIAGEN® RNeasy® (QIAGEN) según el método descrito en el manual de instrucciones. Se disolvió el ARN total en agua estéril (40 µl). Se sintetizó el ADNc monocatenario mediante RT-PCR utilizando el sistema de síntesis de ADNc SuperScript (Invitrogen) con el ARN purificado (1 a 2 µg) como molde, según el método descrito en el manual de instrucciones.

10

3.2 Amplificación por PCR de la región variable de cadena H de anticuerpo y análisis de secuencias.

15 Como cebadores para amplificar el ADNc de la región variable de cadena H (VH) de anticuerpo de ratón, se preparó una mezcla de cebador HB y una mezcla de cebador HF tal como se describe en Krebber *et al.* (J. Immunol. Methods 201:35-55, 1997). Utilizando 0,5 µl de cada una de las mezclas: mezcla de cebador HB 100 µM y mezcla de cebador HF 100 µM, se preparó una solución de reacción (25 µl) (solución de ADNc preparada en 3.1 (2,5 µl)), tampón KOD plus (TOYOBO), dNTP 0,2 mM, MgCl₂ 1,5 mM y 0,75 unidades de ADN polimerasa KOD plus (TOYOBO). Utilizando un ciclador térmico GeneAmp PCR System 9700 (Perkin Elmer), se llevó a cabo una PCR según la eficiencia de amplificación de los fragmentos de ADNc, bajo las condiciones A (3 minutos de calentamiento a 98°C seguido de 32 ciclos de reacción (98°C, 20 s; 58°C, 20 s, y 72°C, 30 s cada ciclo) o bajo las condiciones B (3 minutos de calentamiento a 94°C seguido de 5 ciclos de reacción (94°C, 20 s; 46°C, 20 s, y 68°C, 30 s cada ciclo) y 30 ciclos de reacción (94°C, 20 s; 58°C, 20 s, y 72°C, 30 s cada ciclo)). Tras la PCR, se sometió la solución de reacción a electroforesis en gel de agarosa al 1%. Los fragmentos amplificados del tamaño deseado (aproximadamente 400 pb) se purificaron utilizando un kit de extracción en gel QIAquick (QIAGEN) siguiendo los métodos descritos en el manual de instrucciones adjunto, y se eluyeron con agua estéril (30 µl). Las secuencias de nucleótidos de los fragmentos de ADN se determinaron utilizando un kit de secuenciación cíclica BigDye Terminator (Applied Biosystems) en un secuenciador de ADN ABI PRISM 3100 Genetic Analyzer (Applied Biosystems), siguiendo el método descrito en el manual de instrucciones adjunto. Los grupos de secuencia determinados mediante este método se analizaron comparativamente utilizando el programa de análisis GENETYX-SV/RC versión 6.1 (Genetyx) y se seleccionaron los ADN que presentaban secuencias diferentes.

30

3.3 Preparación de fragmentos de ADN de región variable de anticuerpo para la clonación

35 Se llevó a cabo el procedimiento siguiente para añadir los sitios de corte del enzima de restricción Sfil para la clonación a ambos extremos de los fragmentos de amplificación de región variable de anticuerpo.

40 Para amplificar los fragmentos de VH añadidos con un sitio de corte de Sfil (Sfil-VH), se preparó un cebador (cebador VH-extremo 5') en el que la secuencia conectora de cebador HB (Gly₄Ser)₂ se sustituyó por una secuencia que contenía el sitio de corte de Sfil (SEC ID nº 5). Utilizando 0,5 µl de cebador específico de secuencia VH-extremo 5' 10 µM y de cebador scfor 10 µM (J. Immunol. Methods 201:35-55, 1997), se preparó una solución de reacción (20 µl) (solución purificada de fragmento de amplificación de ADNc de VH preparada en 3.2 (1 µl), tampón KOD plus (TOYOBO), dNTP 0,2 mM, MgCl₂ 1,5 mM, 0,5 unidades de ADN polimerasa KOD plus (TOYOBO)). Utilizando un ciclador térmico GeneAmp PCR system 9700 (Perkin Elmer), se llevó a cabo una PCR según la eficiencia de amplificación de los fragmentos de ADNc, bajo las condiciones A (3 minutos de calentamiento a 98°C seguido de 32 ciclos de reacción (98°C, 20 s; 58°C, 20 s, y 72°C, 30 s cada ciclo) o bajo las condiciones B (3 minutos de calentamiento a 94°C seguido de 5 ciclos de reacción (94°C, 20 s; 46°C, 20 s, y 68°C, 30 s cada ciclo) y 30 ciclos de reacción (94°C, 20 s; 58°C, 20 s, y 72°C, 30 s cada ciclo)). Tras la PCR, la solución de reacción se sometió a electroforesis en gel de agarosa al 1%. Los fragmentos amplificados del tamaño deseado (aproximadamente 400 pb) se purificaron utilizando un kit de extracción en gel QIAquick (QIAGEN) siguiendo el método descrito en el manual de instrucciones adjunto, y se eluyeron con agua estéril (30 µl).

50

55 Para amplificar los fragmentos de ADNc de la región variable de cadena L (V_L) de anticuerpo de ratón, en primer lugar se utilizaron 0,5 µl de cada uno de la mezcla de cebador LB 100 µM y la mezcla de cebador LF 100 µM indicados en Krebber *et al.* (J. Immunol. Methods 201:35-55, 1997), y se preparó una solución de reacción (25 µl) (solución de ADNc preparada en 3.1 (2,5 µl), tampón KOD plus (TOYOBO), dNTP 0,2 mM, MgCl₂ 1,5 mM y 0,75 unidades de ADN polimerasa KOD plus (TOYOBO)). Utilizando un ciclador térmico GeneAmp PCR System 9700 (Perkin Elmer), se llevó a cabo una PCR según la eficiencia de amplificación de los fragmentos, bajo las condiciones de 3 minutos de calentamiento a 94°C seguido de 5 ciclos de reacción (94°C, 20 s; 46°C, 20 s, y 68°C, 30 s cada ciclo) y 30 ciclos de reacción (94°C, 20 s; 58°C, 20 s, y 72°C, 30 s cada ciclo). Tras la PCR, la solución de reacción se sometió a electroforesis en gel de agarosa al 1%. Los fragmentos amplificados del tamaño deseado (aproximadamente 400 pb) se purificaron utilizando el kit de extracción en gel QIAquick (QIAGEN) mediante el método descrito en el manual de instrucciones adjunto, y se eluyeron con agua estéril (30 µl). Los fragmentos se encontraban en un estado en el que la secuencia conectora (Gly₄Ser)₃ derivada del cebador LF se ha añadido a sus extremos C-terminales. Con el fin de añadir un sitio de corte de Sfil a los extremos C-terminales de los fragmentos, se preparó un cebador (cebador V_L-extremo 3') en el que se había sustituido la secuencia conectora (Gly₄Ser)₃ del cebador LF por una secuencia que presentaba el sitio de corte de Sfil (SEC ID nº 6). Para amplificar los fragmentos

65

de V_L con adición de un sitio de corte de SfiI (SfiI-VL), se utilizaron 0,5 μ l de la mezcla de cebador V_L -extremo 3' 10 μ M y cebador scback 10 μ M, y se preparó una mezcla de reacción (20 μ l) (solución purificada de fragmento de amplificación de ADNc de V_L (1 μ l), tampón KOD plus (TOYOBO), dNTP 0,2 mM, $MgCl_2$ 1,5 mM y 0,5 unidades de ADN polimerasa KOD plus (TOYOBO)). Se llevó a cabo la PCR utilizando un ciclador térmico GeneAmp PCR system 9700 (Perkin Elmer) bajo las condiciones de 3 minutos de calentamiento a 94°C seguido de 5 ciclos de reacción (94°C, 20 s; 46°C, 20 s, y 68°C, 30 s cada ciclo) y 30 ciclos de reacción (94°C, 20 s; 58°C, 20 s, y 72°C, 30 s cada ciclo). Tras la PCR, la solución de reacción se sometió a electroforesis en gel de agarosa al 1%. Los fragmentos amplificados del tamaño deseado (aproximadamente 400 pb) se purificaron utilizando el kit de extracción en gel de QIAquick (QIAGEN) mediante el método descrito en el manual de instrucciones adjunto, y se eluyeron con agua estéril (30 μ l).

Los fragmentos SfiI- V_H y SfiI- V_L purificados se digirieron con SfiI (Takara Bio) a 50°C durante la noche en una solución de reacción preparada siguiendo el método descrito en el manual de instrucciones adjunto. A continuación, se purificó la solución de reacción utilizando un kit de purificación de PCR QIAquick (QIAGEN) mediante el método descrito en el manual de instrucciones adjunto, y se eluyeron con tampón EB (30 μ l) incluido en el kit.

3.4 Plásmido de expresión de anticuerpo IgG biespecífico

Al producir el anticuerpo IgG biespecífico de interés, se hizo referencia a la técnica de botón en ojal de IgG1 (Ridgway *et al.*, Protein Eng. 9:617-621, 1996) durante la preparación de IgG4 utilizando una porción CH3 con sustitución de aminoácidos para formar heteromoléculas para cada cadena H. Se sustituyó el tipo a (IgG4ya) con Y349C y T366W, y el tipo b (IgG4yb) se sustituyó con E356C, T366S, L368A e Y407V. Además, también se introdujo una sustitución (-ppcpScp-->-ppcpPcp-) en las regiones bisagra de ambos tipos. Prácticamente la totalidad de las cadenas H se convirtieron en heteromoléculas mediante esta técnica; sin embargo, esto no es necesariamente aplicable a las cadenas L, y la formación de moléculas de anticuerpo innecesarias podría afectar a mediciones posteriores de la actividad. Por lo tanto, para expresar separadamente los brazos de cada molécula de anticuerpo (denominada molécula HL), que presentan diferentes especificidades, y formar eficientemente el tipo de anticuerpo IgG biespecífico de interés dentro de las células, se utilizaron como vectores de expresión para cada molécula HL las inducibles por diferentes fármacos.

Como vector de expresión para un brazo de la molécula de anticuerpo (denominada molécula brazo derecho de HL por conveniencia), se preparó pcDNA4-g4H o pcDNA4-g4L (figura 1 ó figura 2), en el que la región de la cadena H o L respectiva, es decir, una región variable de anticuerpo de ratón apropiada (V_H o V_L) y una región constante de IgG4ya humana (SEC ID nº 7) o región constante κ (SEC ID nº 8) se incorporó en el vector pcDNA4 de tipo inducible por tetraciclina (Invitrogen) cadena abajo de la secuencia de señal (IL3ss) para células animales (Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81:1075, 1984). En primer lugar se utilizaron EcoRV y NotI (Takara Bio) para digerir pcDNA4 en los sitios de corte de enzima de restricción presentes en su sitio de clonación múltiple. La unidad de expresión de brazo derecho de cadena H o L (de aproximadamente 1,6 kb o de aproximadamente 1,0 kb, respectivamente) de un anticuerpo biespecífico quimérico que presentaba las regiones variables de anticuerpo apropiadas se digirió con XhoI (Takara Bio). A continuación, se purificó con el kit de purificación por PCR QIAquick (QIAGEN) mediante el método descrito en el manual de instrucciones adjunto, y se hizo reaccionar con ADN polimerasa KOD (TOYOBO) a 72°C durante 10 minutos en una composición de solución de reacción descrita en el manual de instrucciones adjunto para crear extremos romos. Los fragmentos de extremo romo se purificaron con el kit de purificación por PCR QIAquick (QIAGEN) mediante el método descrito en el manual de instrucciones adjunto, y se digirieron con NotI (Takara Bio). Los fragmentos de extremo romo/NotI (de aproximadamente 1,6 ó 1,0 kb, respectivamente) y el pcDNA4 digerido con EcoRV/NotI se sometieron a una reacción de ligación utilizando Ligation High (TOYOBO), según el método descrito en el manual de instrucciones adjunto. Se transformó una cepa *E. coli* DH5 α (DH5 α altamente competente (TOYOBO)) con la solución de reacción mencionada anteriormente. A partir de los clones resistentes a ampicilina obtenidos de esta manera, se aislaron los plásmidos de ADN respectivos utilizando el kit QIAprep Spin Miniprep (QIAGEN).

Como vector de expresión para el otro brazo de la molécula de anticuerpo (denominada molécula de brazo izquierdo de HL por conveniencia) se preparó pIND-g4H o pIND-g4L (figura 2 ó 3) según el método mencionado anteriormente, en el que la región respectiva de la cadena H o L, es decir, una región variable de anticuerpo (V_H o V_L) de ratón apropiada y una región constante de IgG4yb humana (SEC ID nº 9) o una región constante κ (SEC ID nº 8) se incorporaron en el vector pIND de tipo inducible por análogo de ecdisona (Invitrogen) cadena abajo de la secuencia de señal (IL3ss) para células animales (EMBO. J. 6:2939, 1987) y se aislaron los plásmidos de ADN respectivos.

3.5 Construcción de vector de expresión de anticuerpo biespecífico

El plásmido de expresión de tipo inducible por tetraciclina preparado en 3.4 (pcDNA4-g4H o pcDNA4-g4L) se digirió con SfiI y se sometió a electroforesis en gel de agarosa al 1%. Los fragmentos (de aproximadamente 5 kb) que no presentaban la parte de región variable intrínseca del anticuerpo (V_H o V_L (ver la figura 1 ó 2)) se purificaron utilizando el kit de extracción en gel QIAquick (QIAGEN) mediante el método descrito en el manual de instrucciones adjunto, y se eluyeron con agua estéril (30 μ l). Los fragmentos, y el fragmento SfiI- V_H o SfiI- V_L correspondiente

derivado del anticuerpo anti-F.IXa digerido con Sfil preparado en 3.3, se sometieron a una reacción de ligación utilizando el kit Quick Ligation (New England Biolabs) según el método descrito en el manual de instrucciones adjunto. Se transformó una cepa *E. coli* DH5 α (DH5 α altamente competente (TOYOBO)) con la solución de reacción mencionada anteriormente. Además, los fragmentos obtenidos mediante eliminación de la parte de región variable del anticuerpo mediante una técnica similar a la indicada anteriormente (V_H o V_L (ver la figura 2 ó 3) del plásmido de expresión de tipo inducible por análogo de ecdisona digerido con Sfil (pIND-g4H o pIND-4GL) preparado en 3.4 y el fragmento Sfil-VH o Sfil-VL derivado del anticuerpo anti-F.X digerido con Sfil se incorporaron mediante un método similar.

En cada uno de los transformantes resistentes a ampicilina así obtenidos, se confirmó la inserción del fragmento de interés mediante el método de PCR de colonias utilizando cebadores que circundaban al fragmento insertado. En primer lugar, para el vector de expresión de cadena H o L quimérica del anticuerpo anti-F.IXa, se sintetizaron un cebador CMVF 21-mero (SEC ID nº 10) que se hibridaba con el sitio de cebador directo de CMV situado cadena arriba del sitio de inserción, y un cebador de BGHR 18-mero (SEC ID nº 11) que se hibridaba con el sitio de cebador inverso de BGH situado cadena abajo del sitio de inserción (Sigma Genosys). Para el vector de expresión de cadena H o L quimérica del anticuerpo anti-F.X se sintetizaron un cebador EcdF 24-mero (SEC ID nº 12) que se hibridaba cadena arriba del sitio de inserción y un cebador de BGHR 18-mero (SEC ID nº 11) que se hibridaba con el sitio de cebador inverso de BGH situado cadena abajo del sitio de inserción (Sigma Genosys). Para la PCR de colonias, se preparó una solución de reacción (20 μ l) (0,2 μ l de cebador (10 μ M)), tampón KOD dash (TOYOBO), dNTP 0,2 mM y 0,75 unidades de ADN polimerasa KOD dash (TOYOBO)). A esta solución de reacción se le añadieron células de la cepa transformante en cantidades apropiadas y se llevó a cabo la PCR. La PCR se llevó a cabo utilizando un ciclador térmico GeneAmp PCR system 9700 (Perkin Elmer) bajo las condiciones de calentamiento de 1 minuto a 96°C seguido de 30 ciclos de reacción (96°C, 10 s; 55°C, 10 s, y 72°C, 30 s en cada ciclo). Tras la PCR, la solución de reacción se sometió a electroforesis en gel de agarosa al 1% y se seleccionaron los clones a partir de los que se obtendrían los fragmentos de amplificación del tamaño deseado. El producto de PCR se trató con ExoSAP-IT (Amersham Biosciences) para inactivar el exceso de cebadores y los dNTP, según el manual de instrucciones adjunto. Se determinaron las secuencias de nucleótidos de los fragmentos de ADN utilizando un kit de secuenciación cíclica BigDye Terminator (Applied Biosystems) en un secuenciador de ADN ABI PRISM 3100 Genetic Analyzer (Applied Biosystems), según el método descrito en el manual de instrucciones adjunto. Los grupos de secuencias determinados mediante el presente método se analizaron utilizando el programa de análisis GENETYX-SV/RC versión 6.1 (Genetyx). Para VH, se seleccionaron los clones de interés que no presentaban ninguna inserción, delección o mutación. Para VL, a partir del pseudogén VL derivado de P3U1 utilizado en hibridomas se seleccionaron los clones de interés que no presentaban ninguna inserción, delección o mutación.

A partir de los clones de interés, los plásmidos de ADN respectivos se aislaron mediante la utilización de un kit QIAprep Spin Miniprep (QIAGEN) y después se disolvieron en agua estéril (100 μ l). El vector de expresión de cadena H quimérica del anticuerpo anti-F.IXa, el vector de expresión de cadena L quimérica del anticuerpo F.IXa, el vector de expresión de cadena H del anticuerpo anti-F.X y el vector de expresión de cadena L quimérica del anticuerpo anti-F.X se denominaron pcDNA4-g4IXaHn, pcDNA4-g4IXaLn, pIND-g4XHn y pIND-g4XLn, respectivamente. Se almacenó cada solución de plásmidos a 4°C hasta la utilización.

[Ejemplo 4]. Expresión de anticuerpos biespecíficos quiméricos en células animales

4.1 Preparación de soluciones de ADN

La expresión de los vectores de expresión del brazo derecho de la molécula HL del anticuerpo (pcDNA4-g4IXaHn y pcDNA4-g4IXaLn) se indujo con tetraciclina. En ausencia de tetraciclina, el plásmido codificante de represor Tet denominado pcDNA6/TR (Invitrogen) resultaba necesario para suprimir por completo sus expresiones. Además, la expresión de los vectores de expresión del brazo izquierdo de la molécula HL de anticuerpo (pIND-g4XHn y pIND-g4XLn) se indujo con un análogo de la hormona de insecto ecdisona (ponasterona A). Esto requiere el plásmido pVgRXR (Invitrogen) que codifica el receptor de ecdisona y el receptor del retinoide X que reaccionan con la ponasterona A e inducen la expresión. Por lo tanto, para la transfección de células animales, se preparó una mezcla de seis tipos de plásmido de ADN en total. Para 1 ml de cultivo celular, se utilizaron pcDNA4-g4IXaHn, pcDNA4-g4IXaLn, pIND-g4XHn y pIND-g4XLn (218,8 ng cada uno), así como pcDNA6/TR y pVgRXR (1.312,5 ng cada uno).

4.2 Transfección de células animales

Se suspendió la cepa HEK293H derivada de células de carcinoma renal fetal humano (Invitrogen) en un medio de cultivo DMEM (Invitrogen) que contenía FCS al 10% (MOREGATE), 1 ml del cual se sembró a una densidad celular de 5×10^5 células/ml en cada pocillo de una placa de 12 pocillos para células adhesivas (CORNING) y se cultivó en un incubador de CO₂ (37°C, 5% de CO₂). La mezcla de plásmido de ADN preparada en 4.1 se añadió a una mezcla de reactivos de transfección, lipofectamina 2000 (Invitrogen) (7 μ l) y medio Opti-MEM I (Invitrogen) (250 μ l) y se dejó en reposo a temperatura ambiente durante 20 minutos. La mezcla resultante se añadió a las células en cada pocillo y se incubó durante 4 a 5 horas en un incubador de CO₂ (37°C, 5% de CO₂).

4.3 Inducción de la expresión de anticuerpo IgG biespecífico

Se eliminó el medio de cultivo mediante succión del cultivo celular transfectado indicado anteriormente, y después se añadió 1 ml del medio CHO-S-SFM-II (Invitrogen) que contenía 1 µg/ml de tetraciclina (Wako Pure Chemical Industries). La mezcla resultante se incubó durante un día en un incubador de CO₂ (37°C, 5% de CO₂) para inducir la expresión primaria del brazo derecho de la molécula HL de anticuerpo. Posteriormente, tras eliminar el medio mediante succión, lavar con 1 ml de medio CHO-S-SFM-II y añadir 1 ml de un medio CHO-S-SFM-II que contenía ponasterona A 5 µM (Invitrogen), la mezcla se incubó en un incubador de CO₂ (37°C, 5% de CO₂) durante 2 a 3 días y se indujo la expresión secundaria del brazo izquierdo de la molécula HL de anticuerpo de manera que el anticuerpo IgG biespecífico se secretase al medio. Se recuperó el sobrenadante de cultivo y se centrifugó (aproximadamente 2.000 g, 5 minutos, temperatura ambiente) para separar las células y se concentró utilizando un Microcon[®] YM-50 (Millipore), en caso necesario. Se almacenó la muestra a 4°C hasta la utilización.

[Ejemplo 5]. Cuantificación de la concentración de la IgG humana.

Se ajustó la concentración de anticuerpo de cabra purificado por afinidad contra Fc de la IgG humana (Cappel) a 1 µg/ml con un tampón de recubrimiento y se inmovilizó en una placa inmunológica Nunc. Tras bloquear con un tampón diluyente (D.B.), se añadió una muestra del sobrenadante de cultivo convenientemente diluida con D.B. Además, como estándar para el cálculo de la concentración del anticuerpo, se añadió de manera similar IgG4 humana (anticuerpo anti-TF humanizado, ver el documento WO 99/51743) diluida con D.B. en una serie de dilución de dos veces hasta 11 estadios partiendo de 1.000 ng/ml. Tras tres lavados, se hizo reaccionar anti-IgG humana de cabra-fosfatasa alcalina (Biosource International). Tras cinco lavados, se reveló el color de la placa utilizando el sustrato de fosfatasa Sigma 104[®] (Sigma-Aldrich) como sustrato y se midió la absorbancia a 405 nm en un lector de absorbancia modelo 3550 (Bio-Rad Laboratories) con una longitud de onda de referencia de 655 nm. Utilizando el programa Microplate Manager III (Bio-Rad Laboratories), se calculó la concentración de IgG humana en el sobrenadante de cultivo a partir de la curva estándar.

[Ejemplo 6]. Ensayo de actividad de mimético de F.VIIIa (factor VIII activado de coagulación)

Se evaluó la actividad mimética de F.VIIIa de un anticuerpo biespecífico mediante el ensayo enzimático siguiente. Todas las reacciones siguientes se llevaron a cabo a temperatura ambiente. Se incubó una mezcla de 40 µl de factor IX (3,75 µg/ml, Enzyme Research Laboratories) y 10 µl de la solución de anticuerpos en una placa de 96 pocillos durante 1 hora. A continuación, se añadieron 10 µl de factor XIa (10 ng/ml, Enzyme Research Laboratories), 20 µl de factor X (50 µg/ml, Enzyme Research Laboratories), 5 µl de fosfolípido (400 µg/ml, ver los ejemplos 1 a 3) y 15 µl de TBSB que contenía CaCl₂ 5 mM y MgCl₂ 1 mM (en adelante abreviado como TBSB-S) para iniciar la reacción enzimática. Tras 30 minutos, se detuvo la reacción mediante la adición de 10 µl de EDTA 0,5 M.

Tras añadir una solución de sustrato colorimétrico (50 µl) a cada pocillo, se midió la absorbancia a 405 nm (longitud de onda de referencia: 655 nm) a los 0 y 30 minutos utilizando un lector de microplacas de modelo 3550 (Bio-Rad Laboratories). Se presentó la actividad mimética de F.VIIIa como valor obtenido tras restar el valor del cambio de absorbancia en 30 minutos sin adición de anticuerpo de la adición de anticuerpo (ver las figuras 4 y 5).

Se utilizó TBSB como solvente para los fosfolípidos, mientras que se utilizó TBSB-S como solvente para los factores XIa, IX y X. La solución de sustrato colorimétrico era una mezcla 1:1 de sustrato colorimétrico S-2222 "Tesutochimu" (Chromogenix) disuelto según el manual de instrucciones adjunto y una solución de polibreno (0,6 mg/l de bromuro de hexadimetrina (Sigma)).

Además, se midió la dependencia de la concentración de la actividad mimética de F.VIIIa presentada por XB12/SB04, que era la más alta de todas (figura 6).

[Ejemplo 7]. Ensayo de coagulación plasmática

Con el fin de elucidar si un anticuerpo biespecífico corregía la capacidad de coagulación de la sangre de hemofilia A, se examinaron los efectos del anticuerpo biespecífico sobre el tiempo de tromboplastina parcial activado (APTT) utilizando plasma deficiente en F.VIII. Se calentó a 37°C durante 3 minutos una solución mixta que comprendía una solución de anticuerpo a diversas concentraciones (50 µl), plasma deficiente en F.VIII (50 µl, Biomerieux) y reactivo de APTT (50 µl, Dade Behring). Se inició la reacción de coagulación mediante la adición de CaCl₂ 20 mM (50 µl, Dade Behring) a la mezcla mencionada anteriormente. Se midió el tiempo requerido para la coagulación con un analizador KC10A (Amelung) conectado a CR-A (Amelung) (figuras 7 y 8).

Además, se midió la dependencia de la concentración de XB12/SB04, que mostraba la actividad de acortamiento del tiempo de coagulación más elevada (figura 9).

[Ejemplo 8]. Purificación de los anticuerpos

El sobrenadante de cultivo (10 ml) obtenido mediante el método descrito en el ejemplo 4 se concentró a 1 ml utilizando un Centricon[®] YM-50 (Millipore). A este concentrado se le añadieron BSA al 10% (10 µl), Tween 20 al 1%

(10 μ l) y rProteína A Sepharose™ Fast Flow (Amersham Biosciences) (100 μ l), y la solución se mezcló mediante agitación vertical a 4°C durante la noche. La solución se transfirió a una cubeta de filtro de 0,22 μ m Ultrafree®-MC (Millipore) y tras el lavado con TBS que contenía Tween® 20 al 0,01% (500 μ l) tres veces, se suspendió la resina rProtein A Sepharose™ en 100 μ l de HCl 10 mM/Tween® 20 al 0,01% (pH 2,0) y se dejó reposar durante 3 minutos.

5 A continuación, se eluyó el anticuerpo y se neutralizó inmediatamente el eluido con la adición de 5 μ l de Tris-HCl 1 M, pH 8,0. Utilizando el programa Microplate Manager III (Bio-Rad Laboratories), se calculó la concentración de IgG humana a partir de la curva estándar. Se cuantificó la concentración de anticuerpo según el ejemplo 5.

[Ejemplo 9]. Transferencia *western* de GST-AP del anticuerpo anti-F.X

10 Se construyó un *E. coli* recombinante que expresaba proteína de fusión de péptido F.X. activado (AP) con glutatión-S-transferasa (GST). El ADNc que cubría la región de traducción de longitud completa del F.X humano se amplificó mediante PCR a partir del ADNc hepático humano Marathon-Ready (Clontech). A continuación, se utilizó este ADNc como molde para amplificar la región codificante de la región de AP mediante PCR (Leytus *et al.*, Biochemistry 25:5098, 1986), que se subclonó en un vector pGEM-T (Promega) para obtener pGEX-F10AP codificante de GST-AP. Se cultivó *E. coli* transformado con este plásmido y a DO=0,8, se añadió IPTG 1 mM para inducir la expresión de GST-AP. Tras centrifugar la solución de cultivo (3.000xg, 30 minutos, 4°C), se recolectaron las células y se almacenaron a -20°C hasta la utilización.

20 Tras resuspender el sedimento celular en 1/20 de volumen de cultivo de PBS, se añadieron 2,4 ml de tampón para muestras SDS-PAGE (IWAKI) por cada 0,1 ml de suspensión, y la mezcla resultante se sometió a ebullición a 95°C durante 5 minutos. Se añadió esta solución de reacción (10 μ l) a cada pocillo de un mini gel de SDS-PAGE al 14% (Asahi Technoglass) y se sometió a electroforesis. El gel después de la electroforesis se transfirió a una membrana de transferencia Immobilon-P™ (MILLIPORE) utilizando un blotter semiseco (BIO-RAD) y se bloqueó con BT-PBS (PBS que contenía BSA al 2% y Tween® 20 al 0,05%). Tras completar el bloqueo, se hizo reaccionar durante 1 hora con anticuerpo SB04 o SB06 anti-F.X de ratón purificado en el ejemplo 1.4 y se diluyó con BT-PBS hasta 2 μ g/ml. Tras lavar con PBS que contenía Tween® 20 al 0,05%, la membrana se hizo reaccionar durante 1 hora con anticuerpo de cabra anti-IgG de ratón (H+L) marcado con fosfatasa alcalina (Zymed Laboratories) diluido 2.000 veces con BT-PBS. Tras lavar con PBS que contenía Tween® 20 al 0,05%, se reveló el color de la membrana con un sustrato colorimétrico, sustrato de fosfatasa BCIP/NBT (Kirkegaard & Perry Laboratories) (ver la figura 10).

[Ejemplo 10]. Obtención de anticuerpo biespecífico a partir de biblioteca de scFv derivada de bazo de ratón inmunizado.

35 10.1 Antígeno e inmunización

Se inmunizaron tres ratones BALB/c (macho, 6 semanas de edad al iniciar la inmunización (Japan Charles River)), 3 ratones MRL/lpr (macho, 6 semanas de edad al iniciar la inmunización (Japan Charles River)) y 3 ratones C57BL/6N (macho, 6 semanas de edad al iniciar la inmunización (Japan Charles River)) con factor antígeno IX α β (Enzyme Research Laboratories, Inc.) o factor X (Enzyme Research Laboratories, Inc.) tal como se describe posteriormente. A modo de inmunización inicial, se administró por vía subcutánea el antígeno (40 μ g/cabeza) emulsionado con FCA (adyuvante completo de Freund H37 Ra, Difco Laboratories). Dos semanas después, se administró por vía subcutánea el antígeno (40 μ g/cabeza) emulsionado con FIA (adyuvante incompleto de Freund, Difco Laboratories). Posteriormente, se administraron tres inmunizaciones de refuerzo a intervalos de una semana, y 8 días después de la inmunización final, se extirparon los bazos de los ratones.

10.2 Construcción de una biblioteca fágica

50 Se añadió al reactivo Trizol (Invitrogen) (50 mg de bazo/ml de reactivo) una parte de los bazos extirpados de los ratones inmunizados preparados en los ejemplos 1.1 y 2.1, y se homogenizaron utilizando un homogenizador de vidrio. A continuación, se extrajo el ARN total según el método descrito en el manual de instrucciones adjunto. A partir de la solución de extracto, se extrajo ARN poliA(+) utilizando un kit PolyATract System 1000 (Promega) según el método descrito en el manual de instrucciones adjunto. Se sintetizó ADNc mediante RT-PCR (sistema de síntesis de primera cadena Superscript III para RT-PCR, Invitrogen) y se almacenó a -20°C hasta la utilización.

55 Como cebadores para la amplificación de los ADNc de las regiones variables de cadena pesada (VH) y de cadena ligera (VL) de anticuerpo de ratón, se prepararon mezcla de cebador HB, mezcla de cebador HF, mezcla de cebador LB y mezcla de cebador LF utilizadas en los ejemplos 3.2 y 3.3. Para la amplificación de VH, se preparó una solución de reacción de 50 μ l (2,5 μ l de solución de ADNc, tampón KOD plus (TOYOBO), dNTP 0,2 mM, MgCl₂ 1,5 mM y 3,75 unidades de ADN polimerasa KOD plus (TOYOBO)) utilizando 1 μ l de mezcla de cebador HB 100 μ M y de mezcla de cebador HF 100 μ M. Además, para la amplificación de VL, se prepararon 50 μ l de solución de reacción de la misma composición indicada anteriormente utilizando 1 μ l de mezcla de cebador LB 100 μ M y 1 μ l de mezcla de cebador LF 100 μ M. Se llevó a cabo una PCR utilizando un ciclador térmico GeneAmp PCR system 9700 (Perkin Elmer) mediante un calentamiento de tres minutos a 98°C seguido de 32 ciclos de reacción (98°C, 20 s; 58°C, 20 s, y 72°C, 30 s cada ciclo). Tras la PCR, la solución de reacción se sometió a electroforesis en gel de agarosa al 2%. Los fragmentos amplificados del tamaño de interés (aproximadamente 400 pb) se purificaron utilizando el kit de

extracción en gel QIAquick (QIAGEN) mediante el método descrito en el manual de instrucciones adjunto, y se eluyeron con agua estéril (50 µl). A continuación, para la amplificación de fragmentos scFv, se prepararon diez tubos con 100 µl de solución de reacción (3 µl de solución de fragmento VH, 3 µl de solución de fragmento de VL, tampón KOD plus (TOYOBO), dNTP 0,2 mM, MgCl₂ 1 mM y 5 unidades de ADN polimerasa KOD plus (TOYOBO)). Tras la 1ª PCR (calentamiento de 3 minutos a 94°C seguido de 7 ciclos de reacción (94°C, 1 minuto y 63°C, 4 minutos en cada ciclo), se añadieron cebador scfor 10 µM y cebador scback 10 µM (2,5 µl de cada uno) a cada tubo, manteniéndolos a 63°C, y después se llevó a cabo la 2ª PCR (un calentamiento de 35 segundos a 94°C seguido de 30 ciclos de reacción (94°C, 2 minutos y 63°C, 2 minutos en cada ciclo). Tras la pCR, se purificó la solución de reacción utilizando el kit de purificación mediante PCR QIAquick (QIAGEN) y los productos purificados se digirieron con enzima de restricción Sfil (Takara Bio) a 50°C durante la noche. Tras someter los digeridos a electroforesis en gel de agarosa al 2%, se purificaron los fragmentos amplificados del tamaño de interés (aproximadamente 800 pb) utilizando el kit de extracción en gel QIAquick (QIAGEN) mediante el método descrito en el manual de instrucciones adjunto, y se eluyeron con una cantidad apropiada de agua estéril. Para la presentación de scFv sobre la proteína fágica del gen III, se utilizó pELBGlacl (ver la figura 11) como vector fagémido. Tras digerir el vector (10 µg) con el enzima de restricción Sfil (Takara Bio) a 50°C durante la noche, los fragmentos cortados del tamaño de interés (aproximadamente 5 kb) se purificaron utilizando el kit de extracción en gel QIAquick (QIAGEN) mediante el método descrito en el manual de instrucciones adjunto, y se eluyeron con una cantidad apropiada de agua estéril. El producto de PCR purificado y el fragmento de vector purificado se sometieron a una reacción de ligación a 16°C durante la noche utilizando Ligation High (TOYOBO) según el método descrito en el manual de instrucciones adjunto. Se transformaron células *E. coli* XL1 Blue electrocompetentes (Stratagene) o DH12 electromax (Invitrogen) utilizando la solución de reacción mediante un método de electroporación según el método descrito en el manual de instrucciones adjunto. Se recogieron todos los transformantes resistentes a ampicilina así obtenidos y se almacenaron como la biblioteca recombinante a -20°C hasta la utilización.

Se inoculó la biblioteca de *E. coli* (2x10⁹ cfu) en 50 ml de 2x YTAG (2x TY que contenía 100 µg/ml de ampicilina y glucosa al 2%) y se cultivó a 37°C hasta que la DO 600 alcanzó entre 0,4 y 0,5. Se añadieron 4x10¹¹ fagos ayudantes VCSM13 (Stratagene) al cultivo, que se dejó reposar a 37°C durante 15 minutos para la infección celular. Las células infectadas se cultivaron a 30°C durante 10 minutos, tras la adición de 450 ml de 2x YTAK (2x TY que contenía 100 µg/ml de ampicilina y 25 µg/ml de canamicina) y 25 µl de IPTG 1 mol/l. Se recogió el sobrenadante de cultivo mediante centrifugación, se mezcló con 100 ml de solución de PEG-NaCl (polietilenglicol 8000 al 10%, NaCl 2,5 moles/l) y se dejó reposar a 4°C durante 60 minutos. Se precipitaron los fagos mediante centrifugación a 10.800xg durante 30 minutos y se suspendió el precipitado en 40 ml de agua, se mezcló con 8 ml de solución de PEG-NaCl y se dejó reposar a 4°C durante 1 hora. Los fagos se precipitaron mediante centrifugación a 10.800xg durante 30 minutos y se suspendieron en 5 ml de PBS para obtener la biblioteca fágica. Se almacenaron los fagos a 4°C hasta la utilización.

10.3 Concentración de fagos unidos mediante adsorción (*panning*)

Se marcó factor IXaβ o factor X con biotina utilizando microtubos de NHS-PeO₄-biotina premedido sin pesaje (Pierce). Se añadió factor IXaβ o factor X (100 pmoles) marcados con biotina a la solución de biblioteca fágica preparada en 10.2 (600 µl) y se puso en contacto con el antígeno durante 60 minutos. Se añadieron perlas Dynabeads M-280 recubiertas de estreptavidina (600 µl, DYNAL) con M-PBS al 5% (PBS que contenía leche desnatada al 5% p/v) para la unión durante 15 minutos. Los fagos unidos a las perlas se lavaron varias veces con PBST (PBS que contenía Tween-20 al 0,1%, 1 ml) y después con PBS. Las perlas se suspendieron en 0,8 ml de glicina/HCl 0,1 moles/l (pH 2,2) durante 5 minutos para eluir los fagos.

Alternativamente, la biblioteca fágica (80 µl/pocillo x 5), que había sido incubada con leche desnatada al 2,5% p/v durante 15 minutos, se añadió a factor IXaβ o a factor X (10 µg/pocillo x 5) inmovilizado sobre una placa inmunológica (MaxiSorp, Nunc) y se puso en contacto con el antígeno durante 60 minutos. Los fagos unidos a antígenos se lavaron varias veces con PBST (PBS que contenía Tween-20 al 0,1%, 1 ml) y después con PBS. Los fagos unidos se incubaron con 0,8 ml de glicina/HCl 0,1 ml/l (pH 2,2) durante 5 minutos para eluir los fagos.

La solución de fagos recolectada de esta manera se neutralizó mediante la adición de Tris 2 moles/l (45 µl), se añadió a 10 ml de células XL1-Blue en etapa de crecimiento logarítmico (DO600=0,4 a 0,5) y se dejó reposar durante 30 minutos a 37°C para la infección celular. Se extendió la mezcla sobre una placa 2x YTAG y se cultivó a 30°C. Se recolectaron las colonias, se inocularon en 2x YTAG y se cultivaron a 37°C hasta una DO600=0,4 a 0,5. Se añadieron IPTG (1 mol/l, 5 µl) y fago ayudante VCSM13 (10¹¹ pfu) a la solución de cultivo (10 ml) y se dejó reposar la mezcla a 37°C durante 30 minutos. Se recogieron las células mediante centrifugación, se resuspendieron en 2x YTAK (100 ml) y se cultivaron a 30°C durante 10 horas. Se recuperó el sobrenadante de cultivo mediante centrifugación, se mezcló con PEG-5 al 10%-solución de NaCl 5 moles/l (20 ml) y se dejó reposar a 4°C durante 20 minutos. Se precipitaron los fagos mediante centrifugación a 10.800xg durante 30 minutos y se suspendieron en PBS (2 ml) y se proporcionaron para el adsorción (*panning*) posterior.

10.4 ELISA de fagos

La colonia individual mencionada anteriormente se inoculó en 2x YTA (100 µl) y se cultivó a 30°C durante la noche.

Tras inocular 5 µl de este cultivo en 2x YTAG (500 µl) y el cultivo a 37°C durante 5 horas, se añadió fago ayudante (2x10⁸ pfu) y después se dejó reposar el cultivo a 37°C durante 30 minutos. Además, tras el cultivo durante 30 minutos bajo agitación a 37°C, se añadió 2x YTAG que contenía IPTG 0,5 mM (120 µl). Tras un cultivo durante la noche a 30°C, el sobrenadante centrifugado se sometió a ELISA. Para la ELISA de los clones obtenidos mediante adsorción (*panning*) de los antígenos marcados con biotina, se utilizó una placa de microtitulación de 96 pocillos Strepta (Roche) recubierta con 1,0 µg/ml de antígeno marcado con biotina. Además, para el ELISA de los clones obtenidos mediante adsorción (*panning*) de los antígenos nativos, se utilizó una placa inmunológica (MaxiSorp, Nunc) inmovilizada con 1,0 µg/ml de antígeno nativo. Tras lavar con PBST para eliminar el antígeno, la reacción se bloqueó con 200 µl de M-PBS al 2% o BSA-PBS al 2% (PBS que contenía BSA al 2% p/v) como tampón de bloqueo durante 1 hora a temperatura ambiente. Tras eliminar el tampón, se añadió el sobrenadante de cultivo a la placa, y se dejó reposar durante 60 minutos para la unión de fagos. Tras el lavado, se detectó el fago unido con un anticuerpo anti-M13 unido a HRP (Amersham Pharmacia Biotech) y sustrato TMB (Zymed). Se detuvo la reacción mediante la adición de H₂SO₄ 1 mol/l y se midió el valor de A450 con un lector de placas.

15 10.5 Determinación de secuencias y selección de clones

Utilizando el medio de cultivo 2x YTAG del clon de *E. coli* recombinante positivo en el ELISA, se determinó la secuencia de nucleótidos de la región de scFv mediante amplificación por PCR utilizando los cebadores PBG3-F1 (5'-CAGCTATGAAATACCTATTGCC-3'/SEC ID nº 1) y PBG3-R1 (5'-CTTTTCATAATCAAATCACCGG-3'/SEC ID nº 2). Se sometió una solución para PCR de 15 µl que comprendía 1 µl de medio de cultivo, 1,5 µl de 10x tampón KOD Dash, 0,2 µl de cada uno de los cebadores 10 µmoles/l y 0,3 µl de polimerasa KOD Dash (TOYOBO, 2,5 U/µl) a 30 ciclos de amplificación (96°C, 10 s; 55°C, 10 s, y 72°C, 30 s) utilizando el ciclador térmico GeneAmp PCR System 9700 (Perkin Elmer). Tras la PCR, se añadieron 3 µl de ExoSAP-IT (Amersham) a 5 µl de la solución de reacción, y la mezcla se mantuvo caliente a 37°C durante 15 minutos y posteriormente a 80°C durante 15 minutos. De esta manera, la reacción se llevó a cabo utilizando el kit de secuenciación cíclica BigDye Terminator (Applied Biosystems) con PBG3-F2 (5'-ATTGCCTACGGCAGCCGCT-3'/SEC ID nº 3) o PBG3-R2 (5'-AAATCACCGGAACAGAGCC-3'/SEC ID nº 4) como cebador, y los productos se sometieron a electroforesis con un secuenciador de ADN Applied Biosystems PRISM 3700. Se seleccionaron así los clones que presentaban diferentes secuencias de aminoácidos de CDR3 predichas a partir de las secuencias de nucleótidos, 52 clones como anti-factor IXa y 33 clones como anti-factor X.

10.6 Construcción de vectores de expresión de anticuerpos IgG biespecíficos

Para expresar el anticuerpo scFv en forma de anticuerpo de tipo IgG, se clonaron regiones variables de anticuerpo (V_H, V_L) en vectores de expresión de tipo inducible, por medios similares a los mostrados en los ejemplos 3.3, 3.4 y 3.5. Se incorporaron individualmente regiones variables de anticuerpo anti-F.IXa (V_H y V_L) en un vector de tipo inducible por tetraciclina (pcDNA4-g4H y pcDNA4-g4L, respectivamente). Se incorporaron individualmente regiones variables de anticuerpo anti-F.X (V_H y V_L) en un vector de tipo inducible por análogo de ecdisona (pIND-g4H y pcDNA4-g4L, respectivamente). De los clones de interés, se aislaron los plásmidos de ADN respectivos utilizando el kit QIAprep Spin Miniprep (QIAGEN) y se disolvieron en agua estéril (100 µl).

10.7 Expresión de anticuerpos biespecíficos quiméricos en células animales

Utilizando la solución de ADN preparada por medios similares a los mostrados en el ejemplo 4.1, se expresó ADN en células animales por medios similares a los mostrados en los ejemplos 4.2 y 4.3, y se recogió el sobrenadante de cultivo. Se almacenaron las muestras a 4°C hasta la utilización.

[Ejemplo 11]. Purificación de anticuerpos

A 10 ml del sobrenadante de cultivo obtenido mediante el método descrito en el ejemplo 10.7, se añadieron 100 µl de rProteína A SepharoseTM Fast Flow (Amersham Biosciences) y se le mezclaron mediante agitación vertical a 4°C durante la noche. Se transfirió la solución a una cubeta de filtro de 0,22 µm Ultrafree[®]-MC (Millipore) y tras tres lavados con 500 µl de TBS que contenía Tween[®] 20 al 0,01%, se suspendió resina rProteína A SepharoseTM en 100 µl de HCl 10 mM/Tween[®] 20 al 0,01% (pH 2,0) y se dejó reposar durante 3 minutos. A continuación, se eluyó el anticuerpo y el eluido se neutralizó inmediatamente mediante la adición de 5 µl de Tris-HCl 1 M, pH 8,0. Utilizando el programa Microplate Manager III (Bio-Rad Laboratories), se calculó la concentración de IgG humana en el sobrenadante de cultivo a partir de la curva estándar de IgG4 humana (anticuerpo anti-TF humanizado, ver el documento WO 99/51743). Se cuantificó la concentración de anticuerpos según el ejemplo 5.

60 [Ejemplo 12]. Ensayo de actividad de mimético de F.VIIIa (factor VIII activado de coagulación)

Se evaluó la actividad mimética de F.VIIIa de un anticuerpo biespecífico mediante el ensayo enzimático siguiente. Se llevaron a cabo todas las reacciones indicadas a continuación a temperatura ambiente. Una solución mixta de 10 µl de factor IX (15 µg/ml, Enzyme Research Laboratories), 5 µl de TBSB que contenía CaCl₂ 100 mM y MgCl₂ 20 mM, y 50 µl del sobrenadante de cultivo obtenido mediante el método descrito en el ejemplo 10.7 se incubó en una placa de 96 pocillos durante 1 hora. A continuación, se añadieron 10 µl de factor XIa (10 ng/ml, Enzyme Research

Laboratories), 20 µl de factor X (50 µg/ml, Enzyme Research Laboratories) y 5 µl de fosfolípidos (400 µg/ml) para iniciar la reacción enzimática. Tras 30 minutos, se detuvo la reacción mediante la adición de 10 µl de EDTA 0,5 M.

5 Tras añadir 50 µl de una solución de sustrato colorimétrico a cada pocillo, se midió la absorbancia a 405 nm (longitud de onda de referencia: 655 nm) a los 0 y 60 minutos con un lector de microplacas modelo 3550 (BioRad Laboratories). Se expresó la actividad mimética de F.VIIIa como un valor obtenido mediante la resta del valor de cambio de la absorbancia en el sobrenadante de cultivo que no expresaba ningún anticuerpo del valor obtenido del sobrenadante de cultivo que expresaba el anticuerpo (ver la figura 12).

10 Se utilizó TBSB como solvente para el fosfolípido, el factor XIa, el factor IX y el factor X. La solución de sustrato colorimétrico era una mezcla 1:1 de sustrato colorimétrico S-2222 "Tesutochimu" (Chromogenix) disuelto según el manual de instrucciones adjunto y solución de polibreno (bromuro de hexadimetrina 0,6 mg/l, Sigma).

15 **[Ejemplo 13]. Ensayo de coagulación plasmática**

Para elucidar si un anticuerpo biespecífico preparado según el método del ejemplo 11 recuperaba la capacidad de coagulación de la sangre de hemofilia A, se evaluaron los efectos del anticuerpo sobre el tiempo de tromboplastina parcial activado (APTT) utilizando plasma deficiente en F.VIIIa mediante un método similar al mostrado en el ejemplo 7 (ver la figura 13). Además, A44/B26 y A69/B26, que resultan muy efectivos en el acortamiento del tiempo de coagulación, se midieron para su dependencia de la concentración (ver las figuras 14 y 15).

20 **[Ejemplo 14]. Evaluación de la utilización concomitante de un anticuerpo biespecífico y F.VIII**

25 Se evaluó la utilización concomitante de un anticuerpo biespecífico y F.VIII bajo las condiciones de ensayo de coagulación plasmática siguientes. Se incubó una mezcla de 40 µl de solución de anticuerpo (25 µg/ml) y 50 µl de plasma deficiente de F.VIII (Biomerieux) a temperatura ambiente durante 30 minutos. A esta mezcla, se le añadieron 10 µl de la formulación Kogenate® FS (BAYER) de factor VIII recombinante de coagulación sanguínea y 50 µl de reactivo de APTT (Dade Behring), y se calentó a 37°C durante 3 minutos. Se inició la reacción de coagulación mediante la adición de 50 µl de CaCl₂ 20 mM (Dade Behring). Se midió el tiempo requerido para la coagulación utilizando un analizador KC10A (Amelung) conectado a CR-A (Amelung) (ver la figura 16).

30 **[Ejemplo 15]. Efectos del anticuerpo IgG biespecífico en plasma inhibidor**

35 Se evaluaron los efectos de un anticuerpo IgG biespecífico en el plasma inhibidor bajo las condiciones de ensayo de coagulación plasmática siguientes. Se incubó una mezcla de 50 µl de plasma deficiente en F.VIII (Biomerieux) y 10 µl de anticuerpo neutralizador anti-F.VIII humano (100 µg/ml, número de catálogo MAB3440, CHEMICON) a temperatura ambiente durante 30 minutos. Se utilizó este plasma como plasma inhibidor. A este plasma inhibidor se le añadieron 40 µl de la solución de anticuerpo (25 µg/ml) y 50 µl de reactivo de APTT (Dade Behring) y se calentó a 37°C durante 3 minutos. Se inició la reacción de coagulación mediante la adición de 50 µl de CaCl₂ 20 mM (Dade Behring) a la mezcla. Se midió el tiempo requerido para la coagulación utilizando un analizador KC10A (Amelung) conectado a CR-A (Amelung) (ver la figura 17).

40 **[Ejemplo 16]. Humanización de anticuerpos biespecíficos**

45 De entre los anticuerpos biespecíficos obtenidos en los ejemplos 1 a 7, XB12 (anticuerpo de ratón anti-factor IXa)/SB04 (anticuerpo de ratón anti-factor X), que fue el más efectivo en el acortamiento del tiempo de coagulación sanguínea, se sometió a humanización del modo siguiente.

50 16.1 Búsqueda de homología de los anticuerpos humanos

Se construyó la base de datos basándose en datos de secuencias de aminoácidos de anticuerpos humanos obtenidos de la base de datos Kabat (<ftp://ftp.ebi.ac.uk/pub/databases/kabat/>) y de la base de datos IMGT (<http://imgt.cines.fr/>) disponibles públicamente, y la búsqueda de homologías se llevó a cabo separadamente para la región variable de cadena H de XB12 de ratón, de la región variable de cadena L de XB12 de ratón, de la región variable de cadena H de SB04 de ratón y de la región variable de cadena L de SB04 de ratón. Los resultados confirmaron que presentaban homologías elevadas respecto a las secuencias de anticuerpo humano mostradas posteriormente, y de esta manera se decidió que se utilizarían como la región marco (en adelante abreviada FR) de los anticuerpos humanizados.

60 (1) región variable de cadena H de XB12: KABATID-020619 (base de datos Kabat)

(Mariette *et al.*, *Arthrities Rheum.* 36:1315-1324, 1993)

(2) Región variable de cadena L de XB12: nº de acceso de EMBL X61642 (base de datos IMGT)

65 (Mark *et al.*, *J. Mol. Biol.* 222:581-597, 1991)

(3) región variable de cadena H de SB04: KABATID-025255 (base de datos Kabat)

(Demaison *et al.*, Immunogenetics 42:342-352, 1995)

5

(4) región variable de cadena L de SB04: nº de acceso de EMBL AB064111 (base de datos IMGT)

(datos no publicados)

10 Para la preparación de anticuerpos humanizados, se injertaron regiones determinantes de complementariedad (en adelante abreviadas como CDR) de cada anticuerpo de ratón en las FR de anticuerpos humanos (1) a (4).

Además, se utilizó el sitio de internet en NCBI disponible públicamente (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>) para la búsqueda de secuencias de señal secretoria del anticuerpo humano que eran altamente homólogas a los anticuerpos humanos (1) a (4). Se utilizaron las secuencias de señal secretoria siguientes obtenidas mediante la búsqueda de homólogas.

(1) región variable de cadena H de XB12: nº de acceso GenBank AF062120

(2) región variable de cadena L de XB12: nº de acceso GenBank M74019

(3) región variable de cadena H de SB04: nº de acceso GenBank BC019337

(4) región variable de cadena L de SB04: nº de acceso GenBank AY204756

16.2 Construcción de vector de expresión de gen de anticuerpo humanizado

25 Se prepararon doce oligonucleótidos sintéticos de aproximadamente 50 bases a partir de una secuencia de nucleótidos codificante de la secuencia de aminoácidos entre la secuencia de señal secretoria y la región variable de anticuerpo, de manera que aproximadamente 20 bases de su extremo 3'-terminal se hibridaban entre sí. Además, se prepararon un cebador que hibridaba con el extremo 5'-terminal de un gen de región variable de anticuerpo y que presentaba una secuencia de corte con XhoI, y un cebador que se hibridaba con el extremo 3'-terminal de un gen de región variable de anticuerpo y que presentaba la secuencia de corte con SfiI.

Se mezclaron los oligonucleótidos sintéticos preparados (2,5 µM, 1 µl de cada uno) y se añadieron 1x tampón TaKaRa Ex Taq, dNTP 0,4 mM y 0,5 unidades de TaKaRa Ex Taq (todos de Takara Shuzo), hasta 48 µl de solución de reacción. Tras calentar la mezcla a 94°C durante 5 minutos, se llevaron a cabo 2 ciclos de reacción (94°C, 2 minutos; 55°C, 2 minutos, y 72°C, 2 minutos) para ensamblar y alargar cada uno de los oligonucleótidos sintéticos de ADN. A continuación, se añadieron un cebador que se hibridaba con el extremo 5'-terminal y un cebador que se hibridaba con el extremo 3'-terminal del gen de anticuerpo (10 µM, 1 µl cada uno) y se amplificaron los genes de región variable de anticuerpo mediante 35 ciclos de reacción (94°C, 30 s; 55°C, 30 s, y 72°C, 1 minuto) y una reacción de 5 minutos a 75°C. Tras la PCR, la solución de reacción globalmente se sometió a electroforesis en gel de agarosa al 1%. Los fragmentos amplificados del tamaño esperado (aproximadamente 400 pb) se purificaron con el kit de extracción en gel QIAquick (QIAGEN) mediante el método descrito en el manual de instrucciones adjunto, y se eluyeron con agua estéril (30 µl). Los fragmentos se clonaron utilizando el sistema de vector pGEM-T Easy (Promega) mediante el método descrito en el manual de instrucciones adjunto. Se determinaron las secuencias de nucleótidos de los fragmentos de ADN utilizando el kit de secuenciación cíclica BigDye Terminator (Applied Biosystems) en un secuenciador de ADN ABI PRISM 3700 DNA (Applied Biosystems) según el método descrito en el manual de instrucciones adjunto.

Tras digerir con XhoI y SfiI un plásmido que se había confirmado que comprendía la secuencia génica correcta de la región variable de anticuerpo humanizado, la solución de reacción se sometió a electroforesis en gel de agarosa al 1%. Los fragmentos de ADN del tamaño esperado (aproximadamente 400 pb) se purificaron utilizando el kit de extracción en gel QIAquick (QIAGEN) mediante el método descrito en el manual de instrucciones adjunto y se eluyeron con agua estéril (30 µl). Además, tras digerir con XhoI y SfiI los plásmidos de expresión de tipo inducible con tetraciclina (pcDNA4-g4H, pcDNA4-g4L) y los plásmidos de expresión de tipo inducible con análogos de ecdisona (pIND-g4H, pIND-g4L) preparados en el ejemplo 3.4, se purificaron fragmentos que comprendían la región constante de anticuerpo (aproximadamente 5 kb) utilizando el kit de extracción en gel QIAquick (QIAGEN) mediante el método descrito en el manual de instrucciones adjunto, y se eluyeron con agua estéril (30 µl). El fragmento génico del anticuerpo XB12 humanizado (región variable de cadena H (en adelante V_H) o la región variable de cadena L (en adelante V_L)) digerido con XhoI y SfiI, y el plásmido de expresión de tipo inducible por tetraciclina (pcDNA4-g4H, pcDNA4-g4L) digerido con XhoI y SfiI, se sometieron a una reacción de ligación utilizando el kit de ligación rápida de ADN (Roche Diagnostics) mediante el método descrito en el manual de instrucciones adjunto. Además, el fragmento génico del anticuerpo SB04 humanizado digerido con XhoI y SfiI (región variable de cadena H o región variable de cadena L) y el plásmido de expresión de tipo inducible por análogos de ecdisona digerido con XhoI y SfiI (pIND-g4H, pIND-g4L) se sometieron a una reacción de ligación utilizando el kit de ligación rápida de ADN (Roche Diagnostics) mediante el método descrito en el manual de instrucciones adjunto. Se utilizó una parte de cada mezcla de reacción para transformar la cepa *E. coli* DH5α (TOYOBO).

65

16.3 Preparación de anticuerpo biespecífico humanizado

Los genes se transfectaron y expresaron en HEK293H mediante los métodos descritos en los ejemplos 4.2 y 4.3, utilizando cuatro tipos de vectores de expresión de anticuerpo humanizado, así como pcDNA6/TR y pVgRXR. Además, se llevaron a cabo la purificación y cuantificación de la concentración de anticuerpos mediante los métodos presentados en los ejemplos 8 y 5.

16.4 Evaluación de la actividad del anticuerpo biespecífico humanizado y modificación de la secuencia del anticuerpo

Para evaluar la capacidad de coagulación plasmática de los anticuerpos biespecíficos humanizados preparados de esta manera y del anticuerpo biespecífico quimérico XB12/SB04, se examinaron los efectos de los anticuerpos sobre el APTT utilizando plasma deficiente en F.VIII. Los aminoácidos de la FR del anticuerpo humano se modificaron para incrementar las actividades de los anticuerpos biespecíficos humanizados cuya capacidad de coagulación sanguínea se había reducido. Además, se sustituyeron los residuos cisteína en la CDR3 de la V_H del anticuerpo XB12 por alaninas respecto a la posible caída de su termoestabilidad. Concretamente, se introdujeron mutaciones en el vector de expresión de anticuerpo humanizado utilizando el kit de mutagénesis sitio-dirigida QuikChange (Stratagene) mediante el método descrito en el manual de instrucciones adjunto. Mediante la repetición de la modificación de aminoácidos de la secuencia de FR y la evaluación de la capacidad de coagulación sanguínea, se obtuvo un anticuerpo biespecífico humanizado (anticuerpo XB12 humanizado (VH:hXB12f-A, VL:hXBVL)/anticuerpo SB04 humanizado (VH:hSB04e, VL:hSBVL-F3f) (figura 18).

Aplicabilidad industrial

La presente invención proporciona anticuerpos biespecíficos que reconocen tanto un enzima como su sustrato, y que sustituyen funcionalmente a un cofactor que incrementa la actividad enzimática.

Los anticuerpos biespecíficos según la presente invención se cree que presentan una elevada estabilidad en sangre y una baja antigenicidad. De esta manera, existen grandes expectativas de que se convertirán en productos farmacéuticos.

Listado de secuencias

<110> CHUGAI SEIYAKU KABUSHIKI KAISHA

<120> ANTICUERPO BIESPECÍFICO QUE SUSTITUYE A LAS PROTEÍNAS FUNCIONALES

<130> C1-A0313P3

<150> PCT/JP03/13062 <151> 2003-10-10

<150> PCT/JP03/13123 <151> 2003-10-14

<160> 268

<170> PatentIn versión 3.1

<210> 1

<211> 22

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> secuencia de cebador sintetizada artificialmente

<400> 1

cagctatgaa atacctattg cc

22

<210> 2

<211> 23

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> secuencia de cebador sintetizada artificialmente

ES 2 370 250 T3

	<400> 2	
	ctttcataa tcaaatcac cgg	23
5	<210> 3 <211> 19 <212> ADN <213> Artificial	
10	<220> <223> secuencia de cebador sintetizada artificialmente	
	<400> 3	
15	attgcctacg gcagccgct	19
	<210> 4 <211> 20 <212> ADN <213> Artificial	
20	<220> <223> secuencia de cebador sintetizada artificialmente	
25	<400> 4	
	aaatcaccgg aaccagagcc	20
30	<210> 5 <211> 24 <212> ADN <213> Artificial	
35	<220> <223> secuencia de cebador sintetizada artificialmente	
	<400> 5	
40	ttactcgcgg cccagccggc catg	24
	<210> 6 <211> 28 <212> ADN <213> Artificial	
45	<220> <223> secuencia de cebador sintetizada artificialmente	
	<400> 6	
50	ggaattcggc ccccgaggcc cactcacg	28
	<210> 7 <211> 1215 <212> ADN <213> Homo sapiens	
55	<400> 7	

ES 2 370 250 T3

ggcctcgggg gccagctttc tggggcagge caggcctgac ctggccttg ggcagggag 60
 ggggctaagg tgaggcaggt ggcgccagcc aggtgcacac ccaatgccca tgagcccaga 120
 cactgggacgc tgaacctcgc ggacagttaa gaaccaggg gcctctgcgc cctgggccc 180
 gctctgtccc acaccgggt cacatggcac cacctctctt gcagcttcca ccaaggcccc 240
 atccgtcttc ccctggcgc cctgctccag gagcacctcc gagagcacag ccgccctggg 300
 ctgcctggtc aaggactact tccccgaacc ggtgacggtg tctggaact caggcgcct 360
 gaccaggggc gtgcacacct tcccggctgt cctacagtcc tcaggactct actccctcag 420
 cagcgtggtg accgtgccct ccagcagctt gggcacgaag acctacacct gcaacgtaga 480
 tcacaagccc agcaacacca aggtggacaa gagagttgag tccaaatag gtccccatg 540
 cccaccatgc ccagcacctg agttcctggg gggaccatca gtcttctgt tcccccaaa 600
 acccaaggac actctcatga tctcccggac cctgaggtc acgtgcgtgg tggaggact 660
 gagccaggaa gaccccagg tccagttcaa ctggtactgt gatggcgtgg aggtgcataa 720
 tgccaagaca aagcccggg aggagcagtt caacagcag taccgtgtgg tcagcgtcct 780
 caccgtctg caccaggact ggctgaacgg caaggagtac aagtcaagg tctccaacia 840
 aggcctcccg tcctccatcg agaaaacat ctccaaagcc aaagggcagc cccgagagcc 900
 acaggtgtgc accctgcccc catcccagga ggagatgacc aagaaccagg tcagcctgtg 960
 gtgcctggtc aaaggcttct accccagoga catcgcctg gagtgggaga gcaatggga 1020
 gccggagaac aactacaaga ccacgcctcc cgtgctggac tccgacggct ccttctctct 1080
 ctacagcagg ctaacctggt acaagagcag gtggcaggag gggaatgtct tctcatgctc 1140
 cgtgatgat gaggtctgc acaaccacta cacacagaag agcctctccc tgtctctggg 1200
 taaatgagcg gccgc 1215

- 5 <210> 8
- <211> 684
- <212> ADN
- <213> Homo sapiens

10 <400> 8
 ggcctcgggg gccgaattcc taaactctga gggggtcggg tgactggcc attctttgcc 60
 taaagcattg agtttactgc aaggtcagaa aagcatgcaa agccctcaga atggctgcaa 120
 agagctccaa caaaacaatt tagaacttta ttaaggaata gggggaagct aggaagaac 180
 tcaaaacatc aagatthaa atacgttctt tggctcctt gctataatta tctgggataa 240
 gcatgctgtt ttctgtctgt ccctaacatg ccctgtgatt atccgcaaac aacacaccca 300
 agggcagaac tttgttactt aaacaccatc ctgtttgctt ctttctcag gaactgtgce 360
 tgcaccatct gtcttcatct tccgccatc tgatgagcag ttgaaatctg gaactgcctc 420
 tgttgtgtgc ctgctgaata acttctatcc cagagaggcc aaagtacagt ggaagggtgga 480
 taacccctc caatcgggta actcccagga gagtgtcaca gagcaggaca gcaaggacag 540
 cacctacagc ctacagcaga ccctgacgt gagcaaagca gactacgaga aacacaaagt 600
 ctacgctgc gaagtcacc atcaggcct gagctcgcgc gtcacaaaga gttcaacag 660
 gggagagtgt tagagggcg ccgc 684

ES 2 370 250 T3

<210> 9
 <211> 1215
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

5

<400> 9
 ggccctcgggg gcctcccagg ctctgggcag gcacaggcta ggtgccccta acccaggccc 60
 tgcacacaaa ggggcagggtg ctgggctcag acctgccaag agccatatcc gggaggaccc 120
 tgcccctgac ctaagcccac cccaaaggcc aaactctcca ctccctcagc tcggacacct 180
 tctctctcc cagattccag taactcccaa tcttctctct gcagcttcca ccaagggccc 240
 atccgtcttc ccctggcgc cctgctccag gagcacctcc gagagcacag ccgccctggg 300
 ctgcctggtc aaggactact tccccgaacc ggtgacgggtg tcgtggaact caggcgcctt 360
 gaccagcggc gtgcacacct tcccggctgt cctacagtcc tcaggactct actccctcag 420
 cagcgtggtg acctgacct ccagcagctt gggcacgaag acctacacct gcaacgtaga 480
 tcacaagccc agcaacacca aggtggacaa gagagttgag tccaatatg gtccccatg 540
 cccaccatgc ccagcacctg agttctctggg gggaccatca gtcttctgt tcccccaaa 600
 acccaaggac actctcatga tctcccggac cctgagggtc acgtgcgtgg tggtagcgt 660
 gagccaggaa gaccceggagg tccagttcaa ctggtacgtg gatggcgtgg aggtgcataa 720
 tgccaagaca aagcccgggg aggagcagtt caacagcacg taccgtgtgg tcagcgtcct 780
 caccgtcctg caccaggact ggctgaacgg caaggagtac aagtgcaagg tctccaacaa 840
 aggcctcccg tctccatcg agaaaacct ctccaaagcc aaagggcagc cccgagagcc 900
 acaggtgtac acctgcccc catcccagtg cgagatgacc aagaaccagg tcagcctgtc 960
 ctgcgcggtc aaaggcttct atcccagcga catcgcctg gagtgggaga gcaatgggca 1020
 gccggagaac aactacaaga ccacgcctcc cgtgctggac tccgacggct ccttcttct 1080
 cgtgagcagg ctaacctggtg acaagagcag gtggcaggag gggaatgtct tctcatgctc 1140
 cgtgatgcat gaggctctgc acaaccacta cacacagaag agcctctccc tgtctctggg 1200
 taaatgagcg gccgc 1215

10 <210> 10
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Artificial

15 <220>
 <223> secuencia de cebador sintetizada artificialmente

<400> 10

20 cgcaaattggg cgttaggcgt g

21

<210> 11
 <211> 18
 <212> ADN
 <213> Artificial

25

<220>
 <223> secuencia de cebador sintetizada artificialmente

30 <400> 11

tagaaggcac agtcgagg

18

5 <210> 12
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Artificial

10 <220>
 <223> secuencia de cebador sintetizada artificialmente

<400> 12

ctctgaatac ttcaacaag ttac

24

15 <210> 13
 <211> 116
 <212> PRT
 <213> *Mus musculus*

20 <400> 13

Met Glu Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Thr
 1 5 10 15
 Gln Ser Leu Ser Leu Thr Cys Ser Val Thr Gly Tyr Ser Ile Thr Ser
 20 25 30

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

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

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

Phe Leu Lys Leu Asn Ser Val Thr Thr Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr
 85 90 95

Cys Ala Arg Gly Pro Pro Cys Thr Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val
 100 105 110

25 Thr Val Ser Ala
 115

30 <210> 14
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> *Mus musculus*

<400> 14

Ser Gly Tyr Tyr Trp Thr
 1 5

35 <210> 15
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> *Mus musculus*

40 <400> 15

Tyr Ile Ser Phe Asp Gly Thr Asn Asp Tyr Asn Pro Ser Leu Lys Asn
 1 5 10 15

<210> 16
 <211> 6
 <212> PRT
 5 <213> *Mus musculus*

 <400> 16
 Gly Pro Pro Cys Thr Tyr
 1 5

 10 <210> 17
 <211> 120
 <212> PRT
 <213> *Mus musculus*

 15 <400> 17
 Met Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Val Arg Pro Gly
 1 5 10 15

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

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

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

 Phe Gln Asp Lys Ala Thr Met Thr Ser Asp Thr Ser Ser Asn Thr Ala
 65 70 75 80
 Tyr Leu Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr
 85 90 95

 Cys Val Arg Trp Arg Ile Tyr Tyr Gly Leu Met Asp Tyr Trp Gly Gln
 100 105 110

 Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser
 115 120

 20 <210> 18
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> *Mus musculus*

 25 <400> 18

 Asp Asp Tyr Val His
 1 5

 30 <210> 19
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> *Mus musculus*

 35 <400> 19

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

 40 <210> 20
 <211> 10

<212> PRT
<213> *Mus musculus*

<400> 20

5 Trp Arg Ile Tyr Tyr Gly Leu Met Asp Tyr
1 5 10

<210> 21

<211> 123

10 <212> PRT
<213> *Mus musculus*

<400> 21

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

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

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

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

Phe Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ser Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala
65 70 75 80

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

Cys Ala Arg Gly Asn Arg Tyr Asp Val Gly Ser Tyr Ala Met Asp Tyr
100 105 110

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

<210> 22

<211> 5

<212> PRT

20 <213> *Mus musculus*

<400> 22

His Phe Val Leu His
1 5

25 <210> 23

<211> 17

<212> PRT

30 <213> *Mus musculus*

<400> 23

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

Gly

35 <210> 24

<211> 13
 <212> PRT
 <213> *Mus musculus*

5 <400> 24

Gly Asn Arg Tyr Asp Val Gly Ser Tyr Ala Met Asp Tyr
 1 5 10

<210> 25
 <211> 117
 <212> PRT
 <213> *Mus musculus*

15 <400> 25

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

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

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

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

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

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

Cys Ala Ser Pro Tyr Tyr Pro Leu Gly Cys Trp Gly Gln Gly Thr Leu
 100 105 110

Val Thr Val Ser Ala
 115

<210> 26
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> *Mus musculus*

20 <400> 26

Asp Asn Tyr Met His
 1 5

<210> 27
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> *Mus musculus*

25 <400> 27

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

Gly

<210> 28
 <211> 7
 <212> PRT
 5 <213> *Mus musculus*

 <400> 28
 Pro Tyr Tyr Pro Leu Gly Cys
 1 5
 10
 <210> 29
 <211> 116
 <212> PRT
 <213> *Mus musculus*
 15
 <400> 29
 Met Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Val Lys Pro Gly
 1 5 10 15
 Ala Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Thr Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Glu
 20 25 30
 Asn Thr Ile Tyr Trp Val Lys Gln Ser His Gly Lys Ser Leu Glu Trp
 35 40 45
 Ile Gly Ser Ile Thr Thr Tyr Asn Gln Lys Phe Lys Asp Lys Ala Thr
 50 55 60
 Leu Thr Ile Asp Lys Ser Ser Ser Ser Ala Tyr Met Glu Leu Arg Ser
 65 70 75 80
 Leu Thr Ser Glu Glu Ser Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Ser Gly Gly
 85 90 95
 Arg Gly Lys Pro Tyr Tyr Phe Asp Ser Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu
 100 105 110
 Thr Val Ser Ser
 115
 20
 <210> 30
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> *Mus musculus*
 25
 <400> 30
 Glu Asn Thr Ile Tyr
 1 5
 30
 <210> 31
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> *Mus musculus*
 <400> 31
 35
 Ser Ile Thr Thr Tyr Asn Gln Lys Phe Lys Asp
 1 5 10
 <210> 32
 <211> 12

<212> PRT
<213> *Mus musculus*

<400> 32

5 Ser Gly Gly Arg Gly Lys Pro Tyr Tyr Phe Asp Ser
1 5 10

<210> 33
<211> 117
10 <212> PRT
<213> *Mus musculus*

<400> 33

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

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

Asn Tyr Met His Trp Ile Lys Gln Arg Pro Glu Gln Gly Leu Glu Trp
35 40 45

Ile Gly Arg Ile Asp Pro Gly Asn Gly Asn Ser Arg Tyr Asp Pro Lys
50 55 60

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

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

15 Cys Ala Ser Pro Tyr Tyr Pro Leu Gly Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu
100 105 110
Val Thr Val Ser Ala
115

<210> 34
<211> 5
20 <212> PRT
<213> *Mus musculus*

<400> 34

25 Asp Asn Tyr Met His
1 5

<210> 35
<211> 17
30 <212> PRT
<213> *Mus musculus*

<400> 35

Arg Ile Asp Pro Gly Asn Gly Asn Ser Arg Tyr Asp Pro Lys Phe Gln
1 5 10 15

35 Gly
<210> 36
<211> 7
<212> PRT

<213> *Mus musculus*

<400> 36

5 Pro Tyr Tyr Pro Leu Gly Tyr
1 5

<210> 37

<211> 114

<212> PRT

10 <213> *Mus musculus*

<400> 37

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

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

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

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

Phe Gln Asp Lys Ala Thr Ile Thr Ala Asp Thr Ser Ser Ile Thr Ala
65 70 75 80

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

Cys Thr Gly Ser Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val
100 105 110

Ser Ala

15

<210> 38

<211> 5

<212> PRT

<213> *Mus musculus*

20

<400> 38

Asp Asp Tyr Ile His
1 5

25

<210> 39

<211> 17

<212> PRT

<213> *Mus musculus*

30

<400> 39

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

35

<210> 40

<211> 4

<212> PRT

<213> *Mus musculus*

<400> 40

Ser Phe Ala Tyr
1

5 <210> 41
<211> 114
<212> PRT
<213> *Mus musculus*

10 <400> 41

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

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

Ile Gly Arg Ile His Pro Ala Asn Gly Asn Pro Gln Tyr Ala Pro Lys
50 55 60

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

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

Cys Ala Gly Pro Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val
100 105 110

Ser Ala

15 <210> 42
<211> 5
<212> PRT
<213> *Mus musculus*

20 <400> 42

Asp Asp Tyr Val His
1 5

25 <210> 43
<211> 17
<212> PRT
<213> *Mus musculus*

<400> 43

30 Arg Ile His Pro Ala Asn Gly Asn Pro Gln Tyr Ala Pro Lys Phe Gln
1 5 10 15

35 <210> 44
<211> 4
<212> PRT
<213> *Mus musculus*

<400> 44

40 Pro Phe Ala Tyr
1

<210> 45
 <211> 116
 <212> PRT
 5 <213> *Mus musculus*

 <400> 45
 Met Glu Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser
 1 5 10 15

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

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

 Trp Met Gly Tyr Ile Asn Tyr Asp Gly Ser Asn Asn Tyr Asn Pro Ser
 50 55 60

 Leu Lys Asn Arg Ile Ser Ile Ser Arg Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe
 65 70 75 80
 Phe Leu Lys Leu Asn Ser Val Thr Thr Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr
 85 90 95

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

 Thr Val Ser Ala
 115
 10

 <210> 46
 <211> 6
 <212> PRT
 15 <213> *Mus musculus*

 <400> 46

 Ser Asn Tyr Tyr Trp Asn
 1 5
 20

 <210> 47
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> *Mus musculus*
 25

 <400> 47

 Tyr Ile Asn Tyr Asp Gly Ser Asn Asn Tyr Asn Pro Ser Leu Lys Asn
 1 5 10 15

 30 <210> 48
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> *Mus musculus*

 35 <400> 48

 Gly Gly Ala Phe Thr Tyr
 1 5

 40 <210> 49

<211> 114
 <212> PRT
 <213> *Mus musculus*

5 <400> 49

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

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

Asn Lys Met Asp Trp Val Lys Gln Ser His Gly Lys Ser Leu Glu Trp
 35 40 45

Ile Gly Tyr Ile Ser Pro Asn Asn Gly Asp Ile Gly Tyr Asn Arg Lys
 50 55 60

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

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

Cys Ala Arg His Arg Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val
 100 105 110

Ser Ala

10 <210> 50
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> *Mus musculus*

15 <400> 50

Asp Asn Lys Met Asp
 1 5

20 <210> 51
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> *Mus musculus*

<400> 51

Tyr Ile Ser Pro Asn Asn Gly Asp Ile Gly Tyr Asn Arg Lys Phe Arg
 1 5 10 15

25 Asn

<210> 52
 <211> 4
 <212> PRT
 30 <213> *Mus musculus*

<400> 52

His Arg Ala Tyr
 1

35 <210> 53

<211> 121
 <212> PRT
 <213> *Mus musculus*

5 <400> 53

Met Asp Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly
 1 5 10 15
 Gly Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Thr
 20 25 30

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

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

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

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

Cys Ala Arg Gly Gly Tyr Arg Tyr Pro Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly
 100 105 110

Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser
 115 120

10 <210> 54
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> *Mus musculus*

15 <400> 54

Thr Tyr Ala Met Ser
 1 5

20 <210> 55
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> *Mus musculus*

25 <400> 55

Tyr Ile Ser Asn Gly Gly Ala Asn Thr Tyr Tyr Pro Asp Ser Val Lys
 1 5 10 15

30 <210> 56
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> *Mus musculus*

<400> 56

35 Gly Gly Tyr Arg Tyr Pro Tyr Ala Met Asp Tyr
 1 5 10

<210> 57
 <211> 121
 <212> PRT

<213> *Mus musculus*

<400> 57

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

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

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

Ile Gly Arg Ile His Pro Ser Asp Ser Glu Ala Arg Tyr Asn Gln Lys
50 55 60

5 Phe Lys Ser Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Thr Ala
65 70 75 80

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

Cys Ala Arg Arg Gly Glu Tyr Pro Ser Tyr Thr Met Asp Tyr Trp Gly
100 105 110

Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 58

<211> 5

10 <212> PRT

<213> *Mus musculus*

<400> 58

Ser Tyr Trp Met His
1 5

15 <210> 59

<211> 17

20 <212> PRT

<213> *Mus musculus*

<400> 59

Arg Ile His Pro Ser Asp Ser Glu Ala Arg Tyr Asn Gln Lys Phe Lys
1 5 10 15

Ser

25 <210> 60

<211> 11

<212> PRT

<213> *Mus musculus*

30 <400> 60

Arg Gly Glu Tyr Pro Ser Tyr Thr Met Asp Tyr
1 5 10

35 <210> 61

<211> 119

<212> PRT

ES 2 370 250 T3

<213> *Mus musculus*

<400> 61

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

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

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

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

Phe Lys Gly Lys Ala Lys Leu Thr Ala Val Thr Ser Thr Ser Thr Ala
65 70 75 80

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

Cys Thr Gly Tyr Tyr Gly Asn Tyr Cys Phe Gly Tyr Trp Gly Gln Gly
 100 105 110

5

Thr Leu Val Thr Val Ser Ala
 115

<210> 62

<211> 5

10 <212> PRT

<213> *Mus musculus*

<400> 62

Ser Tyr Trp Met His
1 5

15

<210> 63

<211> 17

<212> PRT

20 <213> *Mus musculus*

<400> 63

Thr Phe Tyr Pro Gly Asn Ser Asp Ser Asn Tyr Asn Gln Lys Phe Lys
1 5 10 15

Gly

25

<210> 64

<211> 9

<212> PRT

<213> *Mus musculus*

30

<400> 64

ES 2 370 250 T3

Tyr Tyr Gly Asn Tyr Cys Phe Gly Tyr
1 5

5 <210> 65
<211> 117
<212> PRT
<213> *Mus musculus*

<400> 65

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

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

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

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

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

Tyr Leu Gln Leu Ser Gly Leu Thr Ser Glu Asp Thr Ala Ile Tyr Tyr
85 90 95

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

10 Leu Thr Val Ser Ser
115

<210> 66
<211> 5
<212> PRT
15 <213> *Mus musculus*

<400> 66

20 Asp Ser Leu Ile His
1 5

<210> 67
<211> 17
<212> PRT
25 <213> *Mus musculus*

<400> 67

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

30 <210> 68
<211> 7
<212> PRT
<213> *Mus musculus*

35 <400> 68

Trp Val Tyr Tyr Phe Asp Tyr
1 5

<210> 69

<211> 123

5 <212> PRT

<213> *Mus musculus*

<400> 69

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

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

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

Ile Gly Glu Ile Asp Ile Ser Asp Gly Ser Thr Thr Tyr Asn Gln Lys
50 55 60

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

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

Cys Ala Arg Gly Glu Asp Tyr Asp Gly Ser His Asp Ala Met Asp Tyr
100 105 110

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

<210> 70

<211> 5

15 <212> PRT

<213> *Mus musculus*

<400> 70

Asp Tyr Trp Met His
1 5

20

<210> 71

<211> 17

<212> PRT

25 <213> *Mus musculus*

<400> 71

Glu Ile Asp Ile Ser Asp Gly Ser Thr Thr Tyr Asn Gln Lys Phe Lys
1 5 10 15

30

<210> 72

<211> 13

<212> PRT

35 <213> *Mus musculus*

<400> 72

Gly Glu Asp Tyr Asp Gly Ser His Asp Ala Met Asp Tyr
1 5 10

<210> 73
 <211> 123
 <212> PRT
 5 <213> *Mus musculus*

 <400> 73
 Met Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Val Met Pro Gly
 1 5 10 15

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

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

 Ile Gly Glu Ile Asp Ile Ser Asp Ser Ser Thr Thr Tyr Asn Gln Lys
 50 55 60

 Phe Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Glu Ser Ser Asn Thr Ala
 65 70 75 80
 Tyr Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr
 85 90 95

 Cys Val Arg Gly Glu Asp Tyr Asp Gly Arg Tyr Asn Val Met Asp Tyr
 100 105 110

 Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser
 115 120
 10

 <210> 74
 <211> 5
 <212> PRT
 15 <213> *Mus musculus*

 <400> 74

 Asp Tyr Trp Met His
 1 5
 20

 <210> 75
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> *Mus musculus*
 25

 <400> 75

 Glu Ile Asp Ile Ser Asp Ser Ser Thr Thr Tyr Asn Gln Lys Phe Lys
 1 5 10 15

 Gly

 30 <210> 76
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> *Mus musculus*

 35 <400> 76

 Gly Glu Asp Tyr Asp Gly Arg Tyr Asn Val Met Asp Tyr
 1 5 10

<210> 77
 <211> 123
 <212> PRT
 5 <213> *Mus musculus*

 <400> 77
 Met Gln Val Gln Leu Gln Gln Pro Gly Gly Glu Leu Val Met Pro Gly
 1 5 10 15

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

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

 Ile Gly Glu Ile Asp Ile Ser Asp Gly His Thr Thr Tyr Asn Gln Glu
 50 55 60

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

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

 Cys Ala Arg Gly Glu Asp Tyr Asp Gly Ser Asn Asp Val Met Asp Tyr
 100 105 110

 Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser
 10 115 120

 <210> 78
 <211> 5
 <212> PRT
 15 <213> *Mus musculus*

 <400> 78
 Asp Tyr Trp Met His
 1 5
 20
 <210> 79
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> *Mus musculus*
 25
 <400> 79
 Glu Ile Asp Ile Ser Asp Gly His Thr Thr Tyr Asn Gln Glu Phe Lys
 1 5 10 15

 Gly
 30 <210> 80
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> *Mus musculus*
 35 <400> 80

ES 2 370 250 T3

Gly Glu Asp Tyr Asp Gly Ser Asn Asp Val Met Asp Tyr
 1 5 10

5 <210> 81
 <211> 123
 <212> PRT
 <213> *Mus musculus*

<400> 81

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

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

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

Ile Gly Glu Ile Asp Ile Ser Asp Ser His Thr Thr Tyr Asn Gln Lys
 50 55 60

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

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

Cys Val Arg Gly Glu Asp Tyr Asp Gly Ser His Asp Val Met Asp Tyr
 100 105 110

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

<210> 82
 <211> 5
 <212> PRT
 15 <213> *Mus musculus*

<400> 82

Asp Tyr Trp Met His
 1 5

20 <210> 83
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> *Mus musculus*

25 <400> 83

Glu Ile Asp Ile Ser Asp Ser His Thr Thr Tyr Asn Gln Lys Phe Lys
 1 5 10 15

Gly

30 <210> 84
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> *Mus musculus*

35 <400> 84

Gly Glu Asp Tyr Asp Gly Ser His Asp Val Met Asp Tyr
 1 5 10

5 <210> 85
 <211> 119
 <212> PRT
 <213> *Mus musculus*

10 <400> 85
 Met Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Ala Lys Pro Gly
 1 5 10 15

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

Ser Trp Met His Trp Ile Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp
 35 40 45
 Leu Gly Tyr Ile Asn Pro Ser Ser Gly Tyr Thr Lys Tyr Asn Arg Lys
 50 55 60

Phe Arg Asp Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala
 65 70 75 80

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

Cys Ala Arg Gly Gly Asn Gly Tyr Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
 100 105 110

Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser
 115

15 <210> 86
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> *Mus musculus*

20 <400> 86

Ser Ser Trp Met His
 1 5

25 <210> 87
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> *Mus musculus*

<400> 87

30 Tyr Ile Asn Pro Ser Ser Gly Tyr Thr Lys Tyr Asn Arg Lys Phe Arg
 1 5 10 15
 Asp

35 <210> 88
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> *Mus musculus*

<400> 88

Gly Gly Asn Gly Tyr Tyr Phe Asp Tyr
1 5

<210> 89

<211> 119

5 <212> PRT

<213> *Mus musculus*

<400> 89

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

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

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

Ile Gly Tyr Ile Asn Pro Ser Ser Gly Tyr Thr Lys Tyr Asn Gln Lys
50 55 60

Phe Lys Val Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala
65 70 75 80

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

10 Cys Ala Asn Gly Asn Leu Gly Tyr Phe Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
100 105 110

Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser
115

<210> 90

<211> 5

15 <212> PRT

<213> *Mus musculus*

<400> 90

Thr Tyr Trp Met His
1 5

20 <210> 91

<211> 17

25 <212> PRT

<213> *Mus musculus*

<400> 91

Tyr Ile Asn Pro Ser Ser Gly Tyr Thr Lys Tyr Asn Gln Lys Phe Lys
1 5 10 15

30 Val

<210> 92

<211> 9

35 <212> PRT

<213> *Mus musculus*

<400> 92

Gly Asn Leu Gly Tyr Phe Phe Asp Tyr

1 5

<210> 93
 <211> 119
 <212> PRT
 <213> *Mus musculus*

5

<400> 93

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

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

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

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

Phe Arg Asp Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala
 65 70 75 80

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

Cys Ala Arg Gly Gly Asn Gly Tyr Tyr Leu Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
 100 105 110

Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser
 115

10

<210> 94
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> *Mus musculus*

15

<400> 94

Asp Tyr Tyr Met His
 1 5

20

<210> 95
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> *Mus musculus*

25

<400> 95

Tyr Ile Asn Pro Ser Ser Gly Tyr Thr Lys Tyr Asn Arg Lys Phe Arg
 1 5 10 15

Asp

30

<210> 96
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> *Mus musculus*

35

<400> 96

Gly Gly Asn Gly Tyr Tyr Leu Asp Tyr
1 5

5 <210> 97
<211> 118
<212> PRT
<213> *Mus musculus*

10 <400> 97

Met Glu Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Met Lys Pro Gly
1 5 10 15
Ala Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Thr Gly Tyr Thr Leu Ser Asn
20 25 30

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

Ile Gly Glu Ile Leu Pro Gly Ser Asp Thr Ile Asn Tyr Asn Glu Lys
50 55 60

Phe Lys Gly Lys Ala Thr Phe Thr Ala Asp Ala Ser Ser Asn Thr Ala
65 70 75 80

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

Cys Ala Arg Glu Gly Ala Ser Trp Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
100 105 110

Leu Val Thr Val Ser Ala
115

15 <210> 98
<211> 5
<212> PRT
<213> *Mus musculus*

20 <400> 98

Asn Asn Trp Ile Gln
1 5

25 <210> 99
<211> 17
<212> PRT
<213> *Mus musculus*

<400> 99

Glu Ile Leu Pro Gly Ser Asp Thr Ile Asn Tyr Asn Glu Lys Phe Lys
1 5 10 15

30 Gly

<210> 100
<211> 8
<212> PRT
35 <213> *Mus musculus*

<400> 100

Glu Gly Ala Ser Trp Phe Ala Tyr
 1 5
 <210> 101
 <211> 118
 5 <212> PRT
 <213> *Mus musculus*
 <400> 101
 Met Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Met Lys Pro Gly
 1 5 10 15
 Ala Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Thr Gly Tyr Ser Ile Ser Asn
 20 25 30
 His Trp Ile Gln Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly His Gly Leu Glu Trp
 35 40 45
 10 Ile Gly Glu Ile Leu Thr Gly Ser Asp Thr Ile Asn Tyr Asn Glu Lys
 50 55 60
 Leu Lys Gly Lys Ala Thr Phe Thr Ala Asp Thr Ser Ser Asn Thr Ala
 65 70 75 80
 Tyr Met Gln Leu Arg Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr
 85 90 95
 Cys Ala Arg Glu Gly Ser Ser Trp Phe Ala His Trp Gly Gln Gly Thr
 100 105 110
 Leu Val Thr Val Ser Ala
 115
 <210> 102
 <211> 5
 15 <212> PRT
 <213> *Mus musculus*
 <400> 102
 Asn His Trp Ile Gln
 20 1 5
 <210> 103
 <211> 17
 <212> PRT
 25 <213> *Mus musculus*
 <400> 103
 Glu Ile Leu Thr Gly Ser Asp Thr Ile Asn Tyr Asn Glu Lys Leu Lys
 1 5 10 15
 Gly
 30 <210> 104
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> *Mus musculus*
 35 <400> 104

ES 2 370 250 T3

Glu Gly Ser Ser Trp Phe Ala His
1 5

5 <210> 105
<211> 118
<212> PRT
<213> *Mus musculus*

<400> 105

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

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

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

Ile Gly Trp Ser Asp Pro Glu Asn Gly Asn Thr Ile Tyr Asp Pro Lys
50 55 60

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

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

10 Cys Ala Arg Gly Gly Arg Arg Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
100 105 110
Ser Val Thr Val Ser Ser
115

15 <210> 106
<211> 5
<212> PRT
<213> *Mus musculus*

<400> 106

20 Asp Tyr Tyr Met His
1 5

<210> 107
<211> 17
<212> PRT
25 <213> *Mus musculus*

<400> 107

Trp Ser Asp Pro Glu Asn Gly Asn Thr Ile Tyr Asp Pro Lys Phe Gln
1 5 10 15

30 Gly
<210> 108
<211> 8
<212> PRT
35 <213> *Mus musculus*

<400> 108

ES 2 370 250 T3

Gly Gly Arg Arg Ala Met Asp Tyr
1 5

<210> 109
<211> 119
<212> PRT
<213> *Mus musculus*

5

<400> 109

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

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

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

Trp Met Gly Tyr Ile Ser Tyr Asp Gly Thr Asn Lys Tyr Asn Pro Ser
50 55 60

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

Phe Leu Lys Leu Asn Ser Val Thr Thr Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr
85 90 95

Cys Ala Arg Gly Gly Ser Gly His Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
100 105 110

Thr Ser Val Thr Val Ser Ser
115

10

<210> 110
<211> 6
<212> PRT
<213> *Mus musculus*

15

<400> 110

Ser Gly Tyr Tyr Trp Asn
1 5

20

<210> 111
<211> 16
<212> PRT
<213> *Mus musculus*

25

<400> 111

Tyr Ile Ser Tyr Asp Gly Thr Asn Lys Tyr Asn Pro Ser Leu Lys Asn
1 5 10 15

30

<210> 112
<211> 9
<212> PRT
<213> *Mus musculus*

35

<400> 112

Gly Gly Ser Gly His Ala Met Asp Tyr
1 5

<210> 113
 <211> 123
 <212> PRT
 5 <213> *Mus musculus*

 <400> 113
 Met Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Val Lys Pro Gly
 1 5 10 15

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

 Tyr Leu Met His Trp Val Lys Gln Lys Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp
 35 40 45
 Ile Gly Phe Ile Ile Pro Tyr Asn Asp Gly Thr Lys Tyr Asn Glu Lys
 50 55 60

 Phe Lys Gly Lys Ala Thr Val Thr Ser Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala
 65 70 75 80

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

 Cys Ala Arg Gly Asn Arg Tyr Asp Val Gly Tyr Tyr Ala Met Asp Tyr
 100 105 110

 Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser
 10 115 120

 <210> 114
 <211> 5
 <212> PRT
 15 <213> *Mus musculus*

 <400> 114

 Asn Tyr Leu Met His
 20 1 5

 <210> 115
 <211> 17
 <212> PRT
 25 <213> *Mus musculus*

 <400> 115

 Phe Ile Ile Pro Tyr Asn Asp Gly Thr Lys Tyr Asn Glu Lys Phe Lys
 30 1 5 10 15

 Gly

 <210> 116
 <211> 13
 <212> PRT
 35 <213> *Mus musculus*

 <400> 116

 Gly Asn Arg Tyr Asp Val Gly Tyr Tyr Ala Met Asp Tyr
 40 1 5 10

<211> 128
 <212> PRT
 <213> *Mus musculus*

5 <400> 117

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

Gly Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser
 20 25 30

Asn Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Thr Pro Glu Arg Ser Leu Glu Trp
 35 40 45

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

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

Tyr Leu Gln Met Ser Ser Leu Arg Ser Ala Asp Thr Ala Met Tyr Tyr
 85 90 95
 Cys Ala Arg His Glu Ala Ser Ile Met Ile Thr Thr Gly Arg Ile Trp
 100 105 110

Ala Trp Phe Gly Asn Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ala
 115 120 125

10 <210> 118
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> *Mus musculus*

15 <400> 118

Ser Asn Ala Met Ser
 1 5

20 <210> 119
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> *Mus musculus*

25 <400> 119

Thr Ile Ser Ser Ala Gly Arg Ser Thr Tyr Tyr Pro Asp Ser Val Lys
 1 5 10 15

Gly

30 <210> 120
 <211> 18
 <212> PRT
 <213> *Mus musculus*

<400> 120

35 His Glu Ala Ser Ile Met Ile Thr Thr Gly Arg Ile Trp Ala Trp Phe

ES 2 370 250 T3

1 5 10 15

Gly Asn

5 <210> 121
 <211> 124
 <212> PRT
 <213> *Mus musculus*

<400> 121

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

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

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

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

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

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

Cys Val Arg His Val Leu Leu Thr Thr Ile Gly Tyr Tyr Ala Ile Asp
 100 105 110

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

<210> 122
 <211> 5
 <212> PRT
 15 <213> *Mus musculus*

<400> 122

20 Arg Tyr Ala Met Ser
 1 5

<210> 123
 <211> 17
 <212> PRT
 25 <213> *Mus musculus*

<400> 123

Thr Ile Ser Ser Gly Gly Ser Tyr Asn Tyr His Pro Asp Ser Val Lys
 1 5 10 15

Asp

30 <210> 124
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> *Mus musculus*

<400> 124

His Val Leu Leu Thr Thr Ile Gly Tyr Tyr Ala Ile Asp Tyr
 1 5 10

5

<210> 125
 <211> 124
 <212> PRT
 <213> *Mus musculus*

10

<400> 125

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

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

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

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

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

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

Cys Ala Arg His Val Leu Gln Thr Met Ile Gly Tyr Tyr Ala Val Asp
 100 105 110

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

15

<210> 126
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> *Mus musculus*

20

<400> 126

Arg Tyr Thr Met Ser
 1 5

25

<210> 127
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> *Mus musculus*

30

<400> 127

Thr Ile Ser Gly Gly Gly Ser Tyr Thr Tyr Tyr Pro Asp Ser Val Lys
 1 5 10 15

Gly

35

<210> 128
 <211> 14
 <212> PRT

ES 2 370 250 T3

<213> *Mus musculus*

<400> 128

5 His Val Leu Gln Thr Met Ile Gly Tyr Tyr Ala Val Asp Tyr
1 5 10

<210> 129

<211> 124

<212> PRT

10 <213> *Mus musculus*

<400> 129

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

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

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

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

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

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

Cys Val Arg His Val Leu Gln Thr Thr Ile Gly Tyr Tyr Ala Val Asp
100 105 110

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

<210> 130

<211> 5

<212> PRT

20 <213> *Mus musculus*

<400> 130

Arg Tyr Thr Met Ser
1 5

25 <210> 131

<211> 17

<212> PRT

30 <213> *Mus musculus*

<400> 131

Thr Ile Ser Gly Gly Gly Gly Tyr Thr Tyr Tyr Pro Asp Ser Val Lys
1 5 10 15

Gly

35 <210> 132

<211> 14

<212> PRT

40 <213> *Mus musculus*

<400> 132

His Val Leu Gln Thr Thr Ile Gly Tyr Tyr Ala Val Asp Tyr
 1 5 10

5 <210> 133
 <211> 124
 <212> PRT
 <213> *Mus musculus*

10 <400> 133

Met Glu Val Lys Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Ala Gly
 1 5 10 15

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

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

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

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

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

Cys Ala Arg His Leu Leu Gln Thr Met Ile Gly Tyr Tyr Ala Met Asp
 100 105 110

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

15 <210> 134
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> *Mus musculus*

20 <400> 134

Arg Tyr Ala Met Ser
 1 5

25 <210> 135
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> *Mus musculus*

30 <400> 135

Thr Ile Ser Ser Gly Gly Arg Tyr Thr Tyr Tyr Pro Asp Ser Val Lys
 1 5 10 15

Gly

35 <210> 136
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> *Mus musculus*

<400> 136

His Leu Leu Gln Thr Met Ile Gly Tyr Tyr Ala Met Asp Tyr
 1 5 10

5

<210> 137
 <211> 120
 <212> PRT
 <213> *Mus musculus*

10

<400> 137

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

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

His Asn Met Asp Trp Val Lys Gln Ser His Gly Lys Ser Leu Glu Trp
 35 40 45

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

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

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

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

Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser
 115 120

15

<210> 138
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> *Mus musculus*

20

<400> 138

Asp His Asn Met Asp
 1 5

25

<210> 139
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> *Mus musculus*

30

<400> 139

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

Gly

35

<210> 140
 <211> 10
 <212> PRT

<213> *Mus musculus*

<400> 140

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

<210> 141

<211> 120

<212> PRT

10 <213> *Mus musculus*

<400> 141

Met Gln Val Gln Leu Gln Gln Phe Gly Ala Glu Leu Val Lys Pro Gly
1 5 10 15
Ala Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly Phe Thr Phe Thr Asp
20 25 30

Asn Asn Met Asp Trp Val Lys Gln Ser His Gly Lys Ser Leu Glu Trp
35 40 45

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

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

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

Cys Ala Arg Arg Lys Arg Arg Gly Tyr Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln
100 105 110

15 Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 142

<211> 5

<212> PRT

20 <213> *Mus musculus*

<400> 142

Asp Asn Asn Met Asp
1 5

25

<210> 143

<211> 17

<212> PRT

<213> *Mus musculus*

30

<400> 143

Asp Ile Asn Pro Asn Tyr Asp Ser Thr Ala Tyr Asn Gln Lys Phe Lys
1 5 10 15

Gly

35

<210> 144

<211> 11

<212> PRT
 <213> *Mus musculus*

<400> 144

5

Arg Arg Lys Arg Arg Gly Tyr Tyr Phe Asp Tyr
 1 5 10

<210> 145
 <211> 120
 <212> PRT
 <213> *Mus musculus*

10

<400> 145

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

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

Asn Asn Met Asp Trp Val Lys Gln Ser His Gly Lys Ser Leu Glu Trp
 35 40 45

15

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

Phe Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala
 65 70 75 80

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

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

Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 146
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> *Mus musculus*

20

<400> 146

Asp Asn Asn Met Asp
 1 5

25

<210> 147
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> *Mus musculus*

30

<400> 147

Asp Val Asn Pro Asn Tyr Asp Ser Thr Met Tyr Asn Gln Lys Phe Lys
 1 5 10 15

Gly

35

<210> 148

<211> 10
 <212> PRT
 <213> *Mus musculus*

5 <400> 148

Arg Ile Arg Arg Gly Tyr Ser Phe Asp Tyr
 1 5 10

10 <210> 149
 <211> 120
 <212> PRT
 <213> *Mus musculus*

15 <400> 149

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

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

Asn Asn Met Asp Trp Val Lys Gln Ser His Gly Lys Ser Leu Glu Trp
 35 40 45

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

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

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

Cys Ala Arg Arg Ile Tyr Tyr Gly Tyr Ala Leu Asp Tyr Trp Gly Gln
 100 105 110

Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser
 115 120

20 <210> 150
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> *Mus musculus*

25 <400> 150

Asp Asn Asn Met Asp
 1 5

30 <210> 151
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> *Mus musculus*

<400> 151

Asp Ile Asn Pro Asn Tyr Asp Ser Thr Ile Tyr Asn Gln Lys Phe Lys
 1 5 10 15

35 Gly

<210> 152

<211> 10
 <212> PRT
 <213> *Mus musculus*

5 <400> 152

Arg Ile Tyr Tyr Gly Tyr Ala Leu Asp Tyr
 1 5 10

10 <210> 153
 <211> 120
 <212> PRT
 <213> *Mus musculus*

15 <400> 153

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

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

His Asn Met Asp Trp Val Lys Gln Ser His Gly Lys Asn Leu Glu Trp
 35 40 45

Ile Gly Asp Ile Asn Pro Asn Tyr Asp Ser Val Ile Ser Asp Gln Lys
 50 55 60

Phe Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala
 65 70 75 80

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

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

Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser
 115 120

20 <210> 154
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> *Mus musculus*

<400> 154

25 Asp His Asn Met Asp
 1 5

30 <210> 155
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> *Mus musculus*

<400> 155

Asp Ile Asn Pro Asn Tyr Asp Ser Val Ile Ser Asp Gln Lys Phe Lys
 1 5 10 15

Gly

<210> 156
 <211> 10
 <212> PRT
 5 <213> *Mus musculus*

 <400> 156
 Arg Leu Arg Gly Gly Phe Ala Met Asp Tyr
 1 5 10

 10 <210> 157
 <211> 120
 <212> PRT
 <213> *Mus musculus*

 15 <400> 157
 Met Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Thr Val Leu Ala Arg Pro Gly
 1 5 10 15

 Ala Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Thr Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp
 20 25 30
 Tyr Asn Met Asp Trp Val Lys Gln Ser His Gly Lys Ser Leu Glu Trp
 35 40 45

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

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

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

 Cys Ala Arg Arg Met Arg Arg Gly Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln
 100 105 110

 Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser
 115 120

 20 <210> 158
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> *Mus musculus*

 25 <400> 158

 Asp Tyr Asn Met Asp
 1 5

 30 <210> 159
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> *Mus musculus*

 35 <400> 159
 Asp Ile Asn Pro Asn Tyr Asp Ser Thr Ile Tyr Lys Gln Asn Phe Lys
 1 5 10 15

 Gly

<210> 160
 <211> 10
 <212> PRT
 5 <213> *Mus musculus*

 <400> 160
 Arg Met Arg Arg Gly Tyr Ala Met Asp Tyr
 1 5 10
 10
 <210> 161
 <211> 120
 <212> PRT
 <213> *Mus musculus*
 15
 <400> 161
 Met Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Val Lys Pro Gly
 1 5 10 15
 Ala Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp
 20 25 30
 Asn Asn Met Asp Trp Val Lys Gln Ser His Gly Lys Gly Leu Glu Trp
 35 40 45
 Ile Gly Asp Ile Asn Thr Lys Ser Gly Gly Ser Ile Tyr Asn Gln Lys
 50 55 60
 Phe Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ile Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala
 65 70 75 80
 Tyr Met Glu Leu Arg Ser Leu Thr Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr
 85 90 95
 Cys Ala Arg Arg Arg Ser Tyr Gly Tyr Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln
 100 105 110
 Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser
 115 120
 20
 <210> 162
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> *Mus musculus*
 25
 <400> 162
 Asp Asn Asn Met Asp
 1 5
 30
 <210> 163
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> *Mus musculus*
 35
 <400> 163
 Asp Ile Asn Thr Lys Ser Gly Gly Ser Ile Tyr Asn Gln Lys Phe Lys
 1 5 10 15
 Gly

<210> 164
 <211> 10
 <212> PRT
 5 <213> *Mus musculus*

 <400> 164
 Arg Arg Ser Tyr Gly Tyr Tyr Phe Asp Tyr
 1 5 10
 10
 <210> 165
 <211> 120
 <212> PRT
 <213> *Mus musculus*
 15
 <400> 165
 Met Gln Val Gln Leu Lys Gln Ser Gly Ala Glu Leu Val Thr Pro Gly
 1 5 10 15
 Thr Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp
 20 25 30
 Asn Asn Met Asp Trp Val Lys Gln Ser His Gly Lys Ser Leu Glu Trp
 35 40 45
 Ile Gly Asp Ile Asn Pro Asn Tyr Asp Ser Thr Ala Tyr Asn Gln Lys
 50 55 60
 Phe Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala
 65 70 75 80
 Tyr Met Glu Leu Arg Ser Leu Thr Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr
 85 90 95
 Cys Ala Arg Arg Val Arg Arg Gly Tyr His Phe Asp Tyr Trp Gly Gln
 100 105 110
 Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser
 115 120
 20 <210> 166
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> *Mus musculus*
 25 <400> 166
 Asp Asn Asn Met Asp
 1 5
 30 <210> 167
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> *Mus musculus*
 35 <400> 167

ES 2 370 250 T3

Asp Ile Asn Pro Asn Tyr Asp Ser Thr Ala Tyr Asn Gln Lys Phe Lys
 1 5 10 15

Gly

<210> 168
 <211> 10
 5 <212> PRT
 <213> *Mus musculus*

<400> 168

Arg Val Arg Arg Gly Tyr His Phe Asp Tyr
 1 5 10

<210> 169
 <211> 122
 15 <212> PRT
 <213> *Mus musculus*

<400> 169

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

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

Asn Ala Leu Tyr Trp Val Lys Gln Ser His Gly Lys Ser Leu Glu Trp
 35 40 45

Ile Gly Ile Ile Asn Pro Asn Ser Gly Gly Thr Asn Tyr Asn Gln Lys
 50 55 60

Phe Lys Asp Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala
 65 70 75 80

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

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

Gly Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser
 115 120

20 <210> 170
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> *Mus musculus*

25 <400> 170

Glu Asn Ala Leu Tyr
 1 5

30 <210> 171
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> *Mus musculus*

<400> 171

Ile Ile Asn Pro Asn Ser Gly Gly Thr Asn Tyr Asn Gln Lys Phe Lys
 1 5 10 15

Asp

5 <210> 172
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> *Mus musculus*

10 <400> 172

Ser Gly Gly Arg Gly Gln Pro Tyr Tyr Phe Asp Tyr
 1 5 10

15 <210> 173
 <211> 118
 <212> PRT
 <213> *Mus musculus*

20 <400> 173

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

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

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

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

Phe Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala
 65 70 75 80

Tyr Met His Leu Ser Ser Leu Ala Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr
 85 90 95

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

Leu Val Thr Val Ser Ala
 115

25 <210> 174
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> *Mus musculus*

30 <400> 174

Ser Tyr Trp Met Gln
 1 5

35 <210> 175
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> *Mus musculus*

<400> 175

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

5 Gly

<210> 176

<211> 8

<212> PRT

10 <213> *Mus musculus*

<400> 176

Asp Gly Tyr Asp Leu Phe Ala Tyr
 1 5

15

<210> 177

<211> 118

<212> PRT

20 <213> *Mus musculus*

<400> 177

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

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

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

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

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

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

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

Leu Val Thr Val Ser Ala
 115

25

<210> 178

<211> 5

<212> PRT

30 <213> *Mus musculus*

<400> 178

Asn Tyr Trp Met Gln
 1 5

35

<210> 179 -

<211> 17

<212> PRT

<213> *Mus musculus*

ES 2 370 250 T3

<400> 179

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

Gly

5 <210> 180
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> *Mus musculus*

10 <400> 180

Asp Gly Tyr Asp Leu Phe Ala Tyr
 1 5

15 <210> 181
 <211> 117
 <212> PRT
 <213> *Mus musculus*

20 <400> 181

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

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

Gly Tyr Tyr Leu Asn Trp Ile Arg Gln Phe Pro Gly His Lys Leu Glu
 35 40 45

Trp Met Gly Tyr Ile Ser Tyr Asp Gly Asn Asn Arg Tyr Asn Pro Ser
 50 55 60

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

Phe Leu Lys Leu Asn Ser Val Thr Thr Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr
 85 90 95

Cys Ala Ser Phe Phe Tyr Gly Lys His Asp Trp Gly Gln Gly Thr Thr
 100 105 110

Leu Thr Val Ser Ser
 115

25 <210> 182
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> *Mus musculus*

30 <400> 182

Ser Gly Tyr Tyr Leu Asn
 1 5

<210> 183
 <211> 16

<212> PRT
 <213> *Mus musculus*

<400> 183

5 Tyr Ile Ser Tyr Asp Gly Asn Asn Arg Tyr Asn Pro Ser Leu Lys Asn
 1 5 10 15

<210> 184

<211> 7

10 <212> PRT
 <213> *Mus musculus*

<400> 184

15 Phe Phe Tyr Gly Lys His Asp
 1 5

<210> 185

<211> 115

20 <212> PRT
 <213> *Mus musculus*

<400> 185

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

Ala Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ala Phe Ser Arg
 20 25 30
 Ser Trp Met Asn Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp
 35 40 45

Ile Gly Trp Ile Tyr Pro Gly Asp Gly Ser Thr Lys Tyr Asn Glu Lys
 50 55 60

Phe Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala
 65 70 75 80

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

Cys Ala Arg Gly Gly Leu Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu Thr
 100 105 110

25 Val Ser Ser
 115

<210> 186

<211> 5

30 <212> PRT
 <213> *Mus musculus*

<400> 186

35 Arg Ser Trp Met Asn
 1 5

<210> 187

<211> 17

<212> PRT
 <213> *Mus musculus*

<400> 187

Trp Ile Tyr Pro Gly Asp Gly Ser Thr Lys Tyr Asn Glu Lys Phe Lys
 1 5 10 15

Gly

5

<210> 188
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> *Mus musculus*

10

<400> 188

Gly Gly Leu Asp Tyr
 1 5

15

<210> 189
 <211> 119
 <212> PRT
 <213> *Mus musculus*

20

<400> 189

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

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

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

Ile Gly Gln Ile Tyr Pro Gly Asp Gly Asp Thr Asn Tyr Asn Gly Lys
 50 55 60

Phe Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala
 65 70 75 80

Tyr Met Gln Leu Ser Ser Leu Ala Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Phe
 85 90 95

Cys Ala Arg Gly Arg Gly Tyr Ser Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
 100 105 110

Thr Ser Val Thr Val Ser Ser
 115

25

<210> 190
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> *Mus musculus*

30

<400> 190

Arg Tyr Trp Met Asn
 1 5

35

<210> 191
 <211> 17
 <212> PRT

<213> *Mus musculus*

<400> 191

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

5 Gly

<210> 192

<211> 9

<212> PRT

10 <213> *Mus musculus*

<400> 192

Gly Arg Gly Tyr Ser Ala Met Asp Tyr
 1 5

15

<210> 193

<211> 120

<212> PRT

<213> *Mus musculus*

20

<400> 193

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

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

Tyr Asn Met Asp Trp Val Lys Gln Ser His Gly Lys Ser Leu Glu Trp
 35 40 45

Ile Gly Asp Ile Asp Pro Asn Asn Gly Gly Ala Leu Tyr Asn Gln Lys
 50 55 60

Phe Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala
 65 70 75 80

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

Cys Ala Arg Arg Pro Val Tyr Tyr Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln
 100 105 110

Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser
 115 120

25 <210> 194

<211> 5

<212> PRT

<213> *Mus musculus*

30 <400> 194

Asp Tyr Asn Met Asp
 1 5

<210> 195

<211> 17
 <212> PRT
 <213> *Mus musculus*

5 <400> 195

Asp Ile Asp Pro Asn Asn Gly Gly Ala Leu Tyr Asn Gln Lys Phe Lys
 1 5 10 15

Gly

10 <210> 196
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> *Mus musculus*

15 <400> 196

Arg Pro Val Tyr Tyr Tyr Ala Met Asp Tyr
 1 5 10

20 <210> 197
 <211> 120
 <212> PRT
 <213> *Mus musculus*

<400> 197

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

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

Asn Asn Met Asp Trp Val Lys Gln Ser His Gly Lys Ser Leu Glu Trp
 35 40 45

Ile Gly Asp Ile Asn Pro Asn Asn Gly Gly Thr Ile Tyr Asn Gln Lys
 50 55 60

Phe Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala
 65 70 75 80

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

Cys Ala Arg Arg Gly Tyr Tyr Gly Arg Thr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln
 100 105 110

25 Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser
 115 120

30 <210> 198
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> *Mus musculus*

<400> 198

Asp Asn Asn Met Asp
 1 5

<210> 199
 <211> 17
 <212> PRT
 5 <213> *Mus musculus*

 <400> 199
 Asp Ile Asn Pro Asn Asn Gly Gly Thr Ile Tyr Asn Gln Lys Phe Lys
 1 5 10 15

 Gly
 10
 <210> 200
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> *Mus musculus*
 15
 <400> 200

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

 20 <210> 201
 <211> 117
 <212> PRT
 <213> *Mus musculus*
 25 <400> 201

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

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

 Asp Tyr Met His Trp Val Asn Gln Arg Pro Glu Gln Gly Leu Glu Trp
 35 40 45
 Ile Gly Trp Ile Asp Pro Glu Asn Gly Asp Thr Glu Tyr Ala Ser Lys
 50 55 60

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

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

 Cys Thr Tyr Gly Ile Tyr Val Arg Gly Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr
 100 105 110

 Leu Thr Val Ser Ser
 115
 30 <210> 202
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> *Mus musculus*
 35 <400> 202

ES 2 370 250 T3

Asp Asp Tyr Met His
 1 5

 <210> 203
 <211> 17
 5 <212> PRT
 <213> *Mus musculus*

 <400> 203

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

 <210> 204
 <211> 7
 15 <212> PRT
 <213> *Mus musculus*

 <400> 204

 Gly Ile Tyr Val Arg Gly Tyr
 20 1 5

 <210> 205
 <211> 107
 <212> PRT
 25 <213> *Mus musculus*

 <400> 205

 Asp Ile Val Met Thr Gln Ser His Lys Phe Met Ser Thr Ser Val Gly
 1 5 10 15

 Asp Arg Val Ser Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asp Val Gly Thr Ala
 20 25 30

 Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile
 35 40 45

 Tyr Trp Ala Ser Thr Arg His Thr Gly Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly
 50 55 60

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

 Glu Asp Leu Ala Asp Tyr Leu Cys Gln Gln Tyr Ser Asn Tyr Ile Thr
 85 90 95
 Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys Arg
 100 105
 30

 <210> 206
 <211> 11
 <212> PRT
 35 <213> *Mus musculus*

 <400> 206

 Lys Ala Ser Gln Asp Val Gly Thr Ala Val Ala
 1 5 10
 40
 <210> 207

<211> 7
 <212> PRT
 <213> *Mus musculus*

5 <400> 207

Trp Ala Ser Thr Arg His Thr
 1 5

10 <210> 208
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> *Mus musculus*

15 <400> 208

Gln Gln Tyr Ser Asn Tyr Ile Thr
 1 5

20 <210> 209
 <211> 108
 <212> PRT
 <213> *Mus musculus*

<400> 209

Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Gln Lys Phe Met Ser Thr Ser Val Gly
 1 5 10 15

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

Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Lys Ala Leu Ile
 35 40 45

Tyr Ser Ala Ser Tyr Arg Tyr Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly
 50 55 60

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

Glu Asp Leu Ala Glu Tyr Phe Cys Gln Gln Tyr Asn Ser Tyr Pro Leu
 85 90 95

25 Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg
 100 105

30 <210> 210
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> *Mus musculus*

<400> 210

Lys Ala Ser Gln Asn Val Gly Thr Ala Val Ala
 1 5 10

35 <210> 211
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> *Mus musculus*

40 <400> 211

Ser Ala Ser Tyr Arg Tyr Ser
 1 5
 <210> 212
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> *Mus musculus*
 <400> 212
 Gln Gln Tyr Asn Ser Tyr Pro Leu Thr
 1 5
 <210> 213
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> *Mus musculus*
 <400> 213
 Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ile Met Ser Ala Ser Leu Gly
 1 5 10 15
 Glu Lys Val Thr Met Ser Cys Arg Ala Thr Ser Ser Val Asn Tyr Ile
 20 25 30
 Tyr Trp Tyr Gln Gln Lys Ser Asp Ala Ser Pro Lys Leu Trp Ile Phe
 35 40 45
 Tyr Thr Ser Asn Leu Ala Pro Gly Val Pro Pro Arg Phe Ser Gly Ser
 50 55 60
 Gly Ser Gly Asn Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Ser Met Glu Ala Glu
 65 70 75 80
 Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Phe Ser Ser Ser Pro Trp Thr
 85 90 95
 Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg
 100 105
 <210> 214
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> *Mus musculus*
 <400> 214
 Arg Ala Thr Ser Ser Val Asn Tyr Ile Tyr
 1 5 10
 <210> 215
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> *Mus musculus*
 <400> 215
 Thr Ser Asn Leu Ala Pro
 1 5
 <210> 216
 <211> 9

<212> PRT
 <213> *Mus musculus*
 <400> 216
 5 Gln Gln Phe Ser Ser Ser Pro Trp Thr
 1 5
 <210> 217
 <211> 114
 10 <212> PRT
 <213> *Mus musculus*
 <400> 217
 Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ala Val Ser Val Gly
 1 5 10 15
 Glu Lys Val Thr Met Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Tyr Ser
 20 25 30
 Ser Asn Gln Lys Asn Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln
 35 40 45
 Ser Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val
 50 55 60
 Pro Asp Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr
 65 70 75 80
 Ile Ser Ser Val Lys Ala Glu Asp Leu Ala Val Tyr Leu Cys Gln Gln
 85 90 95
 Tyr Tyr Arg Phe Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile
 100 105 110
 15 Lys Arg
 <210> 218
 <211> 17
 <212> PRT
 20 <213> *Mus musculus*
 <400> 218
 Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Tyr Ser Ser Asn Gln Lys Asn Tyr Leu
 1 5 10 15
 Ala
 25 <210> 219
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> *Mus musculus*
 30 <400> 219
 Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser
 1 5
 35 <210> 220

ES 2 370 250 T3

<211> 9
 <212> PRT
 <213> *Mus musculus*
 5 <400> 220
 Gln Gln Tyr Tyr Arg Phe Pro Tyr Thr
 1 5
 <210> 221
 10 <211> 18
 <212> ADN
 <213> *Mus musculus*
 <220>
 15 <221> CDS
 <222> (1).. (18)
 <223>
 <400> 221
 20 agt ggt tat tac tgg acc 18
 Ser Gly Tyr Tyr Trp Thr
 1 5
 <210> 222
 25 <211> 6
 <212> PRT
 <213> *Mus musculus*
 <400> 222
 30 Ser Gly Tyr Tyr Trp Thr
 1 5
 <210> 223
 35 <211> 48
 <212> ADN
 <213> *Mus musculus*
 <220>
 40 <221> CDS
 <222> (1).. (48)
 <223>
 <400> 223
 tac ata tcc ttc gac ggt acc aat gac tac aac cca tct ctc aaa aat 48
 Tyr Ile Ser Phe Asp Gly Thr Asn Asp Tyr Asn Pro Ser Leu Lys Asn
 1 5 10 15
 45 <210> 224
 <211> 16
 <212> PRT
 50 <213> *Mus musculus*
 <400> 224
 Tyr Ile Ser Phe Asp Gly Thr Asn Asp Tyr Asn Pro Ser Leu Lys Asn
 1 5 10 15
 55 <210> 225
 <211> 18
 <212> ADN

<213> *Mus musculus*

<220>
 <221> CDS
 5 <222> (1).. (18)
 <223>

<400> 225

ggc ccc ccc tgt act tac 18
 Gly Pro Pro Cys Thr Tyr
 10 1 5

<210> 226
 <211> 6
 <212> PRT
 15 <213> *Mus musculus*

<400> 226

Gly Pro Pro Cys Thr Tyr
 20 1 5

<210> 227
 <211> 30
 <212> ADN
 25 <213> *Mus musculus*

<220>
 <221> CDS
 <222> (1).. (30)
 <223>

30 <400> 227

agg gcc acc tca agt gta aat tac att tac 30
 Arg Ala Thr Ser Ser Val Asn Tyr Ile Tyr
 1 5 10

35 <210> 228
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> *Mus musculus*

40 <400> 228

Arg Ala Thr Ser Ser Val Asn Tyr Ile Tyr
 1 5 10

<210> 229
 <211> 18
 <212> ADN
 <213> *Mus musculus*

<220>
 <221> CDS
 <222> (1).. (18)
 <223>

50 <400> 229

55 aca tcc aac ctg gct cct 18
 Thr Ser Asn Leu Ala Pro
 1 5

ES 2 370 250 T3

<210> 230
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> mums musculus
 5
 <400> 230
 Thr Ser Asn Leu Ala Pro
 1 5
 10 <210> 231
 <211> 27
 <212> ADN
 <213> *Mus musculus*
 15 <220>
 <221> CDS
 <222> (1).. (27)
 <223>
 20 <400> 231
 cag cag ttt tct agt tcc cca tgg acg 27
 Gln Gln Phe Ser Ser Ser Pro Trp Thr
 1 5
 25 <210> 232
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> *Mus musculus*
 <400> 232
 30 Gln Gln Phe Ser Ser Ser Pro Trp Thr
 1 5
 <210> 233
 <211> 15
 35 <212> ADN
 <213> *Mus musculus*
 <220>
 <221> CDS
 40 <222> (1).. (15)
 <223>
 <400> 233
 cac ttt gtt ttg cac 15
 His Phe Val Leu His
 45 1 5
 <210> 234
 <211> 5
 <212> PRT
 50 <213> *Mus musculus*
 <400> 234
 His Phe Val Leu His
 1 5
 55 <210> 235
 <211> 48
 <212> ADN
 <213> *Mus musculus*
 60

ES 2 370 250 T3

<220>
 <221> CDS
 <222> (1).. (48)
 <223>

5

<400> 235

tat att att cct tac aat gat ggt act aag tac aat gag aag ttc aaa 48
 Tyr Ile Ile Pro Tyr Asn Asp Gly Thr Lys Tyr Asn Glu Lys Phe Lys
 1 5 10 15

10

<210> 236
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> *Mus musculus*

15

<400> 236

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

20

<210> 237
 <211> 39
 <212> ADN
 <213> *Mus musculus*

25

<220>
 <221> CDS
 <222> (1).. (39)
 <223>

30

<400> 237

ggg aat agg tac gac gta ggt tcc tat gct atg gac tac 39
 Gly Asn Arg Tyr Asp Val Gly Ser Tyr Ala Met Asp Tyr
 1 5 10

35

<210> 238
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> *Mus musculus*

40

<400> 238

Gly Asn Arg Tyr Asp Val Gly Ser Tyr Ala Met Asp Tyr
 1 5 10

45

<210> 239
 <211> 51
 <212> ADN
 <213> *Mus musculus*

50

<220>
 <221> CDS
 <222> (1).. (51)
 <223>

<400> 239

aag tcc agt cag agc ctt tta tat agt agc aat caa aag aac tac ttg 48
 Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Tyr Ser Ser Asn Gln Lys Asn Tyr Leu
 1 5 10 15

gcc
 51
 Ala

ES 2 370 250 T3

<210> 240
 <211> 17
 <212> PRT
 5 <213> *Mus musculus*

 <400> 240

 Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Tyr Ser Ser Asn Gln Lys Asn Tyr Leu
 1 5 10 15

 Ala
 10 <210> 241
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> *Mus musculus*
 15 <220>
 <221> CDS
 <222> (1).. (21)
 <223>
 20 <400> 241

 tgg gca tcc act agg gaa tct 21
 Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser
 1 5
 25 <210> 242
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> *Mus musculus*
 30 <400> 242

 Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser
 1 5
 35 <210> 243
 <211> 27
 <212> ADN
 <213> *Mus musculus*
 40 <220>
 <221> CDS
 <222> (1) .. (27)
 <223>
 45 <400> 243

 cag caa tat tat agg ttt ccg tac acg 27
 Gln Gln Tyr Tyr Arg Phe Pro Tyr Thr
 1 5
 50 <210> 244
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> *Mus musculus*
 <400> 244

 Gln Gln Tyr Tyr Arg Phe Pro Tyr Thr
 55 1 5

ES 2 370 250 T3

<210> 245
 <211> 15
 <212> ADN
 <213> *Mus musculus*
 5
 <220>
 <221> CDS
 <222> (1).. (15)
 <223>
 10
 <400> 245
 agc tcc tgg atg cac 15
 Ser Ser Trp Met His
 1 5
 15
 <210> 246
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> *Mus musculus*
 20
 <400> 246
 Ser Ser Trp Met His
 1 5
 25
 <210> 247
 <211> 51
 <212> ADN
 <213> *Mus musculus*
 <220>
 30
 <221> CDS
 <222> (1) .. (51)
 <223>
 <400> 247
 35
 tac att aat cct agc agt ggt tat act aag tac aat cgg aag ttc agg 48
 Tyr Ile Asn Pro Ser Ser Gly Tyr Thr Lys Tyr Asn Arg Lys Phe Arg
 1 5 10 15
 gac
 51
 Asp
 40
 <210> 248
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> *Mus musculus*
 <400> 248
 Tyr Ile Asn Pro Ser Ser Gly Tyr Thr Lys Tyr Asn Arg Lys Phe Arg
 1 5 10 15
 45
 Asp
 <210> 249
 <211> 27
 <212> ADN
 50
 <213> *Mus musculus*
 <220>
 <221> CDS

<213> *Mus musculus*

<400> 254

Trp Ala Ser Thr Arg His Thr
 5 1 5

<210> 255
 <211> 24
 <212> ADN
 10 <213> *Mus musculus*

<220>
 <221> CDS
 <222> (1).. (24)
 15 <223>

<400> 255

cag caa tat agc aac tat atc acg 24
 Gln Gln Tyr Ser Asn Tyr Ile Thr
 20 1 5

<210> 256
 <211> 8
 <212> PRT
 25 <213> *Mus musculus*

<400> 256

Gln Gln Tyr Ser Asn Tyr Ile Thr
 1 5

30 <210> 257
 <211> 15
 <212> ADN
 <213> *Mus musculus*

35 <220>
 <221> CDS
 <222> (1).. (15)
 <223>

40 <400> 257

gac aac aac atg gac 15
 Asp Asn Asn Met Asp
 1 5

45 <210> 258
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> *Mus musculus*

<400> 258

50 Asp Asn Asn Met Asp
 1 5

<210> 259
 <211> 51
 55 <212> ADN
 <213> *Mus musculus*

<220>

ES 2 370 250 T3

<221> CDS
 <222> (1).. (51)
 <223>

5 <400> 259

gat att aat act aaa agt ggt ggt tct atc tac aac cag aag ttc aag 48
 Asp Ile Asn Thr Lys Ser Gly Gly Ser Ile Tyr Asn Gln Lys Phe Lys
 1 5 10 15

ggc
 51
 Gly

10 <210> 260
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> *Mus musculus*

15 <400> 260

Asp Ile Asn Thr Lys Ser Gly Gly Ser Ile Tyr Asn Gln Lys Phe Lys
 1 5 10 15

Gly

20 <210> 261
 <211> 30
 <212> ADN
 <213> *Mus musculus*

25 <220>
 <221> CDS
 <222> (1).. (30)
 <223>

30 <400> 261

agg agg agc tac ggc tac tac ttt gac tac 30
 Arg Arg Ser Tyr Gly Tyr Tyr Phe Asp Tyr
 1 5 10

35 <210> 262
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> *Mus musculus*

40 <400> 262

Arg Arg Ser Tyr Gly Tyr Tyr Phe Asp Tyr
 1 5 10

45 <210> 263
 <211> 33
 <212> ADN
 <213> *Mus musculus*

50 <220>
 <221> CDS
 <222> (1).. (33)
 <223>

<400> 263

ES 2 370 250 T3

aag gcc agt cag aat gtg ggt act gct gta gcc 33
 Lys Ala Ser Gln Asn Val Gly Thr Ala Val Ala
 1 5 10

 <210> 264
 5 <211> ·11
 <212> PRT
 <213> *Mus musculus*

 <400> 264
 10
 Lys Ala Ser Gln Asn Val Gly Thr Ala Val Ala
 1 5 10

 <210> 265
 <211> 21
 15 <212> ADN
 <213> *Mus musculus*

 <220>
 <221> CDS
 20 <222> (1).. (21)
 <223>

 <400> 265

 tcg gca tcc tac egg tac agt 21
 Ser Ala Ser Tyr Arg Tyr Ser
 25 1 5

 <210> 266
 <211> 7
 <212> PRT
 30 <213> *Mus musculus*

 <400> 266

 Ser Ala Ser Tyr Arg Tyr Ser
 35 1 5

 <210> 267
 <211> 27
 <212> ADN
 <213> *Mus musculus*
 40
 <220>
 <221> CDS
 <222> (1).. (27)
 <223>
 45
 <400> 267

 cag caa tat aac agc tat cct ctc acg 27
 Gln Gln Tyr Asn Ser Tyr Pro Leu Thr
 1 5

 50 <210> 268
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> *Mus musculus*

 55 <400> 268

REIVINDICACIONES

1. Anticuerpo que reconoce un enzima proteolítico y un sustrato del mismo, en el que dicho anticuerpo es un anticuerpo biespecífico que puede actuar como cofactor que aumenta la reacción enzimática, en el que el enzima es el factor IX de coagulación sanguínea y/o el factor IX activado de coagulación sanguínea; el sustrato es el factor X de coagulación sanguínea; y el cofactor es factor VIII de coagulación sanguínea y/o factor VIII activado de coagulación sanguínea.
2. Anticuerpo según la reivindicación 1, en el que dicho anticuerpo comprende una región determinante de complementariedad que comprende la secuencia de aminoácidos de la CDR3 del anticuerpo anti-factor IX/IXa de coagulación sanguínea de los (a1) o (a2) siguientes o una región determinante de complementariedad equivalente funcionalmente a la misma, y una región determinante de complementariedad que comprende la secuencia de aminoácidos de la CDR3 del anticuerpo anti-factor X de coagulación sanguínea descrita en cualquiera de los (b1) a (b9) siguientes, o una región determinante de complementariedad equivalente funcionalmente a la misma:
- (a1) secuencia de aminoácidos de la CDR3 de la cadena H descrita en SEC ID nº 16,
 - (a2) secuencia de aminoácidos de la CDR3 de la cadena H descrita en SEC ID nº 20,
 - (b1) secuencia de aminoácidos de la CDR3 de la cadena H descrita en SEC ID nº 24,
 - (b2) secuencia de aminoácidos de la CDR3 de la cadena H descrita en SEC ID nº 28,
 - (b3) secuencia de aminoácidos de la CDR3 de la cadena H descrita en SEC ID nº 32,
 - (b4) secuencia de aminoácidos de la CDR3 de la cadena H descrita en SEC ID nº 36,
 - (b5) secuencia de aminoácidos de la CDR3 de la cadena H descrita en SEC ID nº 40,
 - (b6) secuencia de aminoácidos de la CDR3 de la cadena H descrita en SEC ID nº 44,
 - (b7) secuencia de aminoácidos de la CDR3 de la cadena H descrita en SEC ID nº 48,
 - (b8) secuencia de aminoácidos de la CDR3 de la cadena H descrita en SEC ID nº 52,
 - (b9) secuencia de aminoácidos de la CDR3 de la cadena H descrita en SEC ID nº 56.
3. Anticuerpo según la reivindicación 1, en el que dicho anticuerpo comprende una región determinante de complementariedad que comprende la secuencia de aminoácidos de la CDR del anticuerpo anti-factor IX/IXa de coagulación sanguínea de los (a1) o (a2) siguientes, o una región determinante de complementariedad equivalente funcionalmente a la misma, y una región determinante de complementariedad que comprende la secuencia de aminoácidos de la CDR del anticuerpo anti-factor X de coagulación sanguínea descrita en cualquiera de los (b1) a (b9) siguientes o una región determinante de complementariedad equivalente funcionalmente a la misma:
- (a1) secuencias de aminoácidos de las CDR 1, 2 y 3 de la cadena H descritas en SEC ID nº 14, 15 y 16, respectivamente;
 - (a2) secuencias de aminoácidos de las CDR 1, 2 y 3 de la cadena H descritas en SEC ID nº 18, 19 y 20, respectivamente;
 - (b1) secuencias de aminoácidos de las CDR 1, 2 y 3 de la cadena H descritas en SEC ID nº 22, 23 y 24, respectivamente;
 - (b2) secuencias de aminoácidos de las CDR 1, 2 y 3 de la cadena H descritas en SEC ID nº 26, 27 y 28, respectivamente;
 - (b3) secuencias de aminoácidos de las CDR 1, 2 y 3 de la cadena H descritas en SEC ID nº 30, 31 y 32, respectivamente;
 - (b4) secuencias de aminoácidos de las CDR 1, 2 y 3 de la cadena H descritas en SEC ID nº 34, 35 y 36, respectivamente;
 - (b5) secuencias de aminoácidos de las CDR 1, 2 y 3 de la cadena H descritas en SEC ID nº 38, 39 y 40, respectivamente;
 - (b6) secuencias de aminoácidos de las CDR 1, 2 y 3 de la cadena H descritas en SEC ID nº 42, 43 y 44, respectivamente;
 - (b7) secuencias de aminoácidos de las CDR 1, 2 y 3 de la cadena H descritas en SEC ID nº 46, 47 y 48, respectivamente;
 - (b8) secuencias de aminoácidos de las CDR 1, 2 y 3 de la cadena H descritas en SEC ID nº 50, 51 y 52, respectivamente;
 - (b9) secuencias de aminoácidos de las CDR 1, 2 y 3 de la cadena H descritas en SEC ID nº 54, 55 y 56, respectivamente.

4. Composición que comprende el anticuerpo según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 y un portador farmacéuticamente aceptable.
- 5 5. Composición según la reivindicación 4, en la que dicha composición es una composición farmacéutica utilizada para prevenir y/o tratar el sangrado, un trastorno acompañado de sangrado o un trastorno causado por el sangrado.
- 10 6. Composición según la reivindicación 5, en la que el sangrado, el trastorno acompañado de sangrado o el trastorno causado por el sangrado es un trastorno que aparece y/o progresa como resultado de una reducción de la actividad o deficiencia del factor VIII de coagulación sanguínea y/o del factor VIII activado de coagulación sanguínea.
- 15 7. Composición según la reivindicación 6, en la que el trastorno que aparece y/o progresa como resultado de una reducción de la actividad o deficiencia del factor VIII de coagulación sanguínea y/o del factor VIII activado de coagulación sanguínea es la hemofilia A.
- 20 8. Composición según la reivindicación 6, en la que el trastorno que aparece y/o progresa como resultado de una reducción de la actividad o deficiencia del factor VIII de coagulación sanguínea y/o del factor VIII activado de coagulación sanguínea es un trastorno en el que se genera un inhibidor contra el factor VIII de coagulación sanguínea y/o el factor VIII activado de coagulación sanguínea.
- 25 9. Composición según la reivindicación 6, en la que el trastorno que aparece y/o progresa como resultado de una reducción de la actividad o deficiencia del factor VIII de coagulación sanguínea y/o del factor VIII activado de coagulación sanguínea es la hemofilia adquirida.
- 30 10. Composición según la reivindicación 6, en la que el trastorno que aparece y/o progresa como resultado de una reducción de la actividad del factor VIII de coagulación sanguínea y/o del factor VIII activado de coagulación sanguínea es la enfermedad de von Willebrand.
- 35 11. Utilización del anticuerpo según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, o de la composición según cualquiera de las reivindicaciones 4 a 10, para la preparación de una composición farmacéutica para prevenir y/o tratar el sangrado, un trastorno acompañado de sangrado, o un trastorno causado por el sangrado.
- 40 12. Utilización del anticuerpo según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 para preparar la composición según cualquiera de las reivindicaciones 4 a 10.
- 45 13. Kit utilizado en la utilización según la reivindicación 11, en el que dicho kit comprende por lo menos el anticuerpo según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 o la composición según la reivindicación 5.
14. Utilización del anticuerpo según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 o de la composición según cualquiera de las reivindicaciones 4 a 10 en combinación con factor VIII de coagulación sanguínea para la preparación de una composición farmacéutica destinada a la prevención y/o el tratamiento del sangrado, de un trastorno acompañado de sangrado o de un trastorno causado por el sangrado.
15. Kit utilizado en la utilización según la reivindicación 14, en el que dicho kit comprende por lo menos el anticuerpo según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, o la composición según la reivindicación 4, y el factor VIII de coagulación sanguínea.

FIG. 1

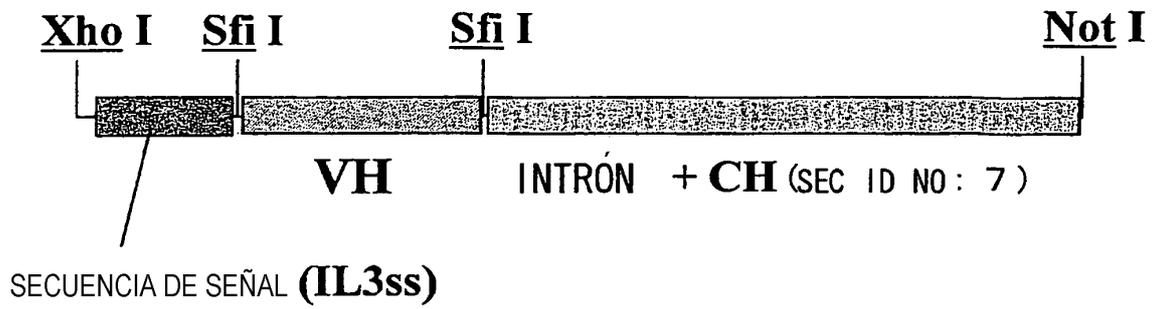


FIG. 2

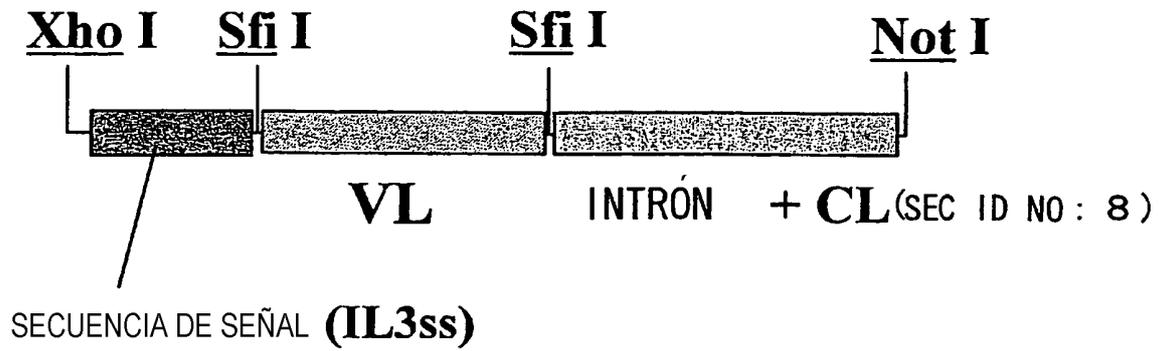


FIG. 3

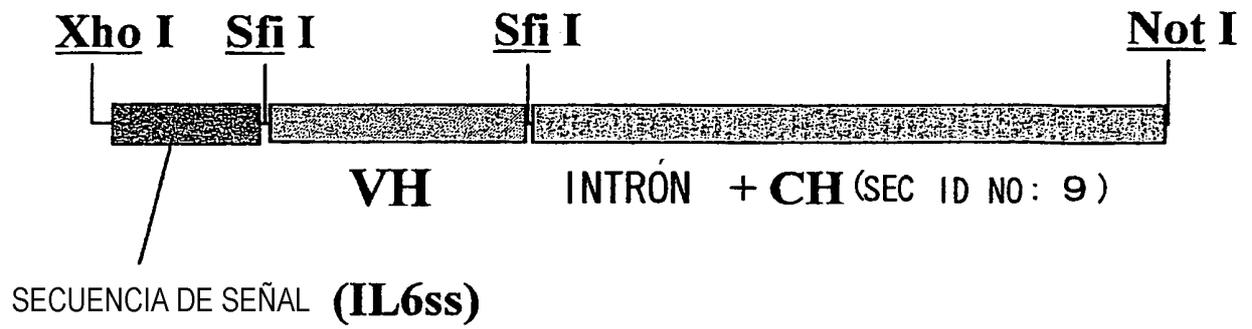


FIG. 4

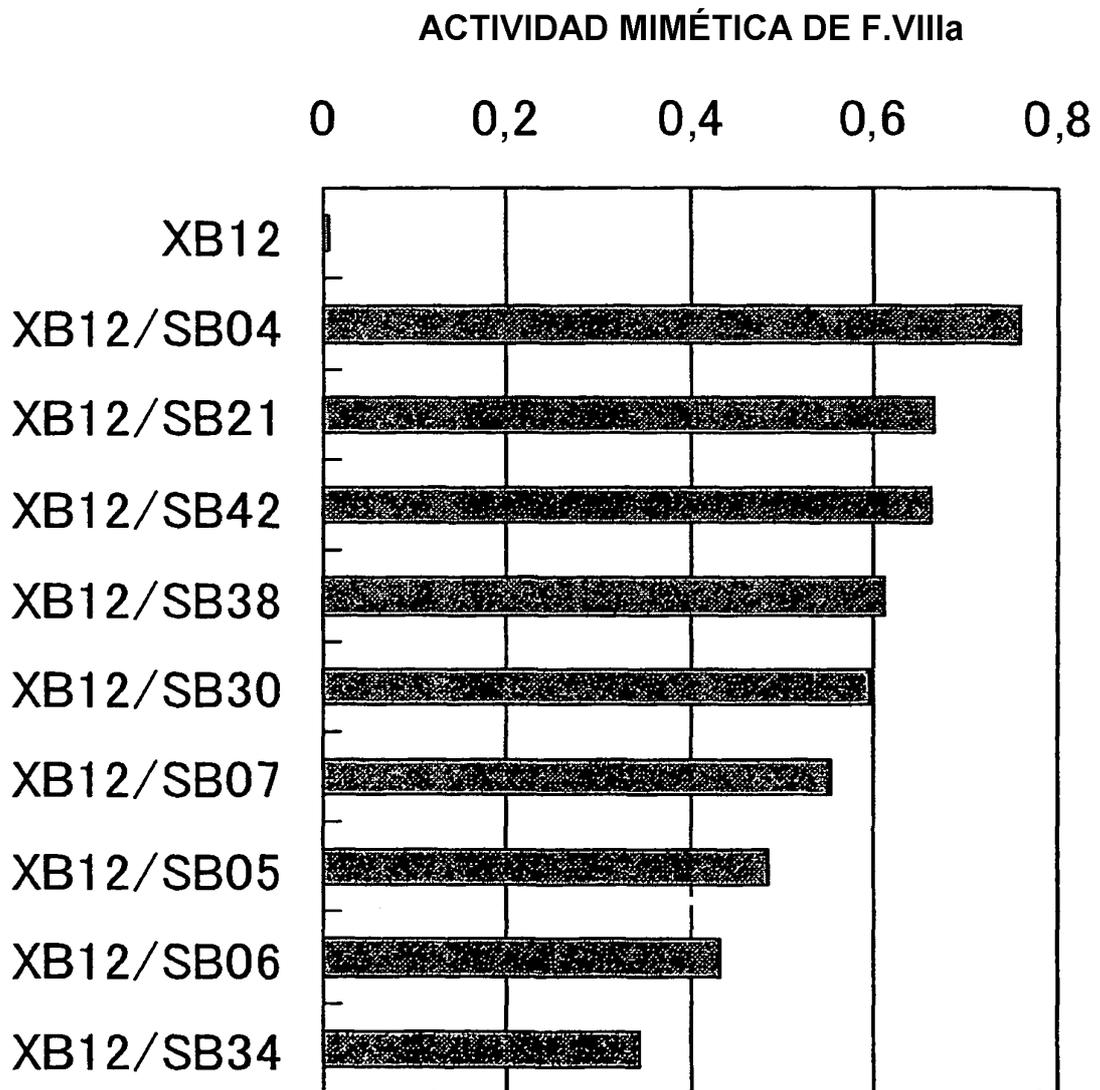


FIG. 5

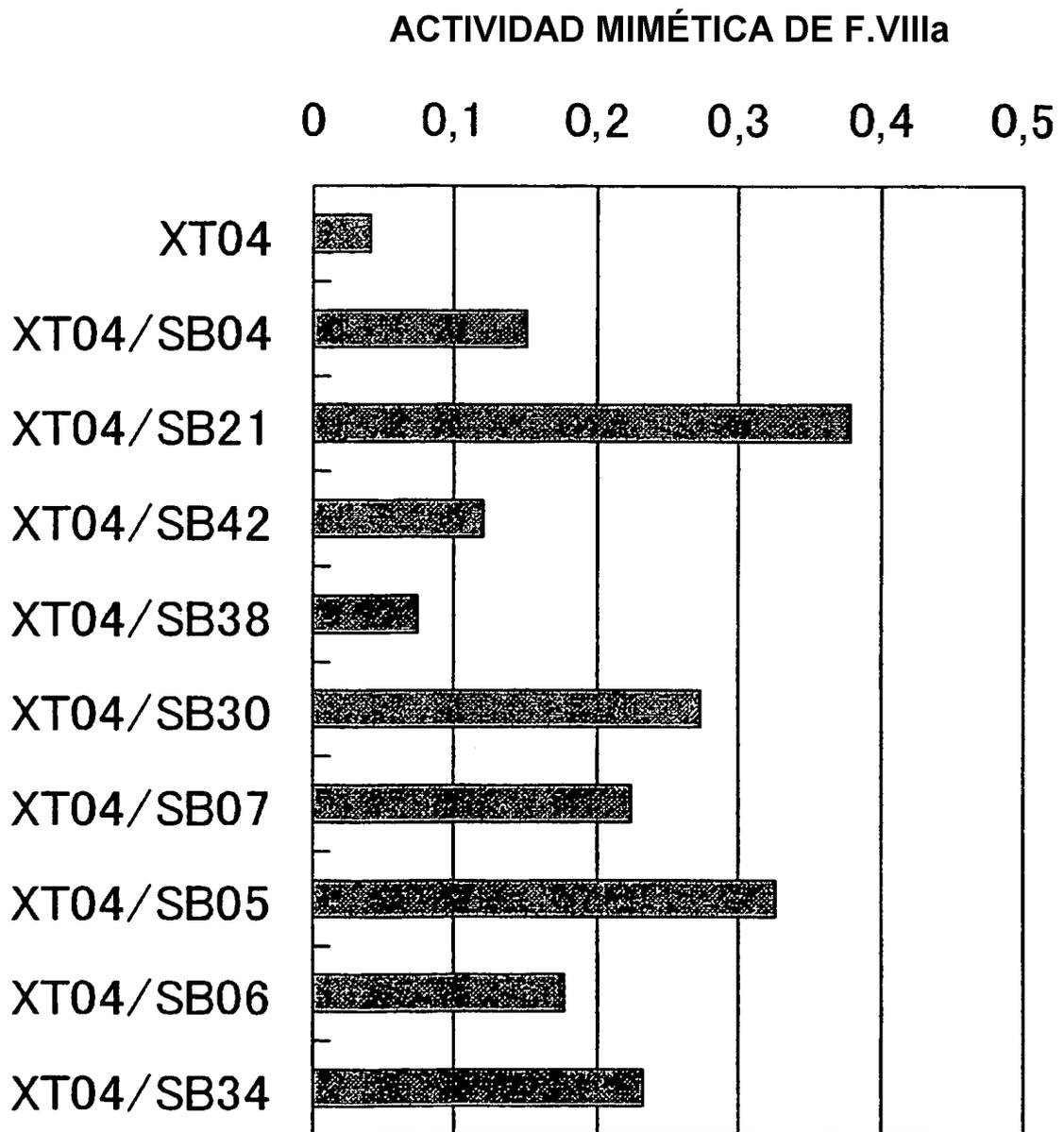


FIG. 6

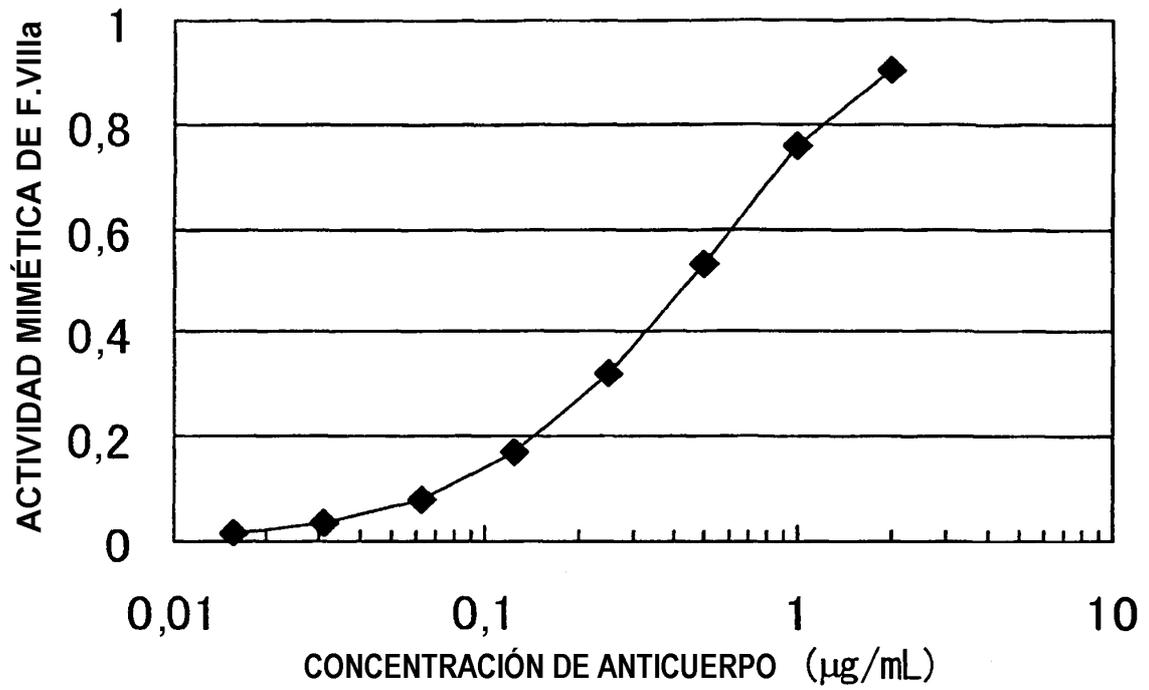


FIG. 7

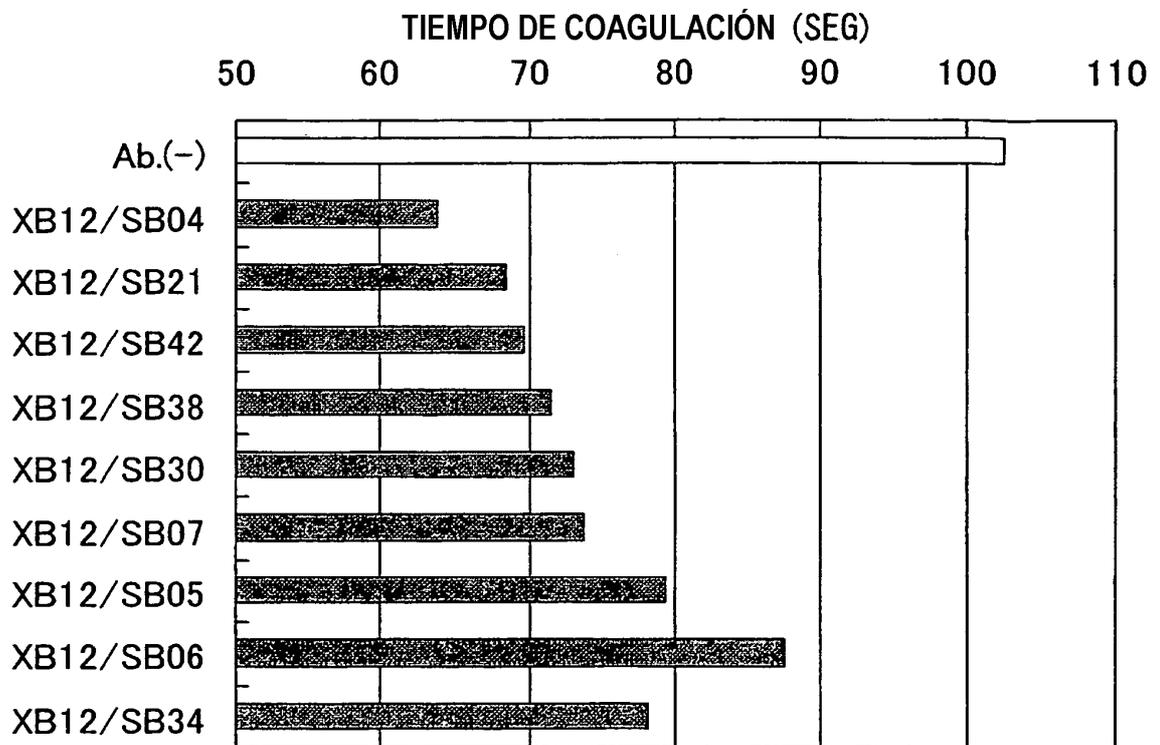


FIG. 8

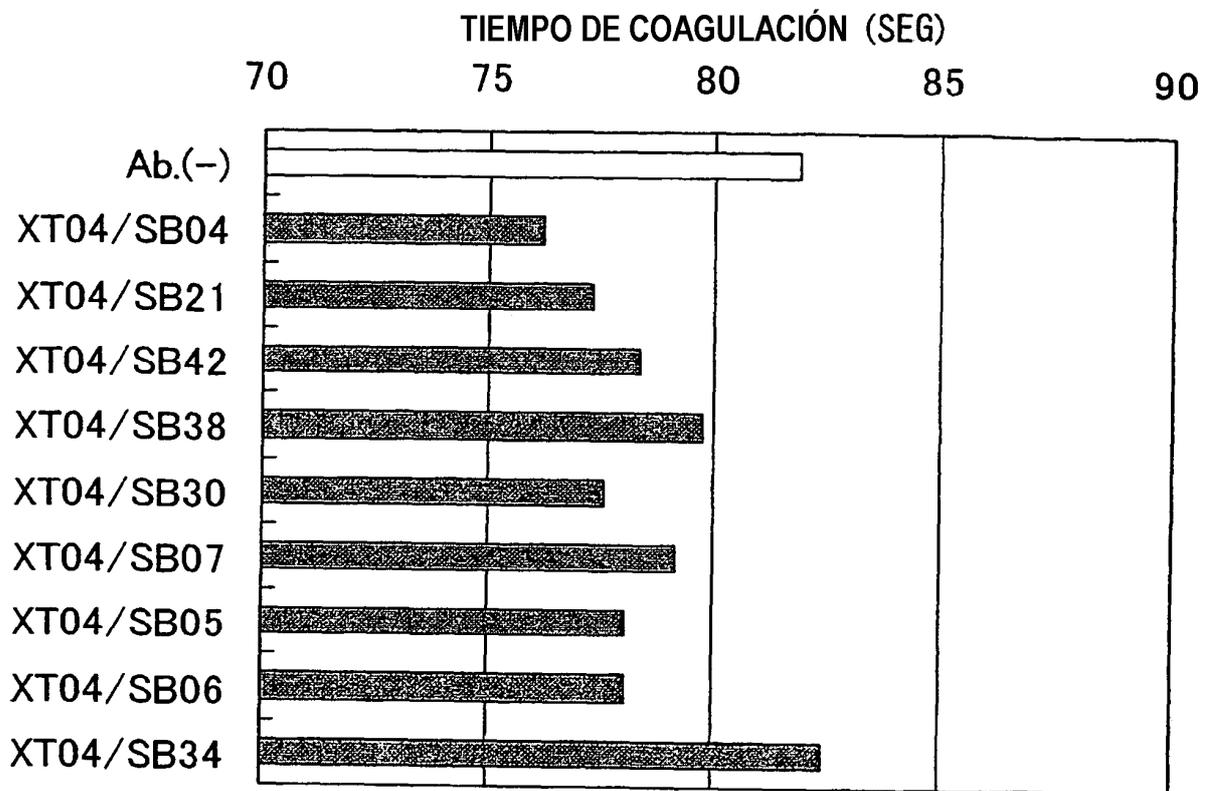


FIG. 9

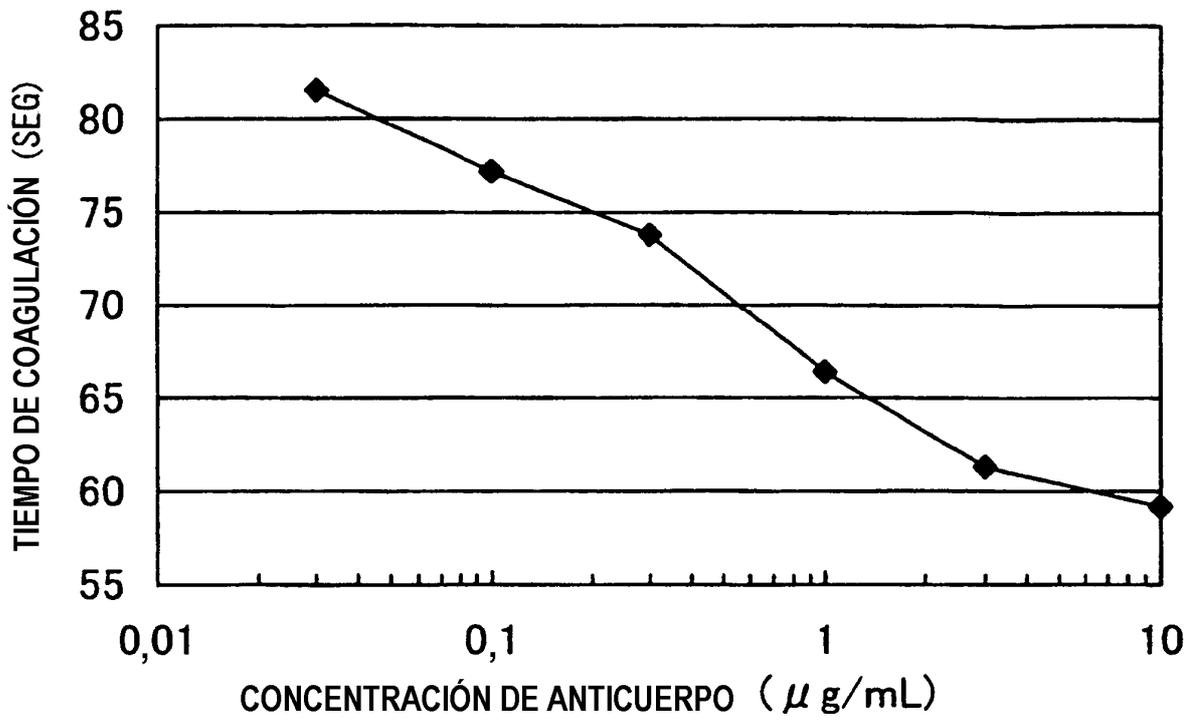


FIG. 10

1

2

3

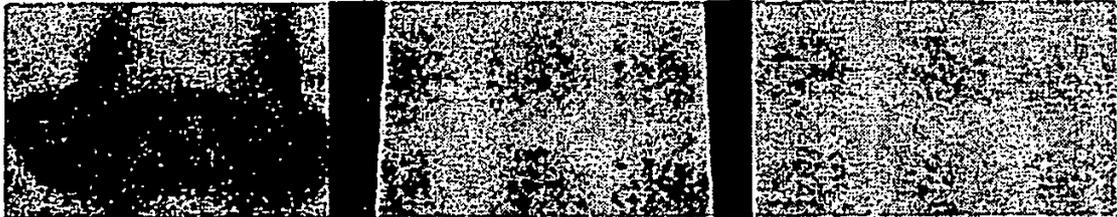


FIG. 11

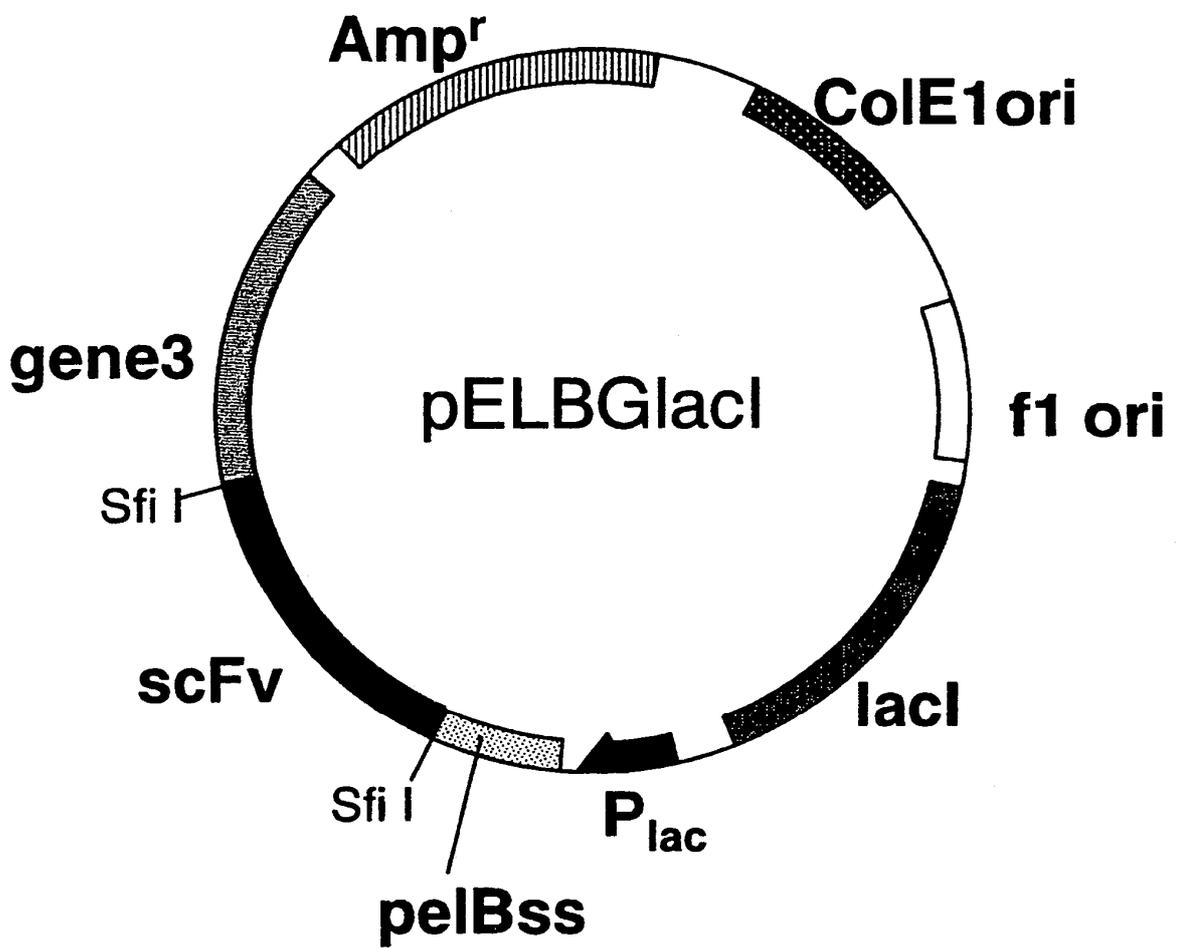


FIG. 12

		ANTI-F. IXa										
		A19	A25	A31	A38	A39	A40	A41	A44	A50	A69	XB12
ANTI-F. X	B2						+					
	B5					+		+				
	B9											+
	B10				+	+	+	+				+
	B11			+	+	+		+		+		+
	B12				+	+	+	+				+
	B13			+		+	+	+				+
	B14				+	+	+	+				+
	B15					+		+				+
	B16			+	+	+		+				+
	B18							+				
	B19								+			
	B20								+			
	B21											
	B23											
	B25											
	B26		+			+		+	+		+	+
	B27					+		+				
	B31	+		+	+	+	+	+				+
	B34-1					+		+				
	B34-2				+	+	+	+				
	B35			+	+	+	+	+		+		+
	B36			+		+		+				
	B38			+	+	+		+				+
	B42							+				
	SB04	+		+	+	+	+	+		+		+
	SB15					+		+				+
	SB27											+

FIG. 13

		ANTI-F. IXa										
		A19	A25	A31	A38	A39	A40	A41	A44	A50	A69	XB12
ANTI -F. X	B2								+			
	B5								++			
	B9											
	B10											++
	B11									++		++
	B12											++
	B13											+++
	B14								+			++
	B15								+			++
	B16			+								+++
	B18								++			
	B19								+			
	B20								++			
	B21								++			
	B23								++			
	B25								++			
	B26							+	++++		++++	
	B27								++			
	B31	++										+++
	B34-1											
	B34-2											
	B35			+						++		++
	B36											
	B38											
	B42											
	SB04	++		+	++	++		++	++	+++		+++
	SB15								++			
SB27												

FIG. 14

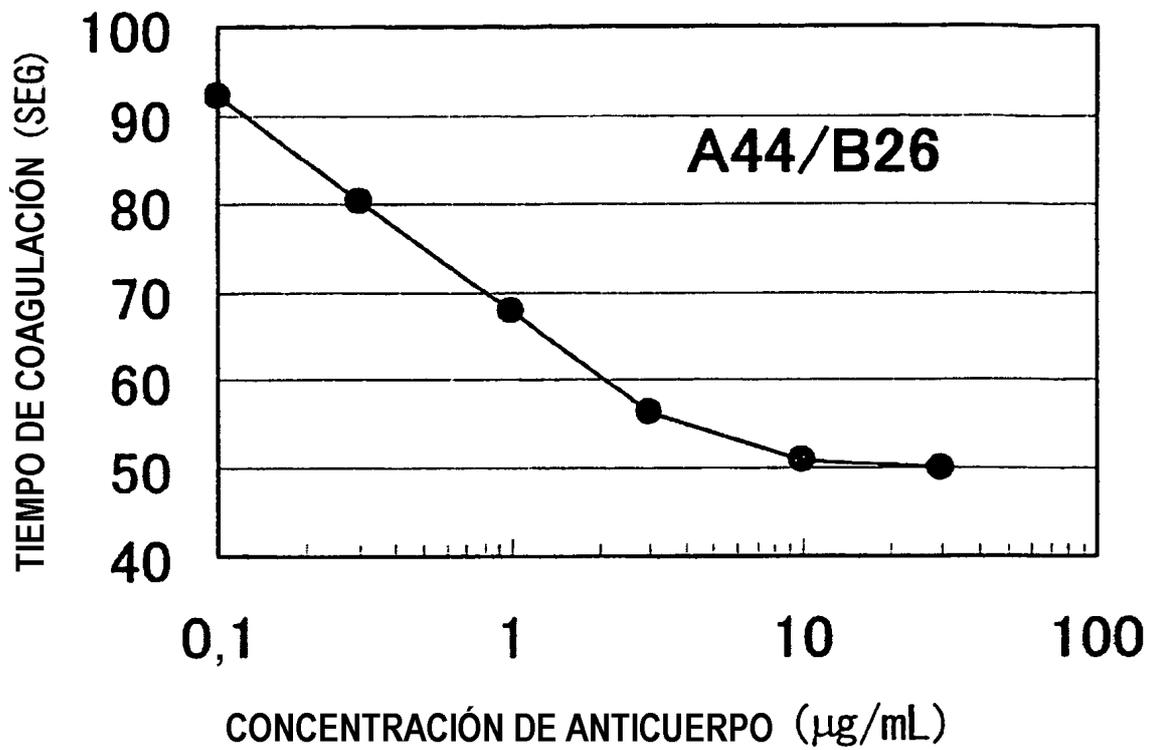


FIG. 15

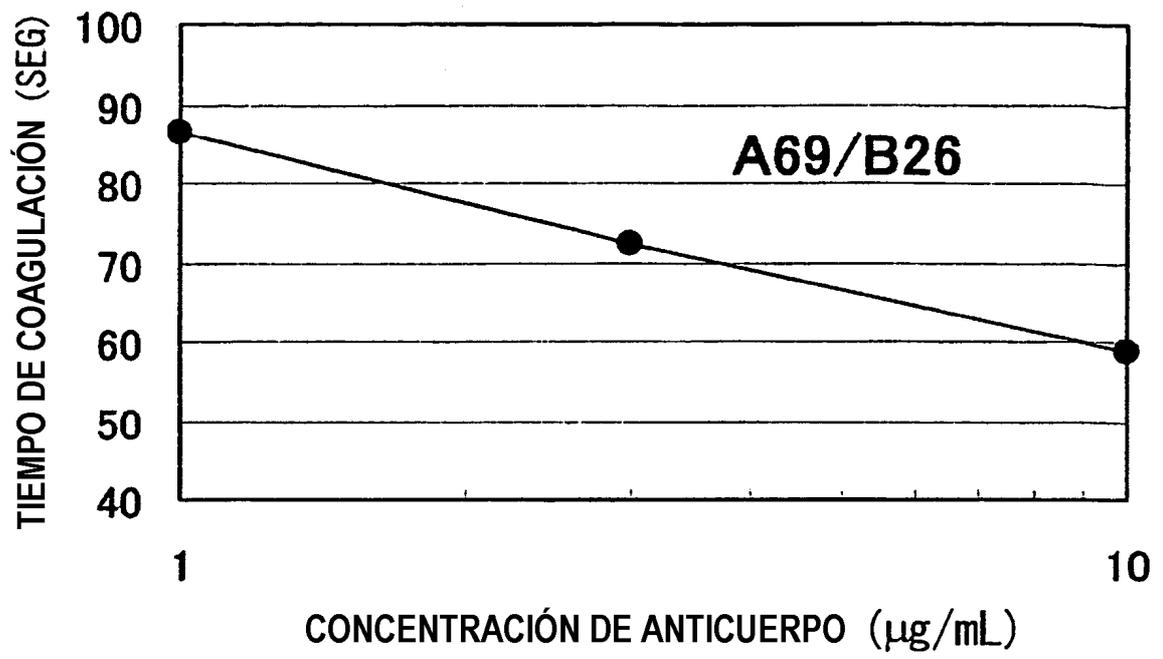


FIG. 16

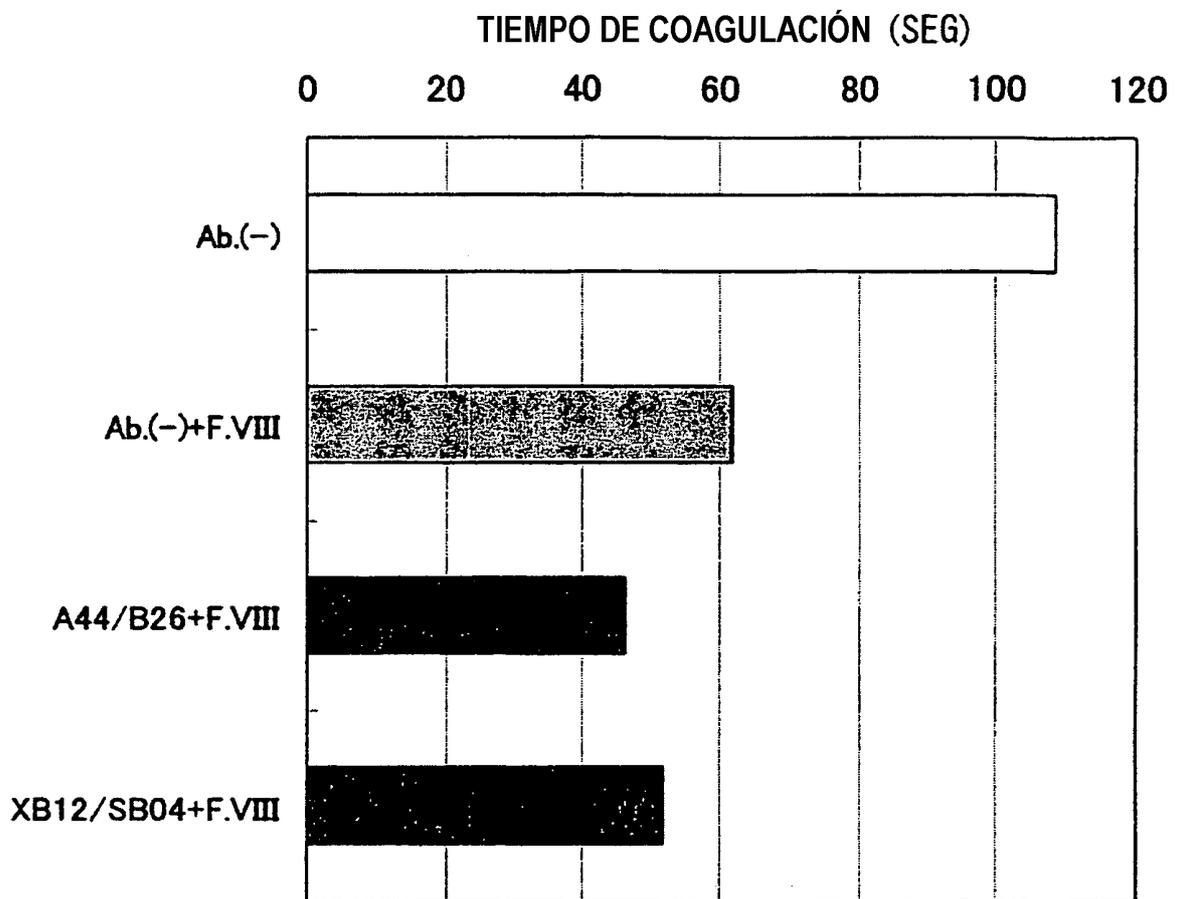


FIG. 17

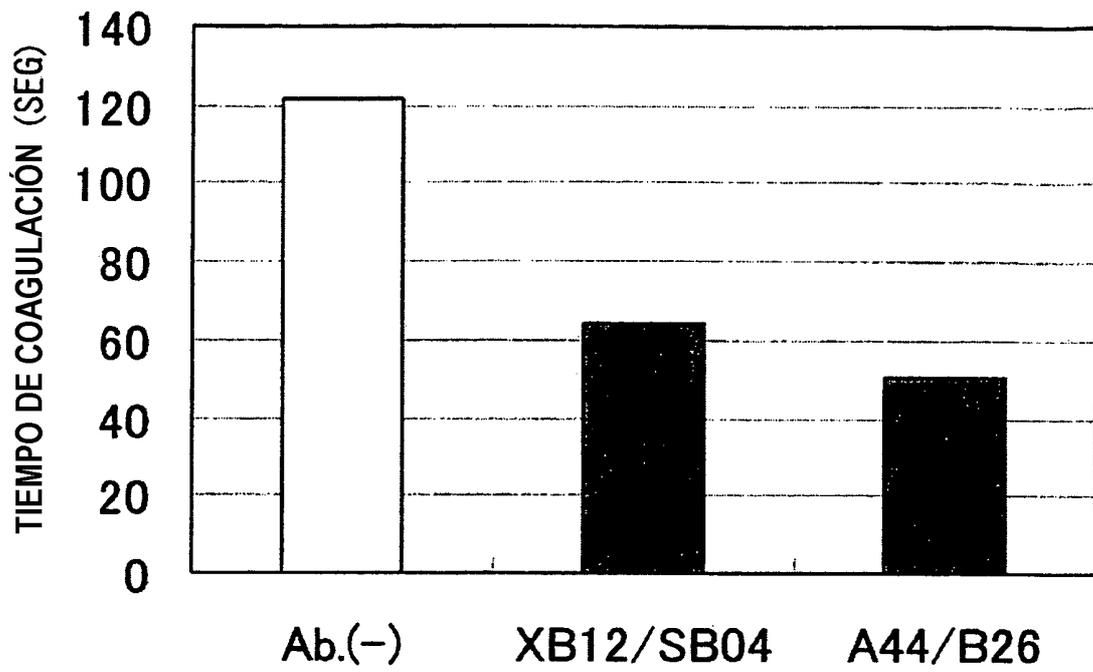


FIG. 18

