

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 494 921**

51 Int. Cl.:

**C12N 15/09** (2006.01)

**A61K 39/395** (2006.01)

**A61P 7/04** (2006.01)

**C07K 16/40** (2006.01)

**C07K 16/46** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **31.03.2006 E 06730769 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **13.08.2014 EP 1876236**

54 Título: **Anticuerpo que sustituye la función del factor VIII de coagulación sanguínea**

30 Prioridad:

**08.04.2005 JP 2005112514**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

**16.09.2014**

73 Titular/es:

**CHUGAI SEIYAKU KABUSHIKI KAISHA (100.0%)  
5-1, Ukima 5-chome, Kita-ku  
Tokyo, 115-8543, JP**

72 Inventor/es:

**KOJIMA, TETSUO;  
HATTORI, KUNIHIRO;  
SOEDA, TETSUHIRO;  
MIYAZAKI, TARO y  
SAITO, HIROYUKI**

74 Agente/Representante:

**DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto**

**ES 2 494 921 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 que sustituye la función del factor VIII de coagulación sanguínea

**Campo técnico**

5 La presente invención se refiere a anticuerpos biespecíficos que sustituyen funcionalmente al factor VIII de coagulación, un cofactor que mejora las reacciones enzimáticas, a procedimientos para producir dichos anticuerpos y a composiciones farmacéuticas que comprenden dicho anticuerpo como ingrediente activo.

**Técnica antecedente**

10 Los anticuerpos son altamente estables en la sangre y tienen una antigenicidad baja; por consiguiente, han atraído mucha atención como farmacéuticos. Los anticuerpos biespecíficos, es decir, anticuerpos que reconocen dos tipos de antígenos simultáneamente, se encuentran entre dichos anticuerpos. Los anticuerpos biespecíficos han sido propuestos durante algún tiempo. No obstante, a la fecha, los únicos anticuerpos biespecíficos informados en la bibliografía son aquellos en los que dos tipos de sitios de unión a antígenos simplemente se encuentran unidos, como los utilizados para redirigir las células NK, los macrófagos y las células T (documento 3 que no es patente). Por ejemplo, el MDX-210, un anticuerpo que actualmente se encuentra en investigación clínica, es un anticuerpo biespecífico que simplemente redirecciona los monocitos que expresan FcγRI y similares contra las células cancerígenas que expresan HER-2/neu. Por consiguiente, hasta ahora, no hubo ejemplos de anticuerpos biespecíficos utilizados como sustitutos funcionales para cofactores que mejoran las reacciones enzimáticas.

15 Un cofactor es una molécula auxiliar necesaria para que una enzima sea funcional y un componente proteico o no proteico que se une a la enzima y que es necesario para su actividad catalítica. Los ejemplos de cofactores proteicos incluyen, a modo no taxativo, factor VIII de coagulación (F. VIII), factor VIII activado de coagulación (F. VIIIa), factor V de coagulación (F. V), factor V activado de coagulación (F. Va), factor tisular (TF), trombomodulina (TM), proteína S (PS), proteína Z (PZ), heparina, complemento C4b, factor regulador H complementario, cofactor proteico de membrana (MCP) y receptor 1 complementario (CR1).

20 Entre estos, el F. VIII/F. VIIIa es un cofactor necesario para la expresión suficiente de la actividad del factor de coagulación IX activado (F. IXa). Mediante el uso de ensayos cromogénicos, Scheifflinger F, *et al.* descubrió que un cierto tipo de anticuerpo anti-F. IX/F. IXa puede mejorar la activación del factor de coagulación X (F. X) mediante F. IXa (documento de patente 1). No obstante, las mediciones de recuperación de coagulación en plasma con carencia de F. VIII mostraron que no se observó recuperación de coagulación cuando se agregó este anticuerpo solo; en su lugar, la recuperación de coagulación se observó únicamente cuando F. IXa se agregó exógenamente.

25 El F. VIIIa es conocido por interactuar no solamente con el F. IXa sino también con el F. X (documentos 1 y 2 que no son patente). A este respecto, el anticuerpo de Scheifflinger F. *et al.* no sustituyó de forma suficiente a nivel funcional al F. VIII/F. VIIIa, y su actividad también se considera insuficiente. [Documento de patente 1] WO 01/19992 [documento 1 que no es patente] Mertens K *et al.*, *Thromb. Haemost.*, 1999, Vol. 82, páginas 209 a 217 [documento 2 que no es patente] Lapan KA *et al.*, *Thromb. Haemost.*, 1998, Vol. 80, páginas 418 a 422 [documento 3 que no es patente] Segal DM *et al.*, *Journal of Immunological Methods*, 2001, Vol. 248, páginas 1 a 6.

**Descripción de la invención**

[Problemas que deben ser resueltos con la invención]

Un objetivo de la presente invención es proporcionar anticuerpos biespecíficos que sustituyan funcionalmente al factor VIII de coagulación, un cofactor que mejora las reacciones enzimáticas.

40 [Medios para resolver los problemas]

Tras una minuciosa investigación, los presentes inventores descubrieron varios anticuerpos biespecíficos que se unen específicamente al F. IX/F. IXa y al F. X, y que sustituyen funcionalmente al F. VIIIa, más específicamente, tienen funciones de cofactor para mejorar la activación del F. X con F. IXa.

45 De estos anticuerpos, los presentes inventores seleccionaron además un anticuerpo (A44/B26) que redujo el tiempo de coagulación en 50 segundos o más en comparación con el observado cuando no se agregó ningún anticuerpo a un sistema de medición de tiempo de coagulación que utiliza suero humano carente de F. VIII. Los presentes inventores posteriormente utilizaron este anticuerpo para producir un anticuerpo de cadena L compartida en común mediante la unión de sus cadenas H con las cadenas L de A44. Como resultado, los presentes inventores mostraron que el anticuerpo de cadena L compartida en común puede producirse con A4L; no obstante, la actividad de este anticuerpo se vio atenuada en comparación con la actividad del anticuerpo biespecífico original (A44HL-B26HL).

Además, las CDR derivadas de la cadena L de A44 y la cadena L de B26 se combinaron con el marco (Fr) derivado de la cadena L de A44 para producir cadenas L híbridas y estas cadenas L se utilizaron para producir anticuerpos compartidos en común cuyo propósito es la recuperación de la actividad del F. VIII. Como resultado, cuando la

combinación de las CDR1, 2 y 3 fue BBA(G) (CDR1, 2 y 3 fueron CDR derivada de la cadena L de B26, CDR derivada de la cadena L de B26 y CDR derivada de la cadena L de A44, respectivamente), la actividad del F. VIII aumentó de forma significativa en comparación con la actividad observada con A44/B26. Además, el tiempo de coagulación se redujo en 70 segundos o más en comparación con el observado cuando no se agregó ningún anticuerpo. Este anticuerpo no atenuó las funciones del F. VIII (0,1; 1 U/mL) y de hecho, actuó de forma aditiva. Además, cuando las CDR1, 2 y 3 fueron ABA(G) o BBA(G), sus tiempos de coagulación se redujeron en 60 segundos o más en comparación con los observados cuando no se agregó ningún anticuerpo.

Cuando las cadenas H de los anticuerpos A50 y A69, que son altamente homólogos a A44, se combinaron con B26H y las cadenas L híbridas mencionadas anteriormente y se evaluaron sus actividades, se obtuvieron anticuerpos que tenían actividades superiores a las con A44H. Asimismo, cuando se produjeron las cadenas L híbridas mediante la combinación de las CDR de A44L, B26L, A50L y A69L y se examinaron sus actividades, se obtuvieron anticuerpos altamente activos; no obstante, ninguno superó la actividad de la cadena L híbrida derivada de A44/B26 (BBA(G)).

Cuando se combinaron varias cadenas L híbridas (BBA, aAA, AAa, ABa, BBa, aBA, BAA, BAa y ABA)) con A69H y B26H y se evaluaron sus actividades, se obtuvieron anticuerpos altamente activos y particularmente en el caso de la combinación BBA o BBa, el tiempo de coagulación se redujo en 80 segundos o más en comparación con el observado cuando no se agregó ningún anticuerpo.

Cuando la humanización de estos anticuerpos se examinó de forma adicional, se logró una actividad igual a la de los anticuerpos originales mediante la combinación de (1) A69H humanizado, (2) B26H humanizado y (3) cadenas L híbridas humanizadas.

Por lo tanto, como se describe anteriormente, los presentes inventores lograron producir anticuerpos biespecíficos altamente activos que sustituyen a nivel funcional al factor VIII de coagulación y de ese modo completaron la presente invención.

La presente invención también proporciona procedimientos para recuperar o aumentar las actividades de estos anticuerpos, que disminuyeron debido a las cadenas L compartidas en común de cada anticuerpo.

Es decir, la presente invención se refiere a anticuerpos biespecíficos que sustituyen funcionalmente al factor VIII de coagulación, un cofactor que mejora las reacciones enzimáticas, a procedimientos para producir dichos anticuerpos y a procedimientos para recuperar o aumentar sus actividades que disminuyeron debido a las cadenas L compartidas en común de cada anticuerpo. Más específicamente, la presente invención proporciona:

[1] Un anticuerpo biespecífico que puede sustituir funcionalmente al factor VIII de coagulación y que

presenta la actividad para mejorar la activación del factor X, que comprende:

un primer dominio que reconoce al factor de coagulación IX y/o al factor de coagulación IX activado; y

un segundo dominio que reconoce al factor de coagulación X, donde

el primer dominio comprende un primer polipéptido que comprende la cadena H de un anticuerpo contra el factor de coagulación IX y/o el factor de coagulación IX activado; el segundo dominio comprende un segundo polipéptido que comprende la cadena H de un anticuerpo contra el factor de coagulación X;

y tanto el primero como el segundo dominio comprenden un tercer polipéptido que comprende una cadena L compartida en común de un anticuerpo contra el factor de coagulación IX, el factor de coagulación IX activado o el factor de coagulación X,

donde el tercer polipéptido comprende un sitio de unión a antígenos que comprende las CDR1, 2 y 3 seleccionadas individualmente de CDR1, 2 y 3 de cada cadena L de dos o más anticuerpos;

[2] El anticuerpo biespecífico de [1], donde el primer polipéptido comprende un sitio de unión a antígenos que comprende las secuencias de aminoácidos de las CDR de (a1), (a2) o (a3) y el segundo polipéptido comprende un sitio de unión a antígenos que comprende las secuencias de aminoácidos de (b), donde:

(a1) Las CDR1, 2 y 3 de cadena H comprenden las secuencias de aminoácidos de las SEQ ID NO: 3, 5 y 7, respectivamente;

(a2) Las CDR1, 2 y 3 de cadena H comprenden las secuencias de aminoácidos de las SEQ ID NO: 21, 5 y 22, respectivamente;

(a3) Las CDR1, 2 y 3 de cadena H comprenden las secuencias de aminoácidos de las SEQ ID NO: 16, 17 y 18, respectivamente; y

(b) Las CDR1, 2 y 3 de cadena H comprenden las secuencias de aminoácidos de las SEQ ID NO: 26, 28 y 30, respectivamente.

- [3] El anticuerpo biespecífico de [1] que reconoce al factor de coagulación IX y/o al factor de coagulación IX activado y al factor de coagulación X, donde la función sustitutiva del factor VIII de coagulación es reducir el tiempo de coagulación en 50 segundos o más en comparación con el tiempo de coagulación observado en la ausencia de un anticuerpo en una prueba de tiempo de tromboplastina parcial (APTT) que implica el calentamiento de una solución mixta de 50 µl, de solución de anticuerpos 50 µl de plasma carente de F. VIII (Biomerieux) y 50 µl de reactivo de APTT (Dade Behring) a 37°C durante 3 minutos, mediante la adición de 50 µL de CaCl<sub>2</sub> 20 mM a la solución mixta y después la medición del tiempo de coagulación.
- [4] Una composición que comprende el anticuerpo de cualquiera de [1] a [3] y un vehículo farmacéuticamente aceptable.
- [5] Una composición farmacéutica que comprende un vehículo farmacéuticamente aceptable y el anticuerpo de cualquiera de [1] a [3], para su uso en la prevención y/o tratamiento del sangrado, una enfermedad que acompañe al sangrado, o una enfermedad causada por el sangrado, donde el sangrado, la enfermedad que acompaña al sangrado, o la enfermedad causada por el sangrado es una enfermedad que se desarrolla y/o progresa debido a la reducción o carencia del factor VIII de coagulación y/o del factor VIII activado de coagulación.
- [6] El uso del anticuerpo de cualquiera de [1] a [3], para producir una composición farmacéutica que contenga un vehículo farmacéuticamente aceptable para prevenir y/o tratar el sangrado, una enfermedad que acompañe al sangrado, o una enfermedad causada por el sangrado, donde el sangrado, la enfermedad que acompaña al sangrado, o la enfermedad causada por el sangrado es una enfermedad que se desarrolla y/o progresa debido a la reducción o carencia en la actividad del factor VIII de coagulación y/o del factor VIII activado de coagulación.
- [7] La composición para el uso de [5] o el uso de [6], donde la enfermedad que se desarrolla y/o progresa debido a la reducción o carencia de actividad del factor VIII de coagulación y/o del factor VIII activado de coagulación es hemofilia A.
- [8] La composición para el uso de [5] o el uso de [6], donde la enfermedad que se desarrolla y/o progresa debido a la reducción o carencia de actividad del factor VIII de coagulación y/o del factor VIII activado de coagulación es una enfermedad que implica la aparición de un inhibidor contra el factor VIII de coagulación y/o del factor VIII activado de coagulación.
- [9] La composición para el uso de [5] o el uso de [6], donde la enfermedad que se desarrolla y/o progresa debido a la reducción o carencia de la actividad del factor VIII de coagulación y/o del factor VIII activado de coagulación es hemofilia adquirida.
- [10] La composición para el uso de [5] o el uso de [6], donde la enfermedad que se desarrolla y/o progresa debido a la reducción en la actividad del factor VIII de coagulación y/o del factor VIII activado de coagulación es la enfermedad de von Willebrand.
- [11] Un kit que comprende al menos el anticuerpo de cualquiera de [1] a [3] o la composición de [4].
- [12] El kit de [11] que comprende además el factor VIII de coagulación.

#### Breve descripción de los dibujos

La figura 1 es un diagrama que muestra una región de inserción de pcDNA4-g4H.

La figura 2 es un diagrama que muestra una región de inserción de pcDNA4-g4L y pIND-g4L.

La figura 3 es un diagrama que muestra una región de inserción de pIND-g4H.

La figura 4 muestra los resultados de la medición de la actividad similar al F. VIIIa de los anticuerpos biespecíficos anti-F. IXa/anti-F. X, que se prepararon mediante el uso del anticuerpo XB 12 anti-F. IXa y los anticuerpos anti-F. X, SB04, SB21, SB42, SB38, SB30, SB07, SB05, SB06 y SB34. Las concentraciones de las soluciones de anticuerpos son 10 µg/mL (1 µg/mL concentración final). Como resultado, la actividad similar al F. VIIIa aumentó en 9 tipos de anticuerpos biespecíficos, enumerados a continuación en orden de actividad creciente: XB12/SB04, XB12/SB21, XB12/SB42, XB12/SB38, XB12/SB30, XB12/SB07, XB12/SB05, XB12/SB06 y XB12/SB34.

La figura 5 muestra los resultados de la medición de la actividad similar al F. VIIIa del anticuerpo XT04 anti-F. IXa y de los anticuerpos biespecíficos anti-F. IXa/anti-F. X preparados mediante el uso de XT04 y de los anticuerpos anti-F. X, SB04, SB21, SB42, SB38, SB30, SB07, SB05, SB05 y SB34. Las concentraciones de las soluciones de anticuerpos son 10 µg/mL (1 µg/mL concentración final). Como resultado, XT04/SB04, XT04/SB21, XT04/SB42, XT04/SB38, XT04/SB30, XT04/SB07, XT04/SB05, XT04/SB06 y XT04/SB34 mostraron un aumento en la actividad similar a F. VIIIa.

La figura 6 muestra los resultados de la medición de la actividad similar al F.VIIIa sobre XB12/SB04, el anticuerpo que mostró la actividad más alta en el ensayo de la figura 4 en varias concentraciones. Como resultado, XB12/SB04 mostró un aumento dependiente de la concentración en la actividad similar al F. VIIIa.

5 La figura 7 muestra los resultados de la medición del tiempo de coagulación observada en la presencia de XB 12/SB04, XB 12/SB21, XB 12/SB42, XB12/SB38, XB 12/SB30, XB12/SB07, XB12/SB05, XB12/SB06 o XB12/SB34. Después de la mezcla de la solución de anticuerpos y el plasma carente de F. VIII, la concentración de anticuerpos fue de 1,7 µg/mL para XB 12/SB06 y 10 µg/mL para el resto. Como resultado, XB12/SB04, XB12/SB21, XB12/SB42, XB12/SB38, XB12/SB30, XB12/SB07, XB12/SB05, XB12/SB06 y XB12/SB34 mostraron un efecto de reducción del tiempo de coagulación en comparación con el observado en la ausencia del anticuerpo.

10 La figura 8 muestra los resultados de la medición del tiempo de coagulación en la presencia de XT04/SB04, XT04/SB21, XT04/SB42, XT04/SB38, XT04/SB30, XT04/SB07, XT04/SB05, XT04/SB06 o XT04/SB34. Después de la mezcla de la solución de anticuerpos y el plasma carente de F. VIII, la concentración de anticuerpos fue de 5 µg/mL para XT04/SB06 y 10 µg/mL para el resto. Como resultado, XT04/SB04, XT04/SB21, XT04/SB42, XT04/SB38, XT04/SB30, XT04/SB07, XT04/SB05 y XT04/SB06 mostraron un efecto de reducción del tiempo de coagulación en comparación con el observado en la ausencia del anticuerpo. No se observó reducción en el tiempo de coagulación para XT04/SB34.

15 La figura 9 muestra los resultados de la medición del tiempo de coagulación sobre XB12/SB04, el anticuerpo que demostró el mayor efecto de reducción del tiempo de coagulación en los ensayos de las figuras 7 y 8 en varias concentraciones. Como resultado, XB12/SB04 mostró una reducción en el tiempo de coagulación dependiente de la concentración. Las concentraciones de anticuerpos en la figura 9 representan valores después de la mezcla de las soluciones de anticuerpos y el plasma carente de F. VIII.

20 La figura 10 muestra los resultados del ensayo de inmunotransferencia GST-AP Western de SB04 o SB06. Las fotografías 1, 2 y 3 representan los resultados de la reacción del GST-AP transferido con SB04, SB06 y la muestra sin el anticuerpo, respectivamente. Como resultado, se detectó únicamente la reacción de unión de SB04 con GST-AP.

25 La figura 11 es un diagrama de pELBGlacl. ColE1ori, región de origen de replicación del plásmido serial ColE1; flori, región de origen de replicación del fago fl; lacI, región de codificación de proteínas del represor de lactosa; P<sub>lac</sub>, promotor de lactosa; pelBss, secuencia señal de proteínas de *E.coli* PelB; scFv, región de codificación de anticuerpos de cadena simple; gen III: región de codificación de proteínas GenIII del fago f1; Amp<sup>r</sup>, gen resistente a la ampicilina; y Sfi I, sitio de escisión Sfi I de la enzima de restricción.

30 La figura 12 muestra las mediciones de actividad similar al F. VIIIa obtenidas mediante el uso de sobrenadantes de cultivo de los anticuerpos biespecíficos, que se expresaron mediante la combinación de los anticuerpos anti-F. IXa (A19, A25, A31, A38, A39, A40, A41, A44, A50, A69 y XB12) y los anticuerpos 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 y SB27). El símbolo + representa el caso donde la actividad similar al F. VIIIa es de 0,1 o superior.

35 La figura 13 muestra los resultados de un ensayo de coagulación de plasma mediante el uso de los anticuerpos biespecíficos purificados, que se expresaron mediante la combinación de los anticuerpos anti-F. IXa (A19, A25, A31, A38, A39, A40, A41, A44, A50, A69 y XB12) y de los anticuerpos 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 y SB27). Las reducciones del tiempo de coagulación, que varían de 10 segundos a 20 segundos, de 20 segundos a 40 segundos, de 40 segundos a 50 segundos, o es de 50 segundos o mayor en comparación con la observada en la ausencia de anticuerpo, se representan con el símbolo +, ++, +++ y ++++, respectivamente.

40 La figura 14 muestra las mediciones del tiempo de coagulación observadas mediante el uso de A44/B26, un anticuerpo que demostró el mayor efecto de reducción del tiempo de coagulación en el ensayo de la figura 13 en varias concentraciones. El tiempo de coagulación observado en la ausencia del anticuerpo fue de 113 segundos. La adición de A44/B26 mostró una reducción en el tiempo de coagulación dependiente de la concentración. Las concentraciones de anticuerpos en la figura 14 representan valores después de la mezcla de las soluciones de anticuerpos y el plasma carente de F. VIII.

45 La figura 15 muestra las mediciones del tiempo de coagulación observadas mediante el uso de A69/B26, un anticuerpo que demostró el mayor efecto de reducción del tiempo de coagulación en el ensayo de la figura 13 en varias concentraciones. El tiempo de coagulación observado en la ausencia del anticuerpo fue de 109,6 segundos. La adición de A69/B26 mostró una reducción en el tiempo de coagulación dependiente de la concentración. Las concentraciones de anticuerpos en la figura 15 representan los valores de la mezcla de las soluciones de anticuerpos y del plasma carente de F. VIII.

50 La figura 16 muestra las mediciones del tiempo de coagulación observadas en la coexistencia de A44/B26 o XB12/SB04 y F. VIII. Como resultado, la solución de mezcla de A44/B26 o XB12/SB04 y F. VIII mostró un efecto de reducción del tiempo de coagulación en comparación con el observado cuando se utilizó solamente F. VIII.

La figura 17 muestra las mediciones del tiempo de coagulación observadas en un plasma inhibidor en la presencia de A44B26 o XB12/SB04. Como resultado, tanto A44/B26 como XB 12/SB04 mostraron un efecto de reducción del tiempo de coagulación en comparación con el observado cuando no se agregó ningún anticuerpo.

5 La figura 18 muestra las mediciones del tiempo de coagulación observadas mediante el uso de XB12/SB04 y XB12 humanizado/SB04 humanizado en varias concentraciones. El tiempo de coagulación observado cuando no se agregó ningún anticuerpo fue de 111,3 segundos. Como resultado, XB 12 humanizado/SB04 humanizado mostraron un efecto de reducción del tiempo de coagulación comparable con el de XB12/SB04. Las concentraciones de anticuerpos en la figura 18 representan valores después de la mezcla de las soluciones de anticuerpos y el plasma carente F. VIII.

10 La figura 19 muestra la estructura del vector de expresión de cadena L, pCAGG-κ.

La figura 20 muestra las mediciones del tiempo de coagulación observadas mediante el uso del anticuerpo biespecífico producido mediante la combinación de A44, B26 y AAA. Después de la mezcla con la solución de anticuerpos y el plasma carente de F. VIII, la concentración de anticuerpos fue de 30 µg/mL.

15 La figura 21 muestra las mediciones del tiempo de coagulación observadas mediante el uso de anticuerpos biespecíficos producidos mediante la combinación de A44/B26 y BAA (G), ABA (G) o BBA (G). Después de la mezcla de las soluciones de anticuerpos y el plasma carente de F. VIII, las concentraciones de anticuerpos fueron de 30 µg/mL.

20 La figura 22 muestra las mediciones del tiempo de coagulación observadas mediante el uso de los anticuerpos biespecíficos producidos mediante la combinación de B26/AAA y A50 o A69. Después de la mezcla de las soluciones de anticuerpos y el plasma carente de F. VIII, las concentraciones de anticuerpos fueron de 30 µg/mL.

La figura 23 muestra las mediciones del tiempo de coagulación observadas mediante el uso del anticuerpo biespecífico producido mediante la combinación de A69, B26 y AAA. Después de la mezcla de la solución de anticuerpos y el plasma carente de F. VIII, la concentración de anticuerpos fue de 30 µg/mL.

25 La figura 24 muestra las mediciones del tiempo de coagulación observadas mediante el uso de anticuerpos biespecíficos producidos mediante la combinación de A69B26 y BBA, aAA, AAa, ABa, BBa, aBA, BAA, BAa o ABA. Después de la mezcla de las soluciones de anticuerpos y el plasma carente de F. VIII, las concentraciones de anticuerpos fueron de 30 µg/mL.

30 La figura 25 muestra las mediciones del tiempo de coagulación observadas mediante el uso de anticuerpos biespecíficos producidos mediante la combinación de A69B26 y BBA(G), AAa(G), BAa(G), ABa(G) o BBa(G). Después de la mezcla de las soluciones de anticuerpos y el plasma carente de F. VIII, las concentraciones de anticuerpos fueron de 30 µg/mL.

La figura 26 muestra las mediciones del tiempo de coagulación observadas mediante el uso de los anticuerpos biespecíficos producidos mediante la combinación de A69B26 y aAA(G) o aBA(G). Después de la mezcla de la solución de anticuerpos y el plasma carente de F. VIII, las concentraciones de anticuerpos fueron de 30 µg/mL.

35 La figura 27 muestra las mediciones del tiempo de coagulación observadas mediante el uso de un anticuerpo biespecífico quimérico y anticuerpos biespecíficos humanizados. La técnica "knobs-into-holes" se utilizó en las regiones constantes de cada anticuerpo. Después de la mezcla de la solución de anticuerpos y el plasma carente de F. VIII, las concentraciones de anticuerpos fueron de 30 µg/mL.

40 La figura 28 muestra las mediciones del tiempo de coagulación observadas mediante el uso de dos tipos de anticuerpos biespecíficos humanizados. Se utilizaron regiones constantes de tipo salvaje para cada anticuerpo. Después de la mezcla de la solución de anticuerpos y el plasma carente de F. VIII, las concentraciones de anticuerpos fueron de 30 µg/mL.

45 La figura 29 muestra las mediciones del tiempo de coagulación observadas cuando se mezcló A69/B26/BBA con XB12, SB04, XB 12 y SB04 y SB12/SB04, respectivamente. La concentración de cada anticuerpo después de la mezcla fue de 20 µg/mL.

#### **Mejor forma de llevar a cabo la invención**

50 Como se describe en la presente, el término "anticuerpo multiespecífico" se refiere a un anticuerpo que puede unirse de forma específica a al menos dos antígenos diferentes. Los anticuerpos multiespecíficos en la presente son anticuerpos biespecíficos (BsAbs) (también llamados anticuerpos específicos duales) que pueden unirse de forma específica a dos antígenos.

En la presente invención, el término "antígeno(s) diferentes" no necesariamente significa que las moléculas de antígenos en sí son diferentes; puede significar simplemente que sus determinantes antigénicos son diferentes. Por consiguiente, por ejemplo, diferentes determinantes antigénicos dentro de una única molécula también se

encuentran incluidos en los diferentes antígenos de la presente invención, y dos anticuerpos que reconocen dichos determinantes antigénicos diferentes dentro de una única molécula, respectivamente, se consideran en la presente invención como anticuerpos que reconocen diferentes antígenos. Además, en la presente invención, el término "cadena (L) ligera compartida en común" se refiere a una cadena ligera que puede unirse con dos o más cadenas pesadas diferentes y mostrar capacidad de unión a cada antígeno. En la presente, el término "cadena(s) pesada(s) (H) diferente(s)" preferentemente se refiere a las cadenas pesadas de los anticuerpos contra diferentes antígenos, pero no se limita a ello y también se refiere a cadenas pesadas cuyas secuencias de aminoácidos son diferentes entre sí.

Los anticuerpos multiespecíficos de la presente invención (preferentemente anticuerpos biespecíficos) son anticuerpos que tienen especificidad para dos o más antígenos diferentes o moléculas que comprenden fragmentos de dichos anticuerpos. Los anticuerpos de la presente invención no se limitan particularmente, pero son preferentemente anticuerpos monoclonales.

Los anticuerpos multiespecíficos de la presente invención comprenden cadenas ligeras (L) compartidas en común.

Los anticuerpos multiespecíficos de la presente invención son preferentemente anticuerpos recombinantes producidos mediante el uso de técnicas de recombinación genética. (Véase, por ejemplo, Borrebaeck CAK y Larrick JW, THERAPEUTIC MONOCLONAL ANTIBODIES, publicado en el Reino Unido por MACMILLAN PUBLISHERS LTD, 1990). Los anticuerpos recombinantes pueden obtenerse mediante la clonación de los ADN que codifican anticuerpos a partir de células que producen hibridomas o anticuerpos, como linfocitos sensibilizados, que producen anticuerpos, insertándolos en vectores adecuados y después introduciéndolos en los hospedadores para producir los anticuerpos.

Los anticuerpos de la presente invención pueden ser fragmentos de anticuerpos o anticuerpos modificados. Los fragmentos de anticuerpos incluyen diacuerpos (Dbs), anticuerpos lineales y anticuerpos de cadena simple (en la presente, también denominados scFvs). En la presente, fragmento "Fv" se define como el fragmento de anticuerpo más pequeño que comprende un sitio de reconocimiento y de unión a antígenos completo. El fragmento "Fv" es un dímero (dímero VH-VL) en el cual una región variable (VH) de cadena pesada (H) y una región variable (VL) de cadena ligera (L) se encuentran fuertemente unidas por un enlace no covalente. Las tres regiones determinantes de complementariedad (CDR) de cada una de las regiones variables interactúan entre sí para formar un sitio de unión a antígenos sobre la superficie del dímero VH-VL. Seis CDR confieren el sitio de unión a antígenos a un anticuerpo. No obstante, una región variable (o la mitad del Fv que comprende únicamente tres CDR específicas para un antígeno) sola puede reconocer y unirse a un antígeno, a pesar de que su afinidad es menor que la de la totalidad del sitio de unión.

El fragmento Fab (también llamado F(ab)) comprende además una región constante de cadena L y una región constante de cadena H (CH1). El fragmento Fab' difiere de un fragmento Fab en que comprende además varios residuos derivados del extremo carboxilo de la región CH1 de cadena H, que comprende una o más cisteínas de la región de articulación del anticuerpo. Fab'-SH se refiere a un Fab' en el que uno o más residuos de cisteína de su región constante comprende un grupo tiol libre. El fragmento F(ab') se produce mediante la escisión de enlaces de disulfuro entre los residuos de cisteína en la región de articulación de enzima pepsina F(ab')<sub>2</sub>. Otros fragmentos de anticuerpos unidos químicamente también son conocidos por los entendidos en la técnica.

Los diacuerpos son fragmentos de anticuerpos bivalentes construidos mediante fusión génica (Holliger, P. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90: 6444-6448 (1993); EP 404,097; WO 93/11161). Los diacuerpos son dímeros que consisten en dos cadenas de polipéptidos, donde cada cadena de polipéptidos comprende una región variable (VL) de cadena L y una región variable (VH) de cadena H unidas con un enlazador lo suficientemente corto como para prevenir la asociación de estos dos dominios dentro de la misma cadena, por ejemplo, un enlazador de aproximadamente 5 aminoácidos. Las regiones VL y VH codificadas en la misma cadena de polipéptidos forman un dímero dado que el enlazador entre VL y VH es muy corto para formar un fragmento de región variable de cadena simple. Por consiguiente, los diacuerpos comprenden dos sitios de unión a antígenos.

El anticuerpo de cadena simple o el fragmento de anticuerpo scFv comprende las regiones VH y VL de un anticuerpo y estas regiones existen en una cadena de polipéptidos simple. En general, el polipéptido de Fv comprende además un enlazador de polipéptidos entre las regiones VH y VL y esto permite que el scFv forme la estructura necesaria para la unión a antígenos (por una reseña sobre scFvs, véase Pluckthun "The Pharmacology of Monoclonal Antibodies" Vol. 113 (Rosenburg y Moore ed. (Springer Verlag, Nueva York) páginas 269 a 315, 1994). En el contexto de la presente invención, los enlazadores no se limitan particularmente mientras no inhiban la expresión de las regiones variables de anticuerpos unidas en sus extremos.

Los anticuerpos biespecíficos de tipo IgG pueden secretarse por hibridomas híbridos (cuadromas) producidos mediante la fusión de dos tipos de hibridomas que producen anticuerpos IgG (Milstein C et al. Nature 1983, 305: 537-540). También pueden secretarse tomando los genes de cadena L y de cadena H que constituyen los dos tipos de IgG de interés, un total de 4 tipos de genes, e introduciéndolos en las células para coexpresar los genes.

En este caso, mediante la introducción de sustituciones de aminoácidos adecuadas en las regiones CH3 de las cadenas H, pueden secretarse preferentemente IgG que tengan una combinación heterogénea de cadenas H (Ridgway JB *et al.* Protein Engineering 1996, 9: 617-621; Merchant AM *et al.* Nature Biotechnology 1998, 16: 677-681).

5 Con respecto a las cadenas L, dado que la diversidad de las regiones variables de cadena L es menor que la de las regiones variables de cadena H, pueden obtenerse cadenas L compartidas en común que pueden conferir capacidad de unión a ambas cadenas H. Los anticuerpos de la presente invención comprenden cadenas L compartidas en común. Los IgG biespecíficos pueden expresarse de forma eficaz mediante la introducción de los genes de cadena L compartida en común y ambas cadenas H en las células.

10 Los anticuerpos biespecíficos pueden producirse mediante el entrecruzamiento químico de Fab. El F(ab')<sub>2</sub> biespecífico puede producirse, por ejemplo, mediante la preparación del Fab' de un anticuerpo, su uso para producir un Fab' maleimidizado con orto-fenilenedi-maleimida (o-PDM), y después la reacción de este con Fab' preparado a partir de otro anticuerpo para entrecruzar el Fab's derivado de diferentes anticuerpos (Keler T *et al.* Cancer Research 1997, 57: 4008-4014). El procedimiento para unir químicamente un derivado de ácido Fab'-tionitrobenzoico (TNB) y un fragmento de anticuerpo como Fab'-tiol (SH) también es conocido (Brennan M *et al.* Science 1985, 229: 81-83).

En lugar de un entrecruzamiento químico, también puede utilizarse un cierre de leucina de Fos y Jun. Se utiliza la formación preferencial de heterodímeros mediante Fos y Jun a pesar de que también formen homodímeros. Los Fab' a los cuales se agregan el cierre de leucina Fos y otros Fab' a los cuales se agregan el cierre de leucina Jun se expresan y preparan. Los Fab'-Fos y Fab'-Jun monoméricos reducidos en condiciones poco rigurosas se mezclan y reaccionan para formar el F(ab')<sub>2</sub> biespecífico (Kostelny SA *et al.* J. of Immunology, 1992, 148: 1547-53). Este procedimiento puede aplicarse no solamente a los Fab's sino también a los scFvs, Fvs y similares.

20 El anticuerpo biespecífico también puede producirse mediante el uso de un diacuerpo. El diacuerpo biespecífico es un heterodímero de dos fragmentos scFv de cruce. Más específicamente, se produce mediante la formación de un heterodímero mediante el uso de VH(A)-VL(B) y VH(B)-VL(A) preparados mediante la unión de VH y VL derivados de dos tipos de anticuerpos, A y B, con el uso de un enlazador relativamente corto de aproximadamente 5 residuos (Holliger P *et al.* Proc Natl. Acad. Sci. E.U.A. 1993, 90: 6444-6448).

25 La estructura deseada puede promoverse mediante la unión de dos scFvs con un enlazador flexible y relativamente largo que comprende aproximadamente 15 residuos (diacuerpo de cadena simple: Kipriyanov SM *et al.* J. of Molecular Biology. 1999, 293: 41-56), y la realización de las sustituciones de aminoácidos adecuadas (knobs-into-holes: Zhu Z *et al.* Protein Science. 1997, 6: 781-788).

Un sc(Fv)<sub>2</sub> que puede producirse mediante la unión de dos tipos de scFvs con un enlazador flexible y relativamente largo, que comprende aproximadamente 15 residuos, también puede ser un anticuerpo biespecífico (Mallender WD *et al.* J. of Biological Chemistry, 1994, 269: 199-206).

35 Los ejemplos de anticuerpos modificados incluyen, a modo no taxativo, anticuerpos unidos a varias moléculas como polietilenglicol (PEG). En el contexto de la presente invención, la sustancia a la cual los anticuerpos modificados se unen no es limitada. Los anticuerpos modificados pueden obtenerse mediante la modificación química de los anticuerpos obtenidos. Dichos procedimientos se encuentran bien establecidos en la técnica.

Los anticuerpos de la presente invención se derivan preferentemente de humanos, ratones, ratas, pero no se limitan a estos. También pueden ser anticuerpos modificados genéticamente, como anticuerpos quiméricos o humanizados.

Los procedimientos para obtener anticuerpos humanos son conocidos en la técnica. Por ejemplo, los animales transgénicos que presentan el repertorio completo de genes de anticuerpos humanos pueden inmunizarse con los antígenos deseados para obtener los anticuerpos humanos deseados (véase la solicitud de patente internacional WO 93/12227, WO 92/03918, WO 94/02602, WO 94/25585, WO 96/34096 y WO 96/33735).

45 Los anticuerpos modificados genéticamente también pueden producirse mediante el uso de procedimientos conocidos. Específicamente, por ejemplo, los anticuerpos quiméricos pueden comprender regiones variables de cadena H y de cadena L de un anticuerpo animal inmunizado y las regiones constantes de cadena H y cadena L de un anticuerpo humano. Los anticuerpos quiméricos pueden obtenerse mediante la unión de los ADN que codifican las regiones variables del anticuerpo derivado del animal inmunizado con los ADN que codifican las regiones constantes de un anticuerpo humano, la inserción de este en un vector de expresión y después su introducción en las células hospedadoras para producir los anticuerpos.

Los anticuerpos humanizados son anticuerpos modificados que habitualmente se denominan anticuerpos humanos "remoldeados". El anticuerpo humanizado se construye mediante la transferencia de las CDR de un anticuerpo derivado de un animal inmunizado a las regiones determinantes de complementariedad de un anticuerpo humano. Las técnicas de recombinación genética convencionales a tales efectos son conocidas.

55

5 Específicamente, la secuencia de ADN diseñada de forma tal que las CDR de un anticuerpo de ratón y las regiones de marco (FR) de un anticuerpo humano se encuentren unidas, puede sintetizarse mediante PCR a partir de varios oligonucleótidos preparados para conformar las regiones que se superponen en sus extremos. El ADN obtenido después puede unirse con un ADN que codifica la región constante de anticuerpos humanos, insertarse en un vector de expresión e introducirse en un hospedador para obtener un anticuerpo humanizado (véase la solicitud de patente europea No. 239400 y la solicitud de patente internacional WO 96/02576). Los FR de anticuerpos humanos unidos a través de las CDR se seleccionan de forma tal que las regiones determinantes de complementariedad formen sitios de unión a antígenos adecuados. Según sea necesario, los aminoácidos de las regiones del marco en las regiones variables de anticuerpos pueden sustituirse de forma tal que las regiones determinantes de complementariedad del anticuerpo humano remodelado formen los sitios de unión a antígenos adecuados (Sato K et al., Cancer Research 1993, 53: 851-856). Las sustituciones pueden introducirse en las regiones del marco derivadas de varios anticuerpos humanos (véase la solicitud de patente internacional WO 99/51743).

15 Los anticuerpos multiespecíficos de la presente invención reconocen el factor de coagulación IX (F. IX) y/o el factor de coagulación IX activado (F. IXa) de los factores relacionados con la coagulación y la fibrinólisis y el factor de coagulación X (F. X); tienen actividades que sustituyen a nivel funcional al cofactor F. VIII/F. VIIIa; y comprenden las cadenas L compartidas en común. Los anticuerpos de la presente invención generalmente tienen una estructura que comprende regiones variables del anticuerpo anti-F. IXa y regiones variables del anticuerpo anti-F. X.

20 Un anticuerpo multiespecífico de la presente invención es un anticuerpo que comprende un primer dominio que reconoce el factor de coagulación IX y/o el factor de coagulación IX activado y un segundo dominio que reconoce el factor de coagulación X, donde el primero y el segundo dominio comprenden además un tercer polipéptido que comprende la secuencia completa o parcial de una cadena L compartida en común.

25 Más específicamente, en una realización preferida, el anticuerpo de la presente invención es un anticuerpo multiespecífico que puede sustituir a nivel funcional al factor VIII de coagulación, que comprende un primer dominio que reconoce el factor de coagulación IX y/o el factor de coagulación IX activado y un segundo dominio que reconoce el factor de coagulación X; donde el primer dominio comprende un primer polipéptido que comprende la cadena H completa o parcial de un anticuerpo contra el factor de coagulación IX o el factor de coagulación IX activado, el segundo dominio comprende un segundo polipéptido que comprende la cadena H completa o parcial de un anticuerpo contra el factor de coagulación X, y el primer y el segundo dominio comprenden además un tercer polipéptido que comprende una secuencia común de la cadena L completa o parcial.

30 El factor VIII activado de coagulación (F. VIIIa) mejora la activación del F. X por F. IXa mediante la unión al F. IXa y al F. X. Entre los anticuerpos biespecíficos descritos anteriormente que reconocen la enzima F. IXa y el sustrato F. X, algunos de ellos presentan actividad para mejorar la activación del F. X. De dichos anticuerpos, algunos pueden presentar actividad para sustituir funcionalmente al cofactor F. VIII/F. VIIIa.

35 El F. VIII/F. VIIIa de la presente invención se somete a proteólisis limitada por proteasas, como trombina; no obstante, mientras la actividad de cofactor de F. VIII/F. VIIIa se encuentre presente, su forma no importa. El F. VIII/V. VIIIa y F. VIII/F. VIIIa mutantes modificados artificialmente mediante técnicas de recombinación genética también se encuentran comprendidos en el F. VIII/F. VIIIa de la presente invención, mientras presenten la actividad de cofactor de F. VIII/F. VIIIa.

40 El "tercer polipéptido" de la presente invención es preferentemente un polipéptido que comprende una secuencia completa o parcial de la cadena L de un anticuerpo contra el factor de coagulación IX (F. IX), el factor de coagulación IX activado (F. IXa) o el factor de coagulación X (F. X).

Además, el "tercer polipéptido" de la presente invención preferentemente comprende un sitio de unión a antígenos que comprende las CDR1, 2 y 3 cada una seleccionada independientemente de CDR1, 2 y 3 de cada una de las cadenas L de dos o más anticuerpos o sitio de unión a antígenos funcionalmente equivalente a estos.

45 En una realización preferida, las CDR1, 2 y 3 de la cadena H del primer polipéptido de un anticuerpo de la presente invención constituyen específicamente, por ejemplo, un sitio de unión a antígenos que comprende secuencias de aminoácidos de cada secuencia de las CDR1, 2 y 3 de la cadena H (SEQ ID NO: 3, 5 y 7; o 21, 5 y 22) de A44 o A69 descritas en los siguientes ejemplos o un sitio de unión a antígenos funcionalmente equivalente a este.

50 En una realización preferida, las CDR1, 2 y 3 de la cadena H del segundo polipéptido constituyen específicamente, por ejemplo, un sitio de unión a antígenos que comprende secuencias de aminoácidos de cada secuencia de las CDR1, 2 y 3 de la cadena H (SEQ ID NO: 26, 28 y 30) de B26 descritas en los siguientes ejemplos o un sitio de unión a antígenos funcionalmente equivalente a este.

Las secuencias de aminoácidos de las regiones variables de cadena H de A44, A50, A69 y B26 de la presente invención se describen en las siguientes SEQ ID NO, respectivamente.

55 A44 SEQ ID NO: 1

A50: SEQ ID NO: 15

A69: SEQ ID NO: 20

B26: SEQ ID NO: 24

5 Las secuencias de nucleótidos de las CDR de la cadena H de A44, A50, A69 y B26 se describen en las siguientes SEQ ID NO, en orden de CDR 1, 2 y 3 (cada una de las SEQ ID NO en el paréntesis indica la secuencia de aminoácidos codificada por la secuencia de nucleótidos).

A44: SEQ ID NO: 2 (3), 4 (5) y 6 (7)

A50: SEQ ID NO: 109 (16), 110 (17) y 111 (18)

A69: SEQ ID NO: 112 (21), 113 (5) y 114 (22)

B26: SEQ ID NO: 25 (26), 27 (28) y 29 (30)

10 Las secuencias de aminoácidos de las regiones variables de cadena L de A44, A50, A69 y B26 de la presente invención se describen en las siguientes SEQ ID NO, respectivamente.

A44: SEQ ID NO: 8

A50: SEQ ID NO: 115

A69: SEQ ID NO: 116

15 B26: SEQ ID NO: 31

Las secuencias de nucleótidos de las CDR de la cadena L de A44, A50, A69 y B26 se describen en las siguientes SEQ ID NO, en orden de CDR 1, 2 y 3 (cada una de las SEQ ID NO en el paréntesis indica la secuencia de aminoácidos codificada por la secuencia de nucleótidos).

A44 SEQ ID NO: 9 (10), 11 (12) y 13 (14)

20 A50: SEQ ID NO: 117 (10), 118 (12) y 119 (19)

A69: SEQ ID NO: 120 (23), 121 (12) y 122 (14)

B26: SEQ ID NO: 32 (33), 34 (35) y 36 (37)

Las secuencias de aminoácidos de la CDR1 se muestran a continuación.

A44: SEQ ID NO: 3 y 10

25 A50: SEQ ID NO: 16 y 10

A69: SEQ ID NO: 21 y 23

B26: SEQ ID NO: 26 y 33

Las secuencias de aminoácidos de la CDR2 se muestran a continuación.

A44: SEQ ID NO: 5 y 12

30 A50: SEQ ID NO: 17 y 12

A69: SEQ ID NO: 5 y 12

B26: SEQ ID NO: 28 y 35

Las secuencias de aminoácidos de la CDR3 se muestran a continuación.

A44: SEQ ID NO: 7 y 14

35 A50: SEQ ID NO: 18 y 19

A69: SEQ ID NO: 22 y 14

B26: SEQ ID NO: 30 y 37

40 Al producir un anticuerpo de longitud completa mediante el uso de las regiones variables divulgadas en la presente invención, sin limitaciones particulares, pueden utilizarse regiones constantes bien conocidas por los entendidos en la técnica. Por ejemplo, pueden utilizarse las regiones constantes descritas en "Sequences of proteins of

immunological interest", (1991), Departamento de Salud y Servicios Humanos de Estados Unidos, Instituto Nacional de Salud del Servicio de Salud Pública o "An efficient route to human bispecific IgG", (1998). Nature Biotechnology vol. 16, 677-681.

5 Se evaluó la actividad de los anticuerpos biespecíficos preferidos de la presente invención para sustituir al F. VIII/F. VIIIa (un cofactor para la activación del F. X mediante F. IXa) con el uso de un sistema de medición que comprende F. XIa (enzima que activa el F. IX), F. IX, F. X, sustrato sintético de F. Xa (S-2222) y fosfolípidos. Estos resultados se utilizaron para seleccionar, en principio, los anticuerpos biespecíficos que indican actividad similar al F. VIIIa de 0,1 o más como aquellos que presentan actividad para sustituir al F. VIII/F. VIIIa. La "actividad similar al F. VIIIa" mencionada en la presente es un valor obtenido de la sustracción del cambio en la absorbancia del solvente o  
10 sobrenadante de cultivo sin expresión de anticuerpos durante 30 minutos o 60 minutos, al cambio en la absorbancia de la solución de anticuerpos o sobrenadante de cultivo que contiene los anticuerpos expresados durante 30 minutos o 60 minutos.

15 La capacidad de los anticuerpos biespecíficos seleccionados anteriormente o anticuerpos biespecíficos relacionados de recuperar la coagulación se midió en un sistema de medición del tiempo de coagulación con el uso de plasma humano carente de F. VIII. Como resultado, se obtuvieron anticuerpos biespecíficos que reducen el tiempo de coagulación en comparación con el observado cuando no se agregaron anticuerpos. El tiempo de coagulación mencionado en la presente se refiere al tiempo de tromboplastina parcial activada (APTT) con el uso de plasma humano carente de F. VIII como se describe en el ejemplo 7. Con el uso de estos anticuerpos biespecíficos, la reducción del tiempo de coagulación fue preferentemente de 10 segundos o más, más preferentemente de 20  
20 segundos o más, aún más preferentemente de 40 segundos o más o más preferentemente de 50 segundos o más.

Más específicamente, en una realización preferida, los anticuerpos multiespecíficos de la presente invención pueden sustituir funcionalmente al factor VIII de coagulación que reconoce al factor de coagulación IX y/o al factor de coagulación IX activado y al factor de coagulación X.

25 La función sustitutiva de F.VIII con los anticuerpos multiespecíficos de la presente invención puede demostrarse a través de la medición de la reducción del tiempo de coagulación con respecto a la observada cuando no se agregó ningún anticuerpo en un sistema de medición del tiempo de coagulación con el uso de plasma humano carente de F. VIII. El tiempo de coagulación mencionado en la presente se refiere a, por ejemplo, el tiempo de tromboplastina parcial activada (APTT) en un sistema de medición del tiempo de coagulación con el uso de plasma humano carente de F. VIII como se describe en el ejemplo 21. Las realizaciones preferidas del anticuerpo multiespecífico de la  
30 presente invención reduce el tiempo de coagulación en 50 segundos o más, preferentemente 60 segundos o más, más preferentemente 70 segundos o más e incluso más preferentemente 80 segundos o más.

Los anticuerpos multiespecíficos de la presente invención comprenden preferentemente CDR de cadena H de un anticuerpo del factor de anticoagulación IX/IXa y CDR funcionalmente equivalentes a estas y CDR de cadena H de un anticuerpo del factor de anticoagulación X o CDR funcionalmente equivalentes a estas.

35 Los anticuerpos de la presente invención comprenden preferentemente un sitio de unión a antígenos que comprende las secuencias de aminoácidos de las CDR1, 2 y 3 de cadena H de las SEQ ID NO: 3, 5 y 7 (CDR de cadena H de A44), o las secuencias de aminoácidos de las CDR1, 2 y 3 de cadena H de las SEQ ID NO: 21, 5 y 22 (CDR de cadena H de A69) de un anticuerpo del factor de anticoagulación IX/IXa, o un sitio de unión a antígenos funcionalmente equivalente a estas y un sitio de unión a antígenos que comprende las secuencias de aminoácidos  
40 de las CDR1, 2 y 3 de cadena H de las SEQ ID NO: 26, 28 y 30 (CDR de cadena H de B26) de un anticuerpo de factor de anticoagulación X o un sitio de unión a antígenos funcionalmente equivalente a estas.

45 En la presente invención el sitio de unión a antígenos "funcionalmente equivalente" tiene propiedades similares a las de un sitio de unión a antígenos que comprende las varias CDR descritas en la presente. Más específicamente, si las siguientes sustituciones de aminoácidos para la estabilización permiten el reconocimiento de un determinante antigénico similar (epítipo), los sitios de unión a antígenos resultantes que incorporan dichas sustituciones son "funcionalmente equivalentes".

Las sustituciones de aminoácidos pueden realizarse en los anticuerpos (clones) de la presente invención para evitar la desamidación, oxidación de metionina y similar o para estabilizar estructuralmente los anticuerpos como se describe a continuación.

50 Las sustituciones de residuos de aminoácidos de los anticuerpos de la presente invención pueden modificarse según sea necesario para evitar la desamidación, la oxidación de metionina y similar o para estabilizar estructuralmente los anticuerpos.

Los residuos N y M pueden modificarse para la desamidación, la oxidación de metionina y demás. El residuo G de la secuencia NG en la CDR3 de cadena H de A44 y A69 y el residuo T de la secuencia NT en la CDR2 de cadena H de B26 también pueden modificarse. Además, los residuos M pueden modificarse para evitar la oxidación de metionina. Asimismo, el residuo D de la secuencia RD en el extremo de la CDR2 de cadena H de A44 y A69 y el residuo V de la secuencia KV de la CDR2 de cadena H de A50 pueden modificarse para aumentar la termoestabilidad mediante la mejora de la estructura de giro y por lo tanto se prefiere particularmente la modificación en un residuo G, S o T. De

5 forma similar, el residuo Y de la CDR3 de cadena L de A44, kabat 95, puede modificarse en un residuo P. Además, para aumentar la termoestabilidad, mediante la mejora del núcleo hidrófobo, el residuo V de la CDR1 de cadena L de B26, kabat 33, puede modificarse en un residuo L. Asimismo, para corregir la alteración de las interfaces VH/VL, el residuo L de la secuencia LDY o el residuo F de la secuencia FDY en el extremo de la CDR3 de cadena H de A44, A50 y A69 pueden modificarse. De forma similar, el residuo I de la secuencia IT o el residuo L de la secuencia LT en el extremo de la CDR3 de cadena L de A44, A50 y A69 pueden modificarse. El residuo Y de la secuencia RYS de la CDR2 de cadena L de B26 también puede modificarse.

Las secuencias de cada una de las CDR de A44, A50, A69 y B26 se muestran a continuación; los residuos de aminoácidos que pueden sustituirse se encuentran subrayados.

CDR1 de cadena H de A44	SSW <u>M</u> H (SEQ ID NO: 3)
CDR1 de cadena H de A50	TYW <u>M</u> H (SEQ ID NO: 16)
CDR1 de cadena H de A69	DYY <u>M</u> H (SEQ ID NO: 21)
CDR1 de cadena H de B26	D <u>N</u> N <u>M</u> D (SEQ ID NO: 26)
CDR2 de cadena H de A44, A69	Y <u>I</u> N <u>P</u> SSGYTKY <u>N</u> R <u>K</u> FR <u>D</u> (SEQ ID NO: 5)
CDR2 de cadena H de A50	Y <u>I</u> N <u>P</u> SSGYTKY <u>N</u> Q <u>K</u> FK <u>V</u> (SEQ ID NO: 17)
CDR2 de cadena H de B26	D <u>I</u> N <u>T</u> K <u>S</u> GG <u>S</u> I <u>Y</u> N <u>Q</u> K <u>F</u> K <u>G</u> (SEQ ID NO: 28)
CDR3 de cadena H de A44	G <u>G</u> N <u>G</u> Y <u>Y</u> F <u>D</u> Y (SEQ ID NO: 7)
CDR3 de cadena H de A50	G <u>N</u> L <u>G</u> Y <u>F</u> F <u>D</u> Y (SEQ ID NO: 18)
CDR3 de cadena H de A69	G <u>G</u> N <u>G</u> Y <u>Y</u> L <u>D</u> Y (SEQ ID NO: 22)
CDR3 de cadena H de B26	R <u>R</u> S <u>Y</u> G <u>Y</u> F <u>D</u> Y (SEQ ID NO: 30)
CDR1 de cadena L de A44, A50	K <u>A</u> S <u>Q</u> D <u>V</u> G <u>T</u> A <u>V</u> A (SEQ ID NO: 10)
CDR1 de cadena H de A69	K <u>A</u> S <u>Q</u> D <u>V</u> S <u>T</u> A <u>V</u> A (SEQ ID NO: 23)
CDR1 de cadena H de B26	K <u>A</u> S <u>Q</u> <u>N</u> <u>V</u> G <u>T</u> A <u>V</u> A (SEQ ID NO: 33)
CDR2 de cadena L de A44, A50, A69	W <u>A</u> S <u>T</u> R <u>H</u> T (SEQ ID NO: 12)
CDR2 de cadena L de B26	S <u>A</u> S <u>Y</u> R <u>Y</u> S (SEQ ID NO: 35)
CDR3 de cadena L de A44, A69	Q <u>Q</u> Y <u>S</u> <u>N</u> <u>Y</u> I <u>T</u> (SEQ ID NO: 14)
CDR3 de cadena L de A50	Q <u>Q</u> Y <u>S</u> S <u>Y</u> L <u>T</u> (SEQ ID NO: 19)
CDR3 de cadena L de B26	Q <u>Q</u> Y <u>N</u> S <u>Y</u> P <u>L</u> T (SEQ ID NO: 37)

10 La presente invención se refiere además a procedimientos para recuperar o aumentar las actividades de los anticuerpos biespecíficos que disminuyeron debido a las cadenas L compartidas en común de cada anticuerpo, en comparación con las actividades de los anticuerpos biespecíficos originales sin las cadenas L compartidas en común. La presente invención proporciona procedimientos para producir los anticuerpos biespecíficos de la presente  
15 invención que utilizan los procedimientos mencionados anteriormente.

Específicamente, la presente invención proporciona procedimientos para producir un anticuerpo biespecífico que comprende una primera cadena H, una segunda cadena H y cadenas L compartidas en común, donde los procedimientos comprenden las siguientes etapas:

(1) preparar un primer anticuerpo contra un primer antígeno y un segundo anticuerpo contra un segundo antígeno;

(2) producir un anticuerpo biespecífico contra el primer antígeno y el segundo antígeno, que comprende regiones variables del primer anticuerpo y del segundo anticuerpo;

(3) medir la actividad de unión a antígenos o la actividad biológica del anticuerpo biespecífico producido en la etapa (2);

5 (4) producir el anticuerpo de cadena L compartida en común mediante la unión de la cadena H del primer anticuerpo y la cadena H del segundo anticuerpo con la cadena L del primer anticuerpo o del segundo anticuerpo;

(5) medir la actividad de unión a antígenos o la actividad biológica del anticuerpo de cadena L compartida en común producido en la etapa (4);

10 (6) producir un anticuerpo de cadena L compartida en común mediante la sustitución de una, dos o tres CDR de las cadenas L compartidas en común producidas en la etapa (4) con las CDR del primer anticuerpo, el segundo anticuerpo u otro anticuerpo altamente homólogo a las secuencias de aminoácidos de las CDR del primer anticuerpo o del segundo anticuerpo;

15 (7) seleccionar un anticuerpo de cadena L compartida en común que tiene una actividad deseada mediante la comparación de la actividad de unión a antígenos o la actividad biológica del anticuerpo de cadena L compartida en común producido en la etapa (6) con la del anticuerpo biespecífico original producido en la etapa (2) o el anticuerpo de cadena L compartida en común producido en la etapa (4); y

(8) obtener un anticuerpo de cadena L compartida en común que tiene una actividad equivalente o mayor a la del anticuerpo biespecífico original producido en la etapa (2), mediante la repetición de las etapas (6) y (7) según sea necesario para el anticuerpo de cadena L compartida en común seleccionado en la etapa (7).

20 En el procedimiento mencionado anteriormente de la presente invención, primero se producen los anticuerpos biespecíficos cuyas cadenas L no se comparten en común en cada anticuerpo.

En la presente invención, sin limitación particular, los anticuerpos biespecíficos pueden obtenerse mediante cualquier procedimiento. Por ejemplo, para obtener anticuerpos biespecíficos que sustituyan funcionalmente un cofactor contra la enzima A y el sustrato B, los animales se inmunizan por separado con la enzima A y el sustrato B de forma tal de obtener anticuerpos anti enzima A y anticuerpos antisustrato B. Posteriormente, se producen los anticuerpos biespecíficos que comprenden las cadenas H y L del anticuerpo anti enzima A y las cadenas H y L del anticuerpo antisustrato B. Preferentemente, se obtienen varios tipos de anticuerpos anti enzima A y antisustrato B y preferentemente, estos se utilizan para producir anticuerpos biespecíficos derivados de tantas combinaciones como sea posible. Después de producir los anticuerpos biespecíficos, se seleccionan aquellos que tienen una actividad para sustituir funcionalmente al cofactor.

Los anticuerpos contra enzimas o sustratos pueden obtenerse mediante procedimientos bien conocidos por los entendidos en la técnica. Por ejemplo, pueden prepararse mediante la inmunización de animales con antígenos. Los antígenos utilizados para inmunizar los animales incluyen antígenos completos que tienen inmunogenicidad y antígenos incompletos (incluidos los haptenos) que no tienen inmunogenicidad. En el contexto de la presente invención, las enzimas o sustratos sobre los cuales se considera que actúan los anticuerpos que sustituyen funcionalmente a los cofactores de la presente invención, se utilizan como antígenos (inmunogen). Los ejemplos de animales que pueden inmunizarse incluyen a modo no taxativo, ratones, ratas, hámsters, coballos, conejos, pollos o monos resus. La inmunización de estos animales con los antígenos puede llevarse a cabo mediante procedimientos bien conocidos en la técnica. En la presente invención, las regiones variables de cadena L y cadena H de los anticuerpos se recolectan de los animales inmunizados o células de dichos animales. Este proceso puede llevarse a cabo mediante el uso de técnicas generalmente conocidas por los entendidos en la técnica. Los animales inmunizados con los antígenos expresan anticuerpos contra dichos antígenos, especialmente en las células del bazo. Por consiguiente, por ejemplo, las regiones variables de cadena L y cadena H pueden recolectarse mediante la preparación de ARNm de las células del bazo de animales inmunizados y a continuación la realización de RT-PCR con el uso de cebadores que corresponden a las regiones variables de los anticuerpos.

Más específicamente, las enzimas y sustratos pueden utilizarse individualmente para inmunizar a los animales. Las enzimas y sustratos utilizados como inmunogenes pueden ser proteínas completas o péptidos parciales de dichas proteínas. Un inmunogen utilizado para inmunizar animales puede prepararse como un antígeno soluble mediante la unión de una porción que sirve como un antígeno para otra molécula o su fragmento, en función de la situación.

50 Las células del bazo pueden aislarse del bazo de ratones inmunizados y fusionarse con células de mieloma de ratón para producir hibridomas. Los hibridomas que se unen a antígenos que a continuación se seleccionan individualmente y las regiones variables de cadena L y cadena H pueden recolectarse mediante RT-PCR con el uso de los cebadores que corresponden a las regiones variables. Pueden utilizarse los cebadores que corresponden a las CDR, los cebadores que corresponden a los marcos que son menos diversos que las CDR o los cebadores que corresponden a la secuencia señal y CH1 o las regiones constantes de cadena L (CL).

De forma alternativa, los ARNm pueden extraerse de las células del bazo de animales inmunizados y los ADNc de las regiones variables de cadena L y de cadena H pueden recolectarse mediante RT-PCR con el uso de cebadores que corresponden a los sitios cercanos a las regiones variables. Los linfocitos también pueden inmunizarse *in vitro* y utilizarse para construir una biblioteca que muestre los scFvs o Fabs. Los clones de anticuerpos que se unen a antígenos pueden concentrarse y clonarse mediante cribado para obtener las regiones variables. En este caso, el análisis puede realizarse mediante el uso de una biblioteca similar producida a partir de los ARNm derivados de los monocitos de la sangre periférica, bazos, amígdalas o similares de humanos o animales no inmunizados.

Los vectores de expresión de anticuerpos se producen mediante el uso de las regiones variables obtenidas. El anticuerpo biespecífico puede obtenerse mediante la introducción de un vector de expresión de anticuerpos anti-enzimas y un vector de expresión de anticuerpos anti-sustrato en las mismas células para expresar el anticuerpo.

A continuación, en el procedimiento de la presente invención mencionado anteriormente, se miden las actividades de unión a antígenos o actividades biológicas de los anticuerpos biespecíficos producidos. Por ejemplo, los anticuerpos que presentan una actividad para sustituir funcionalmente a un cofactor pueden seleccionarse mediante procedimientos como los descritos a continuación.

(1) Seleccionar los anticuerpos mediante el uso de un sistema de reacción que comprende la enzima y el sustrato y el uso del aumento de actividad enzimática (degradación de sustrato) debido a la adición del anticuerpo como indicador.

(2) Seleccionar los anticuerpos mediante el uso de un sistema que mide o imita las funciones biológicas en las que la enzima, el sustrato y el cofactor se encuentran implicados y el uso de la actividad de recuperación funcional ocasionada por la adición del anticuerpo en la ausencia del cofactor como un indicador.

Más específicamente, la "actividad" puede medirse mediante la medición de la capacidad de coagulación de los anticuerpos de prueba, por ejemplo, en un sistema de medición del tiempo de coagulación que utiliza plasma humano carente de factor de coagulación.

Los anticuerpos obtenidos pueden purificarse hasta la homogeneidad. La separación y purificación de los anticuerpos puede llevarse a cabo mediante el uso de procedimientos de separación y purificación convencionales utilizados para proteínas ordinarias. Por ejemplo, los anticuerpos pueden separarse y purificarse mediante la selección y combinación adecuada de cromatografía de columna como cromatografía de afinidad, filtración, ultrafiltración, precipitación de sales, diálisis, electroforesis en gel de poliacrilamida SDS, enfoque isoeléctrico y similares, sin limitación (Anticuerpos: A Laboratory Manual. Ed Harlow y David Lane, Cold Spring Harbor Laboratory, 1988). Las columnas utilizadas para la cromatografía de afinidad incluyen, por ejemplo, columnas de proteína A y proteína G.

En una realización preferida de la presente invención, el cofactor que debe sustituirse es F. VIII/F. VIIIa y más específicamente, la combinación de enzima y sustrato es un factor de coagulación/relacionado con la fibrinólisis, F. IXa y F. X. Por consiguiente, un anticuerpo específico preferido de la presente invención comprende una estructura que comprende la región variable de un anticuerpo anti-F. IXa y la región variable de un anticuerpo anti-F. X.

Más específicamente, por ejemplo, puede producirse un anticuerpo biespecífico que sustituya funcionalmente al F. VIII/F. VIIIa mediante el siguiente procedimiento.

Los ratones se inmunizan mediante inyección subcutánea del F. IXa y F. X disponibles comercialmente, de forma individual. Las células del bazo se aíslan de los bazos de ratones inmunizados que muestran un valor de anticuerpos superior y se fusionan con células de mieloma de ratón para producir hibridomas. Los hibridomas que se unen a los antígenos (F. IXa y F. X) se seleccionan por separado y las regiones variables de cadena L y cadena H pueden recolectarse mediante RT-PCR con el uso de los cebadores que corresponden a las regiones variables. Las regiones variables de cadena L se insertan en los vectores de expresión de cadena L que comprenden la región constante de cadena L y las regiones variables de cadena H se insertan en los vectores de expresión de cadena H que comprenden la región constante de cadena H, respectivamente. Los ARNm se extraen de los bazos de estos ratones inmunizados y los ADNc de las regiones variables de cadena L y cadena H se recolectan mediante RT-PCR con el uso de cebadores que corresponden a las regiones variables. A continuación se construye una biblioteca de fagos que muestra los scFvs con el uso de estas regiones variables. Seguidamente, los clones de anticuerpos que se unen a antígenos se concentran y clonan mediante cribado y sus regiones variables se utilizan para producir los vectores de expresión de anticuerpos. A continuación se introduce un vector de expresión de anticuerpos anti-F. IXa (cadena H y cadena L) y un vector de expresión de anticuerpos anti-F. X (cadena H y cadena L) en las mismas células de forma tal de expresar los anticuerpos y obtener los anticuerpos biespecíficos.

En el procedimiento de la presente invención mencionado anteriormente, la cadena H de un primer anticuerpo (por ejemplo, un anticuerpo anti-F. IXa) y la cadena H de un segundo anticuerpo (por ejemplo, un anticuerpo anti-F. X) se unen con las cadenas L compartidas en común del primer anticuerpo o del segundo anticuerpo para producir un primer anticuerpo de cadena L compartida en común. A continuación se mide la actividad de unión a antígenos o la actividad biológica del anticuerpo obtenido.

Sin ninguna limitación particular para este procedimiento, las cadenas L compartidas en común pueden obtenerse, por ejemplo, mediante las siguientes etapas (1) a (7):

(1) seleccionar un anticuerpo A contra el antígeno A y un anticuerpo B contra el antígeno B;

5 (2) preparar las líneas celulares que secretan la cadena H respectiva, Ha (que secreta la cadena H del anticuerpo A) y Hb (que secreta la cadena H del anticuerpo B), mediante la introducción de un vector de expresión de un gen que codifica la cadena H de cada anticuerpo (preferentemente el fragmento Fd o más específicamente, la región que comprende VH y CH1);

(3) construir por separado una biblioteca en la que las cadenas L se expresen como proteínas de fusión con proteínas en la superficie del fago;

10 (4) introducir la biblioteca de cadena L en Ha de *E. coli* y secretar una biblioteca de fagos que muestra los anticuerpos (Fab cuando la cadena H es un fragmento Fd) que comprende la cadena H del anticuerpo A y varias cadenas L en su superficie;

(5) concentrar los clones de la biblioteca de fagos mediante cribado con el uso del antígeno A;

15 (6) infectar el Hb de *E. coli* con los clones obtenidos y obtener una biblioteca de fagos que muestre los anticuerpos (Fab cuando la cadena H es un fragmento Fd) que comprenden la cadena H del anticuerpo B y varias cadenas L en su superficie; y

(7) concentrar los clones de la biblioteca de fagos obtenida mediante cribado con el uso del antígeno B.

20 Las cadenas L compartidas en común que muestran una alta afinidad con respecto a los antígenos y que corresponden a diferentes cadenas H que pueden utilizarse para producir anticuerpos biespecíficos pueden obtenerse mediante la repetición de las etapas (1) a (7) mencionadas anteriormente.

Más específicamente, las cadenas L compartidas en común pueden obtenerse mediante las siguientes etapas (a) a (e):

(a) producir hospedadores que secreten la cadena H de un anticuerpo que se une a un antígeno deseado;

25 (b) introducir una biblioteca de cadena L de anticuerpo en los hospedadores de la etapa (a) y secretar una biblioteca de fagos que muestre los anticuerpos compuestos por las cadenas H y L mencionadas anteriormente;

(c) seleccionar una biblioteca de fagos que muestre los anticuerpos que se unen específicamente al antígeno deseado de la etapa (a);

30 (d) introducir la biblioteca de fagos seleccionada en la etapa (c) en los hospedadores que secretan las cadenas H de un anticuerpo que se une a un antígeno deseado diferente del de la etapa (a) y secretar una biblioteca de fagos que muestre los anticuerpos compuestos por las cadenas H y L; y

(e) seleccionar una biblioteca de fagos que muestre los anticuerpos que se unen específicamente al antígeno deseado de la etapa (d).

Las cadenas L compartidas en común también pueden obtenerse mediante las siguientes etapas (a) a (e):

(a) producir hospedadores que secreten la cadena H de un anticuerpo que se une a un antígeno deseado;

35 (b) introducir la biblioteca de cadena L de anticuerpo en los hospedadores de la etapa (a) y secretar una biblioteca de fagos que muestre los anticuerpos compuestos por las cadenas H y L mencionadas anteriormente;

(c) seleccionar una biblioteca de fagos que muestre los anticuerpos que se unen específicamente al antígeno deseado de la etapa (a);

40 (d) introducir la biblioteca de fagos seleccionada en la etapa (c) en los hospedadores que secretan una cadena H que comprende una secuencia de aminoácidos diferente a la de la cadena H de la etapa (a) y secretar una biblioteca de fagos que muestre los anticuerpos compuestos por las cadenas H y L; y

(e) seleccionar una biblioteca de fagos que muestre los anticuerpos que se unen específicamente a un antígeno reconocido por la cadena H de la etapa (d).

45 Además, los anticuerpos de cadena L compartidas en común pueden producirse mediante la sustitución de una, dos o tres CDR de las cadenas L compartidas en común producidas como se describe anteriormente con las CDR de un primer anticuerpo, un segundo anticuerpo u otro anticuerpo contra un primer antígeno o un segundo antígeno, cuyas CDR tienen una alta homología con respecto a las secuencias de aminoácidos de las CDR del primer anticuerpo o del segundo anticuerpo.

Esta "sustitución" de las CDR puede realizarse de forma adecuada por los entendidos en la técnica mediante el uso de técnicas conocidas como reordenamiento de CDR. Más específicamente, puede llevarse a cabo mediante los procedimientos descritos en los ejemplos.

5 Estos anticuerpos de cadena L compartida en común se comparan con el anticuerpo biespecífico original de la etapa (2), en el que las cadenas L no se han compartido en común o los anticuerpos de cadena L compartida en común producidos en la etapa (4) en términos de su actividad de unión a antígenos o su actividad biológica y después pueden seleccionarse los anticuerpos de cadena L compartida en común que tienen las actividades deseadas.

10 En el contexto de la presente invención "actividad deseada" se refiere a, por ejemplo, la "actividad" que es equivalente o superior en comparación con la del anticuerpo antes que las cadenas L fueran compartidas en común. Más específicamente, se refiere a la actividad que es equivalente o superior como cofactor F. VIII/F. VIIIa, en comparación con la del anticuerpo antes que las cadenas L se compartieran en común. Por consiguiente, en las etapas mencionadas anteriormente, por ejemplo, se seleccionan preferentemente los anticuerpos de cadena L compartida en común en los que la actividad como cofactor F. VIII/F. VIIIa es equivalente o superior.

15 En el procedimiento mencionado anteriormente, las etapas (6) y (7) anteriores se repiten si fuera necesario, con el uso de los anticuerpos de cadena L compartida en común producidos en la etapa (7), para obtener anticuerpos de cadena L compartida en común que tienen una actividad que es equivalente o superior en comparación con la del anticuerpo biespecífico original producido en la etapa (2). A modo no taxativo, la "repetición" mencionada anteriormente preferentemente se refiere a una repetición de dos veces o más.

20 Los anticuerpos biespecíficos que comprenden las cadenas L compartidas en común, que se producen mediante los procedimientos de la presente invención mencionados anteriormente, también se encuentran comprendidos en la presente invención.

25 En una realización de la presente invención, los anticuerpos tienen actividad para sustituir a nivel funcional al cofactor F. VIII; por consiguiente, se espera que los anticuerpos de la presente invención se vuelvan agentes farmacéuticos eficaces para enfermedades causadas por la disminución de la actividad (función) de este cofactor. Los ejemplos de las enfermedades mencionadas anteriormente incluyen, a modo no taxativo, sangrado, enfermedades que acompañan el sangrado y enfermedades causadas por el sangrado. Por ejemplo, la reducción o carencia de función del F. VIII/F. VIIIa causa un trastorno de sangrado llamado hemofilia.

30 Entre las hemofilias, el trastorno de sangrado que surge de una reducción o carencia congénita de la función del F. VIII/F. VIIIa es llamado hemofilia A. El sangrado en un paciente que padece hemofilia A se trata con terapia reemplazo mediante el uso de una preparación de F. VIII. Cuando el ejercicio duro o la excursión provocan un sangrado intraarticular frecuente, o cuando un paciente padece hemofilia, puede realizarse una administración preventiva de una preparación de F. VIII (Nilsson IM et al., J. Intern. Med., 1992, Vol. 235, p.25-32; Löfqvist T et al., J. Intern. Med., 1997, Vol. 241, p.395-400). Dado que esta administración preventiva de una preparación de F. VIII disminuye dramáticamente los episodios de sangrado en los pacientes que padecen hemofilia A, dicha práctica se ha generalizado en los últimos años. La disminución en los episodios de sangrado no solamente reduce los peligros de sangrado letal o no letal y el agotamiento que acompaña a dicho sangrado, sino que evita la artropatía hemofílica causada por el sangrado intraarticular frecuente. Como resultado, la calidad de vida de los pacientes que padecen hemofilia A puede mejorarse enormemente.

40 La vida media de la preparación de F. VIII en la sangre es reducida, de aproximadamente 12 a 16 horas. Por consiguiente, para una prevención continua, la preparación de F. VIII debe administrarse aproximadamente tres veces por semana. Esta dosis mantiene la actividad del F. VIII en aproximadamente un 1% o más (*The 24th Academic Meeting of the Japanese Society on Thrombosis and Hemostasis, Academic Special Committee, Committee for discussing on standardization of hemophilia, mini symposium, 2001*). En la terapia de reemplazo en el momento del sangrado, a menos que el sangrado sea leve, la administración adicional de la preparación de F. VIII también debe llevarse a cabo regularmente durante un cierto período para evitar la reaparición del sangrado y lograr una hemostasis completa.

45 La preparación de F. VIII generalmente se administra intravenosamente. No obstante, existen dificultades técnicas asociadas con la administración intravenosa. En particular, la administración a pacientes jóvenes es aún más difícil dado que las venas diana generalmente son un tanto angostas.

50 A menudo, los tratamientos caseros y la autoinyección se realizan para la administración preventiva de la preparación de F. VIII y para la administración de emergencia al sangrar. La necesidad de administración frecuente y las dificultades técnicas de la administración no solamente producen agotamiento a los pacientes, sino que hacen que estos opten por terapias caseras y autoinyección. Por consiguiente, existe una fuerte demanda por agentes farmacéuticos que puedan administrarse en intervalos más prolongados o más fácilmente en comparación con las preparaciones de factor VIII de coagulación disponibles actualmente.

55 En los pacientes que padecen hemofilia A, particularmente los pacientes que padecen hemofilia A severa, pueden aparecer anticuerpos contra el F. VIII llamados inhibidores. Cuando se producen dichos inhibidores, el efecto de la

preparación de F. VIII es alterado por los inhibidores. Como resultado, el manejo de la hemostasis en los pacientes se vuelve muy difícil.

5 Cuando ocurre el sangrado en dichos pacientes inhibidores que padecen hemofilia A, generalmente se realiza un tratamiento de neutralización que utiliza grandes cantidades de una preparación de F. VIII o un tratamiento de bypass que utiliza un concentrado complejo o una preparación de F. VIIa. No obstante, en el procedimiento de neutralización, la administración de una gran cantidad de la preparación de F. VIII puede aumentar el valor del inhibidor (anticuerpo anti-F. VIII). El tratamiento de bypass también presenta desventajas, a saber, la vida media corta (de aproximadamente 2 a 8 horas) del concentrado complejo o de la preparación de F. VIIa en la sangre. Dado que sus mecanismos de acción son independientes de la función del F. VIII/F. VIIIa, es decir, la función de catalizar la activación del F. X por el F. IXa, en algunos casos, el mecanismo de hemostasis no puede funcionar bien y por consiguiente no se obtiene ninguna respuesta. Como resultado, es mucho más difícil obtener un efecto hemostático suficiente en los pacientes inhibidores que padecen hemofilia A que en los pacientes no inhibidores que padecen hemofilia A. Por lo tanto, existe una fuerte necesidad en la técnica de un agente farmacéutico que no sea influenciado por la presencia del inhibidor y que además sustituya a nivel funcional al F. VIII/ F. VIIIa.

15 Además de la hemofilia y la hemofilia adquirida que involucran a los auto-anticuerpos anti-F. VIII, otro trastorno de sangrado conocido relacionado con el F. VIII/ F. VIIIa es la enfermedad de vonWillebrand causada por la anomalía funcional o la carencia del factor de vonWillebrand factor (vWF). El vWF es necesario no solamente para que las plaquetas se adhieran normalmente a los tejidos subendoteliales en un sitio dañado de una pared vascular, sino también para que las plaquetas formen complejos con el F. VIII para mantener el F. VIII en plasma en un nivel normal. Dichas funciones disminuyen y provocan anomalías en la función de hemostasis en pacientes que padecen la enfermedad de vonWillebrand.

20 Para el desarrollo de productos farmacéuticos que (i) tengan intervalos de administración prolongados, (ii) puedan administrarse fácilmente, (iii) no sean influenciados por la presencia de inhibidores y (iv) sustituyan a nivel funcional al F. VIII/F. VIIIa independientemente de ellos, pueden utilizarse procedimientos que utilicen anticuerpos. La vida media del anticuerpo en la sangre, en general, es relativamente prolongada, varía de unos pocos días a unas pocas semanas. Los anticuerpos generalmente se desplazan en la sangre después de la administración subcutánea. Es decir, generalmente, los productos farmacéuticos de anticuerpos satisfacen las propiedades (i) y (ii) mencionadas anteriormente.

25 La presente invención proporciona composiciones (farmacéuticas) que comprenden los anticuerpos de la presente invención y vehículos farmacéuticamente aceptables. Por ejemplo, se espera que los anticuerpos de la presente invención que reconocen al F. IX o al F. IXa y al F. X, y que sustituyen a nivel funcional al F. VIII se conviertan en productos farmacéuticos (composiciones farmacéuticas) o agentes farmacéuticos para la prevención y/o tratamiento del sangrado, enfermedades que acompañan al sangrado, enfermedades causadas por el sangrado y similares.

30 En el contexto de la presente invención, el sangrado, las enfermedades que acompañan al sangrado y/o las enfermedades causadas por el sangrado, preferentemente se refieren a enfermedades que se desarrollan y/o progresan debido a la reducción o carencia de actividad del factor VIII de coagulación y/o del factor VIII activado de coagulación. Dichas enfermedades incluyen la hemofilia A, enfermedades en las que aparece un inhibidor contra el factor VIII de coagulación y/o el factor VIII activado de coagulación, hemofilia adquirida y enfermedad de vonWillebrand, pero no se limitan a estas.

35 Las composiciones farmacéuticas utilizadas para propósitos terapéuticos o preventivos, que comprenden los anticuerpos de la presente invención como ingredientes activos, pueden formularse mediante la mezcla, si fuera necesario, con portadores, vehículos farmacéuticamente aceptables y similares que son inactivos contra los anticuerpos. Por ejemplo, puede utilizarse agua esterilizada, solución salina fisiológica, estabilizadores, excipientes, antioxidantes (como ácido ascórbico), tampones (como fosfato, citrato y otros ácidos orgánicos), antisépticos, tensioactivos (como PEG y Tween), agentes quelantes (como EDTA) y aglutinantes. También pueden comprender otros polipéptidos de bajo peso molecular, proteínas como albúmina de suero, gelatina e inmunoglobulinas, aminoácidos como glicina, glutamina, aspargina, arginina y lisina, azúcares y carbohidratos como polisacáridos y monosacáridos y alcoholes de azúcar como manitol y sorbitol. Cuando se prepara una solución acuosa para la inyección, pueden utilizarse soluciones salinas e isotónicas fisiológicas que comprenden glucosa y otros adyuvantes como D-sorbitol, D-manosa, D-manitol y cloruro de sodio y si fuera necesario, en combinación con solubilizantes adecuados como alcohol (por ejemplo, etanol), polialcoholes (como propilenglicol y PEG) y tensioactivos no iónicos (como polisorbato 80 y HCO-50).

40 Si fuera necesario, los anticuerpos de la presente invención podrían encapsularse en microcápsulas (por ejemplo, las compuestas por hidroximetilcelulosa, gelatina y poli(metilmetacrilato)) o incorporarse como componentes de sistemas de administración de fármacos coloidales (por ejemplo, liposomas, microesferas de albúmina, microemulsiones, nanopartículas y nanocápsulas) (véase, por ejemplo, "Remington's Pharmaceutical Science 16th edition", Oslo Ed. (1980)). Los procedimientos para preparar los agentes farmacéuticos como agentes farmacéuticos de liberación controlada también son bien conocidos y dichos procedimientos pueden aplicarse a los anticuerpos de la presente invención (Langer et al., J. Biomed. Mater. Res. 15: 267-277 (1981); Langer, Chemtech. 12: 98-105

(1982); patente de Estados Unidos No. 3,773,919; solicitud de patente europea No. 58,481; Sidman et al., *Biopolymers* 22: 547-556 (1983); solicitud de patente europea No. 133,988).

5 Los anticuerpos o composiciones farmacéuticas de la presente invención pueden utilizarse en combinación con el factor VIII de coagulación y pueden administrarse con el factor VIII de coagulación simultáneamente o en momentos diferentes. Los anticuerpos o composiciones farmacéuticas de la presente invención y el factor VIII de coagulación también pueden combinarse en un kit. Cuando los anticuerpos o composiciones farmacéuticas de la presente invención y el factor VIII de coagulación se utilizan en combinación, la dosis de cada componente puede reducirse según sea necesario en comparación con aquella cuando los componentes se administran individualmente.

10 Pueden utilizarse dos o más tipos de los anticuerpos biespecíficos o de las composiciones farmacéuticas de la presente invención en combinación, y estos anticuerpos o composiciones pueden utilizarse junto con otros anticuerpos biespecíficos contra los anticuerpos F. IX/F. IXa y F. X, anti-F. IX/F. IXa, anticuerpos anti-F. X o sus combinaciones. Cuando dos o más tipos de los anticuerpos biespecíficos o de las composiciones farmacéuticas de la presente invención se utilizan en combinación, o cuando estos anticuerpos o composiciones se utilizan junto con otros anticuerpos biespecíficos contra los anticuerpos F. IX/F. IXa y F. X, anti-F. IX/F. IXa, anticuerpos anti-F. X o sus combinaciones, pueden administrarse simultáneamente o en momentos diferentes. La presente invención también puede realizarse como un kit que comprenda dos o más tipos de los anticuerpos biespecíficos o de las composiciones farmacéuticas de la presente invención o que combine estos anticuerpos o composiciones junto con otros anticuerpos biespecíficos contra los anticuerpos F. IX/F. IXa y F. X, anti-F. IX/F. IXa, anticuerpos anti-F. X o sus combinaciones. Además, cuando dos o más tipos de los anticuerpos biespecíficos o de las composiciones farmacéuticas de la presente invención se utilizan en combinación, o cuando estos anticuerpos o composiciones se utilizan junto con otros anticuerpos biespecíficos contra los anticuerpos F. IX/F. IXa y F. X, anti-F. IX/F. IXa, anticuerpos anti-F. X o sus combinaciones, la dosis de cada componente puede reducirse según sea necesario en comparación con aquella cuando los componentes se administran individualmente.

25 La dosis de una composición farmacéutica de la presente invención puede determinarse de forma adecuada mediante la consideración de la forma de dosificación, el procedimiento de administración, la edad y el peso corporal del paciente, los síntomas del paciente, el tipo de enfermedad y el grado de progreso de la enfermedad y es decidida en última instancia por los médicos. Generalmente, la dosis diaria para un adulto es de 0,1 mg a 2000 mg en una sola vez o en varias porciones. La dosis es más preferentemente de 1 a 1000 mg/día, aún más preferentemente de 50 a 500 mg/día y más preferentemente de 100 a 300 mg/día. Estas dosis pueden variar, en función del peso corporal y la edad del paciente y el procedimiento de administración; no obstante, la selección de una dosis adecuada se encuentra dentro del alcance del entendido en la técnica. De forma similar, el período de dosificación puede determinarse de forma adecuada en función del progreso terapéutico.

30 La terapia génica puede realizarse mediante la incorporación de genes que codifiquen los anticuerpos de la presente invención en vectores para la terapia génica. Además de la administración directa con el uso de plásmidos desnudos, los procedimientos adecuados de administración incluyen la administración después del empaquetado en liposomas y similares, formando una variedad de vectores virales como vectores de retrovirus, vectores de adenovirus, vectores de virus vaccinia, vectores de poxvirus, vectores de virus adeno-asociados, y vectores de HVJ (véase Adolph "Viral Genome Methods" CRC Press, Florida (1996)), o recubrimiento con cuentas de vehículo como partículas de oro coloidales (WO 93/17706 y similares). No obstante, mientras los anticuerpos se expresen *in vivo* y se ejerzan sus actividades, puede utilizarse cualquier procedimiento para la administración. Preferentemente, puede administrarse una dosis suficiente a través de una vía parenteral adecuada (como, por ejemplo, inyección o infusión intravenosa, intraperitoneal, subcutánea, intradérmica, intramuscular, en tejidos adiposos o glándulas mamarias; inhalación, bombardeo de partículas dirigido por gases (con el uso de una pistola de electrones y similares); o vía mucosa (como gotas nasales). De forma alternativa, los genes que codifican los anticuerpos de la presente invención pueden administrarse en las células sanguíneas, en las células de médula ósea y similares *ex vivo*, mediante el uso de transfección liposomal, bombardeo de partículas (patente de Estados Unidos No. 4,945,050) o infección viral y las células pueden volver a introducirse en los animales. Cualquier gen que codifique un anticuerpo de la presente invención puede utilizarse en la terapia génica y sus ejemplos incluyen genes que comprenden secuencias de nucleótidos que codifican las CDR de A44, A69 y B26 descritas anteriormente.

45 La presente invención proporciona procedimientos para prevenir y/o tratar el sangrado, enfermedades que acompañan el sangrado y/o enfermedades causadas por el sangrado, donde dichos procedimientos comprenden administrar los anticuerpos o composiciones de la presente invención. Los anticuerpos o composiciones pueden administrarse, por ejemplo, mediante los procedimientos mencionados anteriormente.

50 La presente invención también se refiere al uso de los anticuerpos de la presente invención para producir las composiciones (farmacéuticas) de la presente invención.

Además, la presente invención proporciona kits para utilizarse con los procedimientos mencionados anteriormente, dichos kits comprenden al menos un anticuerpo o composición de la presente invención. Además, los kits pueden incluir, empaquetados en ellos, una jeringa, una aguja de inyección, un vehículo farmacéuticamente aceptable, algodón empapado en alcohol, bandas adhesivas, instrucciones que describen el procedimiento de uso y similares.

Ejemplos

De aquí en adelante, la presente invención se describe de forma específica mediante el uso de ejemplos.

[Ejemplo 1] Producción de un anticuerpo no neutralizador para el Factor IXa (F.IXa)

## 5 1-1. Inmunización y producción de hibridomas

Ocho ratones BALB/c (machos, de 6 semanas de edad al inicio de la inmunización, Charles River Laboratories Japan, Inc.) y cinco ratones MRL/1pr (machos, de 6 semanas de edad al inicio de la inmunización, Charles River Laboratories Japan, Inc.) se inmunizaron contra el Factor IXa $\beta$  humano (Enzyme Research Laboratories, Inc.) como se describe a continuación. Como la primera inmunización, se administraron subcutáneamente 40  $\mu$ g/cabeza de Factor IXa $\beta$ , emulsionado con adyuvante completo de Freund (FCA), H37Ra (Difco Laboratories). Dos semanas después, se administraron subcutáneamente 40  $\mu$ g/cabeza de Factor IXa $\beta$ , emulsionado con adyuvante incompleto de Freund (FIA, Difco Laboratories). A partir de entonces, se administraron, en intervalos semanales, de tres a siete dosis de refuerzo. Después de haber confirmado un aumento en el valor de anticuerpos en suero contra el Factor IXa $\beta$  con un ensayo inmunosorbente (ELISA) relacionado con enzimas descrito en el siguiente ejemplo 1-2, se administraron intravenosamente 40  $\mu$ g/cabeza del Factor IXa $\beta$ , diluido con solución salina tamponada con fosfato de calcio y magnesio sin iones (PBS (-)), como la inmunización final. Tres días después de la inmunización final se extrajeron los bazo. Una primera parte de cada bazo se utilizó en el ejemplo 10-2. Las células del bazo restantes se fusionaron con células de mieloma de ratón P3X63Ag8U (en adelante denominadas P3U1, ATCC CRL-1597), de conformidad con el procedimiento convencional, con el uso de PEG1500 (Roche Diagnostics). Las células fusionadas suspendidas en medio de RPMI1640 (Invitrogen) que contenía FBS al 10% (Invitrogen) (en adelante denominado FBS/RPMI1640 al 10%), se colocaron en placas de cultivo de 96 pocillos. En los días 1, 2, 3 y 5 después de la fusión celular, el medio se sustituyó con medio selectivo de HAT (FBS al 10%/RPMI1640/concentrado de 50 veces de HAT al 2% (Dainippon Sumitomo Pharma Co., Ltd.)/BM-Condimed H1 al 5% (Roche Diagnostics)) para cultivar de forma selectiva los hibridomas. El sobrenadante de cultivo recolectado en el día 8 o 9 después de la fusión celular se utilizó para medir la actividad de unión al Factor IXa mediante el uso del ELISA descrito en el ejemplo 1-2 y se seleccionaron los hibridomas que tenían actividad de unión al Factor IXa. Posteriormente, se midió la actividad de neutralización para la actividad enzimática del Factor IXa mediante el procedimiento descrito en el ejemplo 1-3 y se seleccionaron los hibridomas que no tenían actividad neutralizadora para el Factor IXa. Los hibridomas se clonaron mediante la realización de dilución limitativa dos veces, en la que una célula por pocillo se colocó en placas de cultivo de 96 pocillos. El ELISA y la medición de la actividad de neutralización descrita en los ejemplos 1-2 y 1-3 se llevó a cabo sobre las células que se confirmaron como colonias únicas mediante observación con microscopio, y se seleccionaron los clones. La ascitis del anticuerpo clonado se preparó mediante el procedimiento descrito en el ejemplo 1-4 y el anticuerpo se purificó de las ascitis. Se confirmó que el anticuerpo purificado no extiende el tiempo de tromboplastina parcial activada (APTT) con el procedimiento descrito en el ejemplo 1-5.

## 1-2. ELISA del Factor IXa

Después que el Factor IXa $\beta$ , diluido en 1  $\mu$ g/mL con un tampón de recubrimiento (bicarbonato de sodio 100 mM, pH 9,6, azida de sodio al 0,02%), se dispensó en una placa Nunc-Immuno (placas Nunc-Immuno<sup>™</sup> 96 MicroWell<sup>™</sup> MaxiSorp<sup>™</sup> (Nalge Nunc International)) a 100  $\mu$ L/pocillo, se incubó durante la noche a 4°C. Una vez que la placa se lavó tres veces con PBS (-) que contenía Tween<sup>®</sup> 20, se bloqueó a temperatura ambiente durante dos horas con un tampón de dilución (50 mM Tris-HCl, pH 8,1, albúmina de suero bovino al 1%, MgCl<sub>2</sub> 1mM, NaCl 0,15 M, Tween<sup>®</sup> 20 al 0,05%, azida de sodio al 0,02%). Después de la eliminación del tampón, se agregó el antisuero de ratón o el sobrenadante de cultivo del hibridoma diluido con el tampón de dilución a 100  $\mu$ L/pocillo a la placa y se incubó a temperatura ambiente durante una hora. Después que la placa se lavó tres veces, se agregaron 100  $\mu$ L/pocillo de IgG anti ratón de cabra marcada con fosfatasa alcalina (H+L) (Zymed Laboratories), diluida en una relación 1/2000 con el tampón de dilución, y se incubaron a temperatura ambiente durante una hora. Una vez que la placa se lavó seis veces, se agregaron 100  $\mu$ L/pocillo de sustrato colorimétrico Blue-Phos<sup>™</sup>, sustrato de fosfatasa micropocillo (Kirkegaard & Perry Laboratories) y se incubaron a temperatura ambiente durante 20 minutos. Después que se agregaron 100  $\mu$ L/pocillo de solución de detención Blue-Phos<sup>™</sup> (Kirkegaard & Perry Laboratories), se midió la absorbancia a 595 nm con el lector de microplaca modelo 3550 (Bio-Rad Laboratories).

## 1-3. Medición de la actividad de neutralización del Factor IXa

Se prepararon 400  $\mu$ g/mL de una solución de fosfolípidos mediante la disolución de los fosfolípidos (Sigma-Aldrich) con agua destilada para la inyección y la realización de sonicación. 40  $\mu$ L de solución salina fisiológica tamponada con Tris que contenía un 0,1% de albúmina de suero bovino (en adelante denominada TBSB), 10  $\mu$ L de Factor IXa $\beta$  30 ng/mL (Enzyme Research Laboratories), 5  $\mu$ L de solución de fosfolípidos 400  $\mu$ g/mL, 5  $\mu$ L de TBSB que contenía CaCl<sub>2</sub> 100 mM y MgCl<sub>2</sub> 20 mM y 10  $\mu$ L de sobrenadante de cultivo de hibridomas se mezclaron en una placa de 96 pocillos, seguido de incubación a temperatura ambiente durante una hora. 20  $\mu$ L de Factor X 50  $\mu$ g/mL (Enzyme Research Laboratories) y 10  $\mu$ L de Factor VIII 3 U/mL (American diagnostica) se agregaron a esta solución mixta y

reaccionaron a temperatura ambiente durante 30 minutos. La reacción se detuvo mediante la adición de 10 µL de EDTA 0,5M a la mezcla de reacción. Después de la adición de 50 µL de una solución S-2222 (Chromogenix) a la solución de reacción y la incubación a temperatura ambiente durante 30 minutos, se midió la absorbancia a 405 nm de longitud de onda de medición, 655 nm de longitud de onda de control con un lector de microplaca modelo 3550 (Bio-Rad Laboratories, Inc.).

#### 1-4. Producción de ascitis y purificación de anticuerpo

La producción de ascitis del hibridoma establecido se llevó a cabo de conformidad con el procedimiento convencional. Específicamente, se transplantaron  $2 \times 10^6$  células de hibridoma cultivadas *in vitro* a las cavidades abdominales de ratones BALB/c (machos, de 5 a 7 semanas de edad al inicio del experimento, Charles River Laboratories Japan) o ratones sin piel BALB/c (machos, de 5 a 6 semanas de edad al inicio del experimento, Charles River Laboratories Japan y CLEA Japan, Inc.), a las que se había administrado pristano (2, 6, 10, 14-tetrametilpentadecano; Wako Pure Chemical Industries, Ltd.) dos veces intraperitonealmente. La ascitis se recogió de los ratones a los que se les había agrandado los abdómenes, una a cuatro semanas antes del trasplante.

La purificación de anticuerpos de la ascitis se llevó a cabo mediante el uso de columna de Proteína G Sepharose™ 4 de flujo rápido (Amersham Biosciences). La ascitis, diluida dos veces en el tampón aglutinante (20 mM de acetato de sodio, pH 5,0), se aplicó a la columna, y se lavó con un volumen de columna 10 del tampón aglutinante. El anticuerpo se eluyó en un volumen de columna 5 del tampón de elución (glicina-HCl 0,1 M, pH 2,5), y se neutralizó con el tampón neutralizador (Tris-HCl 1 M, pH 9,0). La solución resultante se condensó con Centriprep™ 10 (Millipore), y el solvente se sustituyó con TBS (50 mM de solución salina tamponada con Tris). La concentración del anticuerpo se calculó a partir de la absorbancia a 280 nm basada en  $A(1\%, 1\text{cm}) = 13,5$ . La absorbancia se midió mediante DU-650 (Beckman Coulter).

#### 1-5. Medición del tiempo de tromboplastina parcial activada (APTT)

El APTT se midió mediante KC10A (Amelung) conectado a CR-A (Amelung). Una mezcla de 50 µL de la solución de anticuerpos, diluida con TBSB, 50 µL de plasma humano estándar (Dade Behring), y 50 µL de reactivo de APTT (Dade Behring), se calentó a 37°C durante 3 minutos. La reacción de coagulación se inició mediante la adición de 50 µL de  $\text{CaCl}_2$  20 mM (Dade Behring) a la mezcla y se midió el tiempo de coagulación.

[Ejemplo 2] Producción de anticuerpo no neutralizante en comparación con el Factor X (F.X)

#### 2-1. Inmunización y producción de hibridoma

Se inmunizaron ocho ratones BALB/c (machos, de 6 semanas de edad al inicio de la inmunización, Charles River Laboratories Japan) y cinco ratones MRL/1pr (machos, de 6 semanas de edad al inicio de inmunización, Charles River Laboratories Japan) en comparación con el Factor X humano (Enzyme Research Laboratories, Inc.) tal como se describe a continuación. Como primera inmunización, se administraron subcutáneamente 40 µg/cabeza de Factor X, emulsionados con FCA. Después de dos semanas, se administraron subcutáneamente 20 o 40 µg/cabeza de Factor X, emulsionados con FIA. Posteriormente, en intervalos semanales, los detonantes se administraron de 3 a 6 veces en total. Después de confirmarse un aumento en la titulación del anticuerpo en suero en comparación con el Factor X mediante ELISA descrito en el ejemplo 2-2, 20 o 40 µg/cabeza de Factor X, diluido en PBS (-), se administraron intravenosamente como la inmunización final. Tres días después de la inmunización final, se extrajeron los bazo de los ratones. Se utilizó una primera parte de cada bazo en el ejemplo 10-2. Las células de los bazo restantes se fusionaron con células de mieloma de ratón, P3U1, de conformidad con el procedimiento convencional, mediante uso de PEG1500. Las células fusionadas, suspendidas en medio FBS/RPMI1640 al 10%, se colocaron en una placa de cultivo de 96 pocillos. En los días 1, 2, 3 y 5 después de la fusión celular, el medio se sustituyó con medio de selección HAT para cultivar de forma selectiva los hibridomas. La actividad aglutinante en comparación con el Factor X se midió mediante el uso del sobrenadante de cultivo recolectado el día 8 tras la fusión celular mediante el uso de ELISA descrito en el ejemplo 2-2. Se seleccionaron los hibridomas que tienen actividad aglutinante en comparación con el Factor X. Posteriormente, se midió la actividad neutralizante en comparación con la actividad enzimática del Factor Xa tal como se describió en el ejemplo 2-3. Los hibridomas que no tienen actividad neutralizante en comparación con el Factor Xa se clonaron mediante dilución limitativa dos veces. La ascitis del anticuerpo clonado se produjo mediante el procedimiento descrito en el ejemplo 1-4 para purificar el anticuerpo de la ascitis. Se confirmó que el anticuerpo purificado no aumentó el APTT mediante el procedimiento descrito en el ejemplo 1-5.

#### 2-2. ELISA del Factor X

Después de que se dispuso el Factor X, diluido hasta 1 µg/mL con el tampón de recubrimiento, en una placa Nunc-Immuno a 100 µL/pocillo, se incubó durante la noche a 4°C. La placa se lavó tres veces con PBS (-) que contenía Tween® 20, y después se bloqueó a temperatura ambiente durante dos horas con el tampón de dilución. Después de extraerse el tampón, el ratón anti sérico o el sobrenadante de cultivo del hibridoma, diluido con el tampón de dilución, se agregó a la placa, y se incubó a temperatura ambiente durante una hora. Después de lavar la placa tres veces, se agregó IgG anti ratón de cabra marcado con fosfatasa alcalina (H+L), diluida hasta 1/2000 con el tampón de dilución, y se incubó a temperatura ambiente durante una hora. Después de lavar la placa 6 veces, se agregaron

100 µL/pocillo de sustrato de fosfatasa del sustrato colorimétrico Blue-Phos™ (Kirkegaard & Perry Laboratories) y se incubó a temperatura ambiente durante 20 minutos. Después de que se agregaron 100 µL/pocillo de solución de detención Blue-Phos™ (Kirkegaard & Perry Laboratories), se midió la absorbancia a 595 nm con lector de microplaca modelo 3550 (Bio-Rad Laboratories).

### 5 2-3. Medición de actividad neutralizante del Factor Xa

Se mezclaron 10 µL del sobrenadante de cultivo de hibridoma, diluido cinco veces con TBSB, y 40 µL de TBCP (TBSB que contenía 2,78 mM de CaCl<sub>2</sub>, 22,2 µM de fosfolípidos (fosfatidil colina : fosfatidil serina = 75:25, Sigma-Aldrich)) que contenía 250 pg/mL de Factor Xa (Enzyme Research Laboratories) y se incubaron a temperatura ambiente durante una hora. 50 µL de TBCP, que contenían 20 µg/mL de protrombina (Enzyme Research Laboratories) y 100 ng/mL de factor activado de coagulación V (Factor Va; Haematologic Technologies), se agregaron a esta solución de mezcla y reaccionaron a temperatura ambiente durante 10 minutos. La reacción se detuvo mediante la adición de 10 µL de EDTA 0,5 M. Después se agregaron 50 µL de solución S-2238 1 mM (Chromogenix) a esta solución de reacción y se incubaron a temperatura ambiente durante 30 minutos, se midió la absorbancia a 405 nm con lector de microplaca modelo 3550 (Bio-Rad Laboratories).

### 15 [Ejemplo 3] Construcción de vectores de expresión de anticuerpo biespecífico quimérico

#### 3-1. Preparación de fragmentos de ADN que codifican regiones variables de anticuerpos a partir de hibridomas

Se extrajeron todos los ARN de hibridomas que producen anticuerpos anti-F.IXa o anticuerpos anti-F.X, mediante el uso del mini kit QIAGEN® Rneasy® (QIAGEN) de conformidad con el procedimiento descrito en el manual de instrucciones. Todos los ARN se disolvieron en 40 µL de agua esterilizada. Los ADNc de cadena simple se sintetizaron mediante el procedimiento de RT-PCR a través del sistema de síntesis de ADNc SuperScript (Invitrogen) de conformidad con el procedimiento descrito en el manual de instrucciones, mediante el uso de 1 a 2 µg de los ARN purificados como una plantilla.

#### 3-2. Análisis de secuencia y amplificación por PCR de región variable de cadena H de anticuerpo

Como cebadores para amplificación de los ADNc de región variable de cadena H de anticuerpo de ratón (VH), se preparó la mezcla de cebador HB y la mezcla de cebador HF descritas en el informe de Krebber et al. (J. Immunol. Methods 1997; 201:35-55). Se prepararon 25 µL de la solución de la reacción (2,5 µL de solución de ADNc preparada en el ejemplo 3-1, tampón con KOD adicional (TOYOBO), 0,2 mM de dNTPs, 1,5 mM de MgCl<sub>2</sub>, y 0,75 unidades de polimerasa de ADN con KOD adicional (TOYOBO)) mediante el uso de 0,5 µL cada 100 µM de mezcla de cebador HB y 100 µM de mezcla de cebador HF. La PCR se llevó a cabo mediante el uso del sistema por PCR Thermal Cycler GeneAmp 9700 (Perkin Elmer) tanto en la condición A (calentamiento a 98°C durante 3 minutos, seguido de 32 ciclos de reacciones a 98°C durante 20 segundos, 58°C durante 20 segundos, y 72°C durante 30 segundos) como en la condición B (calentamiento a 94°C durante 3 minutos, seguido de 5 ciclos de reacciones a 94°C durante 20 segundos, 46°C durante 20 segundos, y 68°C durante 30 segundos, y 30 ciclos de reacciones adicionales a 94°C durante 20 segundos, 58°C durante 20 segundos, 72°C durante 30 segundos) de acuerdo con la eficacia de amplificación de fragmentos de ADNc. Después de la realización de la PCR, la solución de la reacción se sometió a electroforesis en gel de agarosa al 1%. Los fragmentos amplificados del tamaño deseado (aproximadamente 400 bp) se purificaron mediante el uso del kit de extracción en gel QIAquick (QIAGEN) a través del procedimiento descrito en el manual de instrucciones adjunto y se eluyeron mediante el uso de 30 µL de agua esterilizada. La secuencia de nucleótidos de cada fragmento de ADN se determinó mediante el uso de kit de secuenciación BigDye Terminator Cycle (Applied Biosystems) con analizador genético de secuenciador de ADN ABI PRISM 3100 (Applied Biosystems) de conformidad con el procedimiento descrito en el manual de instrucciones adjunto. Las secuencias determinadas por el presente procedimiento se compararon y analizaron mediante el uso de GENETYX-SV/RC Versión 6.1 (Genetyx) y se seleccionaron aquellas que tenían una secuencia diferente.

#### 3-3. Preparación de fragmentos de ADN de región variable de anticuerpo para clonación

45 Con el fin de agregar el sitio de escisión Sfi I de enzima de restricción para clonarse a ambos extremos de fragmentos de amplificación de la región variable de anticuerpo, se llevaron a cabo los siguientes procedimientos.

Para amplificar el fragmento VH que incluye un sitio de escisión Sfi I agregado (Sfi I-VH), se preparó el extremo VH-5' de cebador cuya secuencia de unión a (Gly4Ser)<sub>2</sub> del cebador HB había sido cambiada a la secuencia que tiene el sitio de escisión Sfi I (SEQ ID NO: 42). Mediante el uso de 0,5 µL cada 10 µM de extremo VH-5' de cebador específico de secuencia y 10 µM de cebador scfor (J. Immunol. Methods 1997; 201: 35-55), se prepararon 20 µL de solución de reacción (1 µL de solución de fragmento de amplificación de ADNc de VH purificado preparado en el ejemplo 3-2, tampón con KOD adicional (TOYOBO), 0,2 mM de dNTPs, 1,5 mM de MgCl<sub>2</sub>, 0,5 unidades de polimerasa de ADN con KOD adicional (TOYOBO)). La PCR se llevó a cabo mediante el uso del sistema por PCR Thermal Cycler GeneAmp 9700 (Perkin Elmer) tanto en la condición A (calentamiento a 98°C durante 3 minutos, seguido de 32 ciclos de reacciones a 98°C durante 20 segundos, 58°C durante 20 segundos, y 72°C durante 30 segundos) como en la condición B (calentamiento a 94°C durante 3 minutos, seguido de 5 ciclos de reacciones a 94°C durante 20 segundos, 46°C durante 20 segundos, y 68°C durante 30 segundos, y 30 ciclos de reacciones adicionales a 94°C durante 20 segundos, 58°C durante 20 segundos, y 72°C durante 30 segundos) de acuerdo con

la eficacia de amplificación de fragmentos de ADNc. Después de la realización de la PCR, la solución de reacción se sometió a electroforesis en gel de agarosa al 1%. Los fragmentos amplificados del tamaño deseado (aproximadamente 400 bp) se purificaron mediante el uso del kit de extracción en gel QIAquick (QIAGEN) a través del procedimiento descrito en el manual de instrucciones adjunto y se eluyeron mediante el uso de 30 µL de agua esterilizada.

Para amplificar un fragmento de ADNc de región variable de cadena (VL) de anticuerpo de ratón L, primero, mediante el uso de 0,5 µL cada 100 µM de mezcla de cebador LB y 100 µM de mezcla de cebador LF descritas en el informe de Krebber et al. (J. Immunol. Methods 1997; 201:35-55), se prepararon 25 µL de la solución de reacción (2,5 µL de solución de ADNc preparada en el ejemplo 3-1, tampón con KOD adicional (TOYOBO), 0,2 mM de dNTPs, 1,5 mM de MgCl<sub>2</sub>, 0,75 unidades de polimerasa de ADN con KOD adicional (TOYOBO)). La PCR se llevó a cabo mediante el uso del sistema por PCR Thermal Cycler GeneAmp 9700 (Perkin Elmer) en las condiciones de calentamiento a 94°C durante 3 minutos, seguido de 5 ciclos de reacciones a 94°C durante 20 segundos, 46°C durante 20 segundos, y 68°C durante 30 segundos, y 30 ciclos de reacciones adicionales a 94°C durante 20 segundos, 58°C durante 20 segundos, y 72°C durante 30 segundos, de acuerdo con la eficacia de amplificación de los fragmentos de ADNc. Después de la realización de la PCR, la solución de reacción se sometió a electroforesis en gel de agarosa al 1%. Los fragmentos amplificados del tamaño deseado (aproximadamente 400 bp) se purificaron mediante el uso del kit de extracción en gel QIAquick (QIAGEN) a través del procedimiento descrito en el manual de instrucciones adjunto y se eluyeron mediante el uso de 30 µL de agua esterilizada. Los fragmentos estaban en un estado donde se agregó la secuencia de unión a 3' (Gly4Ser) derivada del cebador LF a su extremo C. Para agregar un sitio de escisión Sfi I a sus extremos C, se preparó el extremo VL-3' de cebador en el que la secuencia de unión a 3' (Gly4Ser) del cebador LF había sido cambiada a la secuencia que tiene el sitio de escisión Sfi I (SEQ ID NO: 43). Con el fin de amplificar el fragmento VL que incluye el sitio de escisión Sfi I agregado (Sfi I-VL), se utilizaron 0,5 µL cada 10 µM de mezcla de cebador del extremo VL-3' y 10 µM de cebador scback para preparar 20 µL de solución de reacción (1 µL de solución de fragmento de amplificación de ADNc de VL purificado, tampón con KOD adicional (TOYOBO), 0,2 mM de dNTPs, 1,5 mM de MgCl<sub>2</sub>, 0,5 unidades de polimerasa de ADN con KOD adicional (TOYOBO)). La PCR se llevó a cabo mediante el uso del sistema por PCR Thermal Cycler GeneAmp 9700 (Perkin Elmer) en las condiciones de calentamiento a 94°C durante 3 minutos, seguido de 5 ciclos de reacciones a 94°C durante 20 segundos, 46°C durante 20 segundos, y 68°C durante 30 segundos, y 30 ciclos de reacciones adicionales a 94°C durante 20 segundos, 58°C durante 20 segundos, y 72°C durante 30 segundos. Después de la realización de la PCR, la solución de reacción se sometió a electroforesis en gel de agarosa al 1%. Los fragmentos amplificados del tamaño deseado (aproximadamente 400 bp) se purificaron mediante el uso del kit de extracción en gel QIAquick (QIAGEN) a través del procedimiento descrito en el manual de instrucciones adjunto y se eluyeron mediante el uso de 30 µL de agua esterilizada.

Los fragmentos Sfi I-VH y Sfi I-VL purificados se digirieron con Sfi I (TAKARA) a 50°C durante la noche en la solución de la reacción preparada de conformidad con el procedimiento descrito en el manual de instrucciones adjunto. Posteriormente, la solución de la reacción se purificó mediante el uso del kit de purificación de PCR QIAquick (QIAGEN) a través del procedimiento descrito en el manual de instrucciones adjunto, y se eluyó mediante el uso de 30 µL de tampón EB adjunto al kit.

#### 3-4. Plásmidos de expresión de anticuerpos IgG biespecíficos

Cuando se produjeron los anticuerpos IgG biespecíficos deseados, los productos de sustitución de aminoácidos en la región CH3 de IgG4 se prepararon con referencia a la técnica "knobs into holes" de IgG1 (Ridgway et al., Protein Eng. 1996; 9: 617-621) para formar moléculas heterogéneas de cada cadena H. El tipo a (IgG4ya) es un producto de sustitución de Y349C o T366W, y el tipo b (IgG4yb) es un producto de sustitución de E356C, T366S, L368A, o Y407V. Asimismo, las sustituciones (-ppcpScp- y -ppcpPcp-) se introdujeron en la región de articulación de ambos tipos de productos de sustitución. De conformidad con la presente técnica, casi todas las cadenas H pueden convertirse en heterogéneas. Sin embargo, este no es el caso de las cadenas L, y se teme que la producción innecesaria de una molécula de anticuerpo pueda influenciar la medición de actividad posterior. Por lo tanto, en la presente estrategia, los vectores de expresión inducidos mediante diferentes agentes se utilizaron como vectores de expresión que corresponden a cada brazo de moléculas de anticuerpos (conocido como molécula HL) con el fin de expresar de forma individual cada molécula de HL que tenga cada especificidad y produzca de forma eficaz el tipo deseado de anticuerpo IgG biespecífico en las células.

Para expresar un brazo de una molécula de anticuerpo (por ejemplo, conocido como el brazo derecho de la molécula HL), se preparó pcDNA4-g4H o pcDNA4-g4L, en el cual corriente abajo de la región correspondiente de la cadena H o cadena L (figura 1 o 2), esto es, la secuencia de señal para células animales (IL3ss) (Proc. Natl. Acad. Sci. Estados Unidos. 1984; 81: 1075), una región variable de anticuerpo de ratón (VH o VL) y región constante IgG4ya humana adecuadas (SEQ ID NO: 44) o región constante κ (SEQ ID NO: 45) se incorporaron al vector que induce tetraciclina pcDNA4 (Invitrogen). Primero, se digirió pcDNA4 con enzimas de restricción Eco RV y Not I (TAKARA) cuyos sitios de escisión existen en el sitio de multiclonación. Después de que se digirió la unidad que expresa cadena L o cadena H de brazo derecho de anticuerpo biespecífico quimérico (respectivamente, aproximadamente 1,6 kb o aproximadamente 1,0 kb) con Xho I (TAKARA), se purificó mediante el uso del kit de purificación de PCR QIAquick (QIAGEN) a través del procedimiento descrito en el manual de instrucciones adjunto, los extremos se mitigarán con polimerasa de ADN con KOD (TOYOBO) mediante reacción a 72°C durante 10

minutos en la solución de la reacción descrita en el manual de instrucciones adjunto. Los fragmentos con extremos cortantes se purificaron mediante el uso del kit de purificación de PCR QIAquick (QIAGEN) a través del procedimiento descrito en el manual de instrucciones adjunto y se digirieron con Not I (TAKARA). Los fragmentos cortantes Not I (aproximadamente 1,6 kb y 1,0 kb, respectivamente) y pcDNA4 que habían sido digeridos con Eco RV-Not I se ligaron mediante el uso de Ligation High (TOYOBO) de conformidad con el procedimiento descrito en el manual de instrucciones adjunto. La cepa  $\alpha$  DH5 de *E. coli* (Competent high DH5  $\alpha$  (TOYOBO)) se transformó con la solución de reacción. Los ADN de plásmidos respectivos se aislaron de los clones resistentes a ampicilina obtenidos mediante el uso del kit QIAprep Spin Miniprep (QIAGEN).

Para el otro brazo (por ejemplo, conocido como la molécula HL de brazo izquierdo), se preparó pIND-g4H o pIND-g4L, en el cual corriente abajo de las regiones correspondientes de la cadena H o cadena L (figura 2 o 3), esto es, la secuencia de señal para células animales (IL3ss) (EMBO. J. 1987; 6: 2939), una región variable de anticuerpo de ratón (VH o VL) y región constante IgG4yb humana adecuadas (SEQ ID NO: 46) o región constante  $\kappa$  (SEQ ID NO: 45) se incorporaron al vector que induce análogos de ecdisona pIND (Invitrogen) de conformidad con el procedimiento descrito anteriormente. Después se aislaron los ADN de plásmidos respectivos tal como se describió anteriormente.

### 3-5. Construcción de vectores de expresión de anticuerpos biespecíficos

El plásmido de expresión que induce tetraciclina (pcDNA4-g4H o pcDNA4-g4L) preparado en el ejemplo 3-4 se digirió con Sfi I, y la solución de reacción se sometió a electroforesis en gel de agarosa al 1%. Los fragmentos (aproximadamente 5 kb) de los cuales se había quitado la región variable de anticuerpos presente originalmente (VH o VL (ver figura 1 o 2)) se purificaron mediante el uso del kit de extracción en gel QIAquick (QIAGEN) a través del procedimiento descrito en el manual de instrucciones adjunto, y se eluyeron mediante el uso de 30  $\mu$ L de agua esterilizada. Estos fragmentos y sus fragmentos Sfi I-VH o Sfi I-VL correspondientes, derivados del anticuerpo F. IXa digerido con Sfi I preparado en el ejemplo 3-3, se ligaron mediante el uso del kit de ligación Quick (New England Biolabs) de conformidad con el procedimiento descrito en el manual de instrucciones adjunto. La cepa DH5  $\alpha$  de *E. coli* (Competent high DH5 $\alpha$  (TOYOBO)) se transformó con la solución de reacción. Además, el fragmento del cual se había quitado la región variable del anticuerpo (VH o VL, ver figura 3 o 2) del plásmido de expresión que induce análogos de ecdisona digerido con Sfi I (ejemplo 3-4, pIND-g4H o pIND-g4L) mediante un procedimiento similar al descrito anteriormente, y el fragmento Sfi I-VH o Sfi I-VL derivado del anticuerpo anti-F. X digerido con Sfi I se incorporaron a través de un procedimiento similar al descrito anteriormente.

Se confirmó que los transformantes resistentes a la ampicilina respectivos resultantes tienen la inserción del fragmento deseado mediante el uso de un cebador que sostiene el fragmento insertado a través del procedimiento PCR de colonia. En primer lugar, para el vector de expresión de cadena L o cadena H quimérica del anticuerpo anti-F. IXa, se sintetizó (Sigma Genosys) el cebador CMVF (SEQ ID NO: 47), que es 21-mer y se templa al sitio de cebador directo CMV que existe corriente arriba en el sitio de inserción, y el cebador BGHR (SEQ ID NO: 48), que es 18-mer y se templa al sitio de cebador inverso CMV que existe corriente abajo en el sitio de inserción. Para el vector de expresión de cadena L o cadena H quimérica del anticuerpo anti-F. X, se sintetizó (Sigma Genosys) el cebador EcdF (SEQ ID NO: 49), que es 24-mer y se templa corriente arriba del sitio de inserción, y el cebador BGHR (SEQ ID NO: 48), que es 18-mer y se templa al sitio de cebador inverso BGH que existe corriente abajo del sitio de inserción. Para la PCR de colonia, se prepararon 20  $\mu$ L de la solución de reacción (0,2  $\mu$ L cada 10  $\mu$ M de cebador, tampón con cantidad reducida de KOD (TOYOBO), 0,2 mM de dNTP, 0,75 unidades de polimerasa de ADN con cantidad reducida de KOD (TOYOBO)). Se agregó la cantidad adecuada de los transformantes a la solución de reacción, y se llevó a cabo la PCR. La PCR se llevó a cabo mediante el uso del sistema por PCR Thermal Cycler GeneAmp 9700 (Perkin Elmer) en las condiciones de calentamiento a 96°C durante 1 minuto, seguido de 30 ciclos de reacciones a 96°C durante 10 segundos, 55°C durante 10 segundos, y 72°C durante 30 segundos. Después de la realización de la PCR, la solución de reacción se sometió a electroforesis en gel de agarosa al 1%, y se seleccionaron los clones cuyos fragmentos amplificados tenían el tamaño deseado. En los productos de PCR, los cebadores excesivos y dNTP se inactivaron mediante el uso de ExoSAP-IT (Amersham Biosciences) de conformidad con el manual de instrucciones adjunto. La secuencia de nucleótidos de cada fragmento de ADN se determinó mediante el uso del kit de Secuenciación BigDye Terminator Cycle (Applied Biosystems) con analizador genético de secuenciador de ADN ABI PRISM 3100 (Applied Biosystems) de conformidad con el manual de instrucciones adjunto. Las secuencias determinadas por el presente procedimiento se analizaron mediante el uso del software analizador GENETYX-SV/RC Versión 6.1 (Genetyx), se seleccionaron los clones deseados en los cuales no se introdujeron VH, inserciones, eliminaciones, mutaciones y similares, y los clones deseados en los cuales no se introdujeron VL, inserciones, eliminaciones, mutaciones y similares diferentes del pseudo gen VL derivado de P3U1 utilizado en hibridomas.

Los ADN de plásmidos respectivos se aislaron de los clones deseados mediante el uso del kit QIAprep Spin Miniprep (QIAGEN) y se disolvieron en 100  $\mu$ L de agua esterilizada. El vector de expresión de cadena H quimérica del anticuerpo anti-F IXa, el vector de expresión de cadena L quimérica del anticuerpo anti-F IXa, el vector de expresión de cadena H quimérica del anticuerpo anti-F X y el vector de expresión de cadena L quimérica del anticuerpo anti-F X se conocen como pcDNA4-g4IXaHn, pcDNA4-g4IXaLn, pIND-g4XHn, y pIND-g4XLn. Las soluciones de plásmidos respectivas se conservaron a 4°C hasta su uso.

## [Ejemplo 4] Expresión de anticuerpos biespecíficos quiméricos

## 4-1. Preparación de soluciones de ADN

Los vectores de expresión para la molécula HL de brazo derecho del anticuerpo (pcDNA4-g4IXaHn y pcDNA4-g4IXaLn) se inducen con tetraciclina. Con el fin de eliminar por completo la expresión en ausencia de tetraciclina, se requiere un plásmido pcDNA6/TR (Invitrogen) que codifique el represor Tet. Además, los vectores de expresión para la molécula HL de brazo izquierdo del anticuerpo (pIND-g4XHn y pIND-g4XLn) se inducen mediante el análogo de ecdisona (Ponasterona A), que es una hormona de insectos. De esta forma, se requiere un plásmido pVgRXR (Invitrogen), que codifique un receptor de ecdisona que reaccione con Ponasterona A e induzca expresión y un receptor retinoide X. Por lo tanto, se preparó un total de 6 tipos de soluciones mixtas de ADN de plásmidos para transfectar las células animales. Para 1 mL de cultivo celular, se utilizaron 218,8 ng cada pcDNA4-g4IXaHn, pcDNA4-g4IXaLn, pIND-g4XHn, y pIND-g4XLn, y 1312,5 ng cada pcDNA6/TR y pVgRXR.

## 4-2. Transfección de células animales

La cepa HEK293H (Invitrogen) derivada de la célula renal fetal humana se suspendió en medio DMEM que contiene FCS al 10% (MOREGATE), 1 mL de este ( $5 \times 10^5$  células/mL) se colocó en cada pocillo de una placa de 12 pocillos para una célula adherente (CORNING) cultivada en una incubadora de CO<sub>2</sub> (37°C, CO<sub>2</sub> al 5%). La mezcla de ADN de plásmidos preparada en el ejemplo 4-1 y 7 µL de reactivo de transfección, Lipofectamina 2000 (Invitrogen) se agregaron a 250 µL de medio Opti-MEM I (Invitrogen) y se dejó reposar a temperatura ambiente durante 20 minutos, y la mezcla resultante se agregó a las células en cada pocillo, y luego se incubó durante 4 a 5 horas en una incubadora de CO<sub>2</sub> (a 37°C, CO<sub>2</sub> al 5%).

## 4-3. Expresión inducida de anticuerpos IgG biespecíficos

Tal como se describió anteriormente, el medio se quitó mediante aspiración desde el cultivo celular transfectado, y luego se agregó a este 1 mL de medio CHO-S-SFM-II (Invitrogen) que contenía 1 µg/mL de tetraciclina (Wako Pure Chemical Industries, Ltd.) y se cultivó durante un día en una incubadora de CO<sub>2</sub> (a 37°C, CO<sub>2</sub> al 5%) para inducir la expresión primaria de la molécula HL de brazo derecho del anticuerpo. Posteriormente, el medio se quitó mediante aspiración y las células se lavaron una vez con 1 mL de medio CHO-S-SFM-II. Se agregó 1 mL de medio CHO-S-SFM-II que contenía 5 µM de Ponasterona A (Invitrogen) y las células se cultivaron durante 2 o 3 días en una incubadora de CO<sub>2</sub> (a 37°C, CO<sub>2</sub> al 5%) para inducir la expresión secundaria de la molécula HL de brazo izquierdo del anticuerpo y secretar un anticuerpo IgG biespecífico en el medio. Luego de que se recolectó el sobrenadante de cultivo, las células se quitaron mediante centrifugación (a aproximadamente 2.000x g durante 5 minutos a temperatura ambiente) y, en caso necesario, la solución resultante se concentró mediante el uso de Microcon<sup>®</sup> YM-50 (Millipore). Después se conservó esta muestra a 4°C hasta su uso.

## [Ejemplo 5] Determinación cuantitativa de concentración de IgG humana

Se preparó 1 µg/mL de anticuerpo purificado de afinidad de cabra a Fc IgG humano (Cappel) con el tampón de recubrimiento y se inmovilizó en una placa Nunc-Immuno. Después de que la placa se bloqueó con el tampón de dilución (DB), se agregó la muestra de sobrenadante de cultivo, diluida adecuadamente mediante el uso de DB. Además, como el estándar para calcular la concentración del anticuerpo, se agregó de forma similar una serie de dos diluciones de IgG4 humana (anticuerpo anti-TF humanizado, ver WO 99/51743) que se produjo mediante una dilución de 11 etapas desde 1000 ng /mL mediante el uso de DB. Después de que la muestra se lavó tres veces, se hizo reaccionar IgG anti-humana de cabra y fosfatasa alcalina (Biosource International). Después de que la mezcla se lavó cinco veces, se tiñó sustrato de fosfatasa Sigma 104<sup>®</sup> (Sigma-Aldrich) como un sustrato, se midió la absorbancia a 405 nm con una longitud de onda de referencia de 655 nm mediante el uso de un lector de absorbancia modelo 3550 (Bio-Rad Laboratories). Se midió la concentración de IgG humana en el sobrenadante de cultivo a partir de la curva estándar mediante el uso del software Microplate Manager III (Bio-Rad Laboratories).

## [Ejemplo 6] Ensayo de actividad similar al factor VIII de coagulación (F. VIIIa) de activación

La actividad similar al F. VIIIa del anticuerpo biespecífico se evaluó mediante el siguiente ensayo de enzimas. Además, todas las siguientes reacciones se llevaron a cabo a temperatura ambiente. Una mezcla de 40 µL de Factor IX (3,75 µg/mL, Enzyme Research Laboratories) y 10 µL de la solución de anticuerpos se incubaron durante una hora en una placa de 96 pocillos. De forma adicional, se agregaron a esta 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 fosfolípidos (400 µg/mL, ver ejemplo 1-3), y 15 µL de TBSB que contenía 5 mM de CaCl<sub>2</sub> y 1 mM de MgCl<sub>2</sub> (en adelante denominada TBSB-S), y se inició la reacción de enzimas. Después de que la reacción se llevó a cabo durante 30 minutos, se detuvo mediante la adición de 10 µL de EDTA 0,5M.

Después de que se agregaron 50 µL de solución de sustrato colorimétrico a cada pocillo, se midió la absorbancia a 405 nm (longitud de onda de referencia, 655 nm) a 0 minuto y 30 minutos mediante el uso de un lector de microplaca modelo 3550 (Bio-Rad Laboratories). La actividad similar al F. VIIIa se representó mediante el valor en el cual se sustrajo el valor de cambio de absorbancia en ausencia de anticuerpo durante 30 minutos desde este en presencia del anticuerpo durante 30 minutos (ver figuras 4 y 5).

TBSB se utilizó como un solvente de fosfolípidos, y TBSB-S se utilizó como un solvente de Factor XIa, Factor IX, y Factor X. La solución de sustrato colorimétrico fue la mezcla de sustrato colorimétrico "tesutochimu" S-2222 (Chromogenix) que se había disuelto de conformidad con el manual de instrucciones adjunto y solución de polibreno (0,6 mg/L de bromuro de hexadimetrina (Sigma)) en una relación de 1:1.

- 5 Asimismo, para XB12/SB04 que tiene la mayor actividad, se midió la dependencia de concentración de la actividad similar al F. VIIIa (figura 6).

[Ejemplo 7] Ensayo de coagulación en plasma

10 Para determinar si los anticuerpos biespecíficos de la presente invención son capaces de corregir la capacidad de coagulación de la sangre de hemofilia A, se examinó el efecto de estos anticuerpos sobre el tiempo de tromboplastina parcial activada (APTT) con el uso de plasma carente de F. VIII. Una mezcla de 50  $\mu$ L de una solución de anticuerpos que tiene una variedad de concentraciones, 50  $\mu$ L de plasma carente de F. VIII (Biomerieux), y 50  $\mu$ L del reactivo de APTT (Dade Behring), se calentó a 37°C durante 3 minutos. La reacción de coagulación se inició mediante la adición de 50  $\mu$ L de 20 mM de  $\text{CaCl}_2$  (Dade Behring) a la mezcla. Se midió el período de tiempo hasta la coagulación con KC10A (Amelung) conectado a CR-A (Amelung) (figuras 7 y 8).

- 15 Asimismo, se midió la dependencia de concentración de XB12/SB04 que presentó el mayor efecto de reducción del tiempo de coagulación (figura 9).

[Ejemplo 8] Purificación de anticuerpos

20 10 mL del sobrenadante de cultivo obtenido mediante el procedimiento descrito en el ejemplo 4 se concentraron hasta 1 mL a través de Centricon<sup>®</sup> YM-50 (Millipore). A esto, se agregaron 10  $\mu$ L de BSA al 10%, 10  $\mu$ L de Tween<sup>®</sup> 20 al 1%, y 100  $\mu$ L de rProteína A Sepharose<sup>™</sup> de flujo rápido (Amersham Biosciences) y se mezclaron mediante inversión durante la noche a 4°C. La solución se transfirió a una taza de filtro de 0,22  $\mu$ m, Ultrafree<sup>®</sup>-MC (Millipore) y se lavó tres veces con 500  $\mu$ L de TBS que contenía Tween<sup>®</sup> 20 al 0,01%. Posteriormente, se suspendió resina de rProteína A Sepharose<sup>™</sup> en 10 mM de HCl, pH 2,0 que contenía 100  $\mu$ L de Tween<sup>®</sup> 20 al 0,01% y se dejó reposar durante 3 minutos, y después se eluyó el anticuerpo. Inmediatamente después de esto, se agregaron 5  $\mu$ L de Tris-HCl 1 M, pH 8,0 y se neutralizaron. Se midió la concentración de IgG humana en el sobrenadante de cultivo a partir de la curva estándar mediante el uso del software Microplate Manager III (Bio-Rad Laboratories). La concentración de anticuerpos se determinó cuantitativamente de conformidad con el ejemplo 5.

[Ejemplo 9] GST-AP de ensayo de inmunotransferencia Western del anticuerpo anti-F.X

30 Se construyó *E. coli* recombinante para expresar la proteína de fusión (GST AP) entre el péptido activado de F. X (AP) y glutatión S transferasa (GST). Después que se amplificó el ADNc que cubre la región de traducción de longitud completa del F. X humano a partir de ADNc "Marathon-ready" (Clontech) de hígado humano mediante el procedimiento de PCR, se utilizó de forma adicional como una plantilla para amplificar la región de codificación de la región AP (Leytus et al., Biochemistry 1986; 25: 5098) a través del procedimiento de PCR, y después se subclonó en el vector pGEM-T (Promega) para obtener pGEX-F10AP que codifica GST-AP. *E. coli* que se transformó con este plásmido se cultivó, y se agregó 1 mM de IPTG cuando el OD 600 alcanzó 0,8 para inducir la expresión de GST-AP. Después que se centrifugó el medio de cultivo (a 3.000x g, durante 30 minutos, a 4°C), se recolectaron los cuerpos bacterianos y se almacenaron a -20°C hasta su uso.

40 El sedimento del cuerpo bacteriano se volvió a suspender en un volumen de cultivo 1/20 de PBS. Se agregó tampón de muestra SDS-PAGE (IWAKI) en una relación de 2,4 mL por 0,1 mL de la suspensión, que después se hirvió a 95°C durante 5 minutos. Se agregaron 10  $\mu$ L de la solución de reacción a cada pocillo del gel SDS-PAGE mini (14%) (Asahi Techno Glass Corporation), y se llevó a cabo electroforesis. El gel tratado con electroforesis se transfirió a una membrana de transferencia Immobilon-P<sup>™</sup> (Millipore) mediante el uso de un papel semi seco (BIO-RAD), y la membrana se bloqueó con BT-PBS (PBS que contenía BSA al 2% y Tween<sup>®</sup> 20 al 0,05%). Después de que se completó el bloqueo, la membrana se hizo reaccionar durante una hora con anticuerpo de ratón anti-F. X SB04 o SB06, que se purificaron en el ejemplo 1-4 y se diluyeron con BT-PBS hasta 2  $\mu$ g/mL. Después de lavar con PBS que contenía Tween<sup>®</sup> 20 al 0,05%, la membrana se hizo reaccionar durante una hora con IgG anti ratón marcada con fosfatasa alcalina (H+L) (Zymed Laboratories) que se diluyó hasta 1/2000 con BT-PBS. Después de lavar con PBS que contenía Tween<sup>®</sup> 20 al 0,05%, a membrana se hizo reaccionar con sustrato de fosfatasa de sustrato colorimétrico BCIP/NBT (Kirkegaard & Perry Laboratories) (ver figura 10).

- 50 [Ejemplo 10] Adquisición de anticuerpos biespecíficos a partir de la biblioteca scFv derivada de bazos de ratón inmunizados

10-1. Antígeno e inmunización

55 Tres ratones BALB/c (machos, de 6 semanas de edad al inicio de la inmunización, Charles River Laboratories Japan), tres ratones MRL/1pr (machos, de 6 semanas de edad al inicio de la inmunización, Charles River Laboratories Japan), y tres ratones C57BL/6N (machos, de 6 semanas de edad al inicio de la inmunización, Charles River Laboratories Japan) se inmunizaron contra un antígeno, Factor IXa $\beta$  (Enzyme Research Laboratories, Inc.) o

Factor X (Enzyme Research Laboratories, Inc.) tal como se describe a continuación. Como preparación, se administraron subcutáneamente 40 µg/cabeza de un antígeno emulsionado con adyuvante completo de Freund (FCA) (H37 Ra, Difco Laboratories). Después de dos semanas, se administraron subcutáneamente 40 µg/cabeza de un antígeno emulsionado con adyuvante incompleto de Freund (FIA) (Difco Laboratories). Después, las inmunizaciones de estimulación se administraron tres veces en intervalos semanales. Ocho días después de la inmunización final, se extrajeron los bazos.

## 10-2. Construcción de biblioteca de fagos

Las partes de los bazos extraídos de los ratones inmunizados que se prepararon en los ejemplos 1-1 y 2-1, y los bazos extraídos de los ratones inmunizados preparados en el ejemplo 10-1 se agregaron a Trizol Reagent (Invitrogen) (50 mg de bazo/mL del reactivo) y se homogeneizaron mediante el uso de un homogeneizador de vidrio. Posteriormente, de conformidad con el procedimiento descrito en el manual de instrucciones adjunto al reactivo, se extrajeron todos los ARN. Los ARN Poly A (+) se extrajeron de la extracción mediante el uso del kit PolyAtract System 1000 (Promega) de conformidad con el procedimiento descrito en el manual de instrucciones adjunto. Los ADNc se sintetizaron mediante RT-PCR (Sistema de síntesis de primera cadena SuperScript III para RT-PCR, Invitrogen), y se almacenaron a -20°C hasta su uso.

Como cebadores para la amplificación del ADNc de región variable de cadena H de anticuerpo de ratón (VH) y del ADNc de región variable de cadena L de anticuerpo de ratón (VL), se preparó la mezcla de cebador HB, la mezcla de cebador HF, la mezcla de cebador LB y la mezcla de cebador LF que se utilizaron en los ejemplos 3-2 y 3-3. Como cebadores para la amplificación de VH, se utilizaron 1 µL cada 100 µM de mezcla de cebador HB y 100 µM de mezcla de cebador HF para preparar 50 µL de la solución de la reacción (2,5 µL de solución de ADNc, tampón con KOD adicional (TOYOBO), 0,2 mM de dNTPs, 1,5 mM de MgCl<sub>2</sub>, 3,75 unidades de polimerasa de ADN con KOD adicional (TOYOBO)). Como cebadores para la amplificación de VL, se utilizaron 1 µL cada 100 µM de mezcla de cebador LB y 100 µM de mezcla de cebador LF para preparar 50 µL de la solución de reacción que tiene componentes similares a la solución descrita anteriormente. La PCR se llevó a cabo mediante el uso del sistema de PCR Thermal Cycler GeneAmp 9700 (Perkin Elmer) en las condiciones de calentamiento a 98°C durante 3 minutos, seguido de 32 ciclos de reacciones a 98°C durante 20 segundos, 58°C durante 20 segundos, y 72°C durante 30 segundos. Después que se llevó a cabo la PCR, la solución de reacción se sometió a electroforesis en gel de agarosa al 2%. Los fragmentos amplificados del tamaño deseado (aproximadamente 400 bp) se purificaron mediante el uso del kit de extracción en gel QIAquick (QIAGEN) a través del procedimiento descrito en el manual de instrucciones adjunto y se eluyeron mediante el uso de 50 µL de agua esterilizada. Después, para amplificar los fragmentos scFv, se prepararon 10 muestras de 100 µL de solución de reacción (3 µL de solución de fragmento VH, 3 µL de solución de fragmento VL, tampón con KOD adicional (TOYOBO), 0,2 mM de dNTPs, 1 mM de MgCl<sub>2</sub>, y 5 unidades de polimerasa de ADN con KOD adicional (TOYOBO)) y la primera PCR se realizó en las condiciones de calentamiento a 94°C durante 3 minutos, seguido de 7 ciclos de reacciones a 94°C durante 1 minuto y 63°C durante 4 minutos. La solución de la reacción se mantuvo a 63°C y después se agregaron 2,5 µL cada 10 µM de cebador scfor y 10 µM de cebador scback a cada tubo, y después se llevó a cabo la segunda PCR (calentamiento a 94°C durante 35 segundos, seguido de 30 ciclos de reacciones a 94°C durante 2 minutos y 63°C durante 2 minutos). Después de la realización de la PCR, la solución de reacción se purificó mediante el kit de purificación de PCR QIAquick (QIAGEN), y los productos purificados se digirieron con enzima de restricción Sfi I (TAKARA) a 50°C durante la noche. Los productos de digestión se sometieron a electroforesis en gel de agarosa al 2%, y los fragmentos amplificados del tamaño deseado (aproximadamente 800 bp) se purificaron mediante el uso del kit de extracción en gel QIAquick (QIAGEN) a través del procedimiento descrito en el manual de instrucciones adjunto y después se eluyeron con una cantidad adecuada de agua esterilizada. Para la presentación de scFv sobre proteína del gen III de fagos, se utilizó pELBGlacl (ver figura 11) como un vector de fagémidos. Después que se digirieron 10 µg del vector con enzima de restricción Sfi I (TAKARA) a 50°C durante la noche, los fragmentos digeridos del tamaño deseado (aproximadamente 5 kp) se purificaron mediante el uso del kit de extracción en gel QIAquick (QIAGEN) a través del procedimiento descrito en el manual de instrucciones adjunto y se eluyeron con una cantidad adecuada de agua esterilizada. Los productos de PCR purificados y los fragmentos del vector purificado se ligaron a 16°C durante la noche mediante el uso de Ligation High (TOYOBO) de conformidad con el procedimiento descrito en el manual de instrucciones adjunto. La solución resultante se utilizó para transformar células electrocompetentes XL1blue de *E. coli* (Stratagene) o electromax DH12s (Invitrogen) mediante un procedimiento de electroporación de conformidad con el procedimiento descrito en el manual de instrucciones adjunto. Se recogieron todos los transformantes resistentes a ampicilina obtenidos y se almacenaron a -20°C hasta su uso como biblioteca de *E. coli* recombinante.

La biblioteca de *E. coli* ( $2 \times 10^9$  cfu) se colocó 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 el valor 600 OD alcanzó 0,4 a 0,5. Se agregó fago Helper VC5M13 (Stratagene) ( $4 \times 10^{11}$ ) y se dejó reposar a 37°C durante 15 minutos para la infección. A esto, se agregaron 450 mL de 2x YTAG (2x TY que contenía 100 µg/mL de ampicilina y 25 µg/mL de kanamicina) y 25 µL de IPTG (1 mol/L), y se cultivaron a 30°C durante 10 horas. El sobrenadante del cultivo se recolectó mediante centrifugación y se mezcló con 100 mL de solución PEG-NaCl (polietilenglicol 8000 al 10%, 2,5 mol/L de NaCl), y después se dejó reposar a 4°C durante 60 minutos. Los fagos se precipitaron mediante centrifugación a 10.800x g durante 30 minutos y los precipitados se suspendieron en 40 mL de agua. Esto se mezcló con 8 mL de solución PEG-NaCl y después se

dejó reposar a 4°C durante una hora. Los fagos se precipitaron mediante centrifugación a 10.800x g durante 30 minutos y después se suspendieron en 5 mL de PBS para obtener una biblioteca de fagos. Después se conservó la biblioteca de fagos a 4°C hasta su uso.

#### 10-3. Concentración de unión de fagos mediante procedimiento de cribado

5 El Factor IXaβ o Factor X se biotiniló mediante el uso de Microtubos NHS-PEO<sub>4</sub>-Biotina sin medición previa (Pierce). Se agregaron 100 pmol del Factor IXaβ o Factor X biotinilado a 600 μL de la solución de biblioteca de fagos preparada en el ejemplo 10-2, y se puso en contacto con el antígeno durante 60 minutos. Se agregaron 600 μL de estreptavidina Dynabeads M-280 (DYNAL) lavados con M-PBS al 5% (PBS que contenía leche descremada al 5% en p/v) y la reacción aglutinante se llevó a cabo durante 15 minutos. Después que los fagos que unen cuentas se lavaron varias veces con 1 mL de PBST (PBS que contenía Tween-20 al 0,1%), se lavaron con PBS. Las cuentas se suspendieron en 0,8 mL de glicina/HCl (0,1 mol/L, pH 2,2) durante 5 minutos y los fagos se eluyeron.

10 De forma alternativa, se agregó la biblioteca de fagos (80 μL/pocillo x 5) incubada durante 15 minutos con leche descremada al 2,5% en p/v al Factor IXaβ o Factor X (10 μg/pocillo x 5) inmovilizado sobre Inmunoplaaca (MaxiSorp, Nunc), y se puso en contacto con el antígeno durante 60 minutos. Los fagos de unión al antígeno se lavaron varias veces con 1 mL de PBST y después se lavaron con PBS. Se suspendieron en 0,8 mL de glicina/HCl (0,1 mol/L, pH 2,2) durante 5 minutos y los fagos se eluyeron.

15 La solución de fagos recolectada se neutralizó mediante la adición de 45 μL de 2 mol/L Tris. Después se agregó a 10 mL de XL1-Blue en fase de crecimiento logarítmico (OD 600 = 0,4 a 0,5) y se dejó reposar a 37°C durante 30 minutos para infectar las células. Esto se colocó en placas 2x YTAG, y se cultivó a 30°C. Las colonias se recolectaron, inocularon en 2x YTAG y se cultivaron a 37°C hasta que OD 600 alcanzó 0,4 a 0,5. Se agregaron 5 μL de IPTG (1 mol/L) y 1 x 10<sup>11</sup> pfu de fago helper (VCSM13) a 10 mL del cultivo, y se dejaron reposar a 37°C durante 30 minutos. Después de que las células se recolectaron mediante centrifugación, se volvieron a suspender en 100 mL de 2x YTAG, y se cultivaron a 30°C durante 10 horas. El sobrenadante de cultivo se recolectó mediante centrifugación, se mezcló con 20 mL de solución PEG-5 mol/L NaCl al 10%, y se dejó reposar a 4°C durante 20 minutos. Los fagos se precipitaron mediante centrifugación a 10.800x g durante 30 minutos. El precipitado se suspendió en 2 mL de PBS y esto se utilizó para el cribado posterior.

#### 10-4. ELISA de fagos

20 Las colonias únicas descritas anteriormente se inocularon en 100 μL de 2x YTAG y se cultivaron a 30°C durante la noche. Después que 5 μL del cultivo se inocularon en 500 μL de 2x YTAG y se cultivaron a 37°C durante 5 horas, se agregaron 2 x 10<sup>8</sup> pfu de fago helper y se dejaron reposar a 37°C durante 30 minutos. Asimismo, esto se cultivó con agitación a 37°C durante 30 minutos, y después se agregaron a este 120 μL de 2x YTAG que contenían 0,5 mM de IPTG. Esto se cultivó a 30°C durante la noche y el sobrenadante después de la centrifugación se sometió a ELISA. Con el fin de llevar a cabo ELISA para los clones obtenidos mediante cribado del antígeno biotinilado, se utilizó placa de microtitulación StreptaWell 96 (Roche) recubierta con 1,0 μg/mL de antígeno biotinilado. Además, para llevar a cabo ELISA para los clones obtenidos mediante cribado de un antígeno natural, se utilizó Immunoplate (MaxiSorp, Nunc) al cual se le inmovilizó 1,0 μg/mL del antígeno natural. Después de que las placas se lavaron con PBST para quitar los antígenos, se llevó a cabo bloqueo a temperatura ambiente durante una hora con el uso de 200 μL de M-PBS al 2% o BSA-PBS al 2% (PBS que contenía BSA p/v al 2%) como tampón de bloqueo. Se quitó el tampón, y el sobrenadante del cultivo se agregó a este y se dejó reposar durante 60 minutos para unir los fagos. Después de que se lavaron las placas, los fagos de unión se detectaron mediante anticuerpo anti-M13 conjugado con HRP (Amersham Pharmacia Biotech) y sustrato TMB (Zymed). La reacción se detuvo mediante la adición de 1 mol/L de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Después se midió A450 mediante el uso de un lector de placas.

#### 10-5. Secuenciación y selección de clones

25 Los cultivos 2x YTAG recombinantes de *E. coli* de clones positivos en ELISA se utilizaron para amplificar la región scFv mediante PCR a través de cebadores de PBG3-F1 (5'-CAGCTATGAAATACCTATTGCC-3'/SEQ ID NO: 38) y PBG3-R1 (5'-CTTTTCATAATCAAATCACCGG-3'/ SEQ ID NO: 39) y se determinó su secuencia de nucleótidos. 1 μL del cultivo, 1,5 μL de 10x tampón con una cantidad reducida de KOD, 0,2 μL cada 10 μmol/L de cebadores, y 15 μL de solución de reacción PCR que contenía 0,3 μL de polimerasa con una cantidad reducida de KOD (2,5 U/L, TOYOBO) se utilizaron para la amplificación mediante 30 ciclos de reacciones a 96°C durante 10 segundos, 55°C durante 10 segundos, y 72°C durante 30 segundos con el uso del sistema de PCR Thermal Cycler GeneAmp 9700 (Perkin Elmer). Después de la realización de la PCR, se agregaron 3 μL de ExoSAP-IT (Amersham) a 5 μL de la solución de la reacción, y se mantuvo a 37°C durante 15 minutos y posteriormente a 80°C durante 15 minutos. Esta muestra se utilizó para la PCR con el uso de PBG3-F2 (5'-ATTGCCTACGGCAGCCGCT-3'/SEQ ID NO: 40) o PBG3-R2 (5'-AAATCACCGGAACAGAGCC-3'/SEQ ID NO: 41) como un cebador, con kit de secuenciación BigDye Terminator Cycle (Applied Biosystems), y los productos se sometieron a electroforesis con secuenciador de ADN PRISM 3700 de Applied Biosystems. Se seleccionaron 52 clones, donde cada uno tenía una secuencia de aminoácidos diferente de CDR3 deducida de la secuencia de nucleótidos, para anti-Factor IXa, y se seleccionaron 33 clones para anti-Factor X.

## 10-6. Construcción de vectores de expresión de anticuerpos IgG biespecíficos

Para expresar el anticuerpo scFv como tipo IgG, las regiones variables de anticuerpos (VH, VL) se clonaron en vectores de expresión inducibles mediante un procedimiento similar a los ejemplos 3-3, 3-4 y 3-5. Las regiones variables del anticuerpo anti-F IXa (VH y VL) se incorporaron en vectores que inducen tetraciclina (pcDNA4-g4H y pcDNA4-g4L, respectivamente). Las regiones variables del anticuerpo anti-F X (VH y VL) se incorporaron en vectores que inducen análogos de ecdisona (pIND-g4H y pcDNA4-g4L, respectivamente). Los ADN de plásmidos respectivos se aislaron de los clones deseados mediante el uso del kit QIAprep Spin Miniprep (QIAGEN) y se disolvieron en 100 µL de agua esterilizada.

## 10-7. Expresión de anticuerpos biespecíficos quiméricos en células animales

Mediante el uso de soluciones de ADN preparadas a través de un procedimiento similar al descrito en el ejemplo 4-1, los anticuerpos se expresaron en células animales a través de un procedimiento similar al descrito en los ejemplos 4-2 y 4-3 y los sobrenadantes de cultivo se recogieron. Después se almacenaron las muestras a 4°C hasta su uso.

## [Ejemplo 11] Purificación de anticuerpos

Se agregaron 100 µL de rProteína A Sepharose™ de flujo rápido (Amersham Biosciences) a 10 mL de los sobrenadantes del cultivo obtenidos en el ejemplo 10-7, y después se mezclaron mediante inversión durante la noche a 4°C. Las soluciones se transfirieron a una taza de filtro de 0,22 µm Ultrafree® -MC (Millipore) y se lavaron tres veces con 500 µL de TBS que contenía Tween® 20 al 0,01%. Se suspendió resina de rProteína A Sepharose™ en 10 mM de HCl (pH 2,0) que contenía 100 µL de Tween® 20 al 0,01 % y se dejó reposar durante 3 minutos, tras lo cual se eluyeron los anticuerpos. Inmediatamente después de esto, se agregaron 5 µL de Tris-HCl 1 M, pH 8,0 y se agregaron para la neutralización. La concentración de IgG humana en los sobrenadantes de cultivo se calculó a partir de la curva estándar de IgG4 humana (anticuerpo anti-TF humanizado, ver WO 99/51743) con el uso del software Microplate Manager III (Bio-Rad Laboratories). Las concentraciones de anticuerpos se determinaron de conformidad con el ejemplo 5.

## [Ejemplo 12] Ensayo de actividad similar al F. VIIIa

Las actividades similares al F. VIIIa de los anticuerpos biespecíficos se evaluaron mediante el siguiente ensayo de enzimas. Además, todas las siguientes reacciones se llevaron a cabo a temperatura ambiente. La mezcla de 10 µL de 15 µg/mL de Factor IX (Enzyme Research Laboratories), 5 µL de TBSB que contenía 100 mM de CaCl<sub>2</sub> y 20 mM de MgCl<sub>2</sub>, y 50 µL de un sobrenadante del cultivo obtenido a través del procedimiento descrito en el ejemplo 10-7 se incubó durante una hora en una placa de 96 pocillos. Asimismo, 10 µL de 10 ng/mL de Factor XIa (Enzyme Research Laboratories), 20 µL de 50 µg/mL de Factor X (Enzyme Research Laboratories), y 5 µL de 400 µg/mL de fosfolípidos se agregaron a la mezcla para iniciar la reacción de la enzima. Después de llevar a cabo la reacción durante 30 minutos, se detuvo mediante la adición de 10 µL de EDTA 0,5M.

Después que se agregaron 50 µL de solución de sustrato colorimétrico a cada pocillo, se midió la absorbancia a 405 nm (longitud de onda de referencia, 655 nm) a 0 minuto y 60 minutos mediante el uso de un lector de microplaca modelo 3550 (Bio-Rad Laboratories). Las actividades similares al F. VIIIa se representaron mediante los valores en los cuales se sustrajo el valor de cambio de la absorbancia durante 60 minutos de un sobrenadante de cultivo que no expresa anticuerpos al de un sobrenadante del cultivo que expresa anticuerpos (ver figura 12).

Para un solvente de fosfolípidos, se utilizó TBSB de Factor XIa, Factor IX y Factor X. La solución de sustrato colorimétrico es la mezcla de sustrato colorimétrico "tesutochimu" S-2222 (Chromogenix) que se disolvió de conformidad con el manual de instrucciones adjunto y solución de polibreno (0,6 mg/L de bromuro de hexadimetrina (Sigma)) en la relación 1:1.

## [Ejemplo 13] Ensayo de coagulación en plasma

Para determinar si los anticuerpos biespecíficos purificados en el ejemplo 11 recuperaron o no la capacidad de coagulación de la sangre de hemofilia A, se evaluaron los efectos de estos anticuerpos sobre el tiempo de tromboplastina parcial activada (APTT) mediante el uso de plasma carente de F.VIII a través de un procedimiento similar al descrito en el ejemplo 7 (ver figura 13). Asimismo, la dependencia de la concentración se midió para A44/B26 y A69/B26, lo que mostró un gran efecto de reducción del tiempo de coagulación (ver figuras 14 y 15).

## [Ejemplo 14] Consideración del uso combinado de un anticuerpo de IgG biespecífico y F. VIII

Se consideró el uso combinado de un anticuerpo de IgG biespecífico y F. VIII mediante el uso del siguiente ensayo de coagulación en plasma. La mezcla de 40 µL de una solución de anticuerpos (25 µg/mL) y 50 µL de plasma carente de F.VIII (Biomerieux) se incubó a temperatura ambiente durante 30 minutos. Asimismo, a la mezcla se agregaron 10 µL de preparación de factor de coagulación recombinante VIII Kogenate® FS (1 U/mL, BAYER) y 50 µL de reactivo de APTT (Dade Behring), y se calentó a 37°C durante 3 minutos. La reacción de coagulación se inició mediante la adición de 50 µL de CaCl<sub>2</sub> 20 mM (Dade Behring) a la mezcla descrita anteriormente. El período de

tiempo hasta que ocurrió la coagulación se midió mediante el uso de KC 10A (Amelung) conectado a CR-A (Amelung) (ver figura 16).

[Ejemplo 15] Efecto de anticuerpos de IgG biespecíficos sobre plasma inhibidor

5 El efecto de anticuerpos de IgG biespecíficos sobre plasma inhibidor se evaluó mediante el siguiente ensayo de coagulación en plasma. La mezcla de 50  $\mu$ L de plasma carente de F. VIII (Biomerieux) y 10  $\mu$ L de anticuerpo neutralizante F. VIII anti-humano (100  $\mu$ g/mL, Número de catálogo: MAB3440, CHEMICON) se incubó a temperatura ambiente durante 30 minutos. Esto se utilizó como plasma inhibidor. 40  $\mu$ L de solución de anticuerpos (25  $\mu$ g/mL) y 10 50  $\mu$ L de reactivo APTT (Dade Behring) se agregaron a este, y la mezcla se calentó a 37°C durante 3 minutos. La reacción de coagulación se inició mediante la adición de 50  $\mu$ L de 20 mM de  $\text{CaCl}_2$  (Dade Behring) a la mezcla descrita anteriormente. El período de tiempo hasta que ocurrió la coagulación se midió mediante el uso de KC10A (Amelung) al cual se conectó CR-A (Amelung) (ver figura 17).

[Ejemplo 16] Humanización de anticuerpos biespecíficos

15 Entre los anticuerpos biespecíficos obtenidos en los ejemplos 1-7 XB12 (anticuerpo anti-Factor IXa de ratón)/SB04 (anticuerpo anti-Factor X de ratón) que presentaron el mayor efecto de reducción del tiempo de coagulación en sangre, se humanizó de la siguiente manera.

16-1. Búsqueda de homología de anticuerpos humanos

20 Los datos de secuencias de aminoácidos de anticuerpos humanos se obtuvieron 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/>), ambas disponibles públicamente, y la base de datos construida se utilizó para buscar homología en la región variable de cadena XB 1 2-H de ratón, región variable de cadena XB12-L de ratón, región variable de cadena SB04-H de ratón, y región variable de cadena SB04-L de ratón, individualmente. Como resultado, dado que se confirmaron las altas homologías a las siguientes secuencias de anticuerpos humanos, se utilizaron como regiones flanqueantes (en adelante, abreviado como las FR) de un anticuerpo humanizado.

25 (1) región variable de cadena XB12-H: KABATID-020619 (base de datos Kabat) (Mariette *et al.*, *Arthritis Rheum.* 1993; 36:1315-1324)

(2) región variable de cadena XB12-L: EMBL No. de acceso X61642 (base de datos IMGT) (Mark *et al.*, *J Mol Biol.* 1991; 222: 581-597)

(3) región variable de cadena SB04-H: KABATID-025255 (base de datos Kabat) (Demaison *et al.*, *Immunogenetics* 1995; 42: 342-352).

30 (4) región variable de cadena SB04-L: EMBL No. de acceso AB064111 (base de datos IMGT) (datos no publicados)

Después se preparó un anticuerpo humanizado en el cual las regiones determinantes de complementariedad de los anticuerpos de ratón respectivos se implantaron en anticuerpo humano FR de (1)-(4).

35 Asimismo, mediante el uso del sitio web de búsqueda de homología (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>), que también se encuentra disponible públicamente a través de NCBI, se buscaron secuencias de señal secretoria de anticuerpo humano altamente homólogo a los anticuerpos humanos de (1)-(4). Se obtuvieron las siguientes secuencias de señales secretorias y se utilizaron para los subsiguientes procedimientos.

(1) región variable de cadena XB12-H: No. de acceso del Banco de Genes AF062120

(2) región variable de cadena XB12-L: No. de acceso del Banco de Genes M74019

(3) región variable de cadena SB04-H: No. de acceso del Banco de Genes BC019337

40 (4) región variable de cadena SB04-L: No. de acceso del Banco de Genes AY204756

16-2. Construcción de vectores de expresión génica de anticuerpos humanizados

45 Para la secuencia de nucleótidos que codifica una secuencia de aminoácidos a partir de la secuencia de señal secretoria a la región variable de anticuerpos, se prepararon alternativamente 12 oligo ADN de aproximadamente 50 bases de forma tal que se hibriden a este aproximadamente 20 bases en el extremo 3'. Asimismo, se prepararon un cebador que se hibrida al extremo 5' del gen de región variable de anticuerpos y comprende la secuencia de escisión Xho I, y un cebador que se hibrida al extremo 3' del gen de región variable de anticuerpos y comprende la secuencia de escisión Sfi I.

50 Se mezclaron los correspondientes 1  $\mu$ L de oligo ADN sintetizados (2,5  $\mu$ M), se agregaron 1x TaKaRa de tampón Ex Taq, 0,4 mM de dNTPs, y 0,5 unidades de TaKaRa Ex Taq (todos estos obtenidos de TAKARA), y se prepararon de forma tal que la solución de reacción se convirtiera en 48  $\mu$ L. Después de calentar a 94°C durante 5 minutos, se

llevaron a cabo dos ciclos de reacciones a 94°C durante 2 minutos, 55°C durante 2 minutos y 72°C durante 2 minutos, se realizó reacción de elongación y ensamblaje de los oligo ADN sintetizados respectivos. Después, se agregó 1 µL de cebadores (cada 10 µM) que se hibridó al extremo 5' o extremo 3' del gen de anticuerpos, se llevaron a cabo 35 ciclos de reacciones a 94°C durante 30 segundos, 55°C durante 30 segundos, y 72°C durante un minuto, y se hizo reaccionar a 72°C durante 5 minutos para amplificar el gen de región variable de anticuerpos. Después que se llevó a cabo la PCR, la solución de reacción se sometió a electroforesis en gel de agarosa al 1%. Los fragmentos amplificados del tamaño deseado (aproximadamente 400 bp) se purificaron mediante el uso del kit de extracción en gel QIAquick (QIAGEN) a través del procedimiento descrito en el manual de instrucciones adjunto y se eluyeron mediante el uso de 30 µL de agua esterilizada. Los fragmentos se clonaron mediante el uso de pGEM-T Easy Vector Systems (Promega) a través del procedimiento descrito en el manual de instrucciones adjunto. Las secuencias de nucleótidos de los fragmentos de ADN respectivos se secuenciaron mediante el uso del kit de secuenciación BigDye Terminator Cycle (Applied Biosystems) con el secuenciador de ADN ABI PRISM 3700 DNA Sequencer (Applied Biosystems) de conformidad con el procedimiento descrito en el manual de instrucciones adjunto.

Después de que los plásmidos, confirmados para comprender secuencias génicas de región variable de anticuerpos humanizados adecuadas, se digirieron con Xho I y Sfi I, las soluciones de reacción se sometieron a electroforesis en gel de agarosa al 1%. Los fragmentos de ADN que tienen el tamaño deseado (aproximadamente 400 bp) se purificaron mediante el uso del kit de extracción en gel QIAquick (QIAGEN) a través del procedimiento descrito en el manual de instrucciones adjunto y se eluyeron mediante el uso de 30 µL de agua esterilizada. Además, los plásmidos de expresión que inducen tetraciclina (pcDNA4-g4H, pcDNA4-g4L), y plásmidos de expresión que inducen análogos de ecdisona (pIND-g4H, pIND-g4L), que se prepararon en el ejemplo 3-4 y se digirieron con Xho I y Sfi I, fragmentos (aproximadamente 5 kb) que comprenden una región constante de anticuerpos, se purificaron mediante el uso de kit de extracción en gel QIAquick (QIAGEN) a través del procedimiento descrito en el manual de instrucciones adjunto y se eluyeron mediante el uso de 30 µL del agua esterilizada. Los fragmentos del gen de anticuerpos XB12 humanizados, que se habían digerido con Xho I y Sfi I (región variable de cadena H (en adelante, abreviado como VH)) o región variable de cadena L (en adelante, abreviado como VL)), y los plásmidos de expresión que inducen tetraciclina, que se habían digerido con Xho I y Sfi I (pcDNA4-g4H y pcDNA4-g4L), se ligaron mediante el uso del kit de ligación de ADN rápida (Roche Diagnostics) a través del procedimiento descrito en el manual de instrucciones adjunto. Asimismo, los fragmentos del gen de anticuerpos SB04 humanizados, que se habían digerido con Xho I y Sfi I (VH o VL), y los plásmidos de expresión que inducen análogos de ecdisona, que se habían digerido con Xho I y Sfi I (pIND-g4H y pIND-g4L), se ligaron mediante el uso del kit de ligación de ADN rápida (Roche Diagnostics) a través del procedimiento descrito en el manual de instrucciones adjunto. Se utilizó una parte de cada solución de la reacción para transformar la cepa DH5 α de *E. coli* (TOYOBO).

### 16-3. Preparación de anticuerpos biespecíficos humanizados

Mediante el uso de 4 tipos de vectores de expresión de anticuerpos humanizados, pcDNA6/TR, y pVgRXR, la expresión inducida e introducción del gen en HEK293H se llevó a cabo mediante el procedimiento descrito en los ejemplos 4-2 y 4-3. Asimismo, se purificó el anticuerpo y se determinó su concentración a través del procedimiento descrito en los ejemplos 8 y 5.

### 16-4. Evaluación de actividad de anticuerpos biespecíficos humanizados y modificación de secuencias de anticuerpos

Para evaluar la capacidad de coagulación en plasma del anticuerpo biespecífico humanizado y anticuerpo biespecífico quimérico preparados (XB12/SB04), se examinaron los efectos de los anticuerpos sobre APTT mediante el uso de plasma carente de F. VIII de conformidad con el procedimiento del ejemplo 7. Para el anticuerpo biespecífico humanizado cuya capacidad de coagulación sanguínea disminuyó, se modificaron los aminoácidos de los FR de anticuerpos humanos que tienen como objetivo aumentar la actividad. Además, los residuos de cisteína de CDR3 de VH de anticuerpo XB12 que pueden ocasionar la disminución en termoestabilidad y demás fueron modificados a residuos de alanina. Específicamente, se introdujeron las mutaciones en los vectores de expresión de anticuerpos humanizados mediante el uso del kit de mutagénesis dirigida al sitio QuikChange (Stratagene) a través del procedimiento descrito en el manual de instrucciones adjunto. Se obtuvo un anticuerpo biespecífico humanizado (anticuerpo XB12 humanizado (VH:hXB12f A, VL: hXBVL))/anticuerpo SB04 humanizado (VH: hSB04e, VL: hSBVL-F3f) que tenía una actividad de coagulación en sangre equivalente a la de XB12/SB04, mediante la repetición de las modificaciones de aminoácidos en secuencias de FR y la evaluación de la actividad (ver figura 18).

#### [Ejemplo 17] Construcción de vectores de expresión de cadena H de anticuerpos de IgG4 biespecíficos

Asimismo, se expresaron los anticuerpos biespecíficos de A44 y B26 que utilizan una cadena L que se había reordenado por CDR.

Se construyó el vector pCAGGss-g4CH en el cual, corriente abajo del promotor CAGG, una secuencia de señal celular animal e intrón inmediatamente antes de que IgG1CH1 humana sostuviera dos sitios Sfi I, y corriente abajo adicional de estos, existió el ADNc de región constante de IgG4 humana. Puede construirse un vector de expresión para células animales para secretarse como cadena IgG4H mediante inserción entre el gen VH de sitios Sfi I que se sostiene a través del sitio de procesamiento de secuencia de señal y escisión de la secuencia donante. Asimismo,

con el fin de expresar de forma preferencial una IgG4 que tiene cadenas H de combinación heterocigótica, se utilizaron productos de sustitución de aminoácidos para CH3 de IgG4 con referencia a la técnica "knobs-into-holes" en IgG1 (Protein Engineering Vol.9, 617-621, 1996). El tipo a es un producto de sustitución de Y349C o T366W, y el tipo b es un producto de sustitución de E356C, T366S, L368A, o Y407V. Asimismo, también se introdujo una sustitución de aminoácidos (-ppcpScp- → -ppcpPcp-) en la región de articulación para promover la formación de dímeros de las cadenas H. Con respecto a la secuencia de señal, se utilizaron IL-3 de ratón e IL-6 humana para el tipo a y el tipo b, respectivamente (pCAGG-IL3ss-g4CHPa, pCAGG-IL6ss-g4CHPb). Se insertó el fragmento VH del anticuerpo A44 obtenido en el ejemplo descrito anteriormente en el sitio Sfi I de pCAGG-IL3ss-g4CHPa para obtener pCAGG-chiA44-g4a y se insertó el fragmento VH del anticuerpo A69 en el sitio Sfi I de pCAGG-IL3ss-g4CHPa para obtener pCAGG-chiA69-g4a. Además, pCAGG-chiB26-g4b se obtuvo de forma similar mediante la inserción del fragmento VH del anticuerpo B26 en el sitio Sfi I de pCAGG-IL6ss-g4CHPb.

[Ejemplo 18] Construcción de vectores de expresión de cadena L de intercambio de CDR

Se construyó el vector pCAGG-κ (pCAGG-IL3 ss-hlgG ligero) en el cual, corriente abajo del promotor CAGG, la secuencia de señal IL-3 de ratón e intrón inmediatamente antes de que la región constante κ humana sostuviera dos sitios Sfi I, y corriente arriba adicional de estos, existió el exón de región constante de cadena κ humana (CL) (ver figura 19). Puede construirse un vector de expresión para que células animales se secreten como cadena κ mediante la inserción del gen VL de los sitios Sfi I sostenido mediante secuencia donante de escisión y sitio de procesamiento de secuencia de señal.

Con el fin de sintetizar el ADN que codifica la región variable de cadena L en la cual se combinaron marcos y CDR de cadena L del anticuerpo A44 y CDR de la cadena L del anticuerpo A50, A69 y B26, se prepararon oligo ADN sintéticos que tienen aproximadamente 60 bases de forma alternativa de forma tal que aproximadamente 20 bases en sus extremos se hibridan a estos. Asimismo, se preparó un cebador scback que comprende un sitio de procesamiento de secuencia de señal y sitio Sfi I y se hibrida al extremo 5' del gen VL, y un cebador scfor que comprende una secuencia donante de escisión y sitio Sfi I y se hibrida al extremo 3' del gen VL.

A44LF1 (SEQ IDNO: 50)

GCCATGGCGGACTACAAAGATA'TTGTGATGACCCAGTCTCACAAATTCATGTCCACAT CAGTAGGAGAC

A44LR1 (SEQ ID NO: 51)

GGCTACAGCAGTCCCCACATCCTGACTGGCCTTGCAGGTGATGCTGACCCTGTCTCCT ACTGATGTGGA

A44LF2 (SEQ ID NO: 52)

GTGGGGACTGCTGTAGCCTGGTATCAACAGAAACCAGGGCAATCTCCTAAACTACTG ATTTAC

A44LR2 (SEQ ID NO: 53)

GAAGCGATCAGGGACTCCAGTGTGCCGGGTGGATGCCAGTAAATCAGTAGTTTAGG

A44LF3 (SEQ ID NO.: 54)

GGAGTCCCTGATCGCTTCACAGGCAGTAGATATGGGACAGATTTCACTCTCACCATT

A44LR3 (SEQ ID NO: 55)

ACAGAGATAATCTGCCAGGTCTTCAGACTGCACATTGCTAATGGTGAGAGTGAAATC

A44LF4 (SEQ ID NO: 56)

CTGGCAGATTATCTCTGTGTCAGCAATATAGCAACTATATCACGTTCCGGTGGTGGGACC

A44LR4 (SEQ ID NO: 57)

GGAATTCGGCCCCCGAGGCCGACTTACCACGTTTCAGCTCCAGCTT'GGTCCCACCAC CGAACGT

A44LR4Gly (SEQ ID NO: 58)

GGAATTCGGCCCCCGAGGCCGACTTACCTCGTITCAGCTCCAGCTTGGTCCCACCAC CGAACGT

B26LRI\_A44fr (SEQ ID NO: 59)

GGCTACAGCAGTCCCCACATtCTGACTGGCCTTGCAGGTGATGCTGACCCTGTCTCCT ACTGATGTGGA

B26LR2A44fr (SEQ ID NO: 60)

## ES 2 494 921 T3

GAAGCGATCAGGGACTCCACTGTACCGGTAGGATGCCGAGTAAATCAGTAGTTTAGG

B26LF4\_A44fr (SEQ ID NO: 61)

CTGGCAGATTATCTCTGTGTCAGCAATATAACAGCTATCCACTCACGTTTCGGTGGTGGGA CC

A69LR1\_A44fr (SEQ ID NO: 62)

5 GGCTACAGCAGTACTCACATCCTGACTGGCCTTGCAGGTGATGCTGACCCTGTCTCCT ACTGATGTGGA

A5OLF4\_A44fr (SEQ ID NO: 63)

CTGGCAGATTATCTCTGTGTCAGCAATATAGCAGCTATTTAACGTTTCGGTGGTGGGACC

scback (SEQ ID NO: 64)

TTACTCGCGGCCAGCCGGCCATGGCGGACTACAAAG

10 scfor (SEQ ID NO: 65)

GGAATTCGGCCCCCGAG

15 Se mezcló 1 µL de cada oligo ADN sintetizado preparado a 10 µM en la combinación que se muestra en la tabla 1, y se prepararon 45 µL de las soluciones de reacción que comprenden 1x de tampón agregado de enzimas, 0,33 mM de dNTPs, 2,5 unidades de Proof Start Polymerase (Qiagen) o LATaq (TAKARA). Después de calentar a 94°C durante 5 minutos, se llevaron a cabo 7 ciclos de reacciones a 94°C durante un minuto y 63 °C durante 4 minutos, posteriormente se agregaron 5 µL cada solución de 5 µM de scback y 5 µM de scfor, y se llevaron a cabo 30 ciclos de reacciones a 94°C durante 30 segundos, 55°C durante 30 segundos, y 72°C durante 30 segundos para amplificar el gen VL.

BBA :	B26LR1_A44fr	B26LR2_A44fr	A44LF4	A44LF1	A44LF2	A44LF3	A44LR3	A44LR4
BAA :	B26LR1_A44fr	A44LR2	A44LF4	A44LF1	A44LF2	A44LF3	A44LR3	A44LR4
ABA :	A44LR1	B26LR2_A44fr	A44LF4	A44LF1	A44LF2	A44LF3	A44LR3	A44LR4
AAA :	A44LR1	A44LR2	A44LF4	A44LF1	A44LF2	A44LF3	A44LR3	A44LR4
AAa :	A44LR1	A44LR2	A5OLF4_A44fr	A44LF1	A44LF2	A44LF3	A44LR3	A44LR4
BAa :	B26LR1_A44fr	A44LR2	A5OLF4_A44fr	A44LF1	A44LF2	A44LF3	A44LR3	A44LR4
ABa :	A44LR1	B26LR2_A44fr	A5OLF4_A44fr	A44LF1	A44LF2	A44LF3	A44LR3	A44LR4
BBa :	B26LR1_A44fr	B26LR2_A44fr	A5OLF4_A44fr	A44LF1	A44LF2	A44LF3	A44LR3	A44LR4
aAA :	A69LR1_A44fr	A44LR2	A44LF4	A44LF1	A44LF2	A44LF3	A44LR3	A44LR4
aBA :	A69LR1_A44fr	B26LR2_A44fr	A44LF4	A44LF1	A44LF2	A44LF3	A44LR3	A44LR4
BBA(G) :	B26LR1_A44fr	B26LR2_A44fr	A44LF4	A44LF1	A44LF2	A44LF3	A44LR3	A44LR4Gly
BAA(G) :	B26LR1_A44fr	A44LR2	A44LF4	A44LF1	A44LF2	A44LF3	A44LR3	A44LR4Gly
ABA(G) :	A44LR1	B26LR2_A44fr	A44LF4	A44LF1	A44LF2	A44LF3	A44LR3	A44LR4Gly
AAA(G) :	A44LR1	A44LR2	A44LF4	A44LF1	A44LF2	A44LF3	A44LR3	A44LR4Gly
AAa(G) :	A44LR1	A44LR2	A5OLF4_A44fr	A44LF1	A44LF2	A44LF3	A44LR3	A44LR4Gly
Baa(G) :	B26LR1_A44fr	A44LR2	A5OLF4_A44fr	A44LF1	A44LF2	A44LF3	A44LR3	A44LR4Gly
ABa(G) :	A44LR1	B26LR2_A44fr	A5OLF4_A44fr	A44LF1	A44LF2	A44LF3	A44LR3	A44LR4Gly
BBa(G) :	B26LR1_A44fr	B26LR2_A44fr	A5OLF4_A44fr	A44LF1	A44LF2	A44LF3	A44LR3	A44LR4Gly
aAA(G) :	A69LR1_A44fr	A44LR2	A44LF4	A44LF1	A44LF2	A44LF3	A44LR3	A44LR4Gly
aBA(G) :	A69LR1_A44fr	B26LR2_A44fr	A44LF4	A44LF1	A44LF2	A44LF3	A44LR3	A44LR4Gly

Después de la realización de la PCR, los productos se purificaron a partir de todas las soluciones de la reacción mediante el uso del kit de purificación de PCR QIAquick (Qiagen) a través del procedimiento descrito en el manual de instrucciones adjunto, y se eluyeron mediante el uso de agua esterilizada. Después de que se digirieron los fragmentos con la enzima de restricción Sfi I (TOYOBO), se sometieron a electroforesis en gel de agarosa al 2%. Los fragmentos de amplificación que tienen aproximadamente 0,4 kb se purificaron mediante el uso del kit de extracción en gel QIAquick (QIAGEN) a través del procedimiento descrito en el manual de instrucciones adjunto y se eluyeron mediante el uso de agua esterilizada. Los fragmentos obtenidos se ligaron mediante el uso de alta ligación (TOYOBO) con el vector de expresión de cadena L descrito anteriormente pCAGG-k que se había digerido con Sfi I. Se utilizó parte de cada solución de reacción para transformar la cepa DH5  $\alpha$  *E. coli* (TOYOBO). Se determinaron las secuencias de nucleótidos y se confirmaron mediante el uso del kit de secuenciación BigDye Terminator Cycle (Applied Biosystems) con el secuenciador de ADN ABI PRISM 3700 DNA Sequencer (Applied Biosystems) de conformidad con el procedimiento descrito en el manual de instrucciones adjunto. pCAGG-A44BBA se obtuvo mediante inserción del fragmento BBA y otros vectores de expresión se obtuvieron de forma similar mediante inserción de otros fragmentos VL. Las secuencias de región variable de anticuerpos correspondientes se describen en las siguientes SEQ ID NO. Tabla 2

		SEQ ID NO de nucleótidos:	SEQ ID NO de aminoácidos:
(1) AAA	(pAGG-A44L)	66	67
(2) BBA	(pCAGG-A44BBA)	68	69
(3) BAA	(pCAGG-A44BAA)	70	71
(4) ABA	(pCAGG-A44ABA)	72	73
(5) AAa	(pCAGG-A44AAa)	74	75
(6) BAa	(pCAGG-A44BAa)	76	77
(7) ABa	(pCAGG-A44ABa)	78	79
(8) BBa	(pCAGG-A44BBa)	80	81
(9) aAA	(pCAGG-A44aAA)	82	83
(10) aBA	(pCAGG-A44aBA)	84	85
(11) AAA (G)	(pCAGG-A44LG)	86	87
(12) BBA (G)	(pCAGG-A44BBAG)	88	89
(13) BAA (G)	(pCAGG-A44BAAG)	90	91
(14) ABA (G)	(pCAGG-A44ABAG)	92	93
(15) AAa (G)	(pCAGG-A44AAaG)	94	95
(16) BAa (G)	(pCAGG-A44BAaG)	96	97
(17) ABa (G)	(pAGG-A44ABaG)	98	99
(18) BBa (G)	(pCAGG-A44BBaG)	100	101
(19) aAA (G)	(pCAGG-A44aAAAG)	102	103
(20) aBA (G)	(pAGG-A44aBAG)	104	105

[Ejemplo 19] Preparación de anticuerpos

Las células de la cepa HEK293 derivadas de células de carcinoma renal fetal humanas se suspendieron en medio DMEM (Invitrogen) que contenía FCS al 10% (Moregate),  $6 \times 10^6$  células se colocaron en platos de 10 cm de diámetro para células adherentes (Corning) y se cultivaron en una incubadora de CO<sub>2</sub> (37°C, CO<sub>2</sub> al 5%) durante la noche. Cualquiera de los vectores de expresión de cadena L del ejemplo 18, dos tipos del vector de expresión de cadena H (30  $\mu$ g) de pCAGG-chiB26-g4b y pCAGG-chiA44-g4a o pCAGG-chiA69-g4a del ejemplo 17, y 1,5 mL de medio OPTI-MEMI se agregaron a la mezcla de 60  $\mu$ L de reactivo de transfección Lipofectamine 2000 (Invitrogen) y 1,5 mL de medio Opti-MEM I (Invitrogen) y se dejó reposar a temperatura ambiente durante 20 minutos, y la mezcla

resultante se agregó a los platos y se cultivaron durante 3 días en una incubadora de CO<sub>2</sub> (37°C, CO<sub>2</sub> al 5%). Al sobrenadante del cultivo obtenido, se agregaron 100 µL de rProteína A Sepharose™ de flujo rápido (Amersham Biosciences) y se mezclaron mediante inversión a 4°C durante la noche. La resina se precipitó mediante centrifugación y se lavó con TBS que contenía Tween® 20 al 0,01 % tres veces. Después, la resina se suspendió en 10 mM de HCl, 150 mM de NaCl, pH 2,0 que contenía 100 µL de Tween® 20 al 0,01 % y se dejó reposar durante 3 minutos, y después se eluyó el anticuerpo. Inmediatamente después de la elución, se agregaron 5 µL de Tris-HCl 1 M, 150 mM de NaCl, pH 8,0 y se neutralizó.

[Ejemplo 20] Determinación cuantitativa de concentración IgG

Se preparó anticuerpo purificado de afinidad de cabra a Fc de IgG humana (Cappel) con una concentración de 1 µg/mL con PBS y se inmovilizó en una placa Nunc-Immuno. Después que la placa se bloqueó con PBS que contenía BSA al 2%, se agregó la muestra de sobrenadante de cultivo, adecuadamente diluida mediante el uso de este tampón. Además, como el estándar para calcular la concentración del anticuerpo, se agregó de forma similar una serie de dos diluciones de IgG4 humana (anticuerpo anti-TF humanizado, ver WO 99/51743) que se produjo mediante una dilución de 11 etapas desde la concentración de 1 µg/mL con DB. Después de lavar tres veces, se reaccionó fosfatasa alcalina IgG anti-humana de cabra (Biosource International). Después de lavar cinco veces, se utilizó sustrato de fosfatasa Sigma 104® (Sigma-Aldrich) como un sustrato, y se midió la absorbancia a 405 nm con una longitud de onda de referencia de 655 nm mediante el uso de un lector de absorbancia SUNRISE RAINBOW (TECAN). Se midió la concentración de IgG humana en el sobrenadante del cultivo a partir de la curva estándar mediante el uso del software LS-PLATE manager 2001 (TECAN).

[Ejemplo 21] Ensayo de coagulación en plasma

Para determinar si un anticuerpo biespecífico de la presente invención es capaz o no de corregir la capacidad de coagulación de la sangre de hemofilia A, se consideró la influencia de este anticuerpo con respecto al tiempo de tromboplastina parcial activada (APTT) mediante el uso de plasma carente de F. VIII. La mezcla de 50 µL de una solución de anticuerpos que tiene una variedad de concentraciones, 50 µL de plasma carente de F. VIII (Biomerieux), y 50 µL de reactivo de APTT (Dade Behring), se calentó a 37°C durante 3 minutos. La reacción de coagulación se inició mediante la adición de 50 µL de CaCl<sub>2</sub> 20 mM (Dade Behring) a la mezcla descrita anteriormente. Se midió el período de tiempo hasta la coagulación con KC10A (Amelung) al cual se había conectado CR-A (Amelung) (figuras 20 y 26). Los resultados demostraron que el anticuerpo biespecífico acortó el tiempo de coagulación en comparación con el caso donde no se agregó anticuerpo.

[Ejemplo 22] Humanización de un anticuerpo biespecífico que comprende cadenas L híbridas

La humanización se llevó a cabo de la siguiente manera sobre el anticuerpo biespecífico que comprende una combinación de anticuerpo anti-factor IXa A69-VH, anticuerpo anti-factor X B26-VH, y cadenas L híbridas (BBA), que fue la más eficaz para reducir el tiempo de coagulación sanguínea.

22-1. Búsqueda de homología de anticuerpos humanos

Los datos de secuencias de aminoácidos de anticuerpos humanos se obtuvieron a partir de la base de datos Kabat (<ftp://ftp.ebi.ac.uk/pub/databases/kabat/>) y la base de datos IMGT (<http://imgt.cines.fr/>), ambas se encuentran accesibles públicamente, y se llevó a cabo de forma individual una búsqueda de homología para la región variable de cadena A69-H de ratón (secuencia de aminoácidos: SEQ ID NO: 20), región variable de cadena B26-H de ratón (secuencia de aminoácidos: SEQ ID NO: 24), región variable de cadena BBA-L de ratón (secuencia de aminoácidos: SEQ ID NO: 69) mediante el uso de una base de datos construida. Como resultado, se descubrió que las siguientes secuencias de anticuerpos humanos son altamente homólogas; por lo tanto, se utilizaron como regiones flanqueantes (en adelante, FR) para los anticuerpos humanizados.

(1) región variable de cadena H de A69: KABATID-000064 (base de datos Kabat) (Kipps et al., J. Clin. Invest. 1991; 87:2087-2096)

(2) región variable de cadena H de B26: EMBL No. de acceso AB063872 (base de datos IMGT) (datos no publicados)

(3) región variable de cadena L de BBA: KABATID-024300 (base de datos Kabat) (Kipps et al., J. Clin. Method. 1995; 179:203-214)

Se produjeron anticuerpos humanizados, en los que cada una de las regiones determinantes de complementariedad de ratón (CDR) se injertaron en las FR de anticuerpos humanos de (1) a (3).

Los inventores buscaron secuencias de señal secretoria de anticuerpos humanos altamente homólogas a las secuencias de anticuerpos humanos de (1) a (3) mediante el uso del sitio web NCBI disponible públicamente para búsquedas de homología (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>). Se utilizaron las siguientes secuencias de señal secretoria obtenidas a partir de la búsqueda:

(1) para región variable de cadena H de A69: GenBank No. de acceso AF062257 SEQ ID NO: 123 (secuencia de nucleótidos), SEQ ID NO: 124 (secuencia de aminoácidos);

(2) para región variable de cadena H de B26: GenBank No. de acceso AAC 18248 SEQ ID NO: 125 (secuencia de nucleótidos), SEQ ID NO: 126 (secuencia de aminoácidos); y

5 (3) para región variable de cadena L de BBA: GenBank No. de acceso AAA59100 SEQ ID NO: 127 (secuencia de nucleótidos), SEQ ID NO: 128 (secuencia de aminoácidos)

## 22-2. Construcción de vectores de expresión génica de anticuerpos humanizados

Respecto a la secuencia de nucleótidos que codifica la secuencia de aminoácidos que varía a partir de la secuencia de señal secretoria a una región variable de anticuerpos, se produjeron doce oligo ADN sintéticos de aproximadamente 50 bases alternadamente de forma tal que aproximadamente 20 bases en el extremo 3' se hibridaran a ello. Los oligo ADN se diseñaron de forma tal que la secuencia que varía del extremo 5' al extremo 3' sea una secuencia de anticuerpos humanos o de forma tal que el extremo 5' sea una secuencia de anticuerpos humanos y el extremo 3' sea una secuencia de anticuerpos de ratón. Se produjeron un cebador que se temple al extremo 5' del gen de región variable de anticuerpos y comprende una secuencia de restricción XhoI y un cebador que se temple al extremo 3' del gen de región variable de anticuerpos, comprende una secuencia de restricción SfiI, y codifica el extremo 5' de la secuencia de intrones.

Se mezcló 1  $\mu$ L de cada oligo ADN sintético preparado a 2,5  $\mu$ M, se agregaron 1x TaKaRa de tampón Ex Taq, 0,4 mM de dNTPs, y 0,5 unidades de TaKaRa Ex Taq (todos estos obtenidos de TAKARA), y la solución de la reacción se ajustó hasta 48  $\mu$ L. Después de incubar a 94°C durante 5 minutos, se llevaron a cabo dos ciclos de reacciones a 94°C durante 2 minutos, 55°C durante 2 minutos y 72°C durante 2 minutos para formar un ensamblaje de cada oligo ADN sintético y realizar reacciones de elongación. Después, se agregó 1  $\mu$ L de cebadores (cada uno a 10  $\mu$ M) que se templó al extremo 5' o extremo 3' del gen de anticuerpos, se llevaron a cabo 35 ciclos de reacciones a 94°C durante 30 segundos, 55°C durante 30 segundos, y 72°C durante 1 minuto, y después esto se hizo reaccionar a 72°C durante 5 minutos para amplificar el gen de región variable de anticuerpos. Después de la PCR, toda la solución de reacción se sometió a electroforesis en gel de agarosa al 1%. Los fragmentos amplificados que tienen el tamaño deseado (aproximadamente 400 bp) se purificaron mediante el uso del kit de extracción en gel QIAquick (QIAGEN) de conformidad con el procedimiento descrito en las instrucciones adjuntas y se eluyeron con 30  $\mu$ L de agua esterilizada. Los fragmentos se clonaron mediante el uso de pGEM-T Easy Vector Systems (Promega) de conformidad con el procedimiento descrito en las instrucciones adjuntas. La secuencia de nucleótidos de cada fragmento de ADN se determinó sobre el secuenciador de ADN ABI PRISM 3700 DNA Sequencer o ABI PRISM 3730xL DNA Sequencer (Applied Biosystems) mediante el uso del kit de secuenciación BigDye Terminator Cycle (Applied Biosystems) de conformidad con el procedimiento descrito en las instrucciones adjuntas.

Después de digerir el plásmido inserto en el fragmento de región variable de cadena H y el plásmido inserto en el fragmento de región variable de cadena L, que se confirmó que tenían la secuencia génica de región variable de anticuerpos humanizados correcta, con XhoI y SfiI, y con EcoRI, respectivamente, las soluciones de reacción se sometieron a electroforesis en gel de agarosa al 1%. Los fragmentos de ADN que tenían el tamaño deseado (aproximadamente 400 bp) se purificaron mediante el uso del kit de extracción en gel QIAquick (QIAGEN) de conformidad con el procedimiento descrito en las instrucciones adjuntas y se eluyeron con 30  $\mu$ L de agua esterilizada. Posteriormente, los genes de región variable preparados se insertaron en vectores de expresión de células animales (pCAGG-IL3ss-g4CHPa, y pCAGG-IL6ss-g4CHPb) mediante el procedimiento descrito a continuación con el fin de expresar preferentemente la IgG4 producida en el ejemplo 17, en la cual las dos cadenas H forman un heterodímero. Después de digerir pCAGG-IL3ss-g4CHPa con XhoI y SfiI (ambos de TaKaRa), los fragmentos que comprenden la secuencia de señal IL-3 de ratón se quitaron mediante sujeción de la solución de reacción a electroforesis en gel de agarosa al 1% y mediante recolección de los fragmentos de región del vector, y este fragmento se utilizó para producir el vector de expresión de cadena H de A69 humanizado (la región constante comprende sustitución de Y349C y T366W) a través de inserción del fragmento de gen de región variable de cadena H de A69 obtenido anteriormente. De forma similar, después de digerir pCAGG-IL6ss-g4CHPb con XhoI y SfiI (TaKaRa), los fragmentos que comprenden la secuencia de señal IL-6 de ratón se quitaron mediante sujeción de la solución de reacción a electroforesis en gel de agarosa al 1% y mediante recolección de los fragmentos de región del vector, y este fragmento se utilizó para producir el vector de expresión de cadena B26-H humanizado (la región constante comprende sustituciones de E356C, T366S, L368A y Y407V) a través de inserción del fragmento de gen de región variable de cadena B26-H obtenido anteriormente. De forma similar, se insertó el gen de región variable de cadena H preparado en el vector de expresión de célula animal (pCAGGss-g4CH) portando el gen de región constante de tipo salvaje producido en el ejemplo 17. Después de digerir pCAGGss-g4CH con XhoI y SfiI, los fragmentos que comprenden la secuencia de señal se quitaron mediante sujeción de la solución de reacción a electroforesis en gel de agarosa al 1% y mediante recolección de los fragmentos de región del vector, y este fragmento se utilizó para producir el vector de expresión de cadena H humanizado (la región constante es de tipo salvaje) a través de inserción del fragmento de gen de región variable de cadena H obtenido anteriormente. Además, después de digerir el vector de expresión de cadena L (pCAGG-IL3ss-hlgG ligera) producido en el ejemplo 18 con EcoRI, los fragmentos que comprenden la secuencia de señal IL-3 de ratón se quitaron mediante sujeción de la solución de reacción a electroforesis en gel de agarosa al 1% y mediante recolección de los fragmentos de región

del vector, y este fragmento se utilizó para producir el vector de expresión de cadena BBA-L humanizado que se produjo a través de inserción del fragmento de gen de región variable de cadena BBA-L obtenido anteriormente. Las reacciones de ligación se llevaron a cabo mediante el uso de kit de ligación de ADN rápida (Roche Diagnostics), y los vectores resultantes se utilizaron para transformar la cepa DH5α de *E. coli* (TOYOBO).

### 5 22-3. Preparación de anticuerpos biespecíficos humanizados

Los anticuerpos biespecíficos humanizados se expresaron mediante el procedimiento descrito en el ejemplo 4-2 o mediante el siguiente procedimiento. La línea celular HEK293H (Invitrogen) derivada de células de cáncer de riñón embrionarias humanas se suspendieron en medio DMEM (Invitrogen) que contenía suero bovino fetal al 10%, 10 mL de esta suspensión se colocaron en cada plato (para células adherentes, 10 cm de diámetro, CORNING) con una densidad celular de  $5 \times 10^5$  a  $6 \times 10^5$  células/mL, y después de cultivar durante aproximadamente 24 horas en una incubadora de CO<sub>2</sub> (37°C, CO<sub>2</sub> al 5%), el medio de cultivo se quitó mediante aspiración, y se agregaron 6,9 mL de medio CHO-S-SFM-II que contenía suero bovino fetal al 1%. La solución de ADN plásmido preparado en 22-2 (un total de 13,8 µg) se mezcló con 20,7 µL de 1 µg/mL Polietilimina (Polysciences Inc.) y 690 µL de medio CHO-S-SFMII, se dejó reposar durante 10 minutos a temperatura ambiente, y esta mezcla se agregó a las células en cada uno de los platos, y después se incubó en una incubadora de CO<sub>2</sub> (37°C, CO<sub>2</sub> al 5%) durante 4 a 5 horas. Posteriormente, se agregaron 6,9 mL de medio CHO-S-SFM-II (Invitrogen) que contenía suero bovino fetal al 1% (Invitrogen), y esto se cultivó en una incubadora de CO<sub>2</sub> durante tres días. Después de recoger el sobrenadante del cultivo, las células se quitaron mediante centrifugación (a aproximadamente 2.000x g, durante 5 minutos, a temperatura ambiente). Después se esterilizó el sobrenadante mediante un filtro de 0,22 µm, MILLEX®-GV (Millipore). Después se almacenó esta muestra a 4°C hasta su uso.

Más tarde, los anticuerpos se purificaron mediante el procedimiento del ejemplo 11, y su concentración se determinó a través del procedimiento del ejemplo 5 o a través del procedimiento descrito a continuación. Se utilizó Biacore 1000 (BIACORE) y se inmovilizó Proteína A en el Chip de sensor CM5 (BIACORE). Más específicamente, de conformidad con el protocolo de fabricación, el chip de sensor activado se hizo reaccionar con solución de Proteína A (SIGMA) diluida a 50 µg/mL mediante el uso de 10 mM de solución de acetato de sodio (pH 4,0, BIACORE) a 5 µL/minuto durante 30 minutos, y después se llevó a cabo un procedimiento de bloqueo para producir un chip de sensor inmovilizado con Proteína A. Este chip de sensor se utilizó para medir las concentraciones en sobrenadantes de cultivo y productos purificados con Biacore 1000 (BIACORE). Se utilizó tampón HBS-EP (BIACORE) para la inmovilización del chip de sensor y para mediciones de concentración. Se utilizó una serie de dos diluciones de IgG4 humana (anticuerpo anti-TF humanizado, ver WO99/51743) en tampón HBS-EP producido mediante una dilución de seis etapas a partir de 4000 ng/mL como el estándar para las mediciones de concentración

### 22-4. Evaluación de actividad y modificación de secuencia de anticuerpo de anticuerpos biespecíficos humanizados

Para evaluar la capacidad de coagulación en plasma de los anticuerpos biespecíficos humanizados y el anticuerpo biespecífico quimérico preparados (A69/B26/BBA), los efectos de los anticuerpos sobre APTT se examinaron mediante el uso de plasma carente de F. VIII de conformidad con el procedimiento del ejemplo 21. Los aminoácidos de FR de anticuerpos humanos se modificaron para aumentar la actividad del anticuerpo biespecífico humanizado cuya capacidad de coagulación en sangre disminuyó. Durante la expresión y secreción, se expresan tres tipos de anticuerpos, anticuerpo A69 humanizado/BBA humanizado, anticuerpo B26 humanizado/BBA humanizado, y anticuerpo biespecífico A69 humanizado/B26 humanizado/BBA humanizado. Estos anticuerpos se separaron, y para purificar únicamente el anticuerpo biespecífico, se llevaron a cabo modificaciones de aminoácidos para disminuir el punto isoeléctrico de la región variable de cadena A69H humanizada, y para aumentar el punto isoeléctrico de la región variable de cadena B26H humanizada. Al mismo tiempo, las modificaciones de aminoácidos se llevaron a cabo para evitar la piroglutamilación del extremo amino de cadena H, inhibir la desamidación de las secuencias CDR y aumentar la termoestabilidad. Más específicamente, se introdujeron las mutaciones en las regiones variables de anticuerpos humanizados mediante el uso del kit de mutagénesis dirigida al sitio QuikChange (Stratagene) de conformidad con el procedimiento descrito en las instrucciones adjuntas. Se dirigieron el plásmido inserto en el fragmento de gen de región variable de cadena H y el plásmido inserto en el fragmento de gen de región variable de cadena L, que se confirmó que tenían las secuencias génicas de región variable de anticuerpos humanizados deseadas, con XhoI y SfiI, y con EcoRI, respectivamente, y después las soluciones de reacción se sometieron a electroforesis en gel de agarosa al 1%. Los fragmentos de ADN que tenían el tamaño deseado (aproximadamente 400 bp) se purificaron mediante el uso del kit de extracción en gel QIAquick (QIAGEN) de conformidad con el procedimiento descrito en las instrucciones adjuntas y después se eluyeron con 30 µL de agua esterilizada. Después, estos fragmentos se ligaron al gen de región constante de anticuerpos mediante el procedimiento indicado en el ejemplo 22-2 para producir plásmidos de expresión de anticuerpos. Los anticuerpos biespecíficos humanizados se prepararon mediante el procedimiento del ejemplo 22-3, y se evaluó la actividad de coagulación en sangre mediante el procedimiento del ejemplo 21.

Mediante la repetición de las modificaciones de aminoácidos de la secuencia FR y la evaluación de la actividad de coagulación, se obtuvieron anticuerpos biespecíficos humanizados (A69 humanizado (hA69a)/B26 humanizado (hB26-F123e4)/BBA humanizado (hAL-F123j4) y A69 humanizado (hA69-PFL)/B26 humanizado (hB26-PF)/BBA humanizado (hAL-s8)) que tenían una actividad equivalente a la del anticuerpo biespecífico quimérico (A69B26/BBA). La figura 27 muestra la actividad de coagulación en sangre de anticuerpos biespecíficos

humanizados en los que se formó un heterodímero mediante el uso de la técnica "knobs-into-holes" (Protein Engineering vol.9, 617-621, 1996) sobre la secuencia de región constante. Las secuencias de región variable de cada anticuerpo humanizado se describen en las siguientes SEQ ID NOs:

(1) VH de anticuerpo A69 humanizado (hA69a)

5 SEQ ID NO: 129 (secuencia de nucleótidos), SEQ ID NO: 130 (secuencia de aminoácidos);

(2) VH de anticuerpo B26 humanizado (hB26-F123e4)

SEQ ID NO: 131 (secuencia de nucleótidos), SEQ ID NO: 132 (secuencia de aminoácidos);

(3) VL de anticuerpo BBA humanizado (hAL-F123j4)

SEQ ID NO: 133 (secuencia de nucleótidos), SEQ ID NO: 134 (secuencia de aminoácidos);

10 (4) VH de anticuerpo A69 humanizado (hA69-PFL)

SEQ ID NO: 135 (secuencia de nucleótidos), SEQ ID NO: 136 (secuencia de aminoácidos);

(5) VH de anticuerpo B26 humanizado (hB26-PF)

SEQ ID NO: 137 (secuencia de nucleótidos), SEQ ID NO: 138 (secuencia de aminoácidos); y

(6) VL de anticuerpo BBA humanizado (hAL-s8)

15 SEQ ID NO: 139 (secuencia de nucleótidos), SEQ ID NO: 140 (secuencia de aminoácidos).

22-5. Evaluación de la actividad de los anticuerpos biespecíficos humanizados que comprenden una región constante de tipo salvaje, y modificación de las secuencias de anticuerpos.

20 Cuando se produce un anticuerpo biespecífico de cadena L compartida en común, se pueden expresar tres tipos de anticuerpos durante la expresión y secreción a partir de células animales. Además, se esperó la expresión de tres tipos de anticuerpos, anticuerpo A69 humanizado/BBA humanizado, anticuerpo B26 humanizado/BBA humanizado, y anticuerpo biespecífico A69 humanizado/B26 humanizado/BBA humanizado para los anticuerpos de este ejemplo. Estos anticuerpos se separaron, y para purificar únicamente los anticuerpos biespecíficos, se llevaron a cabo modificaciones de aminoácidos para disminuir el punto isoeléctrico de la región variable de cadena A69H humanizada, y para aumentar el punto isoeléctrico de la región variable de cadena B26H humanizada. Como resultado, estos procedimientos permitieron que se separaran los anticuerpos biespecíficos deseados y, de este modo, se prepararon los anticuerpos biespecíficos humanizados que portan una región constante de tipo salvaje y se evaluó la actividad de coagulación. Para aumentar la termoestabilidad, se modificaron las secuencias de aminoácidos de región variable A69 humanizada y BBA humanizada del anticuerpo biespecífico humanizado descrito en el ejemplo 22-4 (A69 humanizado (hA69-PFL)/B26 humanizado (hB26-PF)/BBA humanizado (hAL-s8)).

25 Cada secuencia de región variable de anticuerpos humanizados se describe en las siguientes SEQ ID NOs:

(7) VH de anticuerpo A69 humanizado (hA69-KQ)

SEQ ID NO: 141 (secuencia de nucleótidos), SEQ ID NO: 142 (secuencia de aminoácidos); y

(8) VL de anticuerpo BBA humanizado (hAL-AQ)

SEQ ID NO: 143 (secuencia de nucleótidos), SEQ ID NO: 144 (secuencia de aminoácidos).

35 Los plásmidos de expresión de anticuerpos se produjeron mediante ligación de las secuencias de región variable mencionadas anteriormente a un gen de región constante de tipo salvaje (región constante κ o región constante de IgG4 humana) mediante el procedimiento indicado en el ejemplo 22-2.

40 Los anticuerpos biespecíficos humanizados se prepararon a través del procedimiento del ejemplo 22-3, y después se purificaron mediante el uso de cromatografía de intercambio de cationes. Las condiciones para la cromatografía de intercambio de cationes se indican a continuación. Dado que se obtuvieron tres tipos de picos que corresponden a la combinación homogénea de A69 humanizado, el anticuerpo biespecífico deseado, que es la combinación heterogénea de A69 humanizado y B26 humanizado, y la combinación homogénea de B26 humanizado, se purificó el anticuerpo biespecífico mediante recolección de fracciones pico que corresponden al anticuerpo biespecífico. Las fracciones que contenían el anticuerpo biespecífico se concentraron mediante el uso de Amicon Ultra, MWCO 10000

45 (Millipore), y se dializaron durante la noche en un lugar frío contra 20 mM de acetato de sodio, 150 mM de NaCl, solución pH 6,0, y después se determinó su concentración.

## ES 2 494 921 T3

Columna:	ProPac WCX-10,4 x 250 mm, (Dionex)
Fase móvil:	A: 10 mmol/L de NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> /Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> , pH 6,25 B: 10 mmol/L de NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> /Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> , 500 mmol/L de NaCl, pH 6,25
Velocidad de flujo:	1,0 mL/min
Gradiente:	10% de B (5 min)→(40 min)→60% de B→(5 min)→100% de B (5 min)
Detección:	220 nm

5 Mediante el uso de anticuerpos biespecíficos purificados, se evaluó la actividad de coagulación en sangre a través del procedimiento del ejemplo 21. Tal como se describe en la figura 28, se confirmó que el anticuerpo humanizado (A69 humanizado (hA69-PFL)/B26 humanizado (hB26-PF)/BBA humanizado (hAL-s8)) que mostró actividad equivalente al anticuerpo quimérico en el ejemplo 22-4 y el anticuerpo humanizado recién preparado (A69 humanizado (hA69-KQ)/B26 humanizado (hB26-PF)/BBA humanizado (hAL-AQ)) tenían un nivel similar de actividad de coagulación en sangre.

[Ejemplo 23] Uso combinado de dos o más tipos de anticuerpos

10 El efecto de utilizar un anticuerpo biespecífico en combinación con uno o más anticuerpos adicionales se confirmó mediante un ensayo de coagulación en plasma. Se mezclaron 50 µL de la solución de anticuerpos, 100 µL de plasma carente de F. VIII (Biomerieux), y 50 µL de solución caolín al 0,3% (Biomerieux) y se calentaron a 37°C durante 3 minutos. La reacción de coagulación se inició mediante la adición de 100 µL de 20 mM de CaCl<sub>2</sub> (Dade Behring) a esta solución mezclada. Se midió el período de tiempo hasta la coagulación mediante el uso de KC10A (Amelung) conectado a CR-A (Amelung). Los resultados de medir el tiempo de coagulación en plasma cuando se  
15 mezcló el anticuerpo biespecífico A69/B26/BBA con el anticuerpo anti-F. IXa (XB12), anticuerpo anti-F. X (SB04), XB12 y SB04, y anticuerpo biespecífico SB12/SB04 µg/mL.

### Aplicación industrial

La presente invención proporciona anticuerpos biespecíficos altamente activos que sustituyen a nivel funcional al factor VIII de coagulación y reconocen una enzima y su sustrato.

20 Dado que es probable que los anticuerpos biespecíficos de la presente invención sean altamente estables en sangre y tengan baja antigenicidad, se espera en gran medida que se conviertan en productos farmacéuticos.

**Listado de secuencias**

<110> CHUGAI SEIYAKU KABUSHIKI KAISHA

5 <120> ANTICUERPOS QUE SUSTITUYEN LA FUNCIÓN DEL FACTOR VIII DE COAGULACIÓN SANGUÍNEA

<130> C1-A0504P

<150> JP 2005-112514

10 <151> 2005-04-08

<160> 144

<170> PatentIn version 3.3

15 <210> 1

<211> 119

<212> PRT

<213> Mus musculus

20 <400> 1

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

25 <210> 2  
<211> 15  
<212> DNA  
<213> Mus musculus

30 <220>  
<221> CDS  
<222> (1)..(15)

<400> 2

35 agc tcc tgg atg cac  
Ser Ser Trp Met His  
1 5

15

ES 2 494 921 T3

```

<210> 3
<211> 5
<212> PRT
<213> Mus musculus
5
<400> 3

Ser Ser Trp Met His
1          5

10
<210> 4
<211> 51
<212> DNA
<213> Mus musculus

15
<220>
<221> CDS
<222> (1) .. (51)

<400> 4
20
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

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

<400> 5

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

30
Asp

<210> 6
<211> 27
<212> DNA
35
<213> Mus musculus

<220>
<221> CDS
<222> (1) .. (27)
40
<400> 6

ggg ggt aac ggt tac tac ttt gac tac      27
Gly Gly Asn Gly Tyr Tyr Phe Asp Tyr
1          5

45
<210> 7
<211> 9
<212> PRT
<213> Mus musculus

50
<400> 7

Gly Gly Asn Gly Tyr Tyr Phe Asp Tyr
1          5

<210> 8

```

ES 2 494 921 T3

<211> 107  
 <212> PRT  
 <213> Mus musculus

5 <400> 8

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

<210> 9  
 <211> 33  
 <212> DNA  
 <213> Mus musculus

10

<220>  
 <221> CDS  
 <222> (1) .. (33)

15

<400> 9

aag gcc agt cag gat gtg ggg act gct gta gcc  
 Lys Ala Ser Gln Asp Val Gly Thr Ala Val Ala  
 1 5 10

33

20

<210> 10  
 <211> 11  
 <212> PRT  
 <213> Mus musculus

25

<400> 10

Lys Ala Ser Gln Asp Val Gly Thr Ala Val Ala  
 1 5 10

30

<210> 11  
 <211> 21  
 <212> DNA  
 <213> Mus musculus

35

<220>  
 <221> CDS  
 <222> (1) .. (21)

40 <400> 11

```

tgg gca tcc acc cgg cac act                21
Trp Ala Ser Thr Arg His Thr
1                5

5 <210> 12
  <211> 7
  <212> PRT
  <213> Mus musculus

10 <400> 12
   Trp Ala Ser Thr Arg His Thr
   1                5

15 <210> 13
   <211> 24
   <212> DNA
   <213> Mus musculus

20 <220>
   <221> CDS
   <222> (1) .. (24)

   <400> 13

   cag caa tat agc aac tat atc acg          24
   Gln Gln Tyr Ser Asn Tyr Ile Thr
   1                5

25 <210> 14
   <211> 8
   <212> PRT
   <213> Mus musculus

30 <400> 14
   Gln Gln Tyr Ser Asn Tyr Ile Thr
   1                5

35 <210> 15
   <211> 119
   <212> PRT
   <213> Mus musculus

40 <400> 15

```

ES 2 494 921 T3

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

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> 16  
 <211> 5  
 5 <212> PRT  
 <213> Mus musculus

<400> 16

Thr Tyr Trp Met His  
 1 5

<210> 17  
 <211> 17  
 <212> PRT  
 15 <213> Mus musculus

<400> 17

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

Val

<210> 18  
 <211> 9  
 <212> PRT  
 <213> Mus musculus

<400> 18

Gly Asn Leu Gly Tyr Phe Phe Asp Tyr  
 1 5

<210> 19  
 <211> 8  
 <212> PRT  
 <213> Mus musculus

ES 2 494 921 T3

<400> 19

Gln Gln Tyr Ser Ser Tyr Leu Thr  
1 5

5 <210> 20  
<211> 119  
<212> PRT  
<213> Mus musculus

10 <400> 20

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

15 <210> 21  
<211> 5  
<212> PRT  
<213> Mus musculus

20 <400> 21

Asp Tyr Tyr Met His  
1 5

25 <210> 22  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> Mus musculus

<400> 22

30 Gly Gly Asn Gly Tyr Tyr Leu Asp Tyr  
1 5

<210> 23  
<211> 11  
<212> PRT  
35 <213> Mus musculus

ES 2 494 921 T3

<400> 23

Lys Ala Ser Gln Asp Val Ser Thr Ala Val Ala  
 1 5 10

5 <210> 24  
 <211> 120  
 <212> PRT  
 <213> Mus musculus

10 <400> 24

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

15 <210> 25  
 <211> 15  
 <212> DNA  
 <213> Mus musculus

20 <220>  
 <221> CDS  
 <222> (1)..(15)

<400> 25

gac aac aac atg gac  
 Asp Asn Asn Met Asp  
 1 5

15

30 <210> 26  
 <211> 5  
 <212> PRT  
 <213> Mus musculus

<400> 26

Asp Asn Asn Met Asp  
 1 5

35 <210> 27

ES 2 494 921 T3

```

<211> 51
<212> DNA
<213> Mus musculus

5 <220>
  <221> CDS
  <222> (1)..(51)

10 <400> 27
    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

15 <210> 28
  <211> 17
  <212> PRT
  <213> Mus musculus

  <400> 28

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

20 Gly

  <210> 29
  <211> 30
  <212> DNA
25 <213> Mus musculus

  <220>
  <221> CDS
  <222> (1)..(30)
30 <400> 29

    agg agg agc tac ggc tac tac ttt gac tac      30

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

  <210> 30
  <211> 10
  <212> PRT
  <213> Mus musculus

40 <400> 30

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

45 <210> 31
  <211> 108
  <212> PRT
  <213> Mus musculus

50 <400> 31

    Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Gln Lys Phe Met Ser Thr Ser Val Gly

```

ES 2 494 921 T3

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

Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg  
 100 105

<210> 32  
 <211> 33  
 5 <212> DNA  
 <213> Mus musculus

<220>  
 <221> CDS  
 10 <222> (1) .. (33)

<400> 32

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> 33  
 <211> 11  
 <212> PRT  
 <213> Mus musculus

<400> 33

Lys Ala Ser Gln Asn Val Gly Thr Ala Val Ala  
 1 5 10

<210> 34  
 <211> 21  
 <212> DNA  
 <213> Mus musculus

<220>  
 <221> CDS  
 <222> (1)..(21)

<400> 34

tcg gca tcc tac cgg tac agt 21  
 Ser Ala Ser Tyr Arg Tyr Ser  
 1 5

<210> 35  
 <211> 7  
 <212> PRT  
 <213> Mus musculus  
 5  
 <400> 35  
**Ser Ala Ser Tyr Arg Tyr Ser**  
**1 5**  
 10  
 <210> 36  
 <211> 27  
 <212> DNA  
 <213> Mus musculus  
 15  
 <220>  
 <221> CDS  
 <222> (1)..(27)  
 <400> 36  
 20  
**cag caa tat aac agc tat cct ctc acg** 27  
**Gln Gln Tyr Asn Ser Tyr Pro Leu Thr**  
**1 5**  
 <210> 37  
 <211> 9  
 25  
 <212> PRT  
 <213> Mus musculus  
 <400> 37  
**Gln Gln Tyr Asn Ser Tyr Pro Leu Thr**  
 30  
**1 5**  
 <210> 38  
 <211> 22  
 <212> DNA  
 35  
 <213> Artificial  
 <220>  
 <223> Una secuencia de cebador sintetizada de modo artificial  
 40  
 <400> 38  
**cagctatgaa atacctattg cc** 22  
 45  
 <210> 39  
 <211> 23  
 <212> DNA  
 <213> Artificial  
 <220>  
 50  
 <223> Una secuencia de cebador sintetizada de modo artificial  
 <400> 39  
**cttttcataa tcaaaatcac cgg** 23  
 55  
 <210> 40  
 <211> 19  
 <212> DNA  
 <213> Artificial  
 60  
 <220>  
 <223> Una secuencia de cebador sintetizada de modo artificial

<400> 40

attgcctacg gcagccgct 19

5

<210> 41  
<211> 20  
<212> DNA  
<213> Artificial

10

<220>  
<223> Una secuencia de cebador sintetizada de modo artificial

<400> 41

15

aatcaccgg aaccagagcc 20

<210> 42  
<211> 24  
<212> DNA  
<213> Artificial

20

<220>  
<223> Una secuencia de cebador sintetizada de modo artificial

25

<400> 42

ttactcggg cccagccggc catg 24

30

<210> 43  
<211> 28  
<212> DNA  
<213> Artificial

35

<220>  
<223> Una secuencia de cebador sintetizada de modo artificial

<400> 43

ggaattcggc ccccgaggcc cactcacg 28

40

<210> 44  
<211> 1215  
<212> DNA  
<213> Homo sapiens

45

<400> 44

ES 2 494 921 T3

ggcctcgggg gccagctttc tggggcaggc caggcctgac cttggctttg gggcagggag 60  
 ggggctaagg tgaggcaggt ggcgccagcc aggtgcacac ccaatgccca tgagcccaga 120  
 cactggacgc tgaacctcgc ggacagttaa gaaccagggg gcctctgcgc cctgggcccc 180  
 gctctgtccc acaccgcggt cacatggcac cacctctctt gcagcttcca ccaagggccc 240  
 atccgtcttc cccctggcgc cctgctccag gagcacctcc gagagcacag ccgccctggg 300  
 ctgcctggtc aaggactact tccccgaacc ggtgacggtg tcgtggaact caggcgcctt 360  
 gaccagcggc gtgcacacct tccgggctgt cctacagtcc tcaggactct actccctcag 420  
 cagcgtggtg accgtgccct ccagcagctt gggcacgaag acctacacct gcaacgtaga 480  
 tcacaagccc agcaacacca aggtggacaa gagagttgag tccaaatatg gtccccatg 540  
 cccaccatgc ccagcacctg agttcctggg gggaccatca gtcttcctgt tcccccaaa 600  
 acccaaggac actctcatga tctcccggac ccctgaggtc acgtgcgtgg tggaggacgt 660  
 gagccaggaa gaccccagg tccagttcaa ctggtacgtg gatggcgtgg aggtgcataa 720  
 tgccaagaca aagccgcggg aggagcagtt caacagcacg taccgtgtgg tcagcgtcct 780  
 caccgtcctg caccaggact ggctgaacgg caaggagtac aagtgcaagg tctccaacaa 840  
 aggcctcccg tcctccatcg agaaaacat ctccaaagcc aaagggcagc cccgagagcc 900  
 acaggtgtgc accctgcccc catcccagga ggagatgacc aagaaccagg tcagcctgtg 960  
 gtgcctggtc aaaggcttct accccagcga catcgccgtg gagtgggaga gcaatgggca 1020  
 gccggagaac aactacaaga ccacgcctcc cgtgctggac tccgacgget ccttcttctt 1080  
 ctacagcagg ctaaccgtgg acaagagcag gtggcaggag gggaatgtct tctcatgctc 1140  
 cgtgatgcat gaggctctgc acaaccacta cacacagaag agcctctccc tgtctctggg 1200  
 taaatgagcg gccgc 1215

<210> 45  
 <211> 684  
 <212> DNA  
 <213> Homo sapiens

<400> 45

ggcctcgggg gccgaattcc taaactctga gggggtcgga tgacgtggcc attctttgcc 60  
 taaagcattg agtttactgc aaggctcagaa aagcatgcaa agccctcaga atggctgcaa 120

ES 2 494 921 T3

agagctccaa caaaacaatt tagaacttta ttaaggaata gggggaagct aggaagaaac 180  
tcaaaacatc aagattttaa atacgcttct tgggtctcctt gctataatta tctgggataa 240  
gcatgctggt ttctgtctgt ccctaacatg ccctgtgatt atccgcaaac aacacaccca 300  
agggcagaac tttgttactt aaacaccatc ctgtttgctt ctttcctcag gaactgtggc 360  
tgcaccatct gtcttcatct tcccgccatc tgatgagcag ttgaaatctg gaactgcctc 420  
tgttgtgtgc ctgctgaata acttctatcc cagagaggcc aaagtacagt ggaagggtga 480  
taacgccctc caatcgggta actcccagga gagtgtcaca gagcaggaca gcaaggacag 540  
cacctacagc ctcagcagca ccctgacgct gagcaaagca gactacgaga aacacaaagt 600  
ctacgcctgc gaagtcaccc atcagggcct gagctcgccc gtcacaaaga gcttcaacag 660  
gggagagtgt tagagggcgg ccgc 684

<210> 46  
<211> 1215  
5 <212> DNA  
<213> Homo sapiens

<400> 46

ggcctcgggg gcctcccagc ctctgggcag gcacaggcta ggtgccccta acccaggccc 60  
tgcacacaaa ggggcaggtg ctgggctcag acctgccaaag agccatatcc gggaggacc 120  
tgcccctgac ctaagcccac cccaaaggcc aaactctcca ctccctcagc tcggacacct 180  
tctctcctcc cagattccag taactcccaa tcttctctct gcagcttcca ccaaggcccc 240  
atccgtcttc ccctggcgc cctgctccag gagcacctcc gagagcacag ccgccctggg 300  
ctgcctggtc aaggactact tccccgaacc ggtgacggtg tcgtggaact caggcgcct 360  
gaccagcggc gtgcacacct tcccggctgt cctacagtcc tcaggactct actccctcag 420  
cagcgtggtg accgtgccct ccagcagctt gggcacgaag acctacacct gcaacgtaga 480  
tcacaagccc agcaaaccca aggtggacaa gagagttgag tccaaatatg gtccccatg 540  
cccaccatgc ccagcacctg agttcctggg gggaccatca gtcttctgt tcccccaaa 600  
acccaaggac actctcatga tctcccggac ccctgaggtc acgtgcgtgg tgggtggacgt 660  
gagccaggaa gaccccgagg tccagttcaa ctggtacgtg gatggcgtgg aggtgcataa 720  
tgccaagaca aagccgcggg aggagcagtt caacagcacg taccgtgtgg tcagcgtcct 780  
caccgtcctg caccaggact ggctgaacgg caaggagtac aagtgcaagg tctccaacaa 840  
aggcctcccg tcctccatcg agaaaacat ctccaaagcc aaagggcagc cccgagagcc 900  
acaggtgtac accctgcccc catcccagtg cgagatgacc aagaaccagg tcagcctgtc 960  
ctgcgcggtc aaaggcttct atcccagcga catcgccgtg gagtgggaga gcaatgggca 1020  
gccggagaac aactacaaga ccacgcctcc cgtgctggac tccgacggct ccttcttct 1080  
10 cgtgagcagg ctaaccgtgg acaagagcag gtggcaggag gggaatgtct tctcatgctc 1140  
cgtgatgcat gaggtctctg acaaccacta cacacagaag agcctctccc tgtctctggg 1200  
taaatgagcg gccgc 1215

<210> 47

<211> 21  
 <212> DNA  
 <213> Artificial

5 <220>  
 <223> Una secuencia de cebador sintetizada de modo artificial

<400> 47

10 **cgcaaatggg cggtaggcgt g 21**

<210> 48  
 <211> 18  
 <212> DNA  
 <213> Artificial

15 <220>  
 <223> Una secuencia de cebador sintetizada de modo artificial

20 <400> 48

**tagaaggcac agtcgagg 18**

25 <210> 49  
 <211> 24  
 <212> DNA  
 <213> Artificial

30 <220>  
 <223> Una secuencia de cebador sintetizada de modo artificial

<400> 49

35 **ctctgaatac ttcaacaag ttac 24**

<210> 50  
 <211> 69  
 <212> DNA  
 <213> Artificial

40 <220>  
 <223> Una secuencia de cebador sintetizada de modo artificial

45 <400> 50

**gccatggcgg actacaaaga tattgtgatg acccagtctc acaaattcat gtccacatca 60**

**gtaggagac 69**

<210> 51  
 <211> 69  
 <212> DNA  
 <213> Artificial

50 <220>  
 <223> Una secuencia de cebador sintetizada de modo artificial

55 <400> 51

**ggctacagca gtccccacat cctgactggc cttgcaggtg atgctgaccc tgtctcctac 60**

60 **tgatgtgga 69**

<210> 52

ES 2 494 921 T3

<211> 63  
 <212> DNA  
 <213> Artificial

5 <220>  
 <223> Una secuencia de cebador sintetizada de modo artificial

<400> 52

**gtggggactg ctgtagcctg gtatcaacag aaaccagggc aatctcctaa actactgatt** 60

10 **tac** 63

<210> 53  
 <211> 57  
 <212> DNA  
 <213> Artificial

15 <220>  
 <223> Una secuencia de cebador sintetizada de modo artificial

20 <400> 53

**gaagcgatca gggactccag tgtgccgggt ggatgccag faaatcagta gtttagg** 57

<210> 54  
 <211> 57  
 <212> DNA  
 <213> Artificial

25 <220>  
 <223> Una secuencia de cebador sintetizada de modo artificial

30 <400> 54

**ggagtcocctg atcgcttcac aggcagtaga tatgggacag attcactct caccatt** 57

35 <210> 55  
 <211> 57  
 <212> DNA  
 <213> Artificial

40 <220>  
 <223> Una secuencia de cebador sintetizada de modo artificial

45 <400> 55

**acagagataa tctgccaggt ctcagactg cacattgcta atggtgagag tgaatc** 57

<210> 56  
 <211> 57  
 <212> DNA  
 <213> Artificial

50 <220>  
 <223> Una secuencia de cebador sintetizada de modo artificial

55 <400> 56

**ctggcagatt atctctgtca gcaatatagc aactatatca cgttcggtagg tgggacc** 57

60 <210> 57  
 <211> 64  
 <212> DNA

ES 2 494 921 T3

<213> Artificial

<220>  
<223> Una secuencia de cebador sintetizada de modo artificial

5 <400> 57

**ggaattcggc ccccgaggcc gacttaccac gtttcagctc cagcttggtc ccaccaccga 60**

**acgt 64**

10 <210> 58  
<211> 64  
<212> DNA  
<213> Artificial

15 <220>  
<223> Una secuencia de cebador sintetizada de modo artificial

<400> 58

**ggaattcggc ccccgaggcc gacttacctc gtttcagctc cagcttggtc ccaccaccga 60**

20 **acgt 64**

<210> 59  
<211> 69  
<212> DNA

25 <213> Artificial

<220>  
<223> Una secuencia de cebador sintetizada de modo artificial

30 <400> 59

**ggctacagca gtccccacat tctgactggc cttgcagggtg atgctgacctc tgtctcctac 60**

**tgatgtgga 69**

<210> 60  
<211> 57  
<212> DNA  
<213> Artificial

35 <220>  
<223> Una secuencia de cebador sintetizada de modo artificial

40 <400> 60

**gaagcgaatc gggactccac tgtaccggta ggatgccgag taaatcagta gtttagg 57**

45 <210> 61  
<211> 60  
<212> DNA  
<213> Artificial

50 <220>  
<223> Una secuencia de cebador sintetizada de modo artificial

55 <400> 61

**ctggcagatt atctctgtca gcaafataac agctatccac tcaogttcgg tgggtggacc 60**

<210> 62  
<211> 69

ES 2 494 921 T3

<212> DNA  
 <213> Artificial  
  
 <220>  
 5 <223> Una secuencia de cebador sintetizada de modo artificial  
  
 <400> 62  
  
**ggctacagca gtactcacat cctgactggc cttgcaggtg atgctgaccc tgtctoctac** 60  
  
**tgatgtgga** 69  
 10  
 <210> 63  
 <211> 57  
 <212> DNA  
 <213> Artificial  
 15  
 <220>  
 <223> Una secuencia de cebador sintetizada de modo artificial  
  
 <400> 63  
 20  
**ctggcagatt atctctgtca gcaatatagc agctatttaa cgttcgggtg tgggacc** 57  
  
 <210> 64  
 <211> 37  
 25 <212> DNA  
 <213> Artificial  
  
 <220>  
 <223> Una secuencia de cebador sintetizada de modo artificial  
 30  
 <400> 64  
  
**ttactcgcgg cccagccggc catggcggac taaaaag** 37  
 35  
 <210> 65  
 <211> 17  
 <212> DNA  
 <213> Artificial  
 40  
 <220>  
 <223> Una secuencia de cebador sintetizada de modo artificial  
  
 <400> 65  
  
 45 **ggaattcggc ccccgag** 17  
  
 <210> 66  
 <211> 319  
 <212> DNA  
 50 <213> Homo sapiens  
  
 <220>  
 <221> CDS  
 <222> (1)..(318)  
 55  
 <400> 66  
  
**gat att gtg atg acc cag tct cac aaa ttc atg tcc aca tca gta gga** 48  
**Asp Ile Val Met Thr Gln Ser His Lys Phe Met Ser Thr Ser Val Gly**

ES 2 494 921 T3

1	5	10	15	
gac agg gtc agc atc acc tgc aag gcc agt cag gat gtg ggg act gct				96
Asp Arg Val Ser Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asp Val Gly Thr Ala	20	25	30	
gta gcc tgg tat caa cag aaa cca ggg caa tct cct aaa cta ctg att				144
Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile	35	40	45	
tac tgg gca tcc acc cgg cac act gga gtc cct gat cgc ttc aca ggc				192
Tyr Trp Ala Ser Thr Arg His Thr Gly Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly	50	55	60	
agt aga tat ggg aca gat ttc act ctc acc att agc aat gtg cag tct				240
Ser Arg Tyr Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Asn Val Gln Ser	65	70	75	80
gaa gac ctg gca gat tat ctc tgt cag caa tat agc aac tat atc acg				288
Glu Asp Leu Ala Asp Tyr Leu Cys Gln Gln Tyr Ser Asn Tyr Ile Thr	85	90	95	
ttc ggt ggt ggg acc aag ctg gag ctg aaa c				319
Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys	100	105		

<210> 67  
 <211> 107  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

5

<400> 67

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					

<210> 68  
 <211> 319  
 <212> DNA  
 <213> Homo sapiens

15

<220>  
 <221> CDS  
 <222> (1)..(318)

20

ES 2 494 921 T3

<400> 68

```

gat att gtg atg acc cag tct cac aaa ttc atg tcc aca tca gta gga      48
Asp Ile Val Met  Thr Gln Ser His Lys Phe Met Ser Thr Ser Val Gly
1           5           10           15

gac agg gtc agc atc acc tgc aag gcc agt cag aat gtg ggg act gct      96
Asp Arg Val Ser  Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asn Val Gly Thr Ala
          20           25           30

gta gcc tgg tat caa cag aaa cca ggg caa tct cct aaa cta ctg att      144
Val Ala Trp Tyr  Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile
          35           40           45

tac tcg gca tcc tac cgg tac agt gga gtc cct gat cgc ttc aca ggc      192
Tyr Ser Ala Ser  Tyr Arg Tyr Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly
          50           55           60

agt aga tat ggg aca gat ttc act ctc acc att agc aat gtg cag tct      240
Ser Arg Tyr Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Asn Val Gln Ser
65           70           75           80

gaa gac ctg gca gat tat ctc tgt cag caa tat agc aac tat atc acg      288
Glu Asp Leu Ala Asp Tyr Leu Cys Gln Gln Tyr Ser Asn Tyr Ile Thr
          85           90           95

ttc ggt ggt ggg acc aag ctg gag ctg aaa c      319
Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys
          100           105

```

5 <210> 69  
 <211> 107  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

10 <400> 69

```

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 Asn 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 Ser Ala Ser  Tyr Arg Tyr Ser 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

```

15 <210> 70  
 <211> 319  
 <212> DNA  
 <213> Homo sapiens

20

ES 2 494 921 T3

<220>  
 <221> CDS  
 <222> (1)..(318)

5 <400> 70

```

gat att gtg atg acc cag tct cac aaa ttc atg tcc aca tca gta gga      48
Asp Ile Val Met Thr Gln Ser His Lys Phe Met Ser Thr Ser Val Gly
1           5           10           15

gac agg gtc agc atc acc tgc aag gcc agt cag aat gtg ggg act gct      96
Asp Arg Val Ser Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asn Val Gly Thr Ala
           20           25           30

gta gcc tgg tat caa cag aaa cca ggg caa tct cct aaa cta ctg att      144
Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile
           35           40           45

tac tgg gca tcc acc cgg cac act gga gtc cct gat cgc ttc aca ggc      192
Tyr Trp Ala Ser Thr Arg His Thr Gly Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly
           50           55           60

agt aga tat ggg aca gat ttc act ctc acc att agc aat gtg cag tct      240
Ser Arg Tyr Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Asn Val Gln Ser
65           70           75           80

gaa gac ctg gca gat tat ctc tgt cag caa tat agc aac tat atc acg      288
Glu Asp Leu Ala Asp Tyr Leu Cys Gln Gln Tyr Ser Asn Tyr Ile Thr
           85           90           95

ttc ggt ggt ggg acc aag ctg gag ctg aaa c      319
Phe Gly Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys
           100           105
    
```

10 <210> 71  
 <211> 107  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

15 <400> 71

```

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 Asn 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
    
```

20 <210> 72  
 <211> 319  
 <212> DNA

ES 2 494 921 T3

<213> Homo sapiens

<220>

<221> CDS

5 <222> (1)..(318)

<400> 72

```

gat att gtg atg acc cag tct cac aaa ttc atg tcc aca tca gta gga      48
Asp Ile Val Met Thr Gln Ser His Lys Phe Met Ser Thr Ser Val Gly
1           5           10           15

gac agg gtc agc atc acc tgc aag gcc agt cag gat gtg ggg act gct      96
Asp Arg Val Ser Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asp Val Gly Thr Ala
          20           25           30

gta gcc tgg tat caa cag aaa cca ggg caa tct cct aaa cta ctg att      144
Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile
          35           40           45

tac tcg gca tcc tac cgg tac agt gga gtc cct gat cgc ttc aca ggc      192
Tyr Ser Ala Ser Tyr Arg Tyr Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly
          50           55           60

agt aga tat ggg aca gat ttc act ctc acc att agc aat gtg cag tct      240
Ser Arg Tyr Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Asn Val Gln Ser
          65           70           75           80

gaa gac ctg gca gat tat ctc tgt cag caa tat agc aac tat atc acg      288
Glu Asp Leu Ala Asp Tyr Leu Cys Gln Gln Tyr Ser Asn Tyr Ile Thr
          85           90           95

ttc ggt ggt ggg acc aag ctg gag ctg aaa c      319
Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys
          100           105

```

10

<210> 73

<211> 107

<212> PRT

<213> Homo sapiens

15

<400> 73

```

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 Ser Ala Ser Tyr Arg Tyr Ser 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

```

20

ES 2 494 921 T3

<210> 74  
 <211> 319  
 <212> DNA  
 <213> Homo sapiens

5

<220>  
 <221> CDS  
 <222> (1)..(318)

10

<400> 74

```

gat att gtg atg acc cag tct cac aaa ttc atg tcc aca tca gta gga      48
Asp Ile Val Met Thr Gln Ser His Lys Phe Met Ser Thr Ser Val Gly
1           5           10           15

gac agg gtc agc atc acc tgc aag gcc agt cag gat gtg ggg act gct      96
Asp Arg Val Ser Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asp Val Gly Thr Ala
          20           25           30

gta gcc tgg tat caa cag aaa cca ggg caa tct cct aaa cta ctg att     144
Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile
          35           40           45

tac tgg gca tcc acc cgg cac act gga gtc cct gat cgc ttc aca ggc     192
Tyr Trp Ala Ser Thr Arg His Thr Gly Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly
          50           55           60

agt aga tat ggg aca gat ttc act ctc acc att agc aat gtg cag tct     240
Ser Arg Tyr Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Asn Val Gln Ser
          65           70           75           80

gaa gac ctg gca gat tat ctc tgt cag caa tat agc agc tat tta acg     288
Glu Asp Leu Ala Asp Tyr Leu Cys Gln Gln Tyr Ser Ser Tyr Leu Thr
          85           90           95

ttc ggt ggt ggg acc aag ctg gag ctg aaa c                          319
Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys
          100           105
    
```

15

<210> 75  
 <211> 107  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

20

<400> 75

ES 2 494 921 T3

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 Ser Tyr Leu Thr  
 85 90 95

Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys Arg  
 100 105

<210> 76  
 <211> 319  
 5 <212> DNA  
 <213> Homo sapiens

<220>  
 <221> CDS  
 10 <222> (1)..(318)

<400> 76

gat att gtg atg acc cag tct cac aaa ttc atg tcc aca tca gta gga 48  
 Asp Ile Val Met Thr Gln Ser His Lys Phe Met Ser Thr Ser Val Gly  
 1 5 10 15

gac agg gtc agc atc acc tgc aag gcc agt cag aat gtg ggg act gct 96  
 Asp Arg Val Ser Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asn Val Gly Thr Ala  
 20 25 30

gta gcc tgg tat caa cag aaa cca ggg caa tct cct aaa cta ctg att 144  
 Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile  
 35 40 45

tac tgg gca tcc acc cgg cac act gga gtc cct gat cgc ttc aca ggc 192  
 Tyr Trp Ala Ser Thr Arg His Thr Gly Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly  
 50 55 60

agt aga tat ggg aca gat ttc act ctc acc att agc aat gtg cag tct 240  
 Ser Arg Tyr Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Asn Val Gln Ser  
 65 70 75 80

gaa gac ctg gca gat tat ctc tgt cag caa tat agc agc tat tta acg 288  
 Glu Asp Leu Ala Asp Tyr Leu Cys Gln Gln Tyr Ser Ser Tyr Leu Thr  
 85 90 95

ttc ggt ggt ggg acc aag ctg gag ctg aaa c 319  
 15 Phe Gly Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys  
 100 105

<210> 77  
 <211> 107  
 <212> PRT

ES 2 494 921 T3

<213> Homo sapiens

<400> 77

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 Asn 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 Ser Tyr Leu Thr  
85 90 95

5 Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys Arg  
100 105

<210> 78

<211> 319

<212> DNA

10 <213> Homo sapiens

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(318)

15

<400> 78

gat att gtg atg acc cag tct cac aaa ttc atg tcc aca tca gta gga 48  
Asp Ile Val Met Thr Gln Ser His Lys Phe Met Ser Thr Ser Val Gly  
1 5 10 15

gac agg gtc agc atc acc tgc aag gcc agt cag gat gtg ggg act gct 96  
Asp Arg Val Ser Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asp Val Gly Thr Ala  
20 25 30

gta gcc tgg tat caa cag aaa cca ggg caa tct cct aaa cta ctg att 144  
Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile  
35 40 45

tac tcg gca tcc tac cgg tac agt gga gtc cct gat cgc ttc aca ggc 192  
Tyr Ser Ala Ser Tyr Arg Tyr Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly  
50 55 60

agt aga tat ggg aca gat ttc act ctc acc att agc aat gtg cag tct 240  
Ser Arg Tyr Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Asn Val Gln Ser  
65 70 75 80

gaa gac ctg gca gat tat ctc tgt cag caa tat agc agc tat tta acg 288  
Glu Asp Leu Ala Asp Tyr Leu Cys Gln Gln Tyr Ser Ser Tyr Leu Thr  
85 90 95

ttc ggt ggt ggg acc aag ctg gag ctg aaa c 319  
Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys  
100 105

20

<210> 79

ES 2 494 921 T3

<211> 107  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

5 <400> 79

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 Ser Ala Ser Tyr Arg Tyr Ser 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 Ser Tyr Leu Thr  
85 90 95

Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys Arg  
100 105

10 <210> 80  
<211> 319  
<212> DNA  
<213> Homo sapiens

15 <220>  
<221> CDS  
<222> (1) .. (318)

<400> 80

ES 2 494 921 T3

gat att gtg atg acc cag tct cac aaa ttc atg tcc aca tca ata gga 48  
 Asp Ile Val Met Thr Gln Ser His Lys Phe Met Ser Thr Ser Ile Gly  
 1 5 10 15

gac agg gtc agc atc acc tgc aag gcc agt cag aat gtg ggg act gct 96  
 Asp Arg Val Ser Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asn Val Gly Thr Ala  
 20 25 30

gta gcc tgg tat caa cag aaa cca ggg caa tct cct aaa cta ctg att 144  
 Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile  
 35 40 45

tac tcg gca tcc tac cgg tac agt gga gtc cct gat cgc ttc aca ggc 192  
 Tyr Ser Ala Ser Tyr Arg Tyr Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly  
 50 55 60

agt aga tat ggg aca gat ttc act ctc acc att agc aat gtg cag tct 240  
 Ser Arg Tyr Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Asn Val Gln Ser  
 65 70 75 80

gaa gac ctg gca gat tat ctc tgt cag caa tat agc agc tat tta acg 288  
 Glu Asp Leu Ala Asp Tyr Leu Cys Gln Gln Tyr Ser Ser Tyr Leu Thr  
 85 90 95

ttc ggt ggt ggg acc aag ctg gag ctg aaa c 319  
 Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys  
 100 105

<210> 81  
 <211> 107  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

5

<400> 81

Asp Ile Val Met Thr Gln Ser His Lys Phe Met Ser Thr Ser Ile 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 Leu 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 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 Ser Tyr Leu Thr  
 85 90 95

Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys Arg  
 100 105

10

<210> 82  
 <211> 319  
 <212> DNA  
 <213> Homo sapiens

15

<220>  
 <221> CDS  
 <222> (1)..(318)

ES 2 494 921 T3

<400> 82

gat att gtg atg acc cag tct cac aaa ttc atg tcc aca tca gta gga	48
Asp Ile Val Met Thr Gln Ser His Lys Phe Met Ser Thr Ser Val Gly	
1 5 10 15	
gac agg gtc agc atc acc tgc aag gcc agt cag gat gtg agt act gct	96
Asp Arg Val Ser Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asp Val Ser Thr Ala	
20 25 30	
gta gcc tgg tat caa cag aaa cca ggg caa tct cct aaa cta ctg att	144
Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile	
35 40 45	
tac tgg gca tcc acc cgg cac act gga gtc cct gat cgc ttc aca ggc	192
Tyr Trp Ala Ser Thr Arg His Thr Gly Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly	
50 55 60	
agt aga tat ggg aca gat ttc act ctc acc att agc aat gtg cag tct	240
Ser Arg Tyr Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Asn Val Gln Ser	
65 70 75 80	
gaa gac ctg gca gat tat ctc tgt cag caa tat agc aac tat atc acg	288
Glu Asp Leu Ala Asp Tyr Leu Cys Gln Gln Tyr Ser Asn Tyr Ile Thr	
85 90 95	
ttc ggt ggt ggg acc aag ctg gag ctg aaa c	319
Phe Gly Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys	
100 105	

5

<210> 83  
 <211> 107  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

10

<400> 83

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 Ser 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 Thr Lys Leu Glu Leu Lys Arg	
100 105	

15

<210> 84  
 <211> 319  
 <212> DNA  
 <213> Homo sapiens

20

<220>  
 <221> CDS

ES 2 494 921 T3

<222> (1)..(318)

<400> 84

	gat att gtg atg acc cag tct cac aaa ttc atg tcc aca tca gta gga	48
	Asp Ile Val Met Thr Gln Ser His Lys Phe Met Ser Thr Ser Val Gly	
	1 5 10 15	
	gac agg gtc agc atc acc tgc aag gcc agt cag gat gtg agt act gct	96
	Asp Arg Val Ser Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asp Val Ser Thr Ala	
	20 25 30	
	gta gcc tgg tat caa cag aaa cca ggg caa tct cct aaa cta ctg att	144
	Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile	
	35 40 45	
	tac tcg gca tcc tac cgg tac agt gga gtc cct gat cgc ttc aca ggc	192
	Tyr Ser Ala Ser Tyr Arg Tyr Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly	
	50 55 60	
	agt aga tat ggg aca gat ttc act ctc acc att agc aat gtg cag tct	240
	Ser Arg Tyr Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Asn Val Gln Ser	
	65 70 75 80	
	gaa gac ctg gca gat tat ctc tgt cag caa tat agc aac tat atc acg	288
	Glu Asp Leu Ala Asp Tyr Leu Cys Gln Gln Tyr Ser Asn Tyr Ile Thr	
	85 90 95	
	ttc ggt ggt ggg acc aag ctg gag ctg aaa c	319
5	Phe Gly Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys	
	100 105	

<210> 85

<211> 107

<212> PRT

10 <213> Homo sapiens

<400> 85

	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 Ser Thr Ala
	20 25 30
15	Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Lys Leu 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 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

<210> 86

<211> 322

20 <212> DNA

<213> Homo sapiens

ES 2 494 921 T3

<220>  
 <221> CDS  
 <222> (1)..(321)

5 <400> 86

```

gat att gtg atg acc cag tct cac aaa ttc atg tcc aca tca gta gga      48
Asp Ile Val Met Thr Gln Ser His Lys Phe Met Ser Thr Ser Val Gly
1                               5                               10                               15

gac agg gtc agc atc acc tgc aag gcc agt cag gat gtg ggg act gct      96
Asp Arg Val Ser Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asp Val Gly Thr Ala
                20                               25                               30

gta gcc tgg tat caa cag aaa cca ggg caa tct cct aaa cta ctg att      144
Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile
                35                               40                               45

tac tgg gca tcc acc cgg cac act gga gtc cct gat cgc ttc aca ggc      192
Tyr Trp Ala Ser Thr Arg His Thr Gly Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly
                50                               55                               60

agt aga tat ggg aca gat ttc act ctc acc att agc aat gtg cag tct      240
Ser Arg Tyr Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Asn Val Gln Ser
65                               70                               75                               80

gaa gac ctg gca gat tat ctc tgt cag caa tat agc aac tat atc acg      288
Glu Asp Leu Ala Asp Tyr Leu Cys Gln Gln Tyr Ser Asn Tyr Ile Thr
                85                               90                               95

ttc ggt ggt ggg acc aag ctg gag ctg aaa cga g                          322
Phe Gly Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys Arg
                100                               105
    
```

10 <210> 87  
 <211> 108  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

15 <400> 87

```

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 Gly
                100                               105
    
```

<210> 88  
 <211> 322

ES 2 494 921 T3

<212> DNA  
<213> Homo sapiens

5 <220>  
<221> CDS  
<222> (1)..(321)

<400> 88

gat att gtg atg acc cag tct cac aaa ttc atg tcc aca tca gta gga 48  
Asp Ile Val Met Thr Gln Ser His Lys Phe Met Ser Thr Ser Val Gly  
1 5 10 15

gac agg gtc agc atc acc tgc aag gcc agt cag aat gtg ggg act gct 96  
Asp Arg Val Ser Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asn Val Gly Thr Ala  
20 25 30

gta gcc tgg tat caa cag aaa cca ggg caa tct cct aaa cta ctg att 144  
Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile  
35 40 45

tac tcg gca tcc tac cgg tac agt gga gtc cct gat cgc ttc aca ggc 192  
Tyr Ser Ala Ser Tyr Arg Tyr Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly  
50 55 60

agt aga tat ggg aca gat ttc act ctc acc att agc aat gtg cag tct 240  
Ser Arg Tyr Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Asn Val Gln Ser  
65 70 75 80

10 gaa gac ctg gca gat tat ctc tgt cag caa tat agc aac tat atc acg 288  
Glu Asp Leu Ala Asp Tyr Leu Cys Gln Gln Tyr Ser Asn Tyr Ile Thr  
85 90 95

ttc ggt ggt ggg acc aag ctg gag ctg aaa cga g 322  
Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys Arg  
100 105

15 <210> 89  
<211> 108  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 89

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 Asn 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 Ser Ala Ser Tyr Arg Tyr Ser 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

20 Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys Arg Gly  
100 105

ES 2 494 921 T3

<210> 90  
 <211> 322  
 <212> DNA  
 5 <213> Homo sapiens  
  
 <220>  
 <221> CDS  
 <222> (1) .. (321)  
 10  
 <400> 90  
  
 gat att gtg atg acc cag tct cac aaa ttc atg tcc aca tca gta gga 48  
 Asp Ile Val Met Thr Gln Ser His Lys Phe Met Ser Thr Ser Val Gly  
 1 5 10 15  
  
 gac agg gtc agc atc acc tgc aag gcc agt cag aat gtg ggg act gct 96  
 Asp Arg Val Ser Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asn Val Gly Thr Ala  
 20 25 30  
  
 gta gcc tgg tat caa cag aaa cca ggg caa tct cct aaa cta ctg att 144  
 Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile  
 35 40 45  
 tac tgg gca tcc acc cgg cac act gga gtc cct gat cgc ttc aca ggc 192  
 Tyr Trp Ala Ser Thr Arg His Thr Gly Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly  
 50 55 60  
  
 agt aga tat ggg aca gat ttc act ctc acc att agc aat gtg cag tct 240  
 Ser Arg Tyr Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Asn Val Gln Ser  
 65 70 75 80  
  
 gaa gac ctg gca gat tat ctc tgt cag caa tat agc aac tat atc acg 288  
 Glu Asp Leu Ala Asp Tyr Leu Cys Gln Gln Tyr Ser Asn Tyr Ile Thr  
 85 90 95  
  
 ttc ggt ggt ggg acc aag ctg gag ctg aaa cga g 322  
 Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys Arg  
 100 105  
 15  
 <210> 91  
 <211> 108  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens  
 20  
 <400> 91

ES 2 494 921 T3

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 Asn 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 Gly  
100 105

<210> 92  
<211> 322  
5 <212> DNA  
<213> Homo sapiens

<220>  
10 <221> CDS  
<222> (1)..(321)

<400> 92

gat att gtg atg acc cag tct cac aaa ttc atg tcc aca tca gta gga 48  
Asp Ile Val Met Thr Gln Ser His Lys Phe Met Ser Thr Ser Val Gly  
1 5 10 15

gac agg gtc agc atc acc tgc aag gcc agt cag gat gtg ggg act gct 96  
Asp Arg Val Ser Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asp Val Gly Thr Ala  
20 25 30

gta gcc tgg tat caa cag aaa cca ggg caa tct cct aaa cta ctg att 144  
Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile  
35 40 45

tac tcg gca tcc tac cgg tac agt gga gtc cct gat cgc ttc aca ggc 192  
Tyr Ser Ala Ser Tyr Arg Tyr Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly  
50 55 60

agt aga tat ggg aca gat ttc act ctc acc att agc aat gtg cag tct 240  
Ser Arg Tyr Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Asn Val Gln Ser  
65 70 75 80

gaa gac ctg gca gat tat ctc tgt cag caa tat agc aac tat atc acg 288  
Glu Asp Leu Ala Asp Tyr Leu Cys Gln Gln Tyr Ser Asn Tyr Ile Thr  
85 90 95

ttc ggt ggt ggg acc aag ctg gag ctg aaa cga g 322  
Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys Arg  
100 105

15 <210> 93  
<211> 108  
<212> PRT  
20 <213> Homo sapiens

ES 2 494 921 T3

<400> 93

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 Ser Ala Ser Tyr Arg Tyr Ser 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 Gly  
100 105

5

<210> 94

<211> 322

<212> DNA

<213> Homo sapiens

10

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(321)

15

<400> 94

gat att gtg atg acc cag tct cac aaa ttc atg tcc aca tca gta gga 48  
Asp Ile Val Met Thr Gln Ser His Lys Phe Met Ser Thr Ser Val Gly  
1 5 10 15

gac agg gtc agc atc acc tgc aag gcc agt cag gat gtg ggg act gct 96  
Asp Arg Val Ser Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asp Val Gly Thr Ala  
20 25 30

gta gcc tgg tat caa cag aaa cca ggg caa tct cct aaa cta ctg att 144  
Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile  
35 40 45

tac tgg gca tcc acc cgg cac act gga gtc cct gat cgc ttc aca ggc 192  
Tyr Trp Ala Ser Thr Arg His Thr Gly Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly  
50 55 60

agt aga tat ggg aca gat ttc act ctc acc att agc aat gtg cag tct 240  
Ser Arg Tyr Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Asn Val Gln Ser  
65 70 75 80

gaa gac ctg gca gat tat ctc tgt cag caa tat agc agc tat tta acg 288  
Glu Asp Leu Ala Asp Tyr Leu Cys Gln Gln Tyr Ser Ser Tyr Leu Thr  
85 90 95

ttc ggt ggt ggg acc aag ctg gag ctg aaa cga g 322  
Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys Arg  
100 105

ES 2 494 921 T3

<210> 95  
 <211> 108  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

5

<400> 95

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 Ser Tyr Leu Thr  
 85 90 95

Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys Arg Gly  
 100 105

10

<210> 96  
 <211> 322  
 <212> DNA  
 <213> Homo sapiens

15

<220>  
 <221> CDS  
 <222> (1)..(321)

20

<400> 96

ES 2 494 921 T3

gat att gtg atg acc cag tct cac aaa ttc atg tcc aca tca gta gga 48  
 Asp Ile Val Met Thr Gln Ser His Lys Phe Met Ser Thr Ser Val Gly  
 1 5 10 15

gac agg gtc agc atc acc tgc aag gcc agt cag aat gtg ggg act gct 96  
 Asp Arg Val Ser Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asn Val Gly Thr Ala  
 20 25 30

gta gcc tgg tat caa cag aaa cca ggg caa tct cct aaa cta ctg att 144  
 Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile  
 35 40 45

tac tgg gca tcc acc cgg cac act gga gtc cct gat cgc ttc aca ggc 192  
 Tyr Trp Ala Ser Thr Arg His Thr Gly Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly  
 50 55 60

agt aga tat ggg aca gat ttc act ctc acc att agc aat gtg cag tct 240  
 Ser Arg Tyr Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Asn Val Gln Ser  
 65 70 75 80

gaa gac ctg gca gat tat ctc tgt cag caa tat agc agc tat tta acg 288  
 Glu Asp Leu Ala Asp Tyr Leu Cys Gln Gln Tyr Ser Ser Tyr Leu Thr  
 85 90 95

ttc ggt ggt ggg acc aag ctg gag ctg aaa cgt g 322  
 Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys Arg  
 100 105

<210> 97  
 <211> 108  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

5

<400> 97

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 Asn 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 Ser Tyr Leu Thr  
 85 90 95

Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys Arg Gly  
 100 105

10

<210> 98  
 <211> 322  
 <212> DNA  
 <213> Homo sapiens

15

<220>  
 <221> CDS  
 <222> (1)..(321)

20

<400> 98

ES 2 494 921 T3

gat att gtg atg acc cag tct cac aaa ttc atg tcc aca tca gta gga 48  
 Asp Ile Val Met Thr Gln Ser His Lys Phe Met Ser Thr Ser Val Gly  
 1 5 10 15

gac agg gtc agc atc acc tgc aag gcc agt cag gat gtg ggg act gct 96  
 Asp Arg Val Ser Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asp Val Gly Thr Ala  
 20 25 30

gta gcc tgg tat caa cag aaa cca ggg caa tct cct aaa cta ctg att 144  
 Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile  
 35 40 45

tac tcg gca tcc tac cgg tac agt gga gtc cct gat cgc ttc aca ggc 192  
 Tyr Ser Ala Ser Tyr Arg Tyr Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly  
 50 55 60

agt aga tat ggg aca gat ttc act ctc acc att agc aat gtg cag tct 240  
 Ser Arg Tyr Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Asn Val Gln Ser  
 65 70 75 80

gaa gac ctg gca gat tat ctc tgt cag caa tat agc agc tat tta acg 288  
 Glu Asp Leu Ala Asp Tyr Leu Cys Gln Gln Tyr Ser Ser Tyr Leu Thr  
 85 90 95

ttc ggt ggt ggg acc aag ctg gag ctg aaa cgt g 322  
 Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys Arg  
 100 105

5 <210> 99  
 <211> 108  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

10 <400> 99

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 Ser Ala Ser Tyr Arg Tyr Ser 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 Ser Tyr Leu Thr  
 85 90 95

Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys Arg Gly  
 100 105

15 <210> 100  
 <211> 322  
 <212> DNA  
 <213> Homo sapiens

<220>

ES 2 494 921 T3

<221> CDS  
 <222> (1)..(321)

<400> 100

5

```

gat att gtg atg acc cag tct cac aaa ttc atg tcc aca tca ata gga      48
Asp Ile Val Met Thr Gln Ser His Lys Phe Met Ser Thr Ser Ile Gly
1                               5                               10           15

gac agg gtc agc atc acc tgc aag gcc agt cag aat gtg ggg act gct      96
Asp Arg Val Ser Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asn Val Gly Thr Ala
                20                               25           30

gta gcc tgg tat caa cag aaa cca ggg caa tct cct aaa cta ctg att      144
Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile
                35                               40           45

tac tcg gca tcc tac cgg tac agt gga gtc cct gat cgc ttc aca ggc      192
Tyr Ser Ala Ser Tyr Arg Tyr Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly
                50                               55           60

agt aga tat ggg aca gat ttc act ctc acc att agc aat gtg cag tct      240
Ser Arg Tyr Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Asn Val Gln Ser
65                               70                               75           80

gaa gac ctg gca gat tat ctc tgt cag caa tat agc agc tat tta acg      288
Glu Asp Leu Ala Asp Tyr Leu Cys Gln Gln Tyr Ser Ser Tyr Leu Thr
                85                               90           95

ttc ggt ggt ggg acc aag ctg gag ctg aaa cgt g      322
Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys Arg
                100                               105
    
```

<210> 101  
 <211> 108  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

10

<400> 101

```

Asp Ile Val Met Thr Gln Ser His Lys Phe Met Ser Thr Ser Ile 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 Leu 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 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 Ser Tyr Leu Thr
                85                               90           95

Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys Arg Gly
                100                               105
    
```

15

<210> 102  
 <211> 322  
 <212> DNA

ES 2 494 921 T3

<213> Homo sapiens

<220>

<221> CDS

5 <222> (1)..(321)

<400> 102

gat att gtg atg acc cag tct cac aaa ttc atg tcc aca tca gta gga 48  
 Asp Ile Val Met Thr Gln Ser His Lys Phe Met Ser Thr Ser Val Gly  
 1 5 10 15

gac agg gtc agc atc acc tgc aag gcc agt cag gat gtg agt act gct 96  
 Asp Arg Val Ser Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asp Val Ser Thr Ala  
 20 25 30

gta gcc tgg tat caa cag aaa cca ggg caa tct cct aaa cta ctg att 144  
 Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile  
 35 40 45

tac tgg gca tcc acc cgg cac act gga gtc cct gat cgc ttc aca ggc 192  
 Tyr Trp Ala Ser Thr Arg His Thr Gly Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly  
 50 55 60

agt aga tat ggg aca gat ttc act ctc acc att agc aat gtg cag tct 240  
 Ser Arg Tyr Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Asn Val Gln Ser  
 65 70 75 80

gaa gac ctg gca gat tat ctc tgt cag caa tat agc aac tat atc acg 288  
 Glu Asp Leu Ala Asp Tyr Leu Cys Gln Gln Tyr Ser Asn Tyr Ile Thr  
 85 90 95

ttc ggt ggt ggg acc aag ctg gag ctg aaa cgt g 322  
 Phe Gly Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys Arg  
 100 105

10

<210> 103

<211> 108

<212> PRT

15 <213> Homo sapiens

<400> 103

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 Ser 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 Gly  
 100 105

20

ES 2 494 921 T3

<210> 104  
 <211> 322  
 <212> DNA  
 <213> Homo sapiens  
 5  
 <220>  
 <221> CDS  
 <222> (1)..(321)  
 10 <400> 104

```

gat att gtg atg acc cag tct cac aaa ttc atg tcc aca tca gta gga      48
Asp Ile Val Met Thr Gln Ser His Lys Phe Met Ser Thr Ser Val Gly
1           5           10           15

gac agg gtc agc atc acc tgc aag gcc agt cag gat gtg agt act gct      96
Asp Arg Val Ser Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asp Val Ser Thr Ala
           20           25           30

gta gcc tgg tat caa cag aaa cca ggg caa tct cct aaa cta ctg att      144
Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile
           35           40           45

tac tcg gca tcc tac cgg tac agt gga gtc cct gat cgc ttc aca ggc      192
Tyr Ser Ala Ser Tyr Arg Tyr Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly
           50           55           60

agt aga tat ggg aca gat ttc act ctc acc att agc aat gtg cag tct      240
Ser Arg Tyr Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Asn Val Gln Ser
65           70           75           80

gaa gac ctg gca gat tat ctc tgt cag caa tat agc aac tat atc acg      288
Glu Asp Leu Ala Asp Tyr Leu Cys Gln Gln Tyr Ser Asn Tyr Ile Thr
           85           90           95

ttc ggt ggt ggg acc aag ctg gag ctg aaa cga g      322
Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys Arg
           100           105
  
```

15 <210> 105  
 <211> 108  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens  
 20 <400> 105



ES 2 494 921 T3

ggggctaagg tgaggcaggt ggcgccagcc agtgccacac ccaatgccca tgagcccaga 120  
 cactggacgc tgaacctogc ggacagttaa gaaccaggc gcctctgcgc cctgggccc 180  
 gctctgtccc acaccgcggt cacatggcac cacctctctt gcagcttcca ccaagggccc 240  
 atccgtcttc ccctggcgc cctgctccag gagcaacctc gagagcacag ccgcccctggg 300  
 ctgcctggtc aaggactact tccccgaacc ggtgacggtg tcgtggaact caggcgcct 360  
 gaccagcggc gtgcacacct tcccggctgt cctacagtcc tcaggactct actccctcag 420  
 cagcgtggtg accgtgcctt ccagcagctt gggcacgaag acctacacct gcaacgtaga 480  
 tcacaagccc agcaacacca aggtggacaa gagagttgag tccaaatag gtcccccatg 540  
 cccaccatgc ccagcacctg agttcctggg gggaccatca gtcttctgt tcccccaaa 600  
 acccaaggac actctcatga tctcccgac ccctgaggtc acgtgcgtgg tggaggacgt 660  
 gagccaggaa gaccccagg tccagttcaa ctggtacgtg gatggcgtgg aggtgcataa 720  
 tgccaagaca aagccgcggg aggagcagtt caacagcacg taccgtgtgg tcagcgtcct 780  
 caccgtcctg caccaggact ggctgaacgg caaggagtac aagtgcaagg tctccaacia 840  
 aggcctcccg tcctccatcg agaaaacct ctccaaagcc aaagggcagc cccgagagcc 900  
 acaggtgtgc accctgcccc catcccagga ggagatgacc aagaaccagg tcagcctgtg 960  
 gtgcctggtc aaaggcttct accccagcga catcgccgtg gagggggaga gcaatgggca 1020  
 gccggagaac aactacaaga ccagcctcc cgtgctggac tccgacggct ccttcttctt 1080  
 ctacagcagg ctaaccgtgg acaagagcag gtggcaggag ggaatgtct tctcatgctc 1140  
 cgtgatgat gaggtctctgc acaaccacta cacacagaag agcctctccc tgtctctggg 1200  
 taaatgagcg gccgc 1215

<210> 107  
 <211> 684  
 <212> DNA  
 <213> Homo sapiens

5

<400> 107

ggcctcgggg gccgaattcc taaactctga gggggtcgga tgacgtggcc attctttgcc 60  
 taaagcattg agtttactgc aaggtcagaa aagcatgcaa agccctcaga atgggtgcaa 120  
 agagctccaa caaaacaatt tagaacttta ttaaggaata gggggaagct aggaagaaac 180  
 tcaaaacatc aagattttaa atacgcttct tggctcctt gctataatta tctgggataa 240  
 gcatgctgtt ttctgtctgt ccctaacatg ccctgtgatt atccgcaaac aacacaccca 300  
 agggcagaac tttgttactt aacaccatc ctgtttgctt ctttcctcag gaactgtggc 360  
 tgcaccatct gtcttcatct tcccgccatc tgatgagcag ttgaaatctg gaactgcctc 420  
 tgttgtgtgc ctgctgaata acttctatcc cagagaggcc aaagtacagt ggaaggtgga 480  
 taacgcctc caatcgggta actcccagga gagtgtcaca gagcaggaca gcaaggacag 540  
 cacctacagc ctcagcagca ccctgacgct gagcaaagca gactacgaga aacacaaagt 600  
 ctacgcctgc gaagtcaacc atcagggcct gagctcggcc gtcacaaaga gcttcaacag 660  
 gggagagtgt tagagggcgg ccgc 684

10

ES 2 494 921 T3

<210> 108  
 <211> 1215  
 <212> DNA  
 5 <213> Homo sapiens  
 <400> 108  
 ggcctcgggg gcctcccagg ctctgggcag gcacaggcta ggtgccocta acccaggccc 60  
 tgcacacaaa ggggcagggtg ctgggctcag acctgccaaag agccatatcc gggaggaccc 120  
 tgcccctgac ctaagcccac cccaaaggcc aaactctcca ctccctcagc tcggacacct 180  
 tctctctcc cagattccag taactcccaa tcttctctct gcagcttcca ccaagggccc 240  
 atccgtcttc ccctggcgc cctgctccag gagcacctcc gagagcacag ccgccctggg 300  
 ctgctgggtc aaggactact tccccgaacc ggtgacgggtg tcgtggaact caggcgcct 360  
 gaccagcggc gtgcacacct tcccggtgt cctacagtcc tcaggactct actccctcag 420  
 cagcgtgggtg accgtgccct ccagcagctt gggcacgaag acctacacct gcaacgtaga 480  
 tcacaagccc agcaacacca aggtggacaa gagagttgag tccaaatatg gtccccatg 540  
 cccaccatgc ccagcacctg agttcctggg gggaccatca gtcttctgt tcccccaaa 600  
 acccaaggac actctcatga tctcccgac ccctgaggtc acgtgcgtgg tggtagcgt 660  
 gagccaggaa gacccogagg tccagttcaa ctggtacgtg gatggcgtgg aggtgcataa 720  
 tgccaagaca aagccgctgg aggagcagtt caacagcacg taccgtgtgg tcagcgtcct 780  
 caccgtcctg caccaggact ggctgaacg caaggagtac aagtgaagg tctccaacaa 840  
 aggcctcccg tcctccatcg agaaaacat ctccaaagcc aaagggcagc cccgagagcc 900  
 acaggtgtac accctgcccc catcccagtg cgagatgacc aagaaccagg tcagcctgtc 960  
 ctgcgcggtc aaaggcttct atcccagcga catcgccgtg gagtgggaga gcaatgggca 1020  
 gccggagaac aactacaaga ccacgcctcc cgtgctggac tccgacggct ccttcttct 1080  
 cgtgagcagg ctaaccgtgg acaagagcag gtggcaggag gggaatgtct tctcatgctc 1140  
 cgtgatgcat gaggtctgc acaaccacta cacacagaag agcctctccc tgtctctggg 1200  
 taaatgagcg gccgc 1215

10 <210> 109  
 <211> 15  
 <212> DNA  
 <213> Mus musculus

15 <400> 109

acctactgga tgac 15

20 <210> 110  
 <211> 51  
 <212> DNA  
 <213> Mus musculus

25 <400> 110

tacattaatc ctgacgtgg ttatactaag tacaatcaga agttcaaggt c 51

ES 2 494 921 T3

<210> 111  
 <211> 27  
 <212> DNA  
 <213> Mus musculus  
 5  
 <400> 111  
 ggtaacctcg gctactctt tgactac 27  
 10  
 <210> 112  
 <211> 15  
 <212> DNA  
 <213> Mus musculus  
 15  
 <400> 112  
 gactactata tgcac 15  
 20  
 <210> 113  
 <211> 51  
 <212> DNA  
 <213> Mus musculus  
 <400> 113  
 25  
 tacattaatc ctagcagtg ttactaag tacaatcgga agttcagga c 51  
 30  
 <210> 114  
 <211> 27  
 <212> DNA  
 <213> Mus musculus  
 <400> 114  
 35  
 gggggtaacg gttactacct tgactac 27  
 40  
 <210> 115  
 <211> 106  
 <212> PRT  
 <213> Mus musculus  
 <400> 115  
 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 Leu 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 Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Asn Val Gln Ser  
 45 65 70 75 80  
 Glu Asp Leu Ala Asp Tyr Phe Cys Gln Gln Tyr Ser Ser Tyr Leu Thr  
 85 90 95  
 Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys  
 100 105

ES 2 494 921 T3

<210> 116  
 <211> 106  
 <212> PRT  
 <213> Mus musculus

5 <400> 116

Asp Ile Gln 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 Ser 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 Gly Ser 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 Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys  
 100 105

10 <210> 117  
 <211> 33  
 <212> DNA  
 <213> Mus musculus

15 <400> 117  
 aaggccagtc aggatgtggg tactgctgta gcc 33

20 <210> 118  
 <211> 21  
 <212> DNA  
 <213> Mus musculus

25 <400> 118  
 tgggcaatcca cccggcacac t 21

30 <210> 119  
 <211> 24  
 <212> DNA  
 <213> Mus musculus

35 <400> 119  
 cagcaatata gcagctatct cacc 24

40 <210> 120  
 <211> 33  
 <212> DNA  
 <213> Mus musculus  
 <400> 120  
 aaggccagtc aggatgtgag tactgctgta gcc 33

45 <210> 121  
 <211> 21



ES 2 494 921 T3

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

5 <400> 126

Met Asp Trp Thr Trp Ser Ile Leu Phe Leu Val Ala Ala Ala Thr Gly  
 1 5 10 15

Ala His Ser

10 <210> 127  
 <211> 66  
 <212> DNA  
 <213> Homo sapiens

15 <220>  
 <221> CDS  
 <222> (1)..(66)

<400> 127

atg gac atg agg gtc ccc gct cag ctc ctg ggg ctc ctg cta ctc tgg 48  
 Met Asp Met Arg Val Pro Ala Gln Leu Leu Gly Leu Leu Leu Leu Trp  
 1 5 10 15

20 ctc cga ggt gcc aga tgt 66  
 Leu Arg Gly Ala Arg Cys  
 20

25 <210> 128  
 <211> 22  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

<400> 128

Met Asp Met Arg Val Pro Ala Gln Leu Leu Gly Leu Leu Leu Leu Trp  
 1 5 10 15

Leu Arg Gly Ala Arg Cys  
 20

30 <210> 129  
 <211> 354  
 <212> DNA  
 <213> Homo sapiens

35 <220>  
 <221> CDS  
 <222> (1)..(354)

40 <400> 129

ES 2 494 921 T3

cag gtc cag ctt gtg cag tct ggg gct gag gtg aag aag cct ggg tcc 48  
 Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ser  
 1 5 10 15

tca gtg aag gtt tcc tgc aag gcc tct gga ggc acc ttc agt gac tac 96  
 Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Gly Thr Phe Ser Asp Tyr  
 20 25 30

tat atg cac tgg gtg cgc cag gcc ccc gga caa ggg ctt gag tgg atg 144  
 Tyr Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met  
 35 40 45

gga tac att aat cct agc agt ggt tat act aag tac aat cgg aag ttc 192  
 Gly Tyr Ile Asn Pro Ser Ser Gly Tyr Thr Lys Tyr Asn Arg Lys Phe  
 50 55 60

agg gac aga gtc acc att acc gcg gac aaa tcc acg agc aca gcc tac 240  
 Arg Asp Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr  
 65 70 75 80

atg gag ctg agc agc ctg aga tct gaa gac acg gct gtg tat tac tgt 288  
 Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys  
 85 90 95

gcg aga ggg ggt aac ggt tac tac ctt gac tac tgg ggc cag ggc acc 336  
 Ala Arg Gly Gly Asn Gly Tyr Tyr Leu Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr  
 100 105 110

acg gtc acc gtc tcc tca 354  
 Thr Val Thr Val Ser Ser  
 115

<210> 130  
 <211> 118  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

5

<400> 130

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

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

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

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

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

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

Thr Val Thr Val Ser Ser  
 115

10

<210> 131  
 <211> 357

ES 2 494 921 T3

<212> DNA  
 <213> Homo sapiens

5 <220>  
 <221> CDS  
 <222> (1)..(357)

<400> 131

cag	gtg	cag	ctg	gtg	cag	tct	gga	cct	gac	gtg	aag	aag	ccg	ggg	gcc	48
Gln	Val	Gln	Leu	Val	Gln	Ser	Gly	Pro	Asp	Val	Lys	Lys	Pro	Gly	Ala	
1			5					10					15			
tca	gtg	aag	gtc	tcc	tgc	aag	gcc	tct	ggc	tac	atg	ttt	tcc	gac	aac	96
Ser	Val	Lys	Val	Ser	Cys	Lys	Ala	Ser	Gly	Tyr	Met	Phe	Ser	Asp	Asn	
		20					25						30			
aac	atg	gac	tgg	gcg	cga	cag	gcc	cct	gga	caa	ggg	ctt	gag	tgg	atg	144
Asn	Met	Asp	Trp	Ala	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Gln	Gly	Leu	Glu	Trp	Met	
		35				40						45				
gga	gat	att	aat	act	aaa	agt	ggt	ggt	tct	atc	tac	aac	cag	aag	ttc	192
Gly	Asp	Ile	Asn	Thr	Lys	Ser	Gly	Gly	Ser	Ile	Tyr	Asn	Gln	Lys	Phe	
	50					55					60					
aag	ggc	aga	gtc	atc	atg	acc	ata	gac	aaa	tcc	acg	ggc	aca	gcc	tac	240
Lys	Gly	Arg	Val	Ile	Met	Thr	Ile	Asp	Lys	Ser	Thr	Gly	Thr	Ala	Tyr	
65					70					75					80	
atg	gaa	ttg	agg	agc	ctg	aga	tca	gac	gac	acg	gcc	ata	tat	tac	tgt	288
Met	Glu	Leu	Arg	Ser	Leu	Arg	Ser	Asp	Asp	Thr	Ala	Ile	Tyr	Tyr	Cys	
				85					90					95		
gcg	agg	agg	agg	agc	tac	ggc	tac	tac	ttt	gac	tac	tgg	ggc	cag	gga	336
Ala	Arg	Arg	Arg	Ser	Tyr	Gly	Tyr	Tyr	Phe	Asp	Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly	
			100					105					110			
acc	ctg	gtc	acc	gtc	tcc	tca										357
Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser										
		115														

10

<210> 132  
 <211> 119  
 <212> PRT  
 15 <213> Homo sapiens

<400> 132

ES 2 494 921 T3

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

<210> 133  
 <211> 318  
 5 <212> DNA  
 <213> Homo sapiens

<220>  
 <221> CDS  
 10 <222> (1)..(318)

<400> 133

gac atc gtg atg acc cag tct cca tcc tcc ctg tct gca tct gta gga 48  
 Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly  
 1 5 10 15  
 gac aga gtc acc atc act tgc aag gcc agt cag aat gtg ggg act gct 96  
 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asn Val Gly Thr Ala  
 20 25 30  
 gta gcc tgg tat cag cag aaa cca ggg aaa gcc cct aag ctc ctg atc 144  
 Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile  
 35 40 45  
 tat tcg gca tcc tac cgg tac agt ggg gtc cca tca agg ttc agt ggc 192  
 Tyr Ser Ala Ser Tyr Arg Tyr Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly  
 50 55 60  
 15 agt cga tat ggg aca gat ttc act ctc acc atc tca agc ttg caa cct 240  
 Ser Arg Tyr Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro  
 65 70 75 80  
 gaa gat tta gca act tac tac tgt cag caa tat agc aac tat atc acg 288  
 Glu Asp Leu Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Ser Asn Tyr Ile Thr  
 85 90 95  
 ttc gcc gga ggg acc aag gtg gag atc aaa 318  
 Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys  
 100 105

ES 2 494 921 T3

<210> 134  
 <211> 106  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

5

<400> 134  
 Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly  
 1 5 10 15  
 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asn Val Gly Thr Ala  
 20 25 30  
 Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile  
 35 40 45  
 Tyr Ser Ala Ser Tyr Arg Tyr Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly  
 50 55 60  
 Ser Arg Tyr Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro  
 65 70 75 80  
 Glu Asp Leu Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Ser Asn Tyr Ile Thr  
 85 90 95  
 Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys  
 100 105

10 <210> 135  
 <211> 354  
 <212> DNA  
 <213> Homo sapiens

15 <220>  
 <221> CDS  
 <222> (1)..(354)

20 <400> 135

gag gtc cag ctt gtg cag tct ggg gct gag gtg gtg aag cct ggg tcc 48  
 Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Val Lys Pro Gly Ser  
 1 5 10 15  
 tca gtg aag gtt tcc tgc acg gcc tct gga tac acc ttc agt gac tac 96  
 Ser Val Lys Val Ser Cys Thr Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Ser Asp Tyr

ES 2 494 921 T3

	20		25		30	
	tat atg cac tgg gtg cgc cag gcc ccc gga gaa ggg ctt gag tgg atg					144
	Tyr Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Glu Gly Leu Glu Trp Met					
	35		40		45	
	gga tac att aat cct agc agt ggt tat act aag tac aat cgg aag ttc					192
	Gly Tyr Ile Asn Pro Ser Ser Gly Tyr Thr Lys Tyr Asn Arg Lys Phe					
	50		55		60	
	agg gac aga gtc acc att acc gcg gac aaa tcc acg agc aca gcc tac					240
	Arg Asp Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr					
	65		70		75	80
	atg gag ctg agc agc ctg aga tct gaa gac acg gct gtg tat tac tgt					288
	Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys					
		85		90		95
	gcg aga ggg ggt ctc ggt tac tac ctt gac tac tgg ggc gag ggc acc					336
	Ala Arg Gly Gly Leu Gly Tyr Tyr Leu Asp Tyr Trp Gly Glu Gly Thr					
		100		105		110
	acg gtc acc gtc tcc tca					354
	Thr Val Thr Val Ser Ser					
		115				

<210> 136  
 <211> 118  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

5

<400> 136

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

10

<210> 137  
 <211> 357  
 <212> DNA  
 <213> Homo sapiens

15

<220>

ES 2 494 921 T3

<221> CDS  
 <222> (1)..(357)

<400> 137

5

```

gag gtg cag ctg gtg cag tct gga gct cag gtg aag aag ccg ggg gcc      48
Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Gln Val Lys Lys Pro Gly Ala
1                               5                               10                               15

tca gtg aag gtc tcc tgc aag gcc tct ggc tac acg ttt tcc gac aac      96
Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Ser Asp Asn
20                               25                               30

aac atg gac tgg gtg cga cag gcc cct gga aaa ggg ctt gag tgg atg      144
Asn Met Asp Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Met
35                               40                               45

gga gat att aat act aaa agt ggt ggt tct atc tac aac cag aag ttc      192
Gly Asp Ile Asn Thr Lys Ser Gly Gly Ser Ile Tyr Asn Gln Lys Phe
50                               55                               60

aag ggc aga gtc atc atg acc ata gac aaa tcc acg ggc aca gcc tac      240
Lys Gly Arg Val Ile Met Thr Ile Asp Lys Ser Thr Gly Thr Ala Tyr
65                               70                               75                               80

atg gaa ttg agg agc ctg aga tca gac gac acg gcc ata tat tac tgt      288
Met Glu Leu Arg Ser Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Ile Tyr Tyr Cys
85                               90                               95

gcg agg agg agg agc tac ggc tac tac ttt gac tac tgg ggc cgg gga      336
Ala Arg Arg Arg Ser Tyr Gly Tyr Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Arg Gly
100                               105                               110

acc ctg gtc acc gtc tcc tca                                          357
Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115
  
```

<210> 138  
 <211> 119  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

10

<400> 138

```

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

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

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

Gly Asp Ile Asn Thr Lys Ser Gly Gly Ser Ile Tyr Asn Gln Lys Phe
15
  
```

15

ES 2 494 921 T3

50

55

60

Lys Gly Arg Val Ile Met Thr Ile Asp Lys Ser Thr Gly Thr Ala Tyr  
65 70 75 80

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

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

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser  
115

<210> 139

<211> 318

5 <212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<221> CDS

10 <222> (1)..(318)

<400> 139

gac atc gtg atg acc cag tct cca tcc tcc ctg tct gca tct gta gga 48  
Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly  
1 5 10 15

gac aga gtc acc atc act tgc aag gcc agt cag aat gtg ggg act gct 96  
Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asn Val Gly Thr Ala  
20 25 30

gta gcc tgg tat cag cag aaa cca ggg aaa gcc cct aag ctc ctg atc 144  
Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile  
35 40 45

tat tcg gca tcc tac cgg tac agt ggg gtc cca tca agg ttc agt ggc 192  
Tyr Ser Ala Ser Tyr Arg Tyr Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly  
50 55 60

agt cga tat ggg aca gat ttc act ctc acc atc tca agc ttg caa cct 240  
Ser Arg Tyr Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro  
65 70 75 80

gaa gat tta gca act tac tac tgt cag caa tat agc aac tat atc acg 288  
Glu Asp Leu Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Ser Asn Tyr Ile Thr  
85 90 95

ttc ggc caa ggg acc aag gtg gag atc aaa 318  
Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys  
100 105

15 <210> 140

<211> 106

<212> PRT

<213> Homo sapiens

20 <400> 140

ES 2 494 921 T3

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

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

Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile  
 35 40 45

Tyr Ser Ala Ser Tyr Arg Tyr Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly  
 50 55 60

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

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

Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys  
 100 105

<210> 141  
 <211> 354  
 5 <212> DNA  
 <213> Homo sapiens

<220>  
 <221> CDS  
 10 <222> (1)..(354)

<400> 141

gag gtc cag ctt gtg cag tct ggg gct gag gtg cag aag cct ggg gcc 48  
 Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Gln Lys Pro Gly Ala  
 1 5 10 15

tca gtg aag gtt tcc tgc aag gcc tct gga tac acc ttc act gac tac 96  
 Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr  
 20 25 30

tat atg cac tgg gtg cgc cag gcc ccc gga gaa ggg ctt gag tgg atg 144  
 Tyr Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Glu Gly Leu Glu Trp Met  
 35 40 45

gga tac att aat cct agc agt ggt tat act aag tac aat cgg aag ttc 192  
 Gly Tyr Ile Asn Pro Ser Ser Gly Tyr Thr Lys Tyr Asn Arg Lys Phe  
 50 55 60

agg gac aga gtc acc att acc gcg gac aaa tcc acg agc aca gcc tac 240  
 Arg Asp Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr  
 65 70 75 80

atg gag ctg agc agc ctg aga tct gaa gac acg gct gtg tat tac tgt 288  
 Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys  
 85 90 95

gcg aga ggg ggt caa ggt tac tac ctt gac tac tgg ggc gag gcc acc 336  
 Ala Arg Gly Gly Gln Gly Tyr Tyr Leu Asp Tyr Trp Gly Glu Gly Thr  
 100 105 110

acg gtc acc gtc tcc tca 354  
 Thr Val Thr Val Ser Ser  
 115

15

ES 2 494 921 T3

<210> 142  
 <211> 118  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

5

<400> 142  
 Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Gln Lys Pro Gly Ala  
 1 5 10 15  
 Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr  
 20 25 30  
 Tyr Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Glu Gly Leu Glu Trp Met  
 35 40 45  
 Gly Tyr Ile Asn Pro Ser Ser Gly Tyr Thr Lys Tyr Asn Arg Lys Phe  
 50 55 60  
 Arg Asp Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr  
 65 70 75 80  
 Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys  
 85 90 95  
 Ala Arg Gly Gly Gln Gly Tyr Tyr Leu Asp Tyr Trp Gly Glu Gly Thr  
 100 105 110  
 Thr Val Thr Val Ser Ser  
 115

ç

10 <210> 143  
 <211> 318  
 <212> DNA  
 <213> Homo sapiens

15 <220>  
 <221> CDS  
 <222> (1)..(318)

20 <400> 143

gac atc gtg atg acc cag tct cca tcc tcc ctg tct gca tct gta gga 48  
 Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly  
 1 5 10 15

gac aga gtc acc atc act tgc aag gcc agt cag aat gtg ggg act gct 96  
 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asn Val Gly Thr Ala  
 20 25 30

ES 2 494 921 T3

gta gcc tgg tat cag cag aaa cca ggg aaa gcc cct aag ctc ctg atc 144  
 Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile  
 35 40 45

tat tcg gca tcc tac cgg gcc agt ggg gtc cca tca agg ttc agt ggc 192  
 Tyr Ser Ala Ser Tyr Arg Ala Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly  
 50 55 60

agt cga tat ggg aca gat ttc act ctc acc atc tca agc ttg caa cct 240  
 Ser Arg Tyr Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro  
 65 70 75 80

gaa gat tta gca act tac tac tgt cag caa tat agc aac tat atc acg 288  
 Glu Asp Leu Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Ser Asn Tyr Ile Thr  
 85 90 95

ttc ggc caa ggg acc aag gtg gag atc aaa 318  
 Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys  
 100 105

<210> 144  
 <211> 106  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

5

<400> 144

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

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

Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile  
 35 40 45

Tyr Ser Ala Ser Tyr Arg Ala Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly  
 50 55 60

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

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

Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys  
 100 105

10

## REIVINDICACIONES

1. Un anticuerpo biespecífico que puede sustituir funcionalmente al factor VIII de coagulación y que presenta la actividad para mejorar la activación del factor X, que comprende:
- un primer dominio que reconoce al factor de coagulación IX y/o al factor de coagulación IX activado; y
- 5 un segundo dominio que reconoce al factor de coagulación X, donde
- el primer dominio comprende un primer polipéptido que comprende la cadena H de un anticuerpo contra el factor de coagulación IX y/o el factor de coagulación IX activado; el segundo dominio comprende un segundo polipéptido que comprende la cadena H de un anticuerpo contra el factor de coagulación X;
- 10 y tanto el primero como el segundo dominio comprenden un tercer polipéptido que comprende una cadena L compartida en común de un anticuerpo contra el factor de coagulación IX, el factor de coagulación IX activado o el factor de coagulación X,
- donde el tercer polipéptido comprende un sitio de unión a antígenos que comprende las CDR1, 2 y 3 seleccionadas individualmente de CDR1, 2 y 3 de cada cadena L de dos o más anticuerpos;
- 15 **2.** El anticuerpo biespecífico de la reivindicación 1, donde el primer polipéptido comprende un sitio de unión a antígenos que comprende las secuencias de aminoácidos de las CDR de (a1), (a2), o (a3) y el segundo polipéptido comprende un sitio de unión a antígenos que comprende las secuencias de aminoácidos de (b), donde:
- (a1) Las CDR1, 2 y 3 de cadena H comprenden las secuencias de aminoácidos de las SEQ ID NO: 3, 5 y 7, respectivamente;
- (a2) Las CDR1, 2 y 3 de cadena H comprenden las secuencias de aminoácidos de las SEQ ID NO: 21, 5 y 22, respectivamente;
- 20 (a3) Las CDR1, 2 y 3 de cadena H comprenden las secuencias de aminoácidos de las SEQ ID NO: 16, 17 y 18, respectivamente; y
- (b) Las CDR1, 2 y 3 de cadena H comprenden las secuencias de aminoácidos de las SEQ ID NO: 26, 28 y 30, respectivamente.
- 25 **3.** El anticuerpo biespecífico de la reivindicación 1 que reconoce al factor de coagulación IX y/o al factor de coagulación IX activado y al factor de coagulación X, donde la función sustitutiva del factor VIII de coagulación es reducir el tiempo de coagulación en 50 segundos o más en comparación con el tiempo de coagulación observado en la ausencia de un anticuerpo en una prueba de tiempo de tromboplastina parcial (APTT) que implica el calentamiento de una solución mixta de 50 pL, de solución de anticuerpos, 50 pL de plasma carente de F. VIII (Biomerieux) y 50 pL de reactivo de APTT (Dade Behring) a 37°C durante 3 minutos, mediante la adición de 50 pL de CaCl<sub>2</sub> 20 mM a la solución mixta y después la medición del tiempo de coagulación.
- 30 **4.** Una composición que comprende el anticuerpo de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 y un vehículo farmacéuticamente aceptable.
- 5.** Una composición farmacéutica que comprende un vehículo farmacéuticamente aceptable y el anticuerpo de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, para su uso en la prevención y/o tratamiento del sangrado, una enfermedad que acompañe al sangrado, o una enfermedad causada por el sangrado, donde el sangrado, la enfermedad que acompaña al sangrado, o la enfermedad causada por el sangrado es una enfermedad que se desarrolla y/o progresa debido a la reducción o carencia de actividad del factor VIII de coagulación y/o del factor VIII activado de coagulación.
- 35 **6.** El uso del anticuerpo de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, para producir una composición farmacéutica que contenga un vehículo farmacéuticamente aceptable para prevenir y/o tratar el sangrado, una enfermedad que acompañe al sangrado, o una enfermedad causada por el sangrado, donde el sangrado, la enfermedad que acompaña al sangrado, o la enfermedad causada por el sangrado es una enfermedad que se desarrolla y/o progresa debido a la reducción o carencia de actividad del factor VIII de coagulación y/o del factor VIII activado de coagulación.
- 40 **7.** La composición para el uso de la reivindicación 5 o el uso de la reivindicación 6, donde la enfermedad que se desarrolla y/o progresa debido a la reducción o carencia de actividad del factor VIII de coagulación y/o del factor VIII activado de coagulación es hemofilia A.
- 45 **8.** La composición para el uso de la reivindicación 5 o el uso de la reivindicación 6, donde la enfermedad que se desarrolla y/o progresa debido a la reducción o carencia de actividad del factor VIII de coagulación y/o del factor VIII
- 50

activado de coagulación es una enfermedad que implica la aparición de un inhibidor contra el factor VIII de coagulación y/o el factor VIII activado de coagulación.

5 **9.** La composición para el uso de la reivindicación 5 o el uso de la reivindicación 6, donde la enfermedad que se desarrolla y/o progresa debido a la reducción o carencia de actividad del factor VIII de coagulación y/o del factor VIII activado de coagulación es hemofilia adquirida.

**10.** La composición para el uso de la reivindicación 5 o el uso de la reivindicación 6, donde la enfermedad que se desarrolla y/o progresa debido a la reducción en la actividad del factor VIII de coagulación y/o del factor VIII activado de coagulación es la enfermedad de von Willebrand.

10 **11.** Un kit que comprende al menos el anticuerpo de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 o la composición de la reivindicación 4.

**12.** El kit de la reivindicación 11 que comprende además el factor VIII de coagulación.

FIG. 1

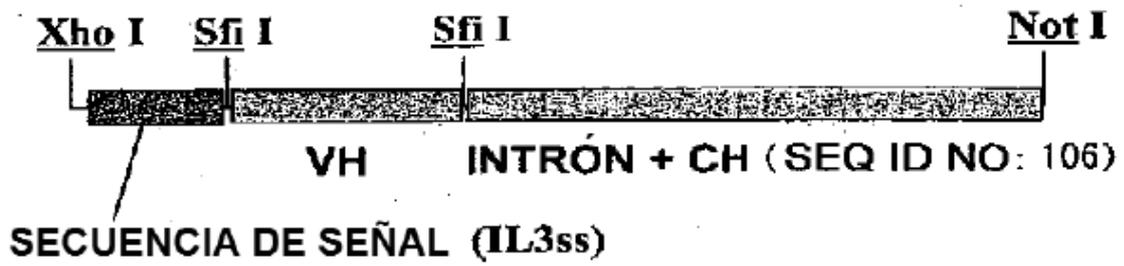


FIG. 2

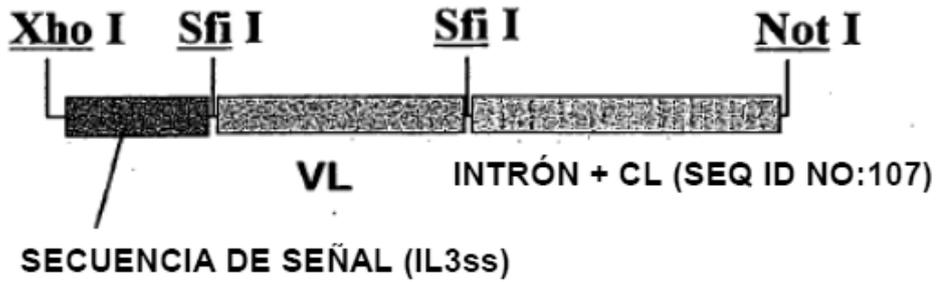


FIG. 3

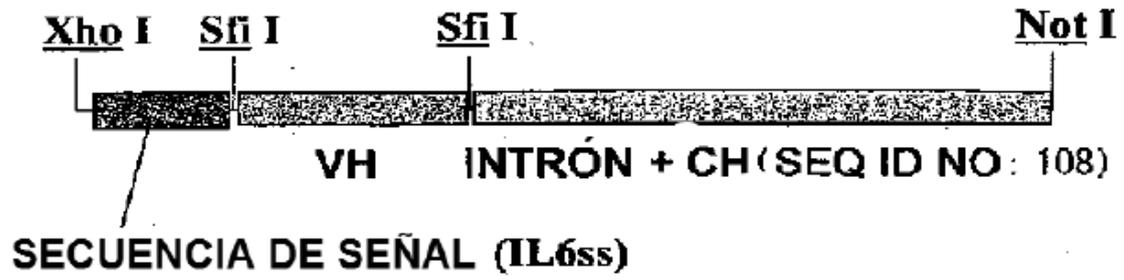
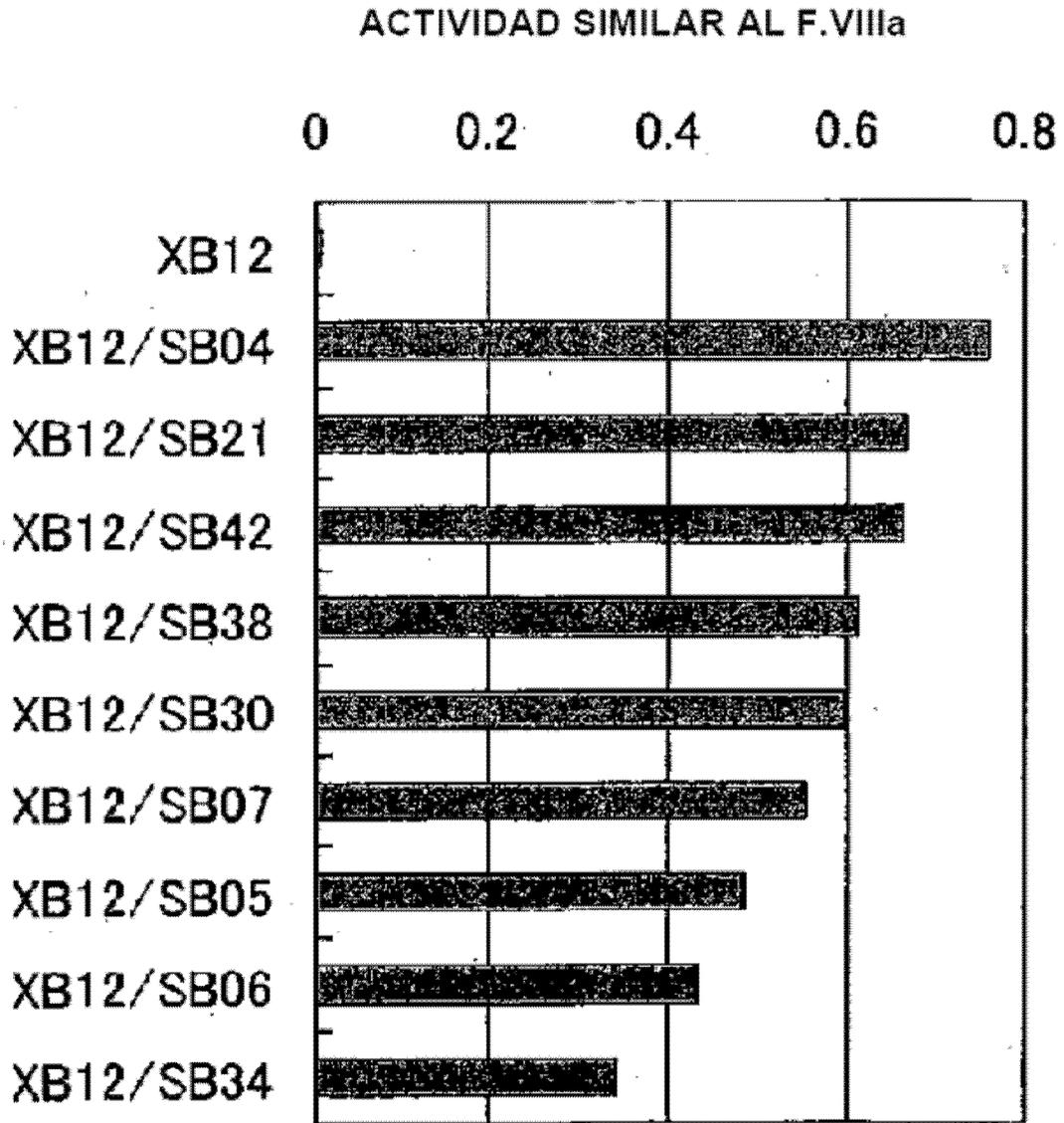


FIG. 4



**FIG. 5**

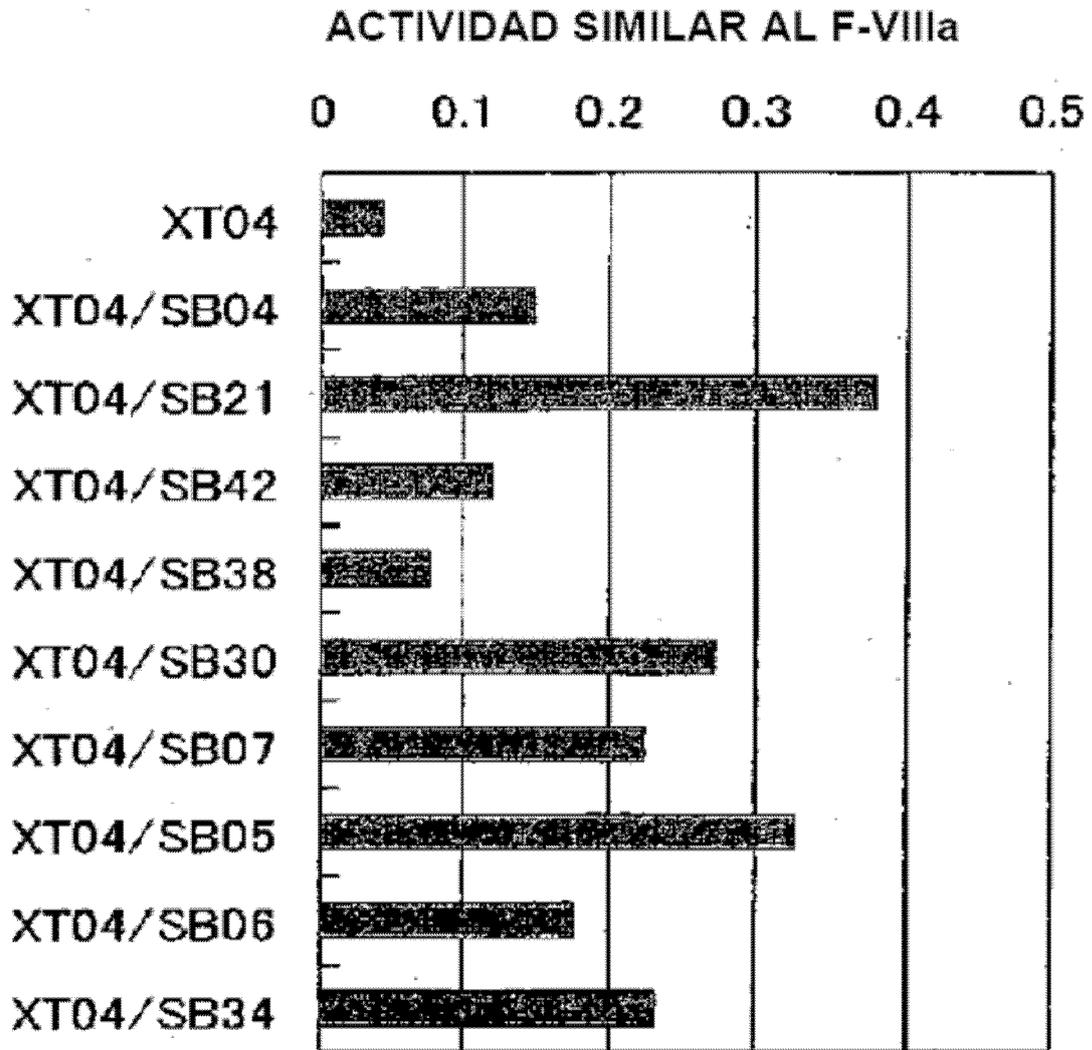


FIG. 6

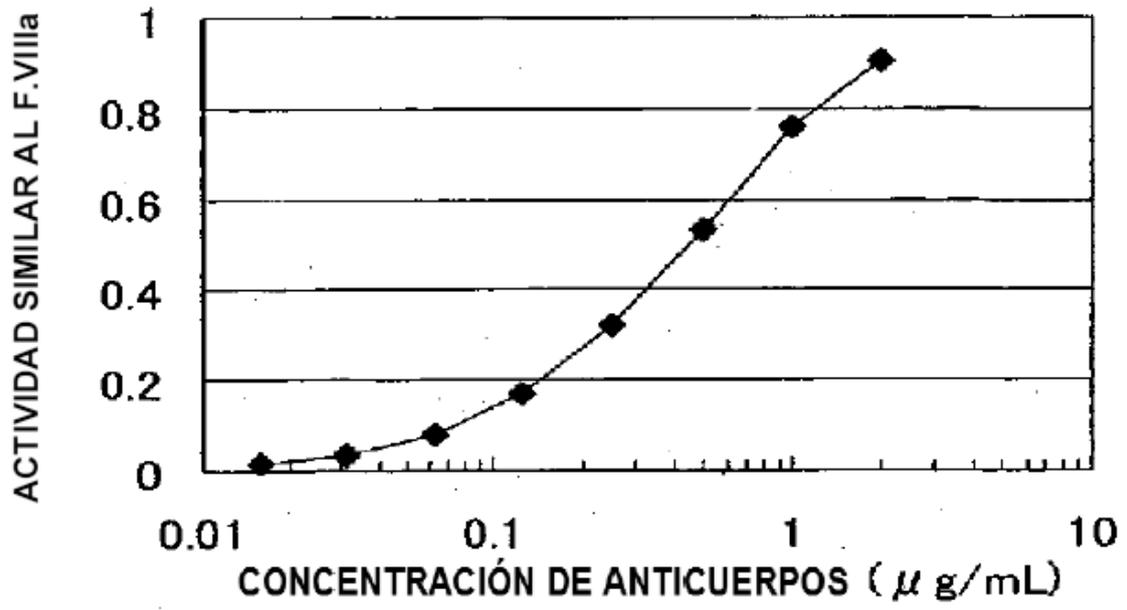


FIG. 7

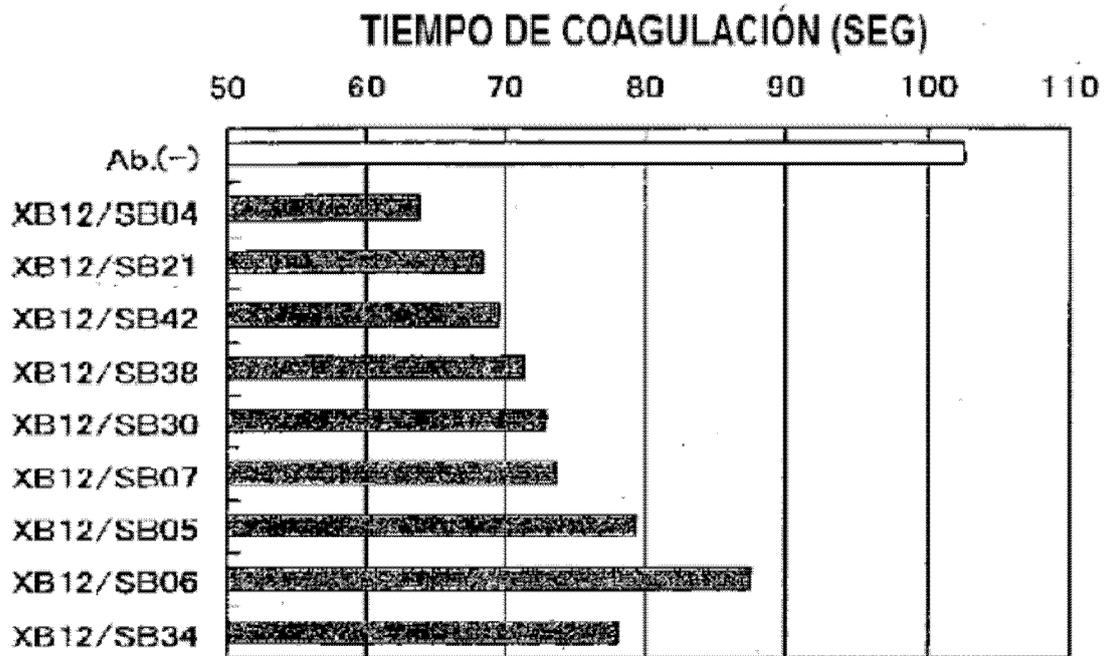


FIG. 8

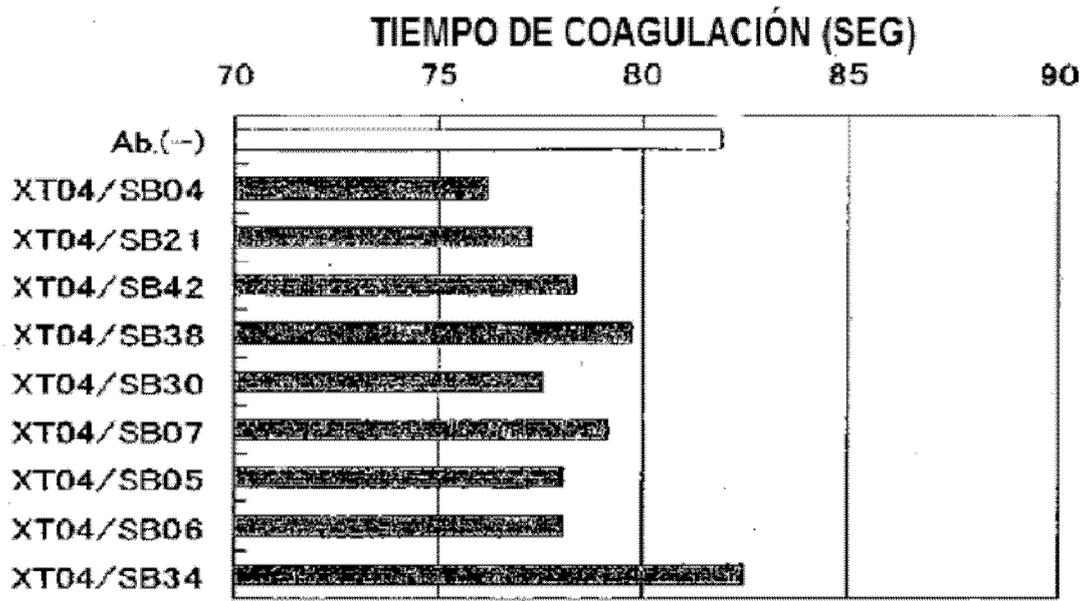


FIG. 9

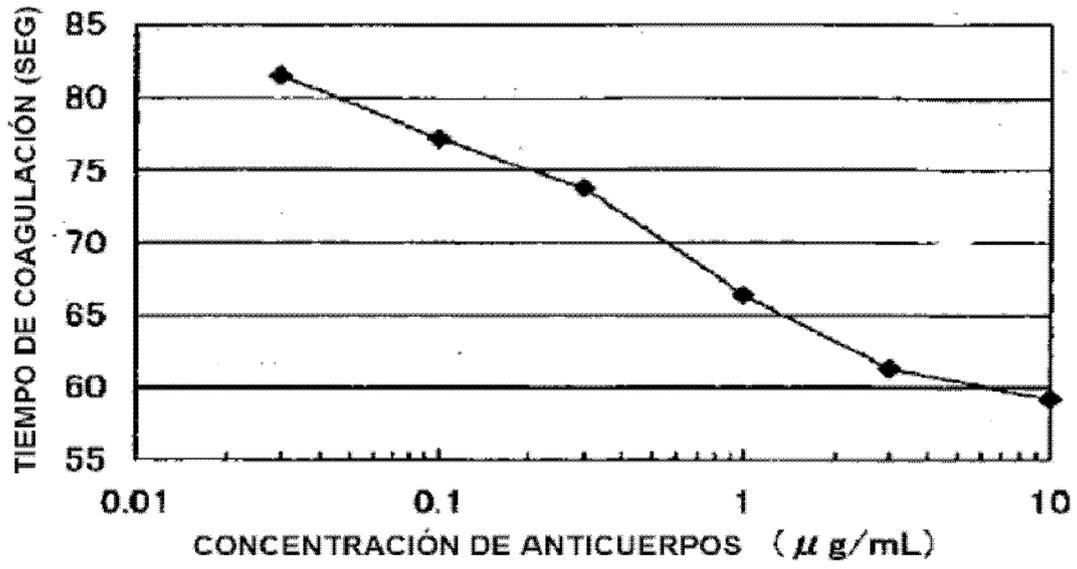


FIG. 10

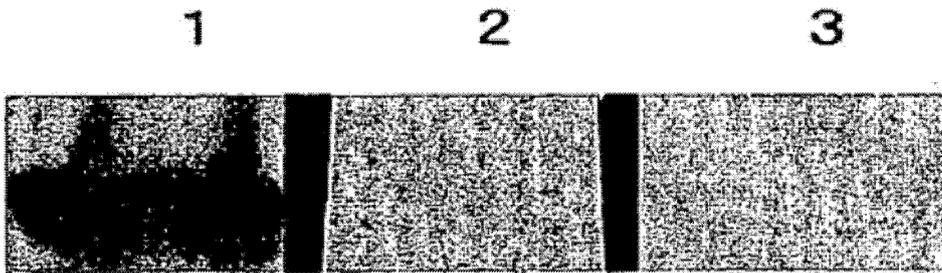


FIG. 11

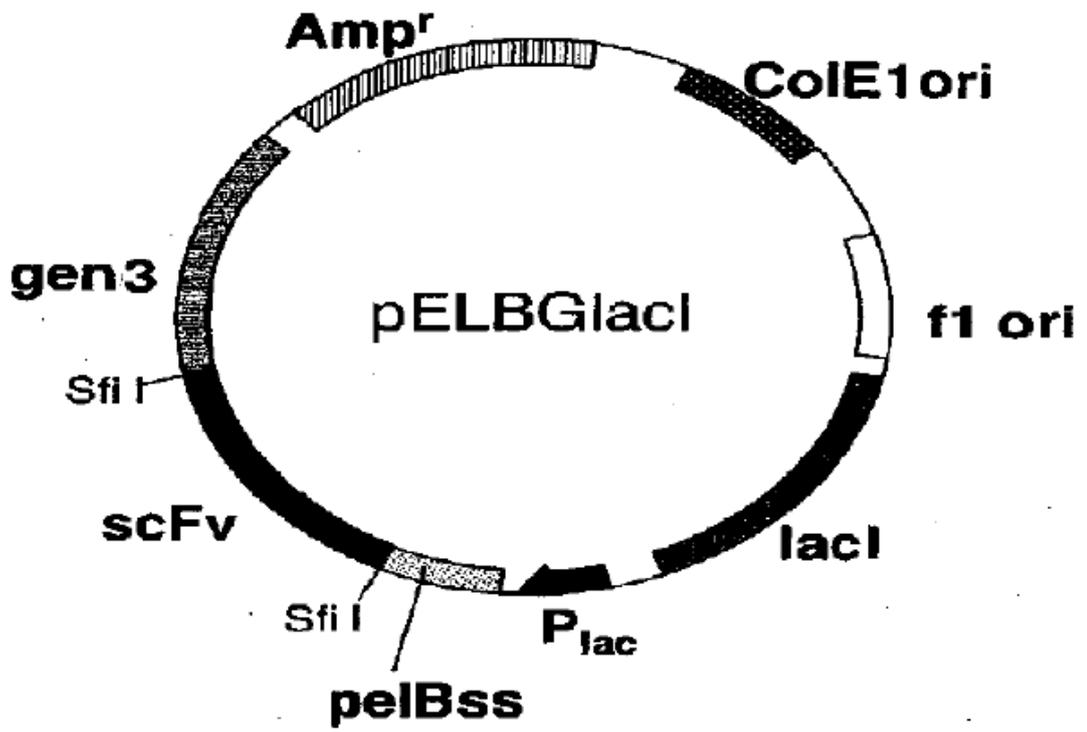


FIG. 12

		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

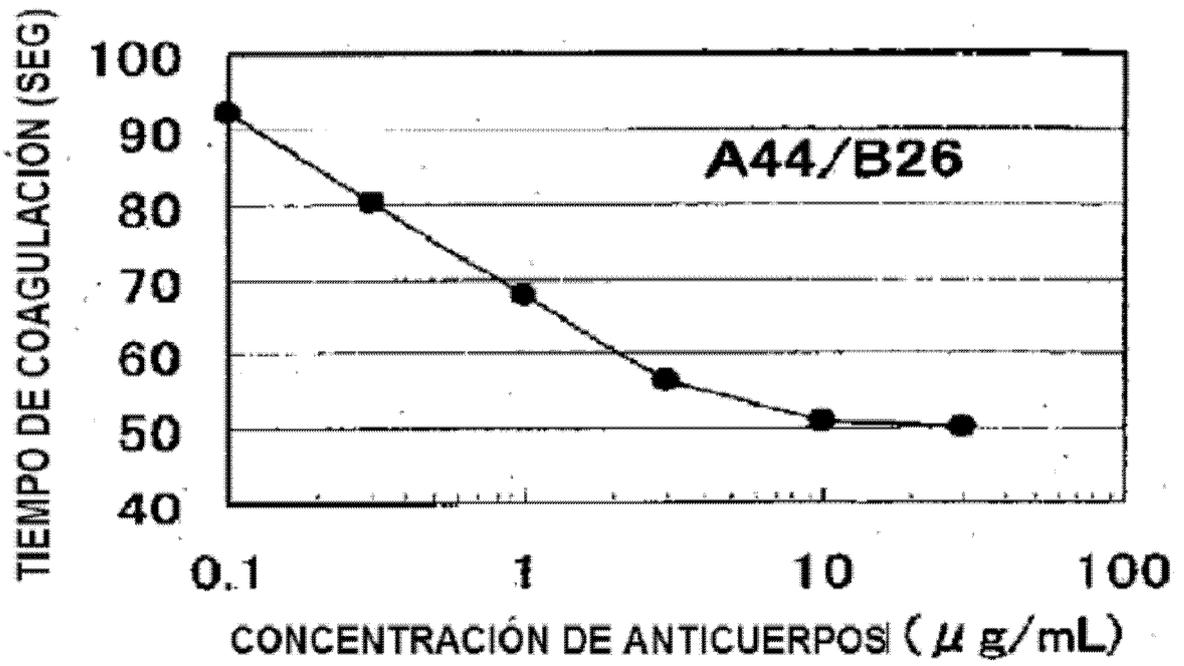


FIG. 15

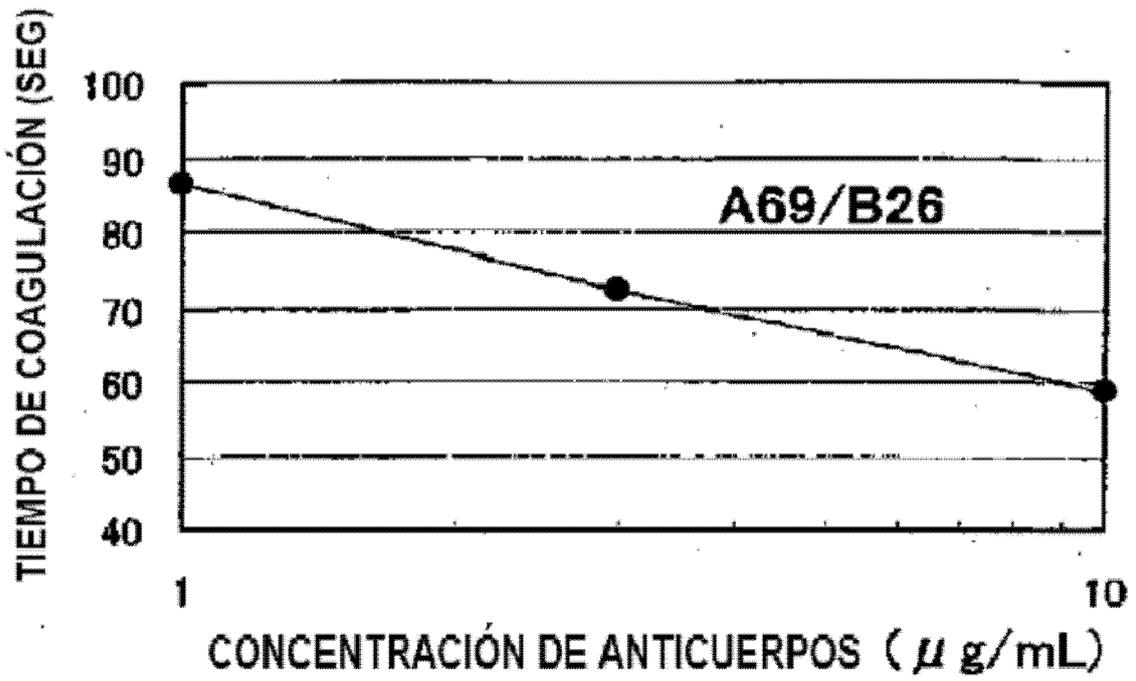


FIG. 16

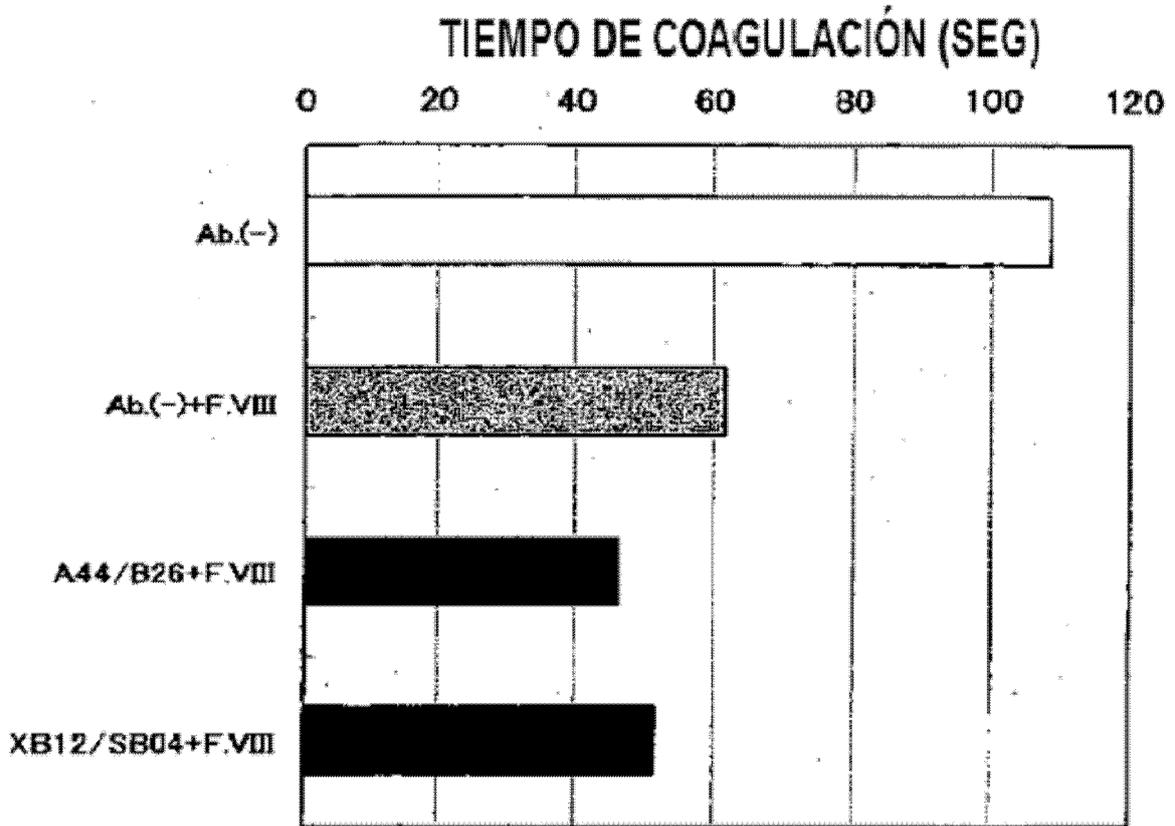


FIG. 17

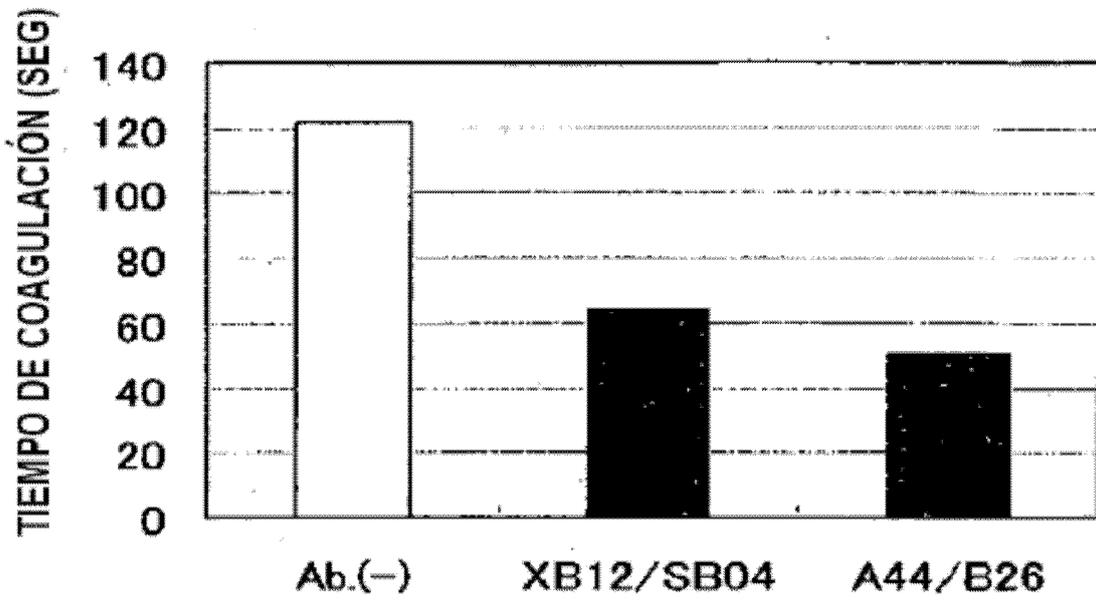


FIG. 18

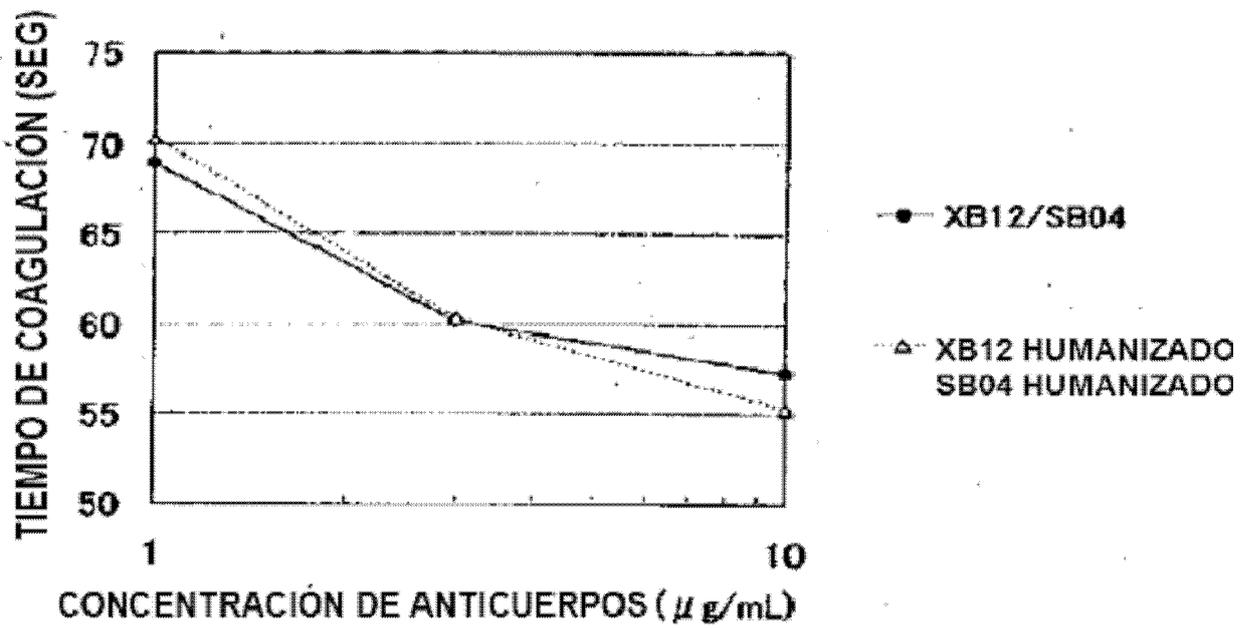
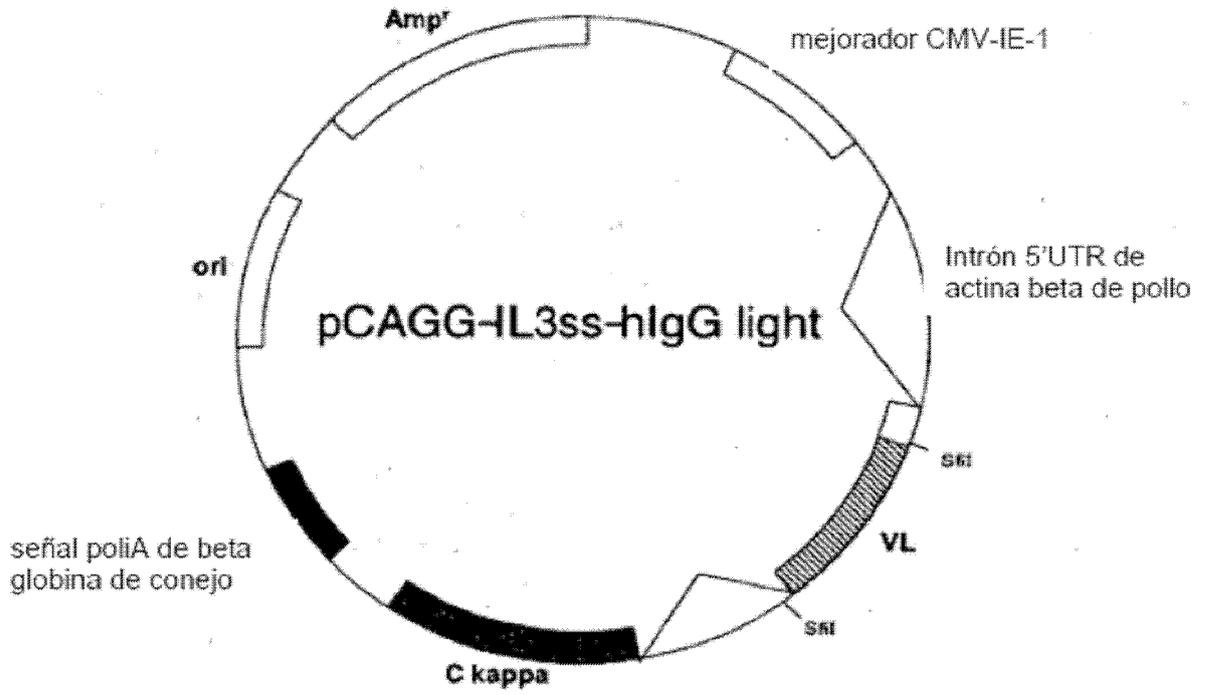


FIG. 19



**FIG. 20**

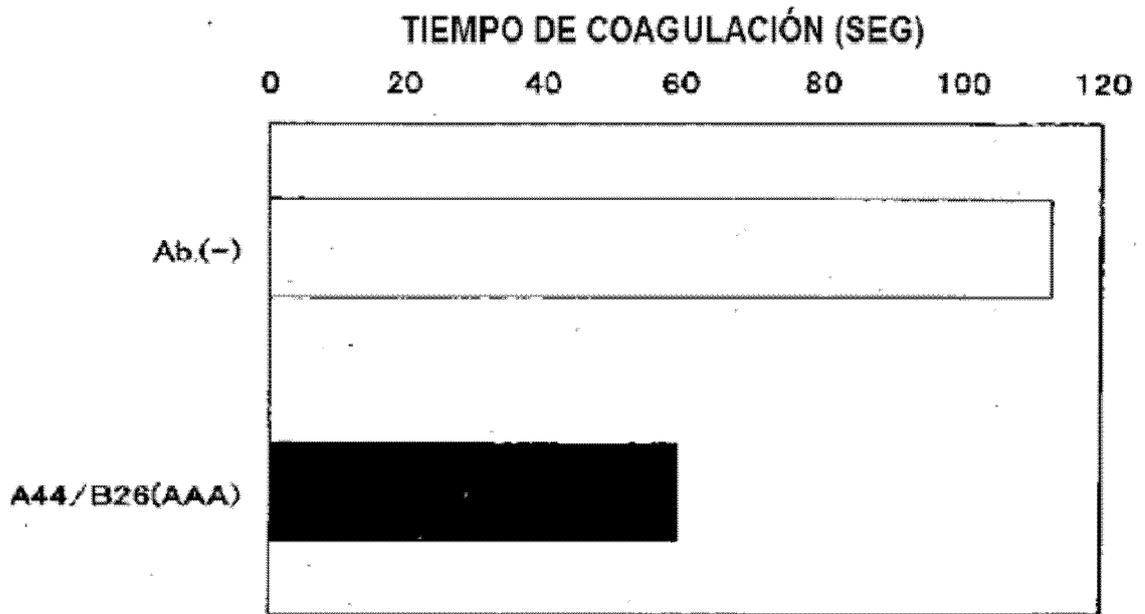


FIG. 21

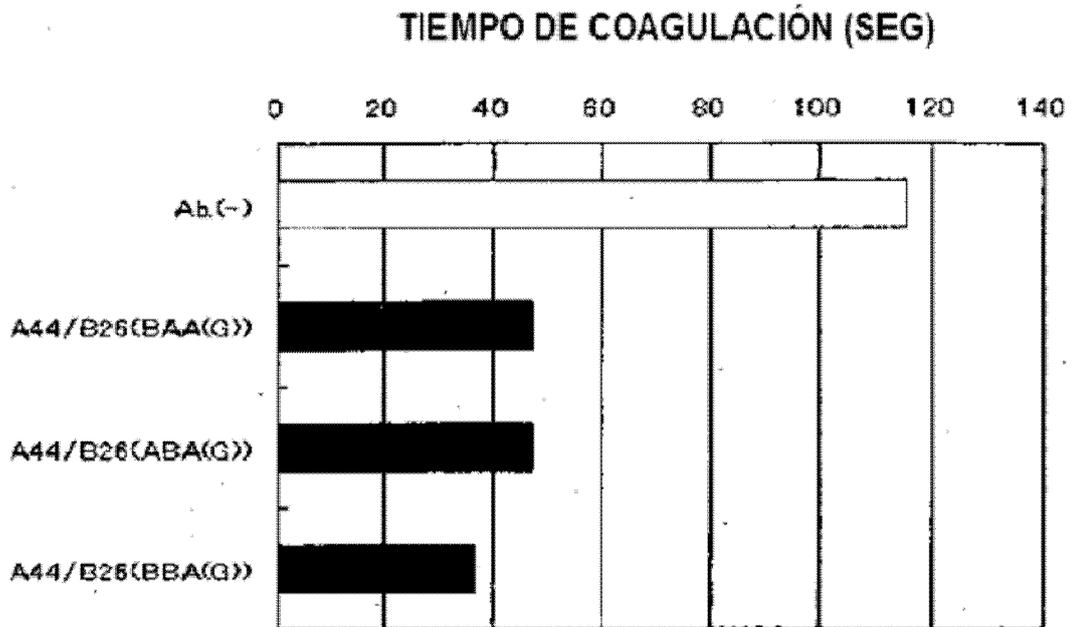


FIG. 22

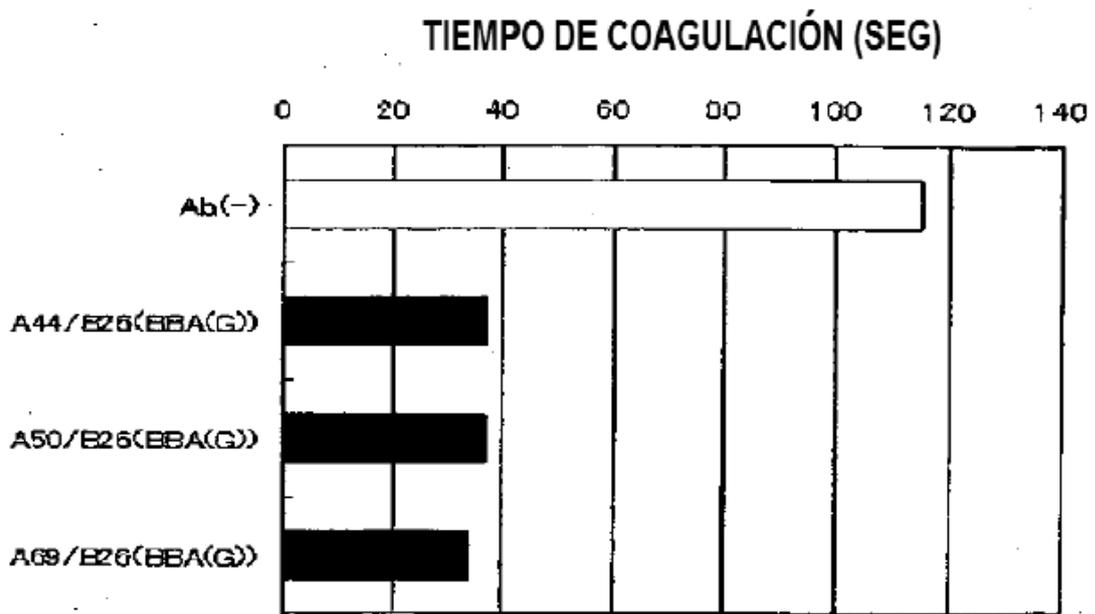


FIG. 23

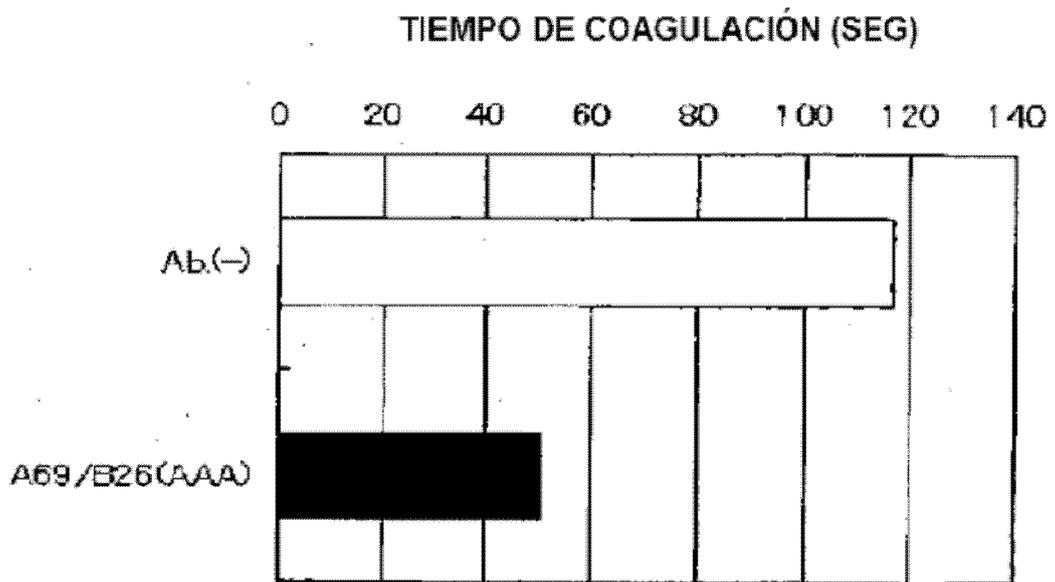


FIG. 24

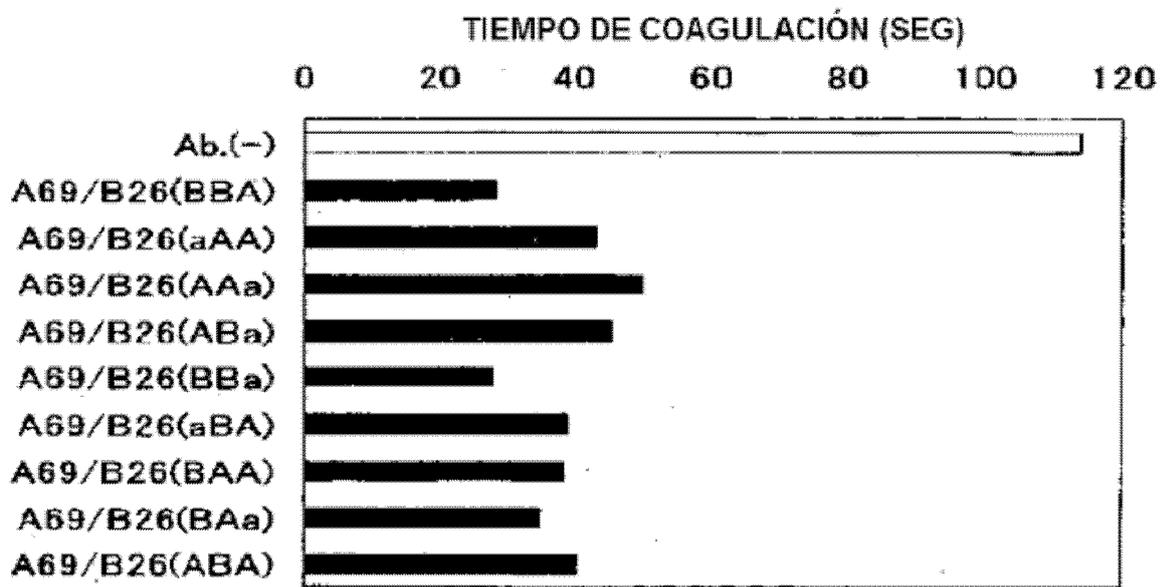
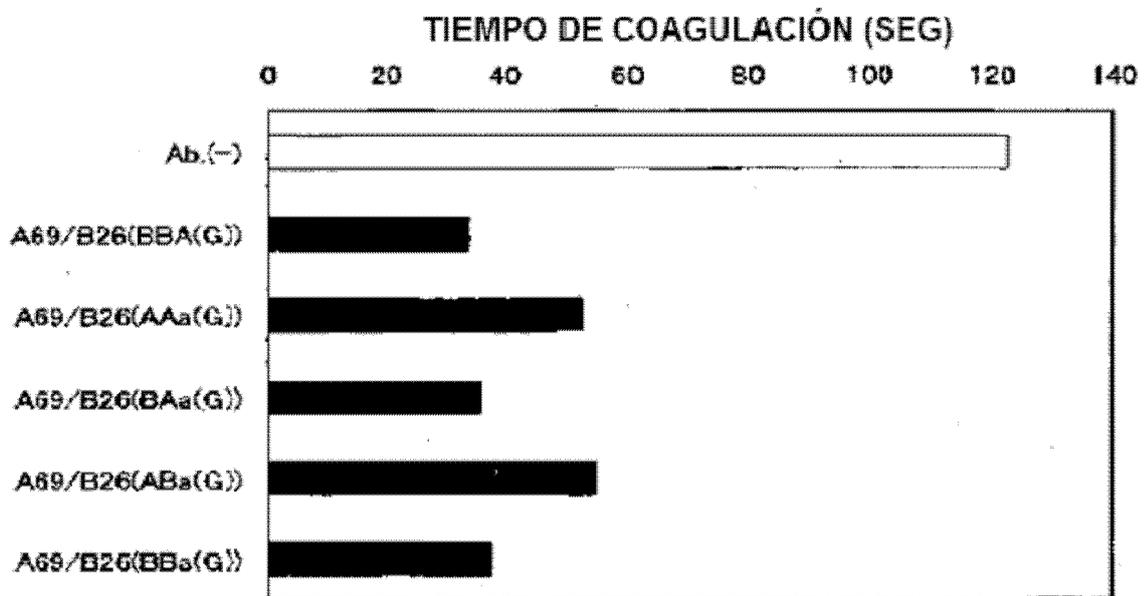


FIG. 25



# FIG. 26

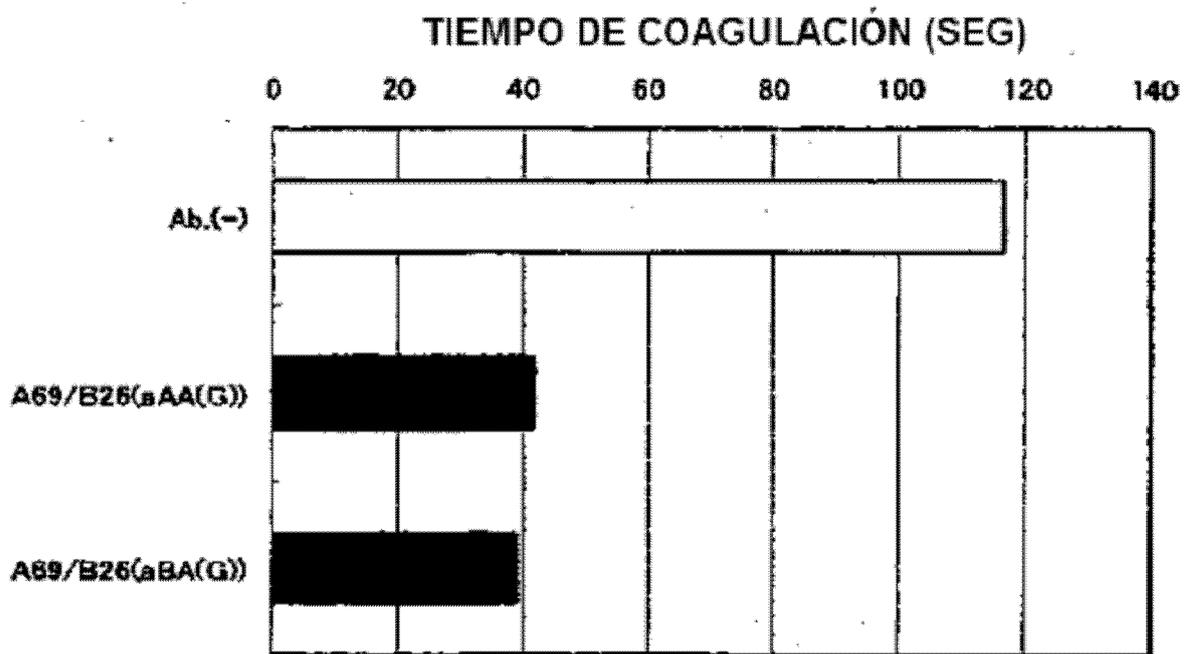


FIG. 27

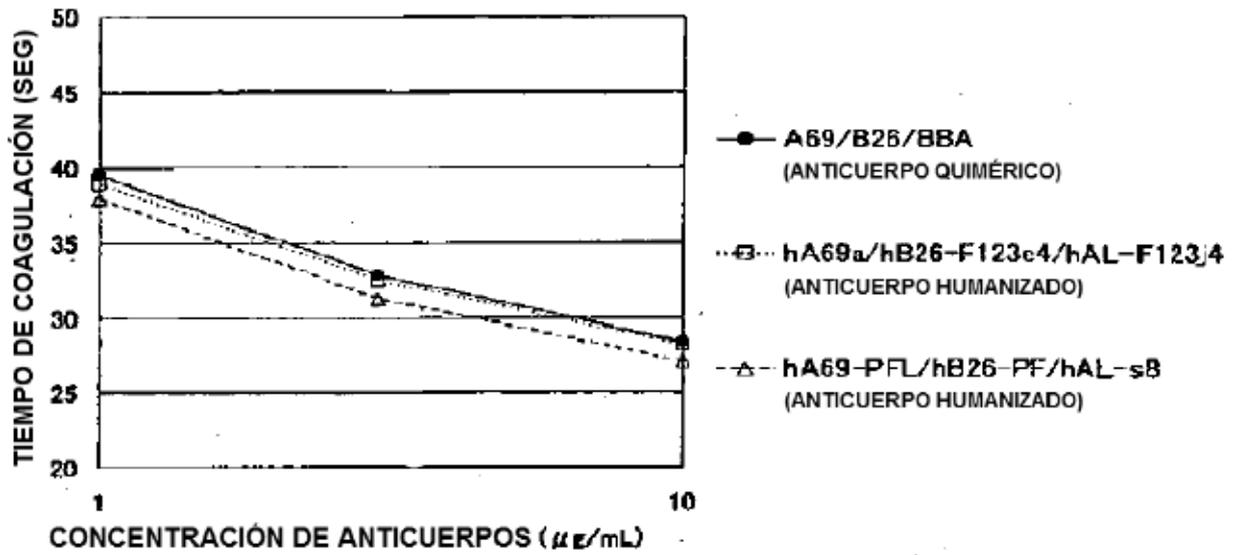


FIG. 28

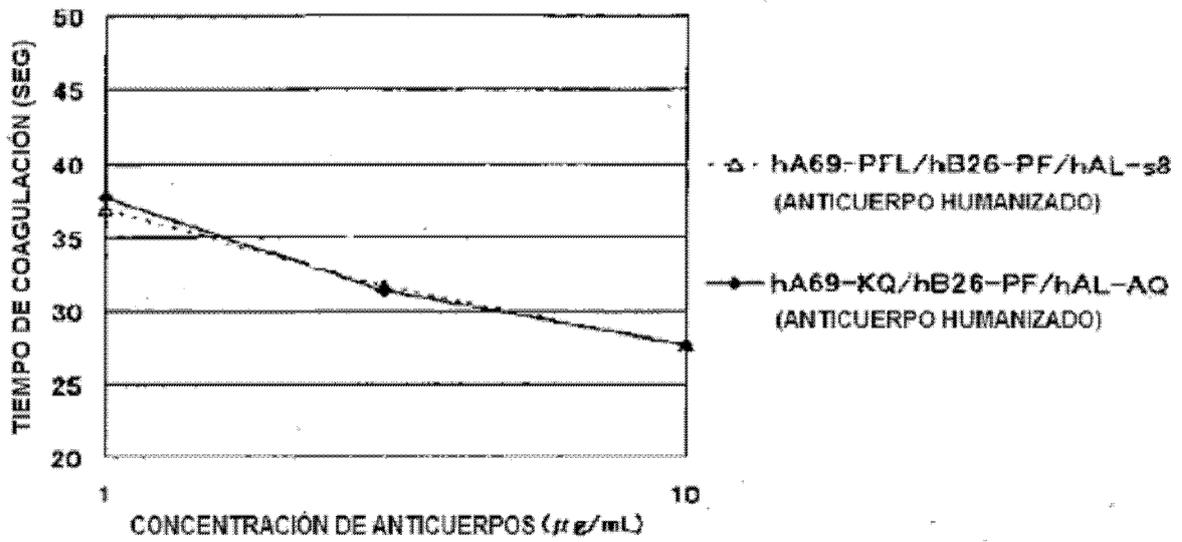


FIG. 29

