

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 604 635**

51 Int. Cl.:

**C07K 16/36** (2006.01)

**A61P 35/00** (2006.01)

**A61K 39/395** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **09.12.2009 PCT/EP2009/066755**

87 Fecha y número de publicación internacional: **17.06.2010 WO10066803**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **09.12.2009 E 09801426 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **28.09.2016 EP 2376537**

54 Título: **Anticuerpos humanos contra el factor tisular humano**

30 Prioridad:

**09.12.2008 DK 200801744**  
**09.12.2008 US 201335**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**08.03.2017**

73 Titular/es:

**GENMAB A/S (100.0%)**  
**Bredgade 34 E**  
**1260 Copenhagen K, DK**

72 Inventor/es:

**VERPLOEGEN, SANDRA;**  
**SATIJN, DAVID, P., E.;**  
**HOET, RENE, M., A;**  
**PARREN, PAUL;**  
**VAN DE WINKEL, JAN;**  
**BREINHOLT, VIBEKE, MILLER;**  
**EHRNROOTH, EVA;**  
**BAADSGAARD, OLE;**  
**VINK, TOM;**  
**BLEEKER, WILLEM, KAREL;**  
**HOUTKAMP, MISCHA;**  
**OUDSHOORN, MAROESKA y**  
**DE JONG, ROB, N.**

74 Agente/Representante:

**UNGRÍA LÓPEZ, Javier**

ES 2 604 635 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

Anticuerpos humanos contra el factor tisular humano.

5 **Campo de la invención**

La presente invención se refiere a anticuerpos dirigidos al factor tisular, en particular, al factor tisular humano, y a los usos de tales anticuerpos, en particular, a su uso en el tratamiento del cáncer, la inflamación y las enfermedades vasculares.

10

**Antecedentes de la invención**

El factor tisular (TF), también llamado tromboplastina, factor de III o CD142 es una proteína presente en el tejido subendotelial, las plaquetas y los leucocitos necesario para el inicio de la formación de trombina a partir del zimógeno protrombina. La formación de trombina en última instancia conduce a la coagulación de la sangre. El factor tisular permite a las células iniciar la cascada de la coagulación de la sangre, y funciona como receptor de alta afinidad para el factor de coagulación VII. El complejo resultante proporciona un evento catalítico que es responsable del inicio de las cascadas de proteasas de coagulación por proteólisis limitada específica. A diferencia de los otros cofactores de estas cascadas de proteasas, que circulan en forma de precursores no funcionales, este factor es un potente iniciador que es totalmente funcional cuando se expresa sobre las superficies celulares.

El factor tisular es el receptor de la superficie celular para la serina proteasa factor VIIa (FVIIa). Se ha encontrado que la unión de FVIIa al factor tisular inicia los procesos de señalización dentro de la célula, jugando dicha función de señalización un papel en la angiogénesis. Mientras que la angiogénesis es un proceso normal en el crecimiento y el desarrollo, así como en la curación de heridas, también es una etapa fundamental en la transición de los tumores a partir de un estado latente a un estado maligno: cuando las células cancerosas adquieren la capacidad para producir proteínas que participan en la angiogénesis, los llamados factores de crecimiento angiogénicos, estas proteínas son liberadas por el tumor en los tejidos cercanos, y estimulan la brotación de nuevos vasos sanguíneos a partir de los vasos sanguíneos sanos existentes hacia y dentro del tumor. Una vez que los nuevos vasos sanguíneos entran en el tumor, éste puede expandir rápidamente su tamaño e invadir tejidos y órganos locales. A través de los nuevos vasos sanguíneos las células cancerosas pueden escapar a la circulación y alojarse en otros órganos para formar nuevos tumores (metástasis).

Además el TF juega un papel en la inflamación. Se supone que el papel de TF está mediado por la coagulación de la sangre (A. J. Chu: "Tissue factor mediates inflammation" en Archives of biochemistry and biophysics, 2005, vol. 440, Núm. 2, págs. 123-132). En consecuencia, la inhibición de TF p. ej., por anticuerpos monoclonales anti-TF tiene importancia en la interrupción del ciclo de coagulación-inflamación contribuyendo no sólo a la anti-inflamación, sino también a las enfermedades vasculares.

La expresión de TF se observa en muchos tipos de cáncer y está asociada con una enfermedad más agresiva. Además, el TF humano también existe en una forma empalmada alternativamente soluble, asHTF. Recientemente se ha encontrado que asHTF promueve el crecimiento tumoral (Hobbs et al. 2007 Trombosis Res. 120(2) S13-S21).

Los anticuerpos que se unen a TF se han descrito en la técnica anterior:

El documento WO98/40408 describe anticuerpos que se pueden unir a TF humano nativo, ya sea solo o presente en un complejo de TF:VIIa, evitando eficazmente la unión del factor X a TF o a ese complejo, y reduciendo de este modo la coagulación de la sangre. Se describe que los anticuerpos se pueden usar para aliviar las trombosis después de un procedimiento médico invasivo, tal como cirugía arterial o cardíaca o para eliminar la coagulación de la sangre que surge del uso de aplicaciones médicas. Se describen otros anticuerpos para su empleo en métodos de diagnóstico *in vivo* que incluyen la formación de imágenes de diagnóstico *in vivo* de TF humano nativo.

El documento WO04/094475 proporciona anticuerpos capaces de unirse al factor tisular humano, que no inhiben la coagulación sanguínea mediada por el factor en comparación con un control de plasma normal. No se describen anticuerpos humanos. Se alega que el anticuerpo puede ser utilizado para el tratamiento del cáncer.

El documento WO03/093422 se refiere a anticuerpos que se unen con mayor afinidad al complejo TF:VIIa que al TF solo. Se propone el uso de los anticuerpos como anticoagulante en el tratamiento de ciertas enfermedades, tales como la sepsis, coagulación intravascular diseminada, la apoplejía isquémica, la trombosis, el síndrome coronario agudo y la coagulopatía en el cáncer avanzado.

El documento WO01/27079 describe composiciones y métodos para inhibir la proliferación celular anormal, en particular la proliferación de células endoteliales, tal como el cáncer, el desarrollo anormal de embriones, el mal funcionamiento de la respuesta inmunitaria, así como la angiogénesis relacionada con la neovascularización y el crecimiento tumoral. Se proponen muchas sustancias activas, incluyendo anticuerpos, pero no se describen anticuerpos específicos.

El documento WO03/037361 se refiere al uso agonistas o antagonistas del TF para el tratamiento relacionado con la apoptosis.

El documento WO03/029295 (D1) se refiere a anticuerpos humanos aislados que reaccionan inmunológicamente con TF humano para inhibir la unión del factor de coagulación VIIa. Sin embargo, la solicitud no describe un solo ejemplo de un anticuerpo que tenga estas propiedades.

El documento WO04/039842 (D2) se refiere a anticuerpos humanizados que reaccionan inmunológicamente con TF humano para inhibir la unión del factor de coagulación VIIa para el tratamiento de los trastornos de la coagulación mediante la inhibición de la formación de trombos. D2 describe adicionalmente un anticuerpo humano; HuTF-31 F2 inhibe la generación de FXa.

Se han aprobado numerosas terapias con anticuerpos monoclonales para el tratamiento de diferentes tipos de tumores, incluyendo, p. ej., bevacizumab (Avastin®), cetuximab (Erbix®), panitumumab (Vectibix™) y trastuzumab (Herceptin®).

### 15 Compendio de la invención

Aunque se han hecho muchos progresos, sigue habiendo una necesidad de mejorar los métodos de tratamiento de enfermedades graves, por ejemplo, de mejorar el tratamiento del cáncer, basado en anticuerpos terapéuticos.

Un objeto de la presente invención es proporcionar nuevos anticuerpos anti-TF humano altamente específicos y eficaces para uso médico. Los anticuerpos de la invención muestran características de unión a TF que difieren de los anticuerpos descritos en la técnica. En realizaciones preferidas, los anticuerpos de la invención tienen una alta afinidad hacia el factor tisular humano, median en la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC), inhiben la unión de FVIIa a TF, inhiben la fosforilación de ERK inducida por FVIIa y la liberación de IL8, no inhiben o inhiben escasamente la coagulación.

### Breve descripción de los dibujos

Figura 1: Alineamiento de secuencias de los anticuerpos de la presente invención.

Se destacan CDR1, CDR2 y CDR3 de acuerdo con IMGT: las secuencias en cursiva representan la región CDR1, las secuencias subrayadas representan la región CDR2, las secuencias en negrita representan la región CDR3.

Figura 2: secuencias de IgG4 (SEQ ID NO: 113-114)

SEQ ID NO: 113: Secuencia de aminoácidos de la región CH de tipo salvaje de IgG4 humana. La Secuencia en cursiva representa la región CH1, la secuencia destacada representa la región bisagra, secuencia regular representa la región CH2 y la secuencia subrayada representa la región CH3.

SEQ ID NO: 114: Secuencia de aminoácidos de la región CH sin bisagra de una IgG4 humana

Figura 3: Unión de HuMAb anti-TF al dominio extracelular de TF.

Figura 4: Unión de HuMAb anti-TF a un TF unido a membrana.

Figura 5: Inhibición de la unión de FVII a TF.

Figura 6: Inhibición de la fosforilación de ERK inducida por FVIIa.

Figura 6a: Inhibición de la fosforilación de ERK inducida por FVIIa

Figura 7: Inhibición de la liberación de IL8 inducida por FVIIa.

Figura 8: Inhibición de la generación de FXa.

Figura 9: Inhibición de la coagulación de la sangre.

Figura 10: Los TF-HuMAb inducen la lisis de las células Bx-PC3 por ADCC.

Figura 11: Depósito de los componentes del complemento C3c y C4c sobre las células diana.

Figura 12: Análisis inmunohistoquímico de la unión de TF-HuMAb a los glomérulos.

Figura 13: Análisis inmunohistoquímico de la unión de TF-HuMAb a tumores pancreáticos.

Figura 14: Eficacia in vivo de TF-HuMAb en xenoinjerto de tumor MDA-MB-231 establecido.

Figura 15: Tiempo de sangrado determinado en monos cinomolgos tras inyecciones intravenosas de HuMAb específico de TF 011. El anticuerpo se administró el día 1 (0 mg/kg), 8 (1 mg/kg), 15 (10 mg/kg) y 22 (100 mg/kg).

Figura 16: Eficacia in vivo de TF-HuMAb en un xenoinjerto de tumor BX-PC3 profiláctico y establecido.

Figura 17: Constructo lanzadera y dominios TF

Figura 18: Unión de los anticuerpos anti-TF a constructos lanzadera TF

Figura 19: Unión de fragmentos Fab de HuMAb-TF al dominio extracelular de TF, ELISA

Figura 20: Unión de fragmentos Fab de HuMAb-TF al dominio extracelular de TF, FACS

Figura 21: Perfil de unión de anti-HuMAb dependiente del número de moléculas de TF expresadas.

## Descripción detallada de la invención

### Definiciones

5 Los términos "factor tisular", "TF", "CD142", "antígeno del factor tisular", "antígeno TF" y "antígeno CD142 se utilizan indistintamente en la presente memoria, y, a menos que se especifique lo contrario, incluyen cualquier variante, isoforma y homólogo de especie del factor tisular humano que es expresado de forma natural por las células o es expresado en las células transfectadas con el gen del factor tisular.

10 El término "inmunoglobulina" se refiere a una clase de glicoproteínas estructuralmente relacionadas que consisten en dos pares de cadenas polipeptídicas, un par de cadenas ligeras (L) de bajo peso molecular y un par de cadenas pesadas (H), que pueden estar interconectadas, las cuatro, por enlaces disulfuro. La estructura de las inmunoglobulinas ha sido bien caracterizada. Véase, por ejemplo, *Fundamental Immunology*. Capítulo 7 (Paul, W., ed., 2ª ed. Raven Press, N.Y. (1989)). En pocas palabras, cada cadena pesada normalmente se compone de una región variable de cadena pesada (abreviada en la presente memoria como V<sub>H</sub> o VH) y una región constante de cadena pesada. La región constante de cadena pesada normalmente se compone de tres dominios, C<sub>H1</sub>, C<sub>H2</sub>, y C<sub>H3</sub>. Cada cadena ligera está típicamente compuesta de una región variable de cadena ligera (abreviada en la presente memoria como V<sub>L</sub> o VL) y una región constante de cadena ligera. La región constante de cadena ligera normalmente se compone de un dominio C<sub>L</sub>. Las regiones V<sub>H</sub> y V<sub>L</sub> se pueden subdividir adicionalmente en regiones de hipervariabilidad (o regiones hipervariables que pueden ser hipervariable en secuencia y/o forma de bucles estructuralmente definidos), denominadas también regiones determinantes de complementariedad (CDR), intercaladas con regiones que están más conservadas, denominadas regiones marco (FR). Cada V<sub>H</sub> y V<sub>L</sub> normalmente se compone de tres CDR y cuatro FR, dispuestas desde el extremo amino al extremo carboxi-terminal en el siguiente orden: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4 (véase también Chothia y Lesk J. Mol. Biol. 196, 901-917 (1987)). Típicamente, la numeración de los residuos de aminoácido en esta región es de acuerdo a IMGT., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5ª ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD. (1991) (expresiones tales como numeración de residuos del dominio variable como en Kabat o de acuerdo con Kabat en la presente memoria se refieren a este sistema de numeración para los dominios variables de cadena pesada o los dominios variables de cadena ligera). Utilizando este sistema de numeración, la secuencia de aminoácidos lineal real de un péptido puede contener menos o más aminoácidos correspondientes a un acortamiento de, o una inserción en, una FR o una CDR del dominio variable. Por ejemplo, un dominio variable de cadena pesada puede incluir una inserción de un solo aminoácido (residuo 52a de acuerdo con Kabat) después del residuo 52 de la CDR2 de V<sub>H</sub> y residuos insertados (por ejemplo los residuos 82a, 82b y 82c, etc. de acuerdo con Kabat) después del residuo 82 de la FR de la cadena pesada. La numeración de Kabat de los residuos se puede determinar para un anticuerpo dado por alineamiento en las regiones de homología de la secuencia del anticuerpo con una secuencia numerada de Kabat "convencional".

40 El término "anticuerpo" (Ab) en el contexto de la presente invención se refiere a una molécula de inmunoglobulina, un fragmento de una molécula de inmunoglobulina, o un derivado de cualquiera de los mismos, que tiene la capacidad de unirse específicamente a un antígeno en condiciones fisiológicas típicas con una semivida de períodos de tiempo significativos, tales como al menos aproximadamente 30 minutos, al menos aproximadamente 45 minutos, al menos aproximadamente una hora, al menos aproximadamente dos horas, al menos aproximadamente cuatro horas, al menos aproximadamente 8 horas, al menos aproximadamente 12 horas, aproximadamente 24 horas o más, aproximadamente 48 horas o más, aproximadamente 3, 4, 5, 6, 7 días o más, etc., o cualquier otro período definido funcionalmente relevante (tal como un tiempo suficiente para inducir, promover, mejorar y/o modular una respuesta fisiológica asociada con la unión del anticuerpo al antígeno y/o un tiempo suficiente para que el anticuerpo reclute una actividad efectora). Las regiones variables de las cadenas pesada y ligera de la molécula de inmunoglobulina contienen un dominio de unión que interactúa con un antígeno. Las regiones constantes de los anticuerpos (Ab) pueden mediar en la unión de la inmunoglobulina a tejidos o factores del anfitrión, incluyendo varias células del sistema inmunitario (tales como células efectoras) y componentes del sistema del complemento tales como C1q, el primer componente en el vía clásica de activación del complemento. Un anticuerpo anti-TF también puede ser un anticuerpo biespecífico, diacuerpo, o molécula similar (véase, por ejemplo, PNAS USA. 90 (14), 6444-8 (1993) para una descripción de los diacuerpos). De hecho, los anticuerpos biespecíficos, diacuerpos, y similares, proporcionados por la presente invención se pueden unir a cualquier diana adecuada, además de a una porción de factores tisulares o complejos de factor tisular FVIIa. Como se indicó anteriormente, el término anticuerpo en la presente memoria, a menos que se indique lo contrario o se contradiga por el contexto claramente, incluye fragmentos de un anticuerpo que retienen la capacidad de unirse específicamente al antígeno. Se ha demostrado que la función de unión al antígeno de un anticuerpo puede ser realizada por fragmentos de un anticuerpo completo. Los ejemplos de los fragmentos de unión incluidos dentro del término "anticuerpo" incluyen (i) un fragmento Fab' o Fab, un fragmento monovalente que consiste en los dominios V<sub>L</sub>, V<sub>H</sub>, C<sub>L</sub> y C<sub>H1</sub>, o un anticuerpo monovalente como se describe en el documento WO2007059782 (Genmab); (ii) fragmentos F(ab')<sub>2</sub>, fragmentos bivalentes que comprenden dos fragmentos Fab unidos por un puente disulfuro en la región bisagra; (iii) un fragmento Fd que consiste esencialmente en los dominios V<sub>H</sub> y C<sub>H1</sub>; (iv) un fragmento Fv que consiste esencialmente en los dominios V<sub>L</sub> y V<sub>H</sub>, (v) un fragmento dAb (Ward et al., Nature 341, 544-546 (1989)), que consiste esencialmente en un dominio V<sub>H</sub> y también llamado

anticuerpo de dominio (Holt et al; Trends Biotechnol. 2003 Nov; 21(11): 484-90); (vi) anticuerpos de camélido o nanocuerpos (Revets et al; Expert Opin Biol Ther. 2005 Ene; 5(1): 111-24) y (vii) una región determinante de complementariedad aislada (CDR). Además, aunque los dos dominios del fragmento Fv, V<sub>L</sub> y V<sub>H</sub>, están codificados por genes separados, éstos pueden unirse, utilizando métodos recombinantes, por medio de un conector sintético que permite elaborarlos como una única cadena de proteína en la que las regiones V<sub>L</sub> y V<sub>H</sub> se emparejan para formar moléculas monovalentes (conocidas como anticuerpos de cadena sencilla o Fv de cadena única (scFv), véase, por ejemplo, Bird et al., Science 242, 423-426 (1988) y Huston et al., PNAS USA 85, 5879-5883 (1988)). Tales anticuerpos de cadena sencilla se incluyen dentro del término anticuerpo a menos que se indique lo contrario o esté claramente indicado por el contexto. Aunque tales fragmentos se incluyen generalmente en el sentido de anticuerpo, tomados en conjunto y cada uno independientemente son características únicas de la presente invención, que presentan diferentes propiedades biológicas y utilidad. Estos y otros fragmentos de anticuerpos útiles en el contexto de la presente invención se discuten más adelante en la presente memoria. También debe entenderse que el término anticuerpo, a menos que se especifique lo contrario, también incluye anticuerpos policlonales, anticuerpos monoclonales (mAb), polipéptidos similares a anticuerpos, tales como anticuerpos quiméricos y anticuerpos humanizados y fragmentos de anticuerpos que retienen la capacidad de unirse específicamente al antígeno (fragmentos de unión al antígeno) proporcionados por cualquier técnica conocida, tales como escisión enzimática, síntesis de péptidos, y técnicas recombinantes. Un anticuerpo generado puede poseer cualquier isotipo.

Un "anticuerpo anti-TF" es un anticuerpo como se ha descrito anteriormente, que se une específicamente al factor tisular antigénico.

Se pretende que el término "anticuerpo humano", según se utiliza en la presente memoria, incluya anticuerpos que tienen regiones variables y constantes derivadas de secuencias de inmunoglobulina de la línea germinal humana. Los anticuerpos humanos de la invención pueden incluir residuos de aminoácidos no codificados por secuencias de inmunoglobulina de la línea germinal humana (p. ej., mutaciones introducidas por mutagénesis al azar o específica del sitio *in vitro* o durante el reordenamiento del gen, o por mutación somática *in vivo*). Sin embargo, no se pretende que el término "anticuerpo humano", según se utiliza en la presente memoria, incluya anticuerpos en los que secuencias de CDR derivadas de la línea germinal de otra especie de mamífero, como un ratón, hayan sido injertadas en secuencias marco humanas.

En una realización preferida, el anticuerpo de la invención es aislado. Se pretende que un "anticuerpo aislado", según se utiliza en la presente memoria, haga referencia a un anticuerpo que está sustancialmente libre de otros anticuerpos que tienen especificidades antigénicas diferentes (por ejemplo un anticuerpo aislado que se une específicamente al factor tisular está sustancialmente libre de anticuerpos que se unen específicamente a antígenos distintos del factor tisular). Un anticuerpo aislado que se une específicamente a un epítipo, isoforma o variante de factor tisular humano puede, sin embargo, tener reactividad cruzada con otros antígenos relacionados, por ejemplo de otras especies (tales como especies de factores tisulares homólogos). Además, un anticuerpo aislado puede estar sustancialmente libre de otro material celular y/o producto químico. En una realización de la presente invención, dos o más anticuerpos monoclonales "aislados" que tienen diferentes especificidades de unión al antígeno se combinan en una composición bien definida.

Cuando se usa en la presente memoria en el contexto de dos o más anticuerpos, el término "compite con" o "presenta reacción cruzada con" indica que los dos o más anticuerpos compiten por la unión a TF, p. ej., compiten por la unión a TF en el análisis descrito en el Ejemplo 6 en la presente memoria. Para algunos pares de anticuerpos, la competición en el análisis del Ejemplo 6 sólo se observa cuando un anticuerpo se aplica como recubrimiento sobre la placa y el otro se utiliza para competir, y no al revés. También se pretende que el término "compite con" cuando se usa en la presente memoria abarque tales combinaciones de anticuerpos.

Los términos "anticuerpo monoclonal" o "composición de anticuerpo monoclonal" según se utilizan en la presente memoria, hagan referencia a una preparación de moléculas de anticuerpo de composición molecular única. Una composición de anticuerpo monoclonal muestra una sola especificidad de unión y una afinidad para un epítipo particular. En consecuencia, el término "anticuerpo monoclonal humano" se refiere a anticuerpos que muestran una sola especificidad de unión que tienen regiones variables y constantes derivadas de secuencias de inmunoglobulina de la línea germinal humana. Los anticuerpos monoclonales humanos pueden ser generados por un hibridoma que incluye una célula B obtenida de un animal no humano transgénico o transcromosómico, tal como un ratón transgénico, que tiene un genoma que comprende un transgén de cadena pesada humana y un transgén de cadena ligera, fusionados a una célula inmortalizada.

Según se utiliza en la presente memoria, el término "unión" en el contexto de la unión de un anticuerpo a un antígeno predeterminado es típicamente una unión con una afinidad correspondiente a una K<sub>D</sub> de aproximadamente 10<sup>-7</sup> M o menos, tal como aproximadamente 10<sup>-8</sup> M o menos, tal como aproximadamente 10<sup>-9</sup> M o menos, aproximadamente 10<sup>-10</sup> M o menos, o aproximadamente 10<sup>-11</sup> M o incluso menos cuando se determina por medio de tecnología de resonancia de plasmón superficial (SPR) en un aparato BIAcore 3000 utilizando el antígeno como ligando y el anticuerpo como analito, y se une al antígeno predeterminado con una afinidad correspondiente a una K<sub>D</sub> que es al

menos diez veces menor, tal como al menos 100 veces menor, por ejemplo al menos 1.000 veces menor, tal como al menos 10.000 veces menor, por ejemplo al menos 100.000 veces inferior a su afinidad para la unión a un antígeno no específico (p. ej., BSA, caseína) distinto del antígeno predeterminado o un antígeno estrechamente relacionado. La cantidad con la cual la afinidad es inferior depende de la  $K_D$  del anticuerpo, de modo que cuando la  $K_D$  del anticuerpo es muy baja (es decir, el anticuerpo es altamente específico), la cantidad con la cual la afinidad por el antígeno es menor que la afinidad por un antígeno no específico puede ser de al menos 10.000 veces.

El término " $k_d$ " ( $\text{seg}^{-1}$ ), según se utiliza en la presente memoria, se refiere a la constante de velocidad de disociación de una interacción anticuerpo-antígeno concreta. Dicho valor se denomina también valor  $k_{\text{off}}$ .

El término " $k_a$ " ( $M^{-1} \times \text{seg}^{-1}$ ), según se utiliza en la presente memoria, se refiere a la constante de velocidad de asociación de una interacción anticuerpo-antígeno concreta.

El término " $K_D$ " (M), según se utiliza en la presente memoria, se refiere a la constante de disociación de equilibrio de una interacción anticuerpo-antígeno concreta.

El término " $K_A$ " ( $M^{-1}$ ), según se utiliza en la presente memoria, se refiere a la constante de asociación de equilibrio de una interacción anticuerpo-antígeno concreta y se obtiene dividiendo la  $k_a$  por la  $k_d$ .

La presente invención también proporciona anticuerpos que comprenden las variantes funcionales de la  $V_L$  región, la región  $V_H$ , o una o más CDR de los anticuerpos de los ejemplos. Una variante funcional de una  $V_L$ ,  $V_H$  o CDR utilizada en el contexto de un anticuerpo anti-TF todavía permite que el anticuerpo conserve al menos una proporción sustancial (al menos aproximadamente 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95% o más) de la afinidad/avidez y/o la especificidad/selectividad del anticuerpo parental y en algunos casos semejante anticuerpo anti-TF puede estar asociado con una mayor afinidad, selectividad y/o especificidad que el anticuerpo parental.

Tales variantes funcionales típicamente conservan una identidad de secuencia significativa con el anticuerpo parental. El porcentaje de identidad entre dos secuencias es una función del número de posiciones idénticas compartidas por las secuencias (es decir, % de homología = núm. de posiciones idénticas/núm. total de posiciones  $\times$  100), teniendo en cuenta el número de huecos, y la longitud de cada hueco, que han de ser introducidas para el alineamiento óptimo de las dos secuencias. La comparación de secuencias y la determinación del porcentaje de identidad entre dos secuencias se pueden lograr utilizando un algoritmo matemático, como se describe en los siguientes ejemplos no limitantes.

El porcentaje de identidad entre dos secuencias de nucleótidos se puede determinar utilizando el programa GAP en el paquete de programas GCG (disponible en <http://www.gcg.com>), utilizando una matriz NWSgapdna.CMP y un peso de hueco de 40, 50, 60, 70, u 80 y un peso de longitud de 1, 2, 3, 4, 5, ó 6. El porcentaje de identidad entre dos secuencias de nucleótidos o de aminoácidos también se puede determinar utilizando el algoritmo de E. Meyers y W. Miller, Comput. Appl. Biosci 4, 11-17 (1988)) que se ha incorporado en el programa ALIGN (versión 2.0), utilizando una tabla de residuos de peso PAM120, una penalización de longitud de hueco de 12 y una penalización por hueco de 4. Además, el porcentaje de identidad entre dos secuencias de aminoácidos se puede determinar utilizando el algoritmo de Needleman y Wunsch, J. Mol. Biol. 48, 444-453 (1970)) que se ha incorporado en el programa GAP en el paquete de programas GCG (disponible en <http://www.gcg.com>), utilizando una matriz Blossum 62 o una matriz PAM250, y un peso de hueco de 16, 14, 12, 10, 8, 6, ó 4 y un peso de longitud de 1, 2, 3, 4, 5, ó 6.

La secuencia de las variantes de CDR puede diferir de la secuencia de la CDR de las secuencias del anticuerpo parental principalmente a través de sustituciones conservativas; por ejemplo al menos aproximadamente 35%, aproximadamente el 50% o más, aproximadamente 60% o más, aproximadamente 70% o más, aproximadamente 75% o más, aproximadamente 80% o más, aproximadamente 85% o más, aproximadamente 90% o más, aproximadamente 95% o más (p. ej., aproximadamente 65 a 99%, tal como aproximadamente 96%, 97% o 98%) de las sustituciones en la variante son sustituciones de residuos de aminoácidos conservativas.

La secuencia de las variantes de CDR puede diferir de la secuencia de la CDR de las secuencias de anticuerpo parental principalmente a través de sustituciones conservativas; por ejemplo al menos 10, tal como al menos 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 ó 1 de las sustituciones en la variante son sustituciones de residuos de aminoácidos conservativas.

En el contexto de la presente invención, las sustituciones conservativas pueden definirse mediante sustituciones dentro de las clases de aminoácidos reflejadas en una o más de las siguientes tres tablas:

Clases de residuos de aminoácidos para sustituciones conservativas

Residuos ácidos	Asp (D) y Glu (E)
Residuos alcalinos	Lys (K), Arg (R), e His (H)
Residuos no cargados hidrófilos	Ser (S), Thr (T), Asn (N), y Gln (Q)
Residuos no cargados alifáticos	Gly (G), Ala (A), Val (V), Leu (L), y Ile (I)
Residuos no cargados no polares	Cys (C), Met (M), y Pro (P)
Residuos aromáticos	Phe (F), Tyr (Y), y Trp (W)

Clases de sustituciones de residuos de aminoácidos conservativas alternativas

1	A	S	T
2	D	E	
3	N	Q	
4	R	K	
5	I	L	M
6	F	Y	W

5

Clasificaciones físicas y funcionales alternativas de residuos de aminoácidos

Residuos que contienen un grupo alcohol	S y T
Residuos alifáticos	I, L, V y M
Residuos asociados a cicloalqueno	F, H, W, e Y
Residuos hidrófobos	A, C, F, G, H, I, L, M, R, T, V, W, e Y
Residuos cargados negativamente	D y E
Residuos polares	C, D, E, H, K, N, Q, R, S, y T
Residuos cargados positivamente	H, K, y R
Residuos pequeños	A, C, D, G, N, P, S, T, y V
Residuos muy pequeños	A, G, y S
Residuos implicados en la formación de giros	A, C, D, E, G, H, K, N, Q, R, S, P, y T
Residuos flexibles	Q, T, K, S, G, P, D, E, y R

Las agrupaciones de sustituciones más conservativas incluyen: valina-leucina-isoleucina, fenilalanina-tirosina, lisina-arginina, alanina-valina, y asparragina-glutamina.

10

También se puede formular otros grupos de aminoácidos utilizando los principios descritos, p. ej., en Creighton (1984) *Proteins: Structure and Molecular Properties*, W. H. (2ª ed. 1993) Freeman and Company.

15

En una realización de la presente invención, la conservación en términos de propiedades hidropáticas/hidrófilas y de peso de residuo/tamaño también se mantiene sustancialmente en una CDR variante en comparación con una CDR de un anticuerpo de los ejemplos (p. ej., la clase de peso, la puntuación hidropática, o ambas secuencias se conservan en al menos aproximadamente 50%, al menos aproximadamente 60%, al menos aproximadamente 70%, al menos aproximadamente 75%, al menos aproximadamente 80%, al menos aproximadamente 85%, al menos aproximadamente 90%, al menos aproximadamente 95%, o más (p. ej., aproximadamente 65 a 99%)). Por ejemplo, las sustituciones de residuos conservativas pueden estar basadas también o alternativamente en la sustitución de grupos de conservación fuertes o débiles basándose en el peso, que son conocidos en la técnica.

20

25

La retención de residuos similares se puede medir también o alternativamente por una puntuación de similitud, como se determina mediante el uso de un programa BLAST (por ejemplo, BLAST 2.2.8 disponible a través del NCBI utilizando los parámetros convencionales BLOSUM62, Hueco abierto = 11 y Hueco extendido = 1) . Las variantes adecuadas presentan típicamente una similitud de al menos aproximadamente 45%, tal como al menos aproximadamente 55%, al menos aproximadamente 65%, al menos aproximadamente 75%, al menos

aproximadamente 85%, al menos aproximadamente 90%, al menos aproximadamente 95%, o más (p. ej., aproximadamente 70 a 99%) con el péptido de origen.

5 Según se utiliza en la presente memoria, "isotipo" se refiere a la clase de inmunoglobulina (por ejemplo, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgD, IgA, IgE, o IgM) que está codificada por los genes de la región constante de la cadena pesada.

10 El término "epítipo" significa un determinante proteico que se puede unir a un anticuerpo específico. Los epítipos consisten habitualmente en agrupaciones superficiales de moléculas tales como aminoácidos o cadenas laterales de azúcares y normalmente tienen características estructurales tridimensionales específicas, así como características de carga específicas. Los epítipos conformacionales y no conformacionales se distinguen en que la unión a los primeros, pero no a los segundos se pierde en presencia de disolventes desnaturizantes. El epítipo puede comprender residuos de aminoácidos implicados directamente en la unión (también llamados componentes inmunodominantes del epítipo) y otros residuos de aminoácidos, que no están directamente involucrados en la unión, tales como residuos de aminoácidos que están bloqueados de manera eficaz por el péptido de unión a antígeno específicamente (en otras palabras, el residuo de aminoácido está dentro de la huella del péptido de unión al antígeno de manera específica).

20 Según se utiliza en la presente memoria, un anticuerpo humano "deriva de" una secuencia de la línea germinal particular, si el anticuerpo se obtiene a partir de un sistema que utiliza secuencias de inmunoglobulina humana, por ejemplo mediante la inmunización de un ratón transgénico que porta genes de inmunoglobulina humana o por escrutinio de una biblioteca de genes de inmunoglobulina humana, y en donde la secuencia del dominio V del anticuerpo humano seleccionado es idéntica en al menos 90%, tal como al menos 95%, por ejemplo al menos 96%, tal como al menos 97%, por ejemplo al menos 98%, o tal como al menos 99% en la secuencia del dominio V de aminoácidos a la secuencia de aminoácidos codificada por el gen de inmunoglobulina de la línea germinal. Normalmente, fuera de la CDR3 de la cadena pesada, un anticuerpo humano derivado de una secuencia de la línea germinal humana en particular mostrará diferencias de no más de 20 aminoácidos, p. ej., diferencias de no más de 10 aminoácidos, tales como no más de 9, 8, 7, 6 ó 5, por ejemplo diferencias de no más de 4, 3, 2, ó 1 aminoácidos con respecto a la secuencia de aminoácidos codificada por el gen de inmunoglobulina de línea germinal.

30 Según se utiliza en la presente memoria, se pretende que el término "inhibe el crecimiento" (p. ej., en referencia a células, tales como células tumorales) incluya cualquier disminución medible en el crecimiento de la célula cuando entra en contacto con un anticuerpo anti-TF en comparación con el crecimiento de las mismas células cuando no están en contacto con un anticuerpo anti-TF, p. ej., la inhibición del crecimiento de un cultivo celular en al menos aproximadamente 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 99%, o 100%. Tal disminución en el crecimiento celular puede producirse por una variedad de mecanismos, p. ej., fagocitosis de células efectoras, ADCC, CDC, y/o apoptosis.

40 Se pretende que el término "molécula biespecífica" incluya cualquier agente, tal como un proteína, péptido, o complejo de proteína o péptido, que tenga dos especificidades de unión diferentes. Por ejemplo, la molécula se puede unir a, o interactuar con, (a) un antígeno de la superficie celular y (b) un receptor de Fc sobre la superficie de una célula efectora. Se pretende que el término "anticuerpo biespecífico" incluya cualquier anticuerpo anti-TF, que sea una molécula biespecífica. El término "anticuerpos biespecíficos" también incluye diacuerpos. Los diacuerpos son anticuerpos bivalentes, biespecíficos en los que los dominios V<sub>H</sub> y V<sub>L</sub> se expresan en una única cadena polipeptídica, pero usando un conector que es demasiado corto para permitir el emparejamiento entre los dos dominios en la misma cadena, forzando de esta manera que los dominios se emparejen con dominios complementarios de otra cadena y creando dos sitios de unión a antígeno (véase por ejemplo Holliger, P. et al., PNAS USA 90, 6444-6448 (1993), Poljak, R.J. et al., Structure 2, 1121-1123 (1994)).

50 Un "anticuerpo con una función efectora deficiente" o un "anticuerpo deficiente en función efectora" se refiere a un anticuerpo que tiene una capacidad significativamente reducida o nula para activar uno o varios mecanismos efectores, tales como la activación del complemento o la unión al receptor de Fc. Por lo tanto, los anticuerpos deficientes en función efectora tienen una capacidad significativamente reducida o nula para mediar la citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpos (ADCC) y/o la citotoxicidad dependiente del complemento (CDC). Un ejemplo de semejante anticuerpo es la IgG4.

55 El término "anticuerpo monovalente" significa, en el contexto de la presente invención, que una molécula de anticuerpo es capaz de unirse a una sola molécula del antígeno, y por lo tanto no susceptible de entrecruzamiento antigénico.

60 El término "anticuerpo IgG4 estabilizado" se refiere a un anticuerpo IgG4 que ha sido modificado para reducir el intercambio de hemimolécula (véase van der Neut Kofschoten M. et al. (2007) Science 14; 317 (5844) y las referencias de la misma, y también Labrijn et al. (2009) Nature Biotechnology, 27, 767-771).

Según se utiliza en la presente memoria, el término "célula efectora" se refiere a una célula inmunitaria que está



implicada en la fase efectora de una respuesta inmunitaria, en oposición a las fases cognitivas y de activación de una respuesta inmunitaria. Las células inmunitarias ilustrativas incluyen una célula de origen mielóide o linfóide, por ejemplo linfocitos (tales como células B y células T, incluyendo las células T citolíticas (CTL)), células asesinas, células asesinas naturales, macrófagos, monocitos, eosinófilos, células polimorfonucleares, tales como los neutrófilos, granulocitos, mastocitos, y basófilos. Algunas células efectoras expresan receptores de Fc específicos y llevan a cabo funciones inmunitarias específicas. En algunas realizaciones, una célula efectora es capaz de inducir la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC), tal como una célula asesina natural, capaz de inducir ADCC. Por ejemplo, los monocitos, macrófagos, que expresan FcR están implicados en la destrucción específica de células diana y la presentación de antígenos a otros componentes del sistema inmunitario, o la unión a células que presentan antígenos. En algunas realizaciones, una célula efectora puede fagocitar un antígeno diana o una célula diana. La expresión de un FcR particular sobre una célula efectora se puede regular mediante factores humorales tales como citoquinas. Por ejemplo, se ha encontrado que la expresión de FcγRI está regulada al alza por el interferón γ (IFN-γ) y/o G-CSF. Esta expresión potenciada aumenta la actividad citotóxica de las células que portan FcγRI contra las dianas. Una célula efectora puede fagocitar o lisar un antígeno diana o una célula diana.

Se pretende que el término "vector", según se utiliza en la presente memoria, haga referencia a una molécula de ácido nucleico capaz de transportar otro ácido nucleico al que se ha unido. Un tipo de vector es un "plásmido", que se refiere a un bucle de ADN de doble hebra circular en el que se pueden ligar segmentos de ADN adicionales. Otro tipo de vector es un vector viral, en donde se pueden ligar otros segmentos de ADN en el genoma viral. Ciertos vectores son susceptibles de replicación autónoma en una célula anfitriona en la que se introducen (por ejemplo, vectores bacterianos que tienen un origen de replicación bacteriano y vectores episomales de mamífero). Otros vectores (tales como los vectores de mamíferos no episomales) se pueden integrar en el genoma de una célula anfitriona tras la introducción en la célula anfitriona, y de ese modo se replican junto con el genoma del anfitrión. Además, ciertos vectores son capaces de dirigir la expresión de genes a los que están unidos operativamente. Tales vectores se denominan en la presente memoria "vectores de expresión recombinante" (o simplemente, "vectores de expresión"). En general, los vectores de expresión de utilidad en las técnicas de ADN recombinante están a menudo en forma de plásmidos. En la presente memoria descriptiva, "plásmido" y "vector" se pueden utilizar indistintamente ya que el plásmido es la forma más comúnmente utilizada de vector. Sin embargo, se pretende que la presente invención incluya dichas otras formas de vectores de expresión, tales como vectores virales (tales como retrovirus de replicación defectuosa, adenovirus y virus adeno-asociados), que sirven para funciones equivalentes.

Se pretende que el término "célula anfitriona recombinante" (o simplemente "célula anfitriona"), según se utiliza en la presente memoria, haga referencia a una célula en la que se ha introducido un vector de expresión. Debe entenderse que se pretende que tales términos hagan referencia no sólo a la célula sujeto en particular, sino también a la progenie de dicha célula. Debido a que pueden producirse ciertas modificaciones en generaciones sucesivas debido a mutación o influencias ambientales, tal progenie puede, de hecho, no ser idéntica a la célula parental, pero todavía se incluye dentro del alcance de la expresión "célula anfitriona" según se utiliza en la presente memoria. Las células anfitrionas recombinantes incluyen, por ejemplo, transfectomas, tales como células CHO, células HEK293, células NS/0, y células linfocíticas.

El término "transfectoma", según se utiliza en la presente memoria, incluye células anfitrionas eucariotas recombinantes que expresan el anticuerpo, tales como células CHO, células NS/0, células HEK293, células vegetales, o células de hongos, incluyendo levaduras.

El término "animal no humano transgénico" se refiere a un animal no humano que tiene un genoma que comprende uno o más transgenes o transcromosomas de cadena pesada y/o ligera humana (ya sea integrados o no integrados en el ADN genómico natural del animal) y que es capaz de expresar anticuerpos completamente humanos. Por ejemplo, un ratón transgénico puede tener un transgén de cadena ligera humana y, o bien un transgén de cadena pesada humana o un transcromosoma de cadena pesada humana, de forma que el ratón produce anticuerpos anti-TF humano cuando se inmuniza con el antígeno TF y/o células que expresan el TF. El transgén de la cadena pesada humana puede integrarse en el ADN cromosómico del ratón, como es el caso para ratones transgénicos, por ejemplo ratones HuMAb, tales como ratones HCo7 o HCo12, o el transgén de la cadena pesada humana puede mantenerse extracromosómicamente, como es el caso de los ratones KM transcromosómicos como se describe en el documento WO02/43478. Tales ratones transgénicos y transcromosómicos (denominados colectivamente en la presente memoria como "ratones transgénicos") son capaces de producir múltiples isotipos de anticuerpos monoclonales humanos para un antígeno dado (por ejemplo, IgG, IgA, IgM, IgD y/o IgE) experimentando recombinación V-D-J y cambio de isotipo. El animal no humano transgénico también se puede utilizar para la producción de anticuerpos contra un antígeno específico mediante la introducción de genes que codifican tales anticuerpos específicos, por ejemplo uniendo operativamente los genes a un gen que se expresa en la leche del animal.

"Tratamiento" se refiere a la administración de una cantidad eficaz de un compuesto terapéuticamente activo de la presente invención con el propósito de aliviar, mejorar, detener o eliminar (curar) los síntomas o estados de enfermedad.

Una "cantidad eficaz" se refiere a una cantidad eficaz, a dosificaciones y durante periodos de tiempo necesarios, para lograr un resultado terapéutico deseado. La cantidad terapéuticamente eficaz de un anticuerpo anti-TF puede variar de acuerdo con factores tales como el estado de enfermedad, edad, sexo y peso del individuo, y la capacidad del anticuerpo anti-TF para provocar una respuesta deseada en el individuo. Una cantidad terapéuticamente eficaz también es aquella en la que cualquier efecto tóxico o perjudicial del anticuerpo o porción de anticuerpo es sobrepasado por los efectos terapéuticamente beneficiosos.

Un anticuerpo "anti-idiotipo" (Id) es un anticuerpo que reconoce determinantes únicos generalmente asociados con el sitio de unión al antígeno de un anticuerpo.

Otros aspectos y realizaciones de la invención

Como se ha descrito anteriormente, en un primer aspecto, la invención se refiere a un anticuerpo humano que se une al Factor Tisular humano en donde el anticuerpo comprende una región VH que comprende las secuencias de las CDR1, 2 y 3 de los SEQ ID NO: 10, 11 y 12 y una región VL que comprende las secuencias de las CDR1, 2 y 3 de los SEQ ID NO: 66, 67 y 68.

En una realización, el anticuerpo se une al dominio extracelular del Factor Tisular con una afinidad aparente ( $CE_{50}$ ) de 3 nM o menos, tal como 0,50 nM o menos, p. ej., 0,35 nM o menos, tal como 0,20 nM o menos, p. ej., 0.1 nM o menos, cuando se determina como se describe en el análisis del Ejemplo 13.

En otra realización, el anticuerpo se une a las células de mamífero que expresan el Factor Tisular, tales como células A431 transfectadas con un constructo que codifica el Factor Tisular, preferiblemente con una afinidad aparente ( $CE_{50}$ ) de 10 nM o menos, p. ej., 8 nM o menos, tal como 5 nM o menos, p. ej., 2 nM o menos, tal como 1 nM o menos, p. ej., 0,5 nM o menos, tal como 0,3 nM o menos, cuando se determina como se describe en el análisis del Ejemplo 14.

En otra realización, el anticuerpo es capaz de inducir la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos en las células A431, de preferencia con un valor de  $CE_{50}$  de 2 nM o menos, p. ej., 1 nM o menos, tal como 0,7 nM o menos, o 0,3 nM o menos, tal como 0,2 nM o menos, o 0,1 nM o menos, o 0,05 nM o menos, cuando se determina como se describe en el análisis del Ejemplo 20.

En otra realización, el anticuerpo es eficaz en la inhibición el crecimiento de tumores MDA-MB-231 establecidos, cuando se determina por el método descrito en el Ejemplo 24 y/o en la inhibición del crecimiento de tumores BxPC3 establecidos, cuando se determina mediante el método descrito en el Ejemplo 26.

En otra realización, el anticuerpo inhibe la coagulación de la sangre inducida por el factor tisular, preferiblemente con una concentración de inhibición mediana de menos de 10 nM, tal como menos de 5 nM, p. ej., menos de 2 nM, tal como menos de 1 nM cuando se determina como se describe en el análisis del Ejemplo 19.

En otra realización, el anticuerpo no inhibe la coagulación. En una realización, la coagulación se inhibe con un máximo de 30%, tal como 25%, tal como 20%, tal como 15%, tal como 10% o tal como 5% en comparación con el nivel nativo.

En una realización adicional, el anticuerpo inhibe la unión de FVIIa al Factor Tisular, preferiblemente con un valor de inhibición máximo de más de 80%, tal como más de 90% cuando se determina como se describe en el análisis del Ejemplo 15.

En una realización adicional, el anticuerpo inhibe la liberación de IL-8 inducida por FVIIa por las células MDA-MB-231, preferiblemente con un valor de inhibición máximo de la inhibición de más de 40%, tal como más de 50%, p. ej. más de 60%, cuando se determina como se describe en el análisis del Ejemplo 17.

En una realización adicional, el anticuerpo inhibe la conversión de FX en FXa por el complejo TF/FVIIa, preferiblemente en menos de 50%, p. ej. menos de 40%, tal como en el intervalo de 1 a 30%, cuando se determina como se describe en el análisis del Ejemplo 18.

En una realización adicional, el anticuerpo compite por la unión al Factor Tisular con un anticuerpo que comprende una región VH que comprende la secuencia del SEQ ID NO: 9 y una región VL que comprende la secuencia del SEQ ID NO: 65.

En una realización adicional, la unión del anticuerpo de la invención al Factor Tisular no implica los tres siguientes residuos: W en la posición 45, K en la posición 46 o Y en la posición 94 del Factor Tisular. En una realización más, la unión no implica ninguno de los siguientes residuos: W en la posición 45, K en la posición 46 o Y en la posición 94 (estos números se refieren al TF maduro, las posiciones equivalentes en la entrada GenBank NP\_001984 son 77, 78 y 126).

También se describen en la presente memoria anticuerpos que compiten por la unión al Factor Tisular con un anticuerpo que comprende una región VH que comprende la secuencia del SEQ ID NO: 37 y una región VL que comprende la secuencia del SEQ ID NO: 93.

5 En una realización adicional, el anticuerpo inhibe la fosforilación de ERK inducida por FVIIa, preferiblemente con una concentración inhibición mediana de menos de 10 nM, tal como menos de 5 nM, p. ej., menos de 2 nM cuando se determina como se describe en el análisis del Ejemplo 16.

10 En una realización adicional, el anticuerpo inhibe la fosforilación de ERK preferiblemente con una concentración de inhibición mediana de menos de 10 nM, tal como menos de 5 nM, p. ej., menos de 2 nM cuando se determina como se describe en el análisis del Ejemplo 16 y no inhibe la liberación de IL-8 inducida por FVII como se describe en el análisis del Ejemplo 17 en más de un máximo de 10%. En una realización adicional, el anticuerpo es capaz de inducir el depósito de C3c y C4c, preferiblemente en donde el anticuerpo es capaz de inducir el depósito de C3c y C4c como se determina en el Ejemplo 21.

15 En una realización adicional, los fragmentos Fab de anticuerpo se unen al dominio extracelular del Factor Tisular como se ha descrito en el Ejemplo 28 con un valor de CE50 de menos de 0,1 µg/mL, tal como por debajo de 0,05 µg/mL, p.ej. por debajo de 0,04 µg/mL tal como se mide por medio de ELISA.

20 En una realización adicional, los fragmentos Fab de anticuerpo se unen al dominio extracelular del factor tisular como se ha descrito en el Ejemplo 28 con un valor de CE50 por encima de 1,0 µg/mL, tal como se mide por medio de ELISA.

25 En una realización adicional, los fragmentos Fab de anticuerpo se unen al dominio extracelular del factor tisular como se ha descrito en el Ejemplo 28 con un valor de CE50 por debajo de 10 µg/mL, tal como por debajo de 1 µg/mL, por ejemplo, por debajo de 0,5 µg/mL, o por debajo de 0,2 µg/mL.

30 En una realización adicional, el anticuerpo se une al factor tisular humano y no al factor tisular murino y muestra una reducción de la unión en comparación con la unión a TF humano al constructo barajado de 42-84 mm, que contiene la secuencia humana para TF excepto para el aminoácido 42-84, que ha sido sustituido con la secuencia de ratón, como se describe en el Ejemplo 27.

35 También se describen en la presente memoria anticuerpos que se unen al factor tisular humano y no al factor tisular murino y muestran una reducción de la unión en comparación con la unión a TF humano al constructo barajado de 85-122, que contiene la secuencia humana para TF excepto para el aminoácido 85-122, que ha sido sustituido con la secuencia de ratón, como se describe en el Ejemplo 27.

40 También se describen en la presente memoria anticuerpos que se unen al factor tisular humano y no al factor tisular murino y muestran una reducción de la unión en comparación con la unión a TF humano al constructo barajado de 123-137 mm que contiene la secuencia humana para TF excepto para el aminoácido 123-137, que ha sido sustituido con la secuencia de ratón, como se describe en el Ejemplo 27.

45 También se describen en la presente memoria anticuerpos que se unen al factor tisular humano y no al factor tisular murino y muestran una reducción de la unión en comparación con la unión a TF humano al constructo barajado de 185-225 mm que contiene la secuencia humana para TF excepto para el aminoácido 185-225, que ha sido sustituido con la secuencia de ratón, como se describe en el Ejemplo 27.

50 También se describen en la presente memoria anticuerpos que se unen al factor tisular humano y no al factor tisular murino y muestran una reducción de la unión en comparación con la unión a TF humano al constructo barajado de 226-250 mm que contiene la secuencia humana para TF excepto para el aminoácido 226 a 250, que ha sido sustituido con la secuencia de ratón, como se describe en el Ejemplo 27.

55 También se describen en la presente memoria anticuerpos que muestran una reducción de la unión en comparación con la unión a TF humano a más de un constructo barajado tal como un anticuerpo que muestra una reducción de la unión al constructo de 42 a 84 mm, así como a 85 a 122 mm y un anticuerpo que muestra una reducción de la unión a 123-137 mm, así como al constructo de 185-225 mm. También se describen en la presente memoria anticuerpos que muestran una reducción de la unión al constructo de 123-137 mm, así como al constructo de 185-225 mm y adicionalmente al constructo de 226-250 mm.

60 En una realización adicional, el anticuerpo es capaz de inducir el depósito de C3c y C4c, preferiblemente en donde el anticuerpo es capaz de inducir el depósito de C3c y C4c tal como se determina en el Ejemplo 21.

También se describen en la presente memoria anticuerpos que compiten por la unión al Factor Tisular con un anticuerpo que comprende una región VH que comprende la secuencia del SEQ ID NO: 9 y una región VL que

comprende la secuencia del SEQ ID NO: 65, y no compiten por la Unión al Factor Tisular con un anticuerpo que comprende una región VH que comprende la secuencia del SEQ ID NO: 37 y una región VL que comprende la secuencia del SEQ ID NO: 93.

5 También se describen en la presente memoria anticuerpos que comprenden una región CDR3 de VH que tiene

a) la secuencia expuesta en

- 10 - el SEQ ID NO: 12,  
 - el SEQ ID NO: 16,  
 - el SEQ ID NO: 20,  
 - el SEQ ID NO: 24,  
 - el SEQ ID NO: 28,

15 o

b) una variante de cualquiera de dichas secuencias, tal como una variante que tiene como máximo 1, 2, 3, 4 ó 5 modificaciones de aminoácidos, preferiblemente sustituciones, tales como sustituciones conservativas.

20 También se describen en la presente memoria anticuerpos que comprenden una región CDR3 de VH que tiene la secuencia expuesta en el SEQ ID NO: 12 o una variante de la misma, en donde la variante comprende la modificación en una o más de las posiciones 2, 3, 6, 9 y 11, preferiblemente donde la modificación es una sustitución, más preferiblemente donde la sustitución se selecciona del grupo que consiste en

- 25 a. R está sustituido por K cuando está en posición 2,  
 b. S está sustituido por A o T cuando está en posición 3,  
 c. G está sustituido por T cuando está en posición 6,  
 d. L está sustituido por F, cuando en la posición 9, y  
 e. S está sustituido por Y cuando está en posición 11.

30 La presente invención se refiere a un anticuerpo humano que se une a un Factor Tisular humano y comprende una región VH que comprende las secuencias de las CDR1, 2 y 3 de los SEQ ID NO: 10, 11 y 12 y una región VL que comprende las secuencias de las CDR1, 2 y 3 de los SEQ ID NO: 66, 67 y 68. También se describen en la presente memoria anticuerpos que comprenden:

- 35 a) una región VH que comprende las secuencias de las CDR1, 2 y 3 de los SEQ ID NO: 14, 15 y 16, y una región VL que comprende las secuencias de las CDR1, 2 y 3 de los SEQ ID NO: 70, 71 y 72,  
 b) una región VH que comprende las secuencias de las CDR1, 2 y 3 de los SEQ ID NO: 18, 19, 20 y una región VL que comprende las secuencias de las CDR1, 2 y 3 de los SEQ ID NO: 74, 75 y 76,  
 40 c) una región VH que comprende las secuencias de las CDR1, 2 y 3 de los SEQ ID NO: 22, 23 y 24 y una región VL que comprende las secuencias de las CDR1, 2 y 3 de los SEQ ID NO: 78, 79 y 80,  
 d) una región VH que comprende las secuencias de las CDR1, 2 y 3 de los SEQ ID NO: 26, 27 y 28 y una región VL que comprende las secuencias de las CDR1, 2 y 3 de los SEQ ID NO: 82, 83 y 84, o  
 45 e) una variante de cualquiera de dichos anticuerpos, en donde dicha variante tiene preferiblemente como máximo 1, 2 ó 3 modificaciones de aminoácidos, más preferiblemente sustituciones de aminoácidos, tales como sustituciones de aminoácidos conservativas en dichas secuencias.

En una realización, el anticuerpo comprende una VH que tiene

- 50 a) una identidad de al menos 80%, tal como al menos 90%, al menos 95%, o al menos 98% o una identidad de 100% con una región VH que comprende la secuencia del SEQ ID NO: 9, o  
 b) como máximo 20, tal como 15, ó 10, ó 5, 4, 3, 2 ó 1 modificaciones de aminoácidos, más preferiblemente sustituciones de aminoácidos, tales como sustituciones de aminoácidos conservativas en comparación con una región VH que comprende la secuencia del SEQ ID NO: 9.

55 En una realización adicional, el anticuerpo comprende una VL que tiene

- a) una identidad de al menos 80%, tal como al menos 90%, al menos 95%, o al menos 98% o una identidad de 100% con una región VL que comprende la secuencia del SEQ ID NO: 65, o  
 60 b) como máximo 20, tal como 15, ó 10, o 5, 4, 3, 2 ó 1 modificaciones de aminoácidos, más preferiblemente sustituciones de aminoácidos, tales como sustituciones de aminoácidos conservativas en comparación con una región VH que comprende la secuencia del SEQ ID NO: 65.

En una realización adicional, el anticuerpo comprende una región VH que comprende la secuencia del SEQ ID NO: 9 y una región VL que comprende la secuencia del SEQ ID NO: 65.

También se describen en la presente memoria anticuerpos que comprenden:

- a) una región VH que comprende la secuencia del SEQ ID NO: 13 y una región VL que comprende la secuencia del SEQ ID NO: 69,
- 5 b) una región VH que comprende la secuencia del SEQ ID NO: 17 y una región VL que comprende la secuencia del SEQ ID NO: 73,
- c) una región VH que comprende la secuencia del SEQ ID NO: 21 y una región VL que comprende la secuencia del SEQ ID NO: 77,
- 10 d) una región VH que comprende la secuencia del SEQ ID NO: 25 y una región VL que comprende la secuencia del SEQ ID NO: 81, o
- e) una variante de cualquiera de dichos anticuerpos, en donde dicha variante tiene preferiblemente como máximo 1, 2 ó 3 modificaciones de aminoácidos, más preferiblemente sustituciones de aminoácidos, tales como sustituciones de aminoácidos conservativas en dichas secuencias.

15 También se describen en la presente memoria anticuerpos que compiten por la unión del Factor Tisular a un anticuerpo que comprende una región VH que comprende la secuencia del SEQ ID NO: 9 y una región VL que comprende la secuencia del SEQ ID NO: 65, y que compiten por la unión del Factor Tisular a un anticuerpo que comprende una región VH que comprende la secuencia del SEQ ID NO: 37 y una región VL que comprende la secuencia del SEQ ID NO: 93.

20 También se describen en la presente memoria anticuerpos que comprenden una región CDR3 de VH que tiene

a) la secuencia expuesta en

- 25 - SEQ ID NO: 8,
- SEQ ID NO: 52, o

b) una variante de cualquiera de dichas secuencias, tal como una variante que tiene como máximo 1, 2 ó 3 modificaciones de aminoácidos, preferiblemente sustituciones, tales como sustituciones conservativas.

30 También se describen en la presente memoria anticuerpos que comprenden:

- a) una región VH que comprende las secuencias de las CDR1, 2 y 3 de los SEQ ID NO: 6, 7 y 8 y una región VL que comprende las secuencias de las CDR1, 2 y 3 de los SEQ ID NO: 62, 63 y 64,
- 35 b) una región VH que comprende las secuencias de las CDR1, 2 y 3 de los SEQ ID NO: 50, 51 y 52 y una región VL que comprende las secuencias de las CDR1, 2 y 3 de los SEQ ID NO: 106, 107 y 108, o
- c) una variante de cualquiera de dichos anticuerpos, en donde dicha variante tiene preferiblemente como máximo 1, 2 ó 3 modificaciones de aminoácidos, más preferiblemente sustituciones de aminoácidos, tales como sustituciones de aminoácidos conservativas en dichas secuencias.

40 También se describen en la presente memoria anticuerpos que comprende una VH que tiene

- a) una identidad de al menos 80%, tal como al menos 90%, al menos 95%, o al menos 98% o una identidad de 100% con una secuencia de la región VH seleccionada del grupo que consiste en: los SEQ ID NO: 5 y 49, o
- 45 b) como máximo 20, tal como 15, ó 10, o 5, 4, 3, 2 ó 1 modificaciones de aminoácidos, más preferiblemente sustituciones de aminoácidos, tales como sustituciones de aminoácidos conservativas en comparación con una secuencia de la región VH seleccionada del grupo que consiste en: los SEQ ID NO: 5 y 49.

50 También se describen en la presente memoria anticuerpos que comprenden una VL que tiene

- c) una identidad de al menos 80%, tal como al menos 90%, al menos 95%, o al menos 98% o una identidad de 100% con una secuencia de la región VL seleccionada del grupo que consiste en: los SEQ ID NO: 61 y 105, o
- 55 d) como máximo 20, tal como 15, ó 10, o 5, 4, 3, 2 ó 1 modificaciones de aminoácidos, más preferiblemente sustituciones de aminoácidos, tales como sustituciones de aminoácidos conservativas en comparación con una secuencia de la región VH seleccionada del grupo que consiste en: los SEQ ID NO: 61 y 105.

También se describen en la presente memoria anticuerpos que comprenden:

- a) una región VH que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 5 y una región VL que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 61,
- 60 b) una región VH que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 49 y una región VL que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 105, o
- c) una variante de cualquiera de dichos anticuerpos, en donde dicha variante tiene preferiblemente como máximo 1, 2 ó 3 modificaciones de aminoácidos, más preferiblemente sustituciones de aminoácidos, tales como

sustituciones de aminoácidos conservativas en dichas secuencias.

También se describen en la presente memoria anticuerpos que

- 5 - no compiten por la unión al Factor Tisular con un anticuerpo que comprende una región VH que comprende la secuencia del SEQ ID NO: 9 y una región VL que comprende la secuencia del SEQ ID NO: 65, y
- compiten por la unión al Factor Tisular con un anticuerpo que comprende una región VH que comprende la secuencia del SEQ ID NO: 37 y una región VL que comprende la secuencia del SEQ ID NO: 93.

También se describen en la presente memoria anticuerpos que comprenden una región CDR3 de VH que tiene

- 10 a) la secuencia expuesta en
  - el SEQ ID NO: 32,
  - 15 - SEQ ID NO: 36,
  - SEQ ID NO: 40,
  - SEQ ID NO: 56,
- o
- 20 b) una variante de cualquiera de dichas secuencias, tales como una variante que tiene como máximo 1, 2 ó 3 modificaciones de aminoácidos, preferiblemente sustituciones, tales como sustituciones conservativas.

También se describen en la presente memoria anticuerpos que comprenden:

- 25 a) una región VH que comprende las secuencias de las CDR1, 2 y 3 de los SEQ ID NO: 30, 31 y 32 y una región VL que comprende las secuencias de las CDR1, 2 y 3 de los SEQ ID NO: 86, 87 y 88,
- b) una región VH que comprende las secuencias de las CDR1, 2 y 3 de los SEQ ID NO: 34, 35 y 36 y una región VL que comprende las secuencias de las CDR1, 2 y 3 de los SEQ ID NO: 90, 91 y 92,
- 30 c) una región VH que comprende las secuencias de las CDR1, 2 y 3 de los SEQ ID NO: 38, 39 y 40 y una región VL que comprende las secuencias de las CDR1, 2 y 3 de los SEQ ID NO: 94, 95 y 96,
- d) una región VH que comprende las secuencias de las CDR1, 2 y 3 de los SEQ ID NO: 54, 55 y 56 y una región VL que comprende las secuencias de las CDR1, 2 y 3 de los SEQ ID NO: 110, 11 y 112, o
- 35 e) una variante de cualquiera de dichos anticuerpos, en donde dicha variante tiene preferiblemente como máximo 1, 2 ó 3 modificaciones de aminoácidos, más preferiblemente sustituciones de aminoácidos, tales como sustituciones de aminoácidos conservativas en dichas secuencias.

También se describen en la presente memoria anticuerpos que comprenden una VH que tiene

- 40 a) una identidad de al menos 80%, tal como al menos 90%, al menos 95%, o al menos 98% o una identidad de 100% con una secuencia de la región VH seleccionada del grupo que consiste en: los SEQ ID NO: 29, 33, 37 y 53, o
- b) como máximo 20, tal como 15, ó 10, ó 5, 4, 3, 2 ó 1 modificaciones de aminoácidos, más preferiblemente sustituciones de aminoácidos, tales como sustituciones de aminoácidos conservativas en comparación con una secuencia de la región VH seleccionada del grupo que consiste en: los SEQ ID NO: 29, 33, 37 y 53.

También se describen en la presente memoria anticuerpos que comprenden una VL que tiene

- 45 a) una identidad de al menos 80%, tal como al menos 90%, al menos 95%, o al menos 98% o una identidad de 100% con una secuencia de la región VL seleccionada del grupo que consiste en: los SEQ ID NO: 85, 89, 93 y 109, o
- 50 b) como máximo 20, tal como 15, ó 10, ó 5, 4, 3, 2 ó 1 modificaciones de aminoácidos, más preferiblemente sustituciones de aminoácidos, tales como sustituciones de aminoácidos conservativas en comparación con una secuencia de la región VH seleccionada del grupo que consiste en: los SEQ ID NO: 85, 89, 93 y 109.

También se describen en la presente memoria anticuerpos que comprenden:

- 55 a) una región VH que comprende la secuencia del SEQ ID NO: 29 y una región VL que comprende la secuencia del SEQ ID NO: 85,
- b) una región VH que comprende la secuencia del SEQ ID NO: 33 y una región VL que comprende la secuencia del SEQ ID NO: 89,
- 60 c) una región VH que comprende la secuencia del SEQ ID NO: 37 y una región VL que comprende la secuencia del SEQ ID NO: 93,
- d) una región VH que comprende la secuencia del SEQ ID NO: 53 y una región VL que comprende la secuencia del SEQ ID NO: 109, o
- e) una variante de cualquiera de dichos anticuerpos, en donde dicha variante tiene preferiblemente como

## ES 2 604 635 T3

máximo 1, 2 ó 3 modificaciones de aminoácidos, más preferiblemente sustituciones de aminoácidos, tales como sustituciones de aminoácidos conservativas en dichas secuencias.

5 También se describen en la presente memoria anticuerpos que compiten por la unión al Factor Tisular con un anticuerpo que comprende una región VH que comprende la secuencia del SEQ ID NO: 41 y una región VL que comprende la secuencia del SEQ ID NO: 97.

También se describen en la presente memoria anticuerpos que comprenden una región CDR3 de VH que tiene  
a) la secuencia expuesta en

- 10
- el SEQ ID NO: 4,
  - el SEQ ID NO: 44,
  - el SEQ ID NO: 48,

15 o  
b) una variante de cualquiera de dichas secuencias, tales como una variante que tiene como máximo 1, 2 ó 3 modificaciones de aminoácidos, preferiblemente sustituciones, tales como sustituciones conservativas.

También se describen en la presente memoria anticuerpos que comprenden:

- 20
- a) una región VH que comprende las secuencias de las CDR1, 2 y 3 de los SEQ ID NO: 2, 3 y 4 y una región VL que comprende las secuencias de las CDR1, 2 y 3 de los SEQ ID NO: 58, 59 y 60,
  - b) una región VH que comprende las secuencias de las CDR1, 2 y 3 de los SEQ ID NO: 42, 43 y 44 y una región VL que comprende las secuencias de las CDR1, 2 y 3 de los SEQ ID NO: 98, 99 y 100,
  - 25 c) una región VH que comprende las secuencias de las CDR1, 2 y 3 de los SEQ ID NO: 46, 47 y 48 y una región VL que comprende las secuencias de las CDR1, 2 y 3 de los SEQ ID NO: 102, 103 y 104, o
  - d) una variante de cualquiera de dichos anticuerpos, en donde dicha variante tiene preferiblemente como máximo 1, 2 o 3 modificaciones de aminoácidos, más preferiblemente sustituciones de aminoácidos, tales como sustituciones de aminoácidos conservativas en dichas secuencias.
- 30

También se describen en la presente memoria anticuerpos que comprenden una VH que tiene

- 35
- a) una identidad de al menos 80%, tal como al menos 90%, al menos 95%, o al menos 98% o una identidad de 100% con una secuencia de la región VH seleccionada del grupo que consiste en: los SEQ ID NO: 1, 41 y 45 o
  - b) como máximo 20, tal como 15, ó 10, ó 5, 4, 3, 2 ó 1 modificaciones de aminoácidos, más preferiblemente sustituciones de aminoácidos, tales como sustituciones de aminoácidos conservativas en comparación con una secuencia de la región VH seleccionada del grupo que consiste en: los SEQ ID NO: 1, 41 y 45.

También se describen en la presente memoria anticuerpos que comprenden una VL que tiene

- 40
- c) una identidad de al menos 80%, tal como al menos 90%, al menos 95%, o al menos 98% o una identidad de 100% con una secuencia de la región VL seleccionada del grupo que consiste en: los SEQ ID NO: 57, 97 y 101
  - o
  - d) como máximo 20, tal como 15, ó 10, ó 5, 4, 3, 2 ó 1 modificaciones de aminoácidos, más preferiblemente sustituciones de aminoácidos, tales como sustituciones de aminoácidos conservativas en comparación con una secuencia de la región VH seleccionada del grupo que consiste en: los SEQ ID NO: 57, 97 y 101.
- 45

También se describen en la presente memoria anticuerpos que comprenden:

- 50
- a) una región VH que comprende la secuencia del SEQ ID NO: 1 y una región VL que comprende la secuencia del SEQ ID NO: 57,
  - b) una región VH que comprende la secuencia del SEQ ID NO: 41 y una región VL que comprende la secuencia del SEQ ID NO: 97,
  - 55 c) una región VH que comprende la secuencia del SEQ ID NO: 45 y una región VL que comprende la secuencia del SEQ ID NO: 101, o
  - d) una variante de cualquiera de dichos anticuerpos, en donde dicha variante tiene preferiblemente como máximo 1, 2 ó 3 modificaciones de aminoácidos, más preferiblemente sustituciones de aminoácidos, tales como sustituciones de aminoácidos conservativas en dichas secuencias.

60 En una realización adicional más, el anticuerpo de la invención tiene una afinidad para el factor tisular que es menor de 5 nM, tal como menor de 3,5 nM, por ejemplo, menor de 2 nM cuando se determina por el método descrito en el Ejemplo 22 en la presente memoria.

Un grupo particularmente interesante de anticuerpos de la invención tiene una unión al Factor Tisular que se

caracteriza por una avidéz normal o elevada y una velocidad de disociación (kd) elevada. Como se demuestra en la presente memoria, dichos anticuerpos pueden exhibir una unión específica a un tumor ya que se unen el tejido canceroso, pero no se unen, o se unen menos, a los tejidos sanos. Sin estar limitado por ninguna teoría específica, se plantea la hipótesis de que este grupo de anticuerpos sólo se une bien a las células que expresan altos niveles de TF, porque la unión sólo es eficaz si es bivalente. Los ejemplos de estos anticuerpos incluyen los anticuerpos 044, 098 y 111, que se describen en la presente memoria.

Por consiguiente, en una realización, el anticuerpo de la invención tiene una kd de más de  $10^{-3} \text{ seg}^{-1}$  cuando se determina por el método de afinidad descrito en el Ejemplo 22 en la presente memoria, y una avidéz menor de 5 nM, tal como menor de 1 nM, por ejemplo, menor de 0,2 nM cuando se determina por el método de avidéz descrito en el Ejemplo 22 en la presente memoria.

En otra realización, el anticuerpo de la invención tiene una kd mayor de  $10^{-3} \text{ seg}^{-1}$ , cuando se determina por el método de afinidad descrito en el Ejemplo 22 en la presente memoria y/o una ka mayor de  $5 \times 10^4$ , Mol  $\text{seg}^{-1}$  cuando se determina por el método de afinidad descrito en el Ejemplo 22 en la presente memoria.

En una realización adicional, el anticuerpo no muestra unión a tejido sano, en particular, no se une a los glomérulos humanos, p. ej. como se determina en el análisis descrito en el Ejemplo 23, pero muestran unión a los tumores pancreáticos, p. ej., como se determina en el análisis descrito en el Ejemplo 23 en la presente memoria.

En una realización adicional más, el anticuerpo es eficaz en la inhibición de crecimiento de los tumores BX-PC3 establecidos cuando se determina por el método descrito en el Ejemplo 26 en la presente memoria.

En otra realización, el anticuerpo de la invención tiene una o más de las siguientes propiedades: inhibición de la proliferación, inhibición de la angiogénesis tumoral, inducción de la apoptosis de las células tumorales, unión a Factor Tisular seccionado alternativamente.

También se describen en la presente memoria anticuerpos que compiten por la unión al Factor Tisular con un anticuerpo que comprende

- a) una región VH que comprende la secuencia del SEQ ID NO: 9 y una región VL que comprende la secuencia del SEQ ID NO: 65,
- b) una región VH que comprende la secuencia del SEQ ID NO: 1 y una región VL que comprende la secuencia del SEQ ID NO: 57,
- c) una región VH que comprende la secuencia del SEQ ID NO: 5 y una región VL que comprende la secuencia del SEQ ID NO: 61,
- d) una región VH que comprende la secuencia del SEQ ID NO: 13 y una región VL que comprende la secuencia del SEQ ID NO: 69;
- e) una región VH que comprende la secuencia del SEQ ID NO: 17 y una región VL que comprende la secuencia del SEQ ID NO: 73,
- f) una región VH que comprende la secuencia del SEQ ID NO: 21 y una región VL que comprende la secuencia del SEQ ID NO: 77,
- g) una región VH que comprende la secuencia del SEQ ID NO: 25 y una región VL que comprende la secuencia del SEQ ID NO: 81,
- h) una región VH que comprende la secuencia del SEQ ID NO: 29 y una región VL que comprende la secuencia del SEQ ID NO: 85,
- i) una región VH que comprende la secuencia del SEQ ID NO: 33 y una región VL que comprende la secuencia del SEQ ID NO: 89,
- j) una región VH que comprende la secuencia del SEQ ID NO: 37 y una región VL que comprende la secuencia del SEQ ID NO: 93,
- k) una región VH que comprende la secuencia del SEQ ID NO: 41 y una región VL que comprende la secuencia del SEQ ID NO: 97,
- l) una región VH que comprende la secuencia del SEQ ID NO: 45 y una región VL que comprende la secuencia del SEQ ID NO: 101,
- m) una región VH que comprende la secuencia del SEQ ID NO: 49 y una región VL que comprende la secuencia del SEQ ID NO: 105, o
- n) una región VH que comprende la secuencia del SEQ ID NO: 53 y una región VL que comprende la secuencia del SEQ ID NO: 109

También se describen en la presente memoria anticuerpos que se unen al mismo epítipo en el Factor Tisular que un anticuerpo que tiene:

- a) una región VH que comprende la secuencia del SEQ ID NO: 9 y una región VL que comprende la secuencia del SEQ ID NO: 65,



- b) una región VH que comprende la secuencia del SEQ ID NO: 1 y una región VL que comprende la secuencia del SEQ ID NO: 57,
- c) una región VH que comprende la secuencia del SEQ ID NO: 5 y una región VL que comprende la secuencia del SEQ ID NO: 61,
- 5 d) una región VH que comprende la secuencia del SEQ ID NO: 13 y una región VL que comprende la secuencia del SEQ ID NO: 69,
- e) una región VH que comprende la secuencia del SEQ ID NO: 17 y una región VL que comprende la secuencia del SEQ ID NO: 73,
- 10 f) una región VH que comprende la secuencia del SEQ ID NO: 21 y una región VL que comprende la secuencia del SEQ ID NO: 77,
- g) una región VH que comprende la secuencia del SEQ ID NO: 25 y una región VL que comprende la secuencia del SEQ ID NO: 81,
- h) una región VH que comprende la secuencia del SEQ ID NO: 29 y una región VL que comprende la secuencia del SEQ ID NO: 85,
- 15 i) una región VH que comprende la secuencia del SEQ ID NO: 33 y una región VL que comprende la secuencia del SEQ ID NO: 89,
- j) una región VH que comprende la secuencia del SEQ ID NO: 37 y una región VL que comprende la secuencia del SEQ ID NO: 93,
- 20 k) una región VH que comprende la secuencia del SEQ ID NO: 41 y una región VL que comprende la secuencia del SEQ ID NO: 97,
- l) una región VH que comprende la secuencia del SEQ ID NO: 45 y una región VL que comprende la secuencia del SEQ ID NO: 101,
- m) una región VH que comprende la secuencia del SEQ ID NO: 49 y una región VL que comprende la secuencia del SEQ ID NO: 105, o
- 25 n) una región VH que comprende la secuencia del SEQ ID NO: 53 y una región VL que comprende la secuencia del SEQ ID NO: 109.

En una realización adicional, el anticuerpo de la invención comprende:

- 30 - una región variable de cadena pesada derivada de una secuencia  $V_H$  de la línea germinal humana seleccionada del grupo que consiste en: IGHV1-18\*01, IGHV3-23\*01, IGHV3-30\*01, IGHV3-33\*01, IGHV3-333\*03, IGHV1-69\*02, IGHV1-69\*04 e IGHV5-51\*01 y/o
- una región variable de cadena ligera derivada de una secuencia de  $V_L$  de la línea germinal humana seleccionada del grupo que consiste en: IGKV3-20\*01, IGKV1-13\*02, IGKV3-11\*01, e IGKV1D-16\*01.

35 En un aspecto adicional, la invención se refiere a un anticuerpo monoclonal anti-TF que comprende una región VH que tiene la secuencia expuesta en el SEQ ID NO: 9, o una variante que tiene como máximo 25 modificaciones de aminoácidos, por ejemplo 20, tal como a lo sumo 15, 14, 13, 12 u 11 modificaciones de aminoácidos, tal como 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 ó 1 modificaciones de aminoácidos, tales como deleciones o inserciones, preferiblemente sustituciones, tales como sustituciones conservativas.

40 La variante de la secuencia expuesta en el SEQ ID NO: 9, puede tener un % de identidad de al menos 80 con cualquiera de dichas secuencias, tal como identidad de al menos 85% o una identidad de 90% o una identidad de 95%, tal como una identidad de 96% o una identidad de 97% o una identidad de 98% o una identidad de 99%.

45 En un aspecto de la invención, el anticuerpo monoclonal anti-TF aislado comprende una secuencia de VL expuesta en el SEQ ID NO: 65, o una variante que tiene a lo sumo 25 modificaciones de aminoácidos, tal como 20, tal como a lo sumo 15, 14, 13, 12 u 11 modificaciones de aminoácidos, tal como 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 ó 1 modificaciones de aminoácidos, tales como deleciones o inserciones, preferiblemente sustituciones, tales como sustituciones conservativas.

50 La variante de la secuencia expuesta en el SEQ ID NO: 65 puede tener una identidad de al menos 80% con cualquiera de dichas secuencias, tal como identidad de al menos 85% o una identidad de 90% o una identidad de 95%, tal como una identidad de 96% o una identidad de 97% o una identidad de 98% o una identidad de 99%.

55 En otra realización, el anticuerpo comprende

- 60 a) una región VL que tiene la secuencia del SEQ ID NO: 65, y una región VH que tiene una secuencia del SEQ ID NO: 9,
- b) una variante de cualquiera de las anteriores, en donde dicha variante preferiblemente sólo tiene sustituciones conservativas en dichas secuencias.

En una realización preferida, el anticuerpo comprende una región VL que tiene la secuencia expuesta en SEQ ID No: 65 y una región VH que tiene la secuencia expuesta en el SEQ ID NO: 9, o una variante de cualquiera de las dos

secuencias, teniendo cada variante

- 5 a) a lo sumo 25 modificaciones de aminoácidos, tal como 20, tal como a lo sumo 15; 14, 13, 12 u 11 modificaciones de aminoácidos, tal como 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 ó 1 modificaciones de aminoácidos, tales como delecciones o inserciones, preferiblemente sustituciones, tales como sustituciones conservativas o b) una identidad de al menos 80% con el SEQ ID NO: 9 o el SEQ ID NO: 65, respectivamente, tal como una identidad de al menos 85% o una identidad de 90% o una identidad de 95%, tal como una identidad de 96% o una identidad de 97% o una identidad de 98% o una identidad de 99%.

10 También se describe en la presente memoria un anticuerpo que comprende una región VL que tiene la secuencia expuesta en el SEQ ID NO: 57 y una región VH que tiene la secuencia expuesta en el SEQ ID NO: 1, o una variante de cualquiera de las dos secuencias, teniendo la variantes

- 15 a) a lo sumo 25 modificaciones de aminoácidos, tal como 20, tal como a lo sumo 15, 14, 13, 12 u 11 modificaciones de aminoácidos, tal como 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 ó 1 modificaciones de aminoácidos, tales como delecciones o inserciones, preferiblemente sustituciones, tales como sustituciones conservativas, o b) una identidad de al menos 80% con el SEQ ID NO: 1 o el SEQ ID NO: 57, respectivamente, tal como una identidad de al menos 85% o una identidad de 90% o una identidad de 95%, tal como una identidad de 96% o una identidad de 97% o una identidad de 98% o una identidad de 99%.

20 También se describe en la presente memoria un anticuerpo que comprende una región VL que tiene la secuencia expuesta en el SEQ ID NO: 61 y una región VH que tiene la secuencia expuesta en el SEQ ID NO: 5, o una variante de cualquiera de las dos secuencias, teniendo las variantes

- 25 a) a lo sumo 25 modificaciones de aminoácidos, tal como 20, tal como a lo sumo 15, 14, 13, 12 u 11 modificaciones de aminoácidos, tales como 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 ó 1 modificaciones de aminoácidos, tales como delecciones o inserciones, preferiblemente sustituciones, tales como sustituciones conservativas, o b) una identidad de al menos 80% con el SEQ ID NO: 5 o el SEQ ID NO: 61, respectivamente, tal como una identidad de al menos 85% o una identidad de 90% o una identidad de 95%, tal como una identidad de 96% o una identidad de 97% o una identidad de 98% o una identidad de 99%.

30 También se describe en la presente memoria un anticuerpo que comprende una región VL que tiene la secuencia expuesta en el SEQ ID NO: 69 y una región VH que tiene la secuencia expuesta en el SEQ ID NO: 13, o una variante de cualquiera de las dos secuencias, teniendo las variantes

- 35 a) a lo sumo 25 modificaciones de aminoácidos, tal como 20, tal como a lo sumo 15, 14, 13, 12 u 11 modificaciones de aminoácidos, tal como 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 ó 1 modificaciones de aminoácidos, tales como delecciones o inserciones, preferiblemente sustituciones, tales como sustituciones conservativas, o b) una identidad de al menos 80% con el SEQ ID NO: 13 o el SEQ ID NO: 69, respectivamente, tal como una identidad de al menos 85% o una identidad de 90% o una identidad de 95%, tal como una identidad de 96% o una identidad de 97% o una identidad de 98% o una identidad de 99%.

40 También se describe en la presente memoria un anticuerpo que comprende una región VL que tiene la secuencia expuesta en el SEQ ID NO: 73 y una región VH que tiene la secuencia expuesta en el SEQ ID NO: 17, o una variante de cualquiera de las dos secuencias, teniendo las variantes

- 45 a) a lo sumo 25 de modificaciones de aminoácidos, tal como 20, tal como a lo sumo 15, 14, 13, 12 u 11 modificaciones de aminoácidos, tal como 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 ó 1 modificaciones de aminoácidos, tales como delecciones o inserciones, preferiblemente sustituciones, tales como sustituciones conservativas, o b) una identidad de al menos 80% con el SEQ ID NO: 17 o el SEQ ID NO: 73, respectivamente, tal como una identidad de al menos 85% o una identidad de 90% o una identidad de 95%, tal como una identidad de 96% o una identidad de 97% o una identidad de 98% o una identidad de 99%.

50 También se describe en la presente memoria un anticuerpo que comprende una región VL que tiene la secuencia expuesta en el SEQ ID NO: 77 y una región VH que tiene la secuencia expuesta en el SEQ ID NO: 21, o una variante de cualquiera de las dos secuencias, teniendo las variantes

- 55 a) a lo sumo 25 modificaciones de aminoácidos, tal como 20, tal como a lo sumo 15, 14, 13, 12 u 11 modificaciones de aminoácidos, tal como 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 ó 1 modificaciones de aminoácidos, tales como delecciones o inserciones, preferiblemente sustituciones, tales como sustituciones conservativas, o b) una identidad de al menos 80% con el SEQ ID NO: 21 o el SEQ ID NO: 77, respectivamente, tal como una identidad de al menos 85% o una identidad de 90% o una identidad de 95%, tal como una identidad de 96% o una identidad de 97% o una identidad de 98% o una identidad de 99%.

60



- a) a lo sumo 25 modificaciones de aminoácidos, tal como 20, tal como a lo sumo 15, 14, 13, 12 u 11 modificaciones de aminoácidos, tal como 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 ó 1 modificaciones de aminoácidos, tales como deleciones o inserciones, preferiblemente sustituciones, tales como sustituciones conservativas, o
- b) una identidad de al menos 80% con el SEQ ID NO: 49 o el SEQ ID NO: 105, respectivamente, tal como una identidad de al menos 85% o una identidad de 90% o una identidad de 95%, tal como una identidad de 96% o una identidad de 97% o una identidad de 98% o una identidad de 99%.

También se describe en la presente memoria un anticuerpo que comprende una región VL que tiene la secuencia expuesta en el SEQ ID NO: 109 y una región VH que tiene la secuencia expuesta en el SEQ ID NO: 53, o una variante de cualquiera de las dos secuencias, teniendo las variantes

- a) a lo sumo 25 modificaciones de aminoácidos, tal como 20, tal como a lo sumo 15, 14, 13, 12 u 11 modificaciones de aminoácidos, tal como 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 ó 1 modificaciones de aminoácidos, tales como deleciones o inserciones, preferiblemente sustituciones, tales como sustituciones conservativas, o
- b) una identidad de al menos 80% con el SEQ ID NO: 53 o el SEQ ID NO: 109, respectivamente, tal como una identidad de al menos 85% o una identidad de 90% o una identidad de 95%, tal como una identidad de 96% o una identidad de 97% o una identidad de 98% o una identidad de 99%.

Los anticuerpos monoclonales de la presente invención pueden, por ejemplo ser producidos por el procedimiento del hibridoma descrito primero por Kohler et al., Nature 256, 495 (1975), o pueden ser producidos por métodos de ADN recombinante. Los anticuerpos monoclonales también se pueden aislar de bibliotecas de anticuerpos en fagos utilizando las técnicas descritas en, por ejemplo, por Clackson et al., Nature 352, 624-628 (1991) y Marks et al., J. Mol. Biol. 222, 581-597 (1991). Los anticuerpos monoclonales se pueden obtener de cualquier fuente adecuada. Así, por ejemplo, los anticuerpos monoclonales se pueden obtener a partir de hibridomas preparados a partir de células B esplénicas murinas obtenidas de ratones inmunizados con un antígeno de interés, por ejemplo en forma de células que expresan el antígeno en la superficie, o un ácido nucleico que codifica un antígeno de interés. Los anticuerpos monoclonales también se pueden obtener a partir de hibridomas derivados de células que expresan anticuerpos de seres humanos o mamíferos no humanos inmunizados, tales como ratas, conejos, perros, primates, etc.

En una realización, el anticuerpo de la invención es un anticuerpo humano. Los anticuerpos monoclonales humanos dirigidos contra el factor tisular pueden generarse utilizando ratones transgénicos o transcromosómicos que llevan partes del sistema inmunitario humano en lugar del sistema de ratón. Tales ratones transgénicos y ratones transcromosómicos incluyen los ratones referidos en la presente memoria como ratones HuMAb y ratones KM, respectivamente, y se denominan colectivamente en la presente memoria "ratones transgénicos".

El ratón HuMAb contiene miniloci de un gen de inmunoglobulina humana que codifica secuencias de inmunoglobulina de cadena variable y constante pesada humana ( $\mu$  y  $\gamma$ ) y variable y constante ligera ( $\kappa$ ) no reordenadas, junto con mutaciones dirigidas que inactivan los loci de la cadena  $\mu$  y  $\kappa$  endógenos (Lonberg, N. et al., Nature 368, 856-859 (1994)). En consecuencia, los ratones muestran una reducción de la expresión de IgM o  $\kappa$  de ratón y en respuesta a la inmunización, los transgenes de cadena pesada y ligera humanos introducidos, se someten a cambio de clase y mutación somática para generar anticuerpos monoclonales IgG, $\kappa$  humanos de alta afinidad (Lonberg, N. et al. (1994), supra; revisado en Lonberg, N. Handbook of Experimental Pharmacology 113, 49-101 (1994), Lonberg, N. y Huszar, D., Intern. Rev. Immunol. Vol. 1365-93 (1995) y Harding, F. y Lonberg, N. Ann. N.Y. Acad. Sci 764 536-546 (1995)). La preparación de ratones HuMAb se describe con detalle en Taylor, L. et al., Nucleic Acids Research 20, 6287-6295 (1992), Chen, J. et al., International Immunology 5, 647-656 (1993), Tuaille et al., J. Immunol. 152, 2912-2920 (1994), Taylor, L. et al., International Immunology 6, 579-591 (1994), Fishwild, D. et al., Nature Biotechnology 14, 845-851 (1996). Véanse también los documentos US 5.545.806, US 5.569.825, US 5.625.126, US 5.633.425, US 5.789.650, US 5.877.397, US 5.661.016, US 5.814.318, US 5.874.299, US 5.770.429, US 5.545.807, WO 98/24884, WO 94/25585, WO 93/1227, WO 92/22645, WO 92/03918 y WO 01/09187.

Los ratones HCo7 presentan una interrupción JKD en sus genes de cadena ligera endógenos ( $\kappa$ ) (como describen Chen et al., EMBO J. 12, 821-830 (1993)), una interrupción CMD en sus genes de la cadena pesada endógenos (como se describe en el Ejemplo 1 del documento WO 01/14424), un transgén de cadena ligera  $\kappa$  humana KCo5 (como describen Fishwild et al., Nature Biotechnology 14, 845-851 (1996)), y un transgén de cadena pesada humana HCo7 (como se describe en el documento US 5.770.429).

Los ratones HCo12 tienen una interrupción JKD en sus genes de la cadena ligera endógenos ( $\kappa$ ) (como describen Chen et al., EMBO J. 12, 821-830 (1993)), una interrupción CMD en sus genes de la cadena pesada endógenos (como se describe en el Ejemplo 1 del documento WO 01/14424), un transgén de la cadena ligera  $\kappa$  humana KCo5 (como describen Fishwild et al., Nature Biotechnology 14, 845-851 (1996)), y un transgén de la cadena pesada humana HCo12 (como se describe en el Ejemplo 2 del documento WO 01/14424).

En la cepa de ratón KM, el gen de la cadena ligera  $\kappa$  de ratón endógeno ha sido interrumpido de manera homocigótica como describen Chen et al., EMBO J. 12, 811-820 (1993) y el gen de la cadena pesada de ratón

endógeno se ha interrumpido de manera homocigótica como se describe en el Ejemplo 1 del documento WO 01/09187. Esta cepa de ratón lleva un transgén de la cadena ligera kappa humana, KCo5, como describen Fishwild et al., Nature Biotechnology 14, 845-851 (1996). Esta cepa de ratón también lleva un transcromosoma de la cadena pesada humana compuesto por el fragmento hCF del cromosoma 14 (SC20) como se describe en el documento WO 02/43478.

Los esplenocitos de estos ratones transgénicos se pueden utilizar para generar hibridomas que secretan anticuerpos monoclonales humanos de acuerdo con técnicas bien conocidas. Los anticuerpos monoclonales o policlonales humanos de la presente invención, o los anticuerpos de la presente invención procedentes de otras especies también pueden ser generados transgénicamente mediante la generación de otro mamífero no humano o planta que sean transgénicos para las secuencias de las cadenas de inmunoglobulina pesada y ligera de interés y la producción del anticuerpo en una forma recuperable. En relación con la producción transgénica en mamíferos, los anticuerpos pueden ser producidos en, y recuperados de, la leche de cabras, vacas, u otros mamíferos. Véanse, por ejemplo, los documentos US 5.827.690, US 5.756.687, US 5.750.172 y US 5.741.957.

Además, los anticuerpos humanos de la presente invención o los anticuerpos de la presente invención de otras especies se pueden generar a través de tecnologías de tipo de presentación, incluyendo, sin limitación, la presentación en fagos, la presentación retroviral, la presentación ribosomal, y otros mecanismos, utilizando mecanismos bien conocidos en la técnica y las moléculas resultantes se pueden someter a maduración adicional, tal como maduración de afinidad, ya que tales mecanismos son bien conocidos en la técnica (véase, por ejemplo, Hoogenboom et al., J. Mol. Biol. 227, 381 (1991) (presentación en fagos), Vaughan et al., Nature Biotech 14, 309 (1996) (presentación en fagos), Hanes y Plutchau, PNAS EE.UU. 94, desde 4.937 hasta 4.942 (1.997) (Visualización ribosomal), Parmley y Smith, Gene 73, 305-318 (1988) (presentación en fagos), Scott TIBS 17, 241-245 (1992), Cwirla et al., PNAS USA 87, 6378-6382 (1990), Russel et al., Nucl. Acids Research 21, 1081-1085 (1993), Hogenboom et al., Immunol. Reviews 130, 43-68 (1992), Chiswell y McCafferty TIBTECH 10, 80-84 (1992), Y documento 5.733.743). Si se utilizan las tecnologías de presentación para producir anticuerpos que no son humanos, tales anticuerpos pueden ser humanizados.

El anticuerpo de la invención puede ser de cualquier isotipo. La elección del isotipo normalmente estará orientada por las funciones efectoras deseadas, tales como la inducción de ADCC. Los isotipos ilustrativos son IgG1, IgG2, IgG3, y IgG4. Se pueden utilizar regiones constantes de la cadena ligera, kappa o lambda. Si se desea, la clase de anticuerpo anti-TF de la presente invención puede ser cambiada mediante métodos conocidos. Por ejemplo, un anticuerpo de la presente invención que era originalmente IgM se puede cambiar de clase a un anticuerpo IgG de la presente invención. Además, se pueden utilizar las técnicas de cambio de clase para convertir una subclase IgG en otra, por ejemplo de IgG1 a IgG2. Así, la función efectora de los anticuerpos de la presente invención puede ser cambiada por medio de cambio de isotipo, por ejemplo, a un anticuerpo IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgD, IgA, IgE, o IgM para diversos usos terapéuticos. En una realización un anticuerpo de la presente invención es un anticuerpo IgG1, por ejemplo, una IgG1,k.

En una realización, el anticuerpo de la invención es un anticuerpo completo, preferiblemente un anticuerpo IgG1, en particular, un anticuerpo IgG1,k. En otra realización, el anticuerpo de la invención es un fragmento de anticuerpo o un anticuerpo de cadena sencilla.

Los fragmentos de anticuerpos pueden ser obtenidos, p. ej., por fragmentación utilizando técnicas convencionales, y los fragmentos pueden ser escrutados para determinar su utilidad de la misma manera que se describe en la presente memoria para los anticuerpos completos. Por ejemplo, se pueden generar fragmentos  $F(ab')_2$  tratando el anticuerpo con pepsina. El fragmento  $F(ab')_2$  resultante puede ser tratado para reducir los puentes disulfuro para producir fragmentos Fab'. Los fragmentos Fab se pueden obtener mediante el tratamiento de un anticuerpo IgG con papaína; los fragmentos Fab' se pueden obtener con la digestión con pepsina de un anticuerpo IgG. También se puede producir un fragmento  $F(ab')$  mediante la unión de Fab' como se describe a continuación a través de un enlace tioéter o un enlace disulfuro. Un fragmento Fab' es un fragmento de anticuerpo obtenido cortando un enlace disulfuro de la región bisagra del  $F(ab')_2$ . Se puede obtener un fragmento Fab' por tratamiento de un fragmento  $F(ab')_2$  con un agente reductor, tal como ditiotreitól. También se puede generar un fragmento de anticuerpo por la expresión de ácidos nucleicos que codifican tales fragmentos en células recombinantes (véase, por ejemplo Evans et al., J. Immunol. Meth. 184,123-38 (1995)). Por ejemplo, un gen quimérico que codifica una porción de un fragmento  $F(ab')_2$  podría incluir secuencias de ADN que codificaran el dominio  $C_H1$  y la región bisagra de la cadena H, seguido de un codón de parada de la traducción para producir semejante molécula de fragmento de anticuerpo truncada.

En una realización, el anticuerpo anti-TF es un anticuerpo monovalente, preferiblemente un anticuerpo monovalente como se describe en el documento WO2007059782 (Genmab) que tiene una delección de la región bisagra. Por consiguiente, en una realización, el anticuerpo es un anticuerpo monovalente, en donde dicho anticuerpo anti-TF se construye mediante un método que comprende:

- i) proporcionar un constructo de ácido nucleico que codifica la cadena ligera de dicho anticuerpo monovalente,

comprendiendo dicho constructo una secuencia de nucleótidos que codifica la región VL de un anticuerpo anti-TF específico del antígeno seleccionado y una secuencia de nucleótidos que codifica la región CL constante de una Ig, en donde dicha secuencia de nucleótidos que codifica la región VL de un anticuerpo específico del antígeno seleccionado y dicha secuencia de nucleótidos que codifica la región CL de una Ig están unidos operablemente entre sí, y en donde, en caso de un subtipo IgG1, la secuencia de nucleótidos que codifica la región CL se ha modificado de tal manera que la región CL no contiene aminoácidos capaces de formar enlaces disulfuro o enlaces covalentes con otros péptidos que comprenden una secuencia de aminoácidos idéntica de la región CL en presencia de IgG humana policlonal o cuando se administra a un animal o ser humano;

ii) proporcionar un constructo de ácido nucleico que codifica la cadena pesada de dicho anticuerpo monovalente, comprendiendo dicho constructo una secuencia de nucleótidos que codifica la región VH de un anticuerpo específico del antígeno seleccionado y una secuencia de nucleótidos que codifica una región constante CH de una Ig humana, en donde la secuencia de nucleótidos que codifica la región CH se ha modificado de tal manera que la región correspondiente a la región bisagra y, según se requiera por el subtipo de Ig, otras regiones de la región CH, tales como la región CH3, no comprende ningún residuo de aminoácido que participe en la formación de enlaces disulfuro o enlaces covalentes o enlaces entre cadenas pesadas no covalentes estables con otros péptidos que comprenden una secuencia de aminoácidos idéntica de la región CH de la Ig humana en presencia de IgG humana policlonal o cuando se administra a un animal o ser humano, en donde dicha secuencia de nucleótidos que codifica la región VH de un anticuerpo específico del antígeno seleccionado y dicha secuencia de nucleótidos que codifica la región CH de dicha Ig están unidos operablemente entre sí;

iii) proporcionar un sistema de expresión celular para la producción de dicho anticuerpo monovalente;

iv) producir dicho anticuerpo monovalente mediante la expresión simultánea de los constructos de ácido nucleico de (i) y (ii) en las células del sistema de expresión celular de (iii).

Del mismo modo, en una realización, el anticuerpo anti-TF es un anticuerpo monovalente, que comprende

(i) una región variable de un anticuerpo de la invención como se describe en la presente memoria o una porción de unión al antígeno de dicha región, y

(ii) una región C<sub>H</sub> de una inmunoglobulina o un fragmento de la misma que comprende las regiones C<sub>H2</sub> y C<sub>H3</sub>, en donde la región C<sub>H</sub> o el fragmento de la misma se han modificado de tal manera que la región correspondiente a la región bisagra y, si la inmunoglobulina no es un subtipo IgG4, otras regiones de la región C<sub>H</sub>, tal como la región C<sub>H3</sub>, no comprende ningún residuo de aminoácido, que son capaces de formar enlaces disulfuro con una región C<sub>H</sub> idéntica u otros enlaces entre cadenas pesadas covalentes o no covalentes estables con una región idéntica C<sub>H</sub> en presencia de una IgG humana policlonal.

En una realización adicional, la cadena pesada del anticuerpo monovalente anti-TF se ha modificado de tal manera que toda la bisagra ha sido eliminada.

En una realización adicional, dicho anticuerpo monovalente es del subtipo IgG4 (véase el SEQ ID NO: 114, una variante sin bisagra del SEQ ID NO: 113), pero la región C<sub>H3</sub> ha sido modificada de modo que se han realizado una o más de las siguientes sustituciones de aminoácidos: la Thr (T) en la posición 234 ha sido reemplazada por Ala (A); la Leu (L) en la posición 236 ha sido reemplazada por Ala (A); la Leu (L) en la posición 236 ha sido reemplazada por Val (V); la Phe (F) en la posición 273 ha sido reemplazada por Ala (A); la Phe (F) en la posición 273 ha sido reemplazada por Leu (L); la Tyr (Y) en la posición 275 ha sido reemplazada por Ala (A).

En otra realización adicional, la secuencia de dicho anticuerpo monovalente ha sido modificada para que no comprenda sitios aceptores para la glicosilación ligada a N.

Los anticuerpos anti-TF de la invención también incluyen anticuerpos de cadena sencilla. Los anticuerpos de cadena sencilla son péptidos en los que se conectan las regiones Fv de cadena pesada y ligera. En una realización, la presente invención proporciona un Fv de cadena sencilla (scFv) en donde las cadenas pesadas y ligeras en Fv de un anticuerpo anti-TF de la presente invención se unen con un conector peptídico flexible (típicamente de aproximadamente 10, 12, 15 o más residuos de aminoácidos) en una sola cadena peptídica. Los métodos para producir tales anticuerpos se describen, por ejemplo, en los documentos US 4.946.778, Pluckthun en *The Pharmacology of Monoclonal Antibodies*, vol. 113, Rosenberg y Moore eds. Springer-Verlag, Nueva York, págs. 269-315 (1994), Bird et al., *Science* 242, 423-426 (1988), Huston et al., *PNAS USA* 85, 5879-5883 (1988) y McCafferty et al., *Nature* 348, 552-554 (1990). El anticuerpo de cadena sencilla puede ser monovalente, si sólo se utiliza una única V<sub>H</sub> y V<sub>L</sub>, bivalente, si se utilizan dos V<sub>H</sub> y V<sub>L</sub>, o polivalente, si se utilizan más de dos V<sub>H</sub> y V<sub>L</sub>.

En una realización, el anticuerpo anti-TF de la invención es un anticuerpo de función efectora deficiente. Tales anticuerpos son particularmente útiles cuando el anticuerpo se utiliza en la estimulación del sistema inmunitario a través del bloqueo de los efectos inhibidores de TF. Para tales aplicaciones, puede ser ventajoso que el anticuerpo no tenga funciones efectoras, tales como ADCC, ya que pueden conducir a una citotoxicidad no deseada.

En una realización, el anticuerpo anti-TF de función efectora deficiente es un anticuerpo IgG4 estabilizado. Los

ejemplos de los anticuerpos IgG4 estabilizados adecuados son anticuerpos, en donde la que arginina en la posición 409 en una región constante de cadena pesada de IgG4 humana, que se indica en el índice de EU como en Kabat et al., se sustituye por lisina, treonina, metionina o leucina, preferiblemente lisina (descrito en el documento WO2006033386 (Kirin)) y/o en donde la región bisagra comprende una secuencia Cys-Pro-Pro-Cys.

En una realización adicional, el anticuerpo IgG4 anti-TF estabilizado es un anticuerpo IgG4 que comprende una cadena pesada y una cadena ligera, en donde dicha cadena pesada comprende una región constante de IgG4 humano que tiene un residuo seleccionado del grupo que consiste en: Lys, Ala, Thr, Met y Leu en la posición correspondiente a 409 y/o un residuo seleccionado del grupo que consiste en: Ala, Val, Gly, Ile y Leu en la posición correspondiente a 405, y en donde dicho anticuerpo comprende opcionalmente uno o más sustituciones, deleciones y/o inserciones adicionales, pero no comprende una secuencia Cys-Pro-Pro-Cys en la región bisagra. Preferiblemente, dicho anticuerpo comprende un residuo Lys o Ala en la posición correspondiente a 409 o la región CH3 del anticuerpo se ha reemplazado por la región CH3 de la IgG1 humana, de la IgG2 humana o de la IgG3 humana.

En una realización adicional más, el anticuerpo anti-TF IgG4 estabilizado es un anticuerpo IgG4 que comprende una cadena pesada y una cadena ligera, en donde dicha cadena pesada comprende una región constante de IgG4 humana que tiene un residuo seleccionado del grupo que consiste en: Lys, Ala, Thr, Met y Leu en la posición correspondiente a 409 y/o un residuo seleccionado del grupo que consiste en: Ala, Val, Gly, Ile y Leu en la posición correspondiente a 405, y en donde dicho anticuerpo comprende opcionalmente una o más sustituciones, deleciones y/o inserciones adicionales y en donde dicho anticuerpo comprende una secuencia Cys-Pro-Pro-Cys en la región bisagra. Preferiblemente, dicho anticuerpo comprende un residuo Lys o Ala en la posición correspondiente a 409 o la región CH3 del anticuerpo se ha reemplazado por la región CH3 de la IgG1 humana, de la IgG2 humana o de la IgG3 humana.

En una realización adicional, el anticuerpo anti-TF con función efectora deficiente es un anticuerpo de un tipo distinto de IgG4, p. ej., IgG1, IgG2 o IgG3 que se ha mutado de tal manera que la capacidad de mediar funciones efectoras, tales como la ADCC, se ha reducido o incluso eliminado. Tales mutaciones, p. ej., han sido descritas por Dall'Acqua WF et al., *J Immunol.* 177(2): 1129-1138 (2006) y Hezareh M, *J Virol.*; 75 (24): 12161-12168 (2001).

En una realización adicional, el anticuerpo de la invención se conjuga con otro radical, tal como un radical citotóxico, un radioisótopo o un fármaco. Tales anticuerpos pueden ser producidos por medio de conjugación química del otro radical al lado N-terminal o al lado C-terminal del anticuerpo anti-TF o fragmento del mismo (p. ej., una cadena H de anticuerpo anti-TF, una cadena L, o un fragmento específico/selectivo anti-TF del mismo) (véase, p. ej., *Antibody Engineering Handbook*, editado por Osamu Kanemitsu, publicado por Chijin Shokan (1994)). Tales derivados de anticuerpos conjugados también se pueden generar mediante conjugación en los residuos internos o azúcares, cuando sea apropiado.

En general, los anticuerpos anti-TF descritos en la presente memoria pueden ser modificados mediante la inclusión de cualquier número adecuado de tales aminoácidos modificados y/o asociaciones con tales sustituyentes conjugados. La idoneidad en este contexto se determina generalmente por la capacidad para conservar al menos sustancialmente la selectividad y/o la especificidad para TF asociadas con el anticuerpo parental anti-TF no derivatizado. La inclusión de uno o más aminoácidos modificados puede ser ventajosa, por ejemplo, para el aumento de la semivida en suero del polipéptido, la reducción de la antigenicidad del polipéptido, o el aumento de la estabilidad de almacenamiento del polipéptido. Los aminoácidos son modificados, por ejemplo, co-traduccionalmente o post-traduccionalmente durante la producción recombinante (p. ej., glicosilación ligada a N en los motivos N-X-S/T durante la expresión en células de mamífero) o modificados por medios sintéticos. Los ejemplos no limitantes de un aminoácido modificado incluyen un aminoácido glicosilado, un aminoácido sulfatado, un aminoácido prenilado (p. ej., farnesilado, geranylgeranilado), un aminoácido acetilado, un aminoácido acilado, un aminoácido PEGilado, un aminoácido biotinilado, un aminoácido carboxilado y un aminoácido fosforilado. La bibliografía está repleta de referencias adecuadas para orientar a un experto en la modificación de los aminoácidos. Se encuentran protocolos ilustrativos en Walker (1998) *Protein Protocols On Cd-Rom*, Humana Press, Towata, NJ. El aminoácido modificado puede ser seleccionado por ejemplo entre un aminoácido glicosilado, un aminoácido PEGilado, un aminoácido farnesilado, un aminoácido acetilado, un aminoácido biotinilado, un aminoácido conjugado con un radical lipídico, o un aminoácido conjugado con un agente derivatizante orgánico.

Los anticuerpos anti-TF también se pueden modificar químicamente por conjugación covalente con un polímero para aumentar, por ejemplo, su semivida en circulación. Los polímeros ilustrativos, y los métodos para el anclaje a péptidos, se ilustran, por ejemplo, en los documentos US 4.766.106, US 4.179.337, US 4.495.285 y US 4.609.546. Otros polímeros ilustrativos adicionales incluyen polioles polioxiethylados y polietilenglicol (PEG) (p. ej., un PEG con un peso molecular de entre aproximadamente 1.000 y aproximadamente 40.000, tal como entre aproximadamente 2.000 y aproximadamente 20.000, por ejemplo, aproximadamente 3.000-12.000 g/mol).

En una realización, la presente invención proporciona un anticuerpo anti-TF que está conjugado con una segunda

molécula que se selecciona entre un radionúclido, un sustrato de enzima, un cofactor, un marcador fluorescente, un marcador quimioluminiscente, una etiqueta peptídica, o una partícula magnética. En una realización, se puede conjugar un anticuerpo anti-TF con uno o más fragmentos de anticuerpo, ácidos nucleicos (oligonucleótidos), nucleasas, hormonas, inmunomoduladores, quelantes, compuestos de boro, agentes fotoactivos y colorantes. Estos y otros agentes adecuados se pueden acoplar ya sea directamente ya sea indirectamente a un anticuerpo anti-TF de la presente invención. Un ejemplo de acoplamiento indirecto de un segundo agente es el acoplamiento por un radical espaciador. Estos espaciadores, a su vez, pueden ser insolubles o solubles (véase, por ejemplo, Diener et al., Science 231, 148 (1986)) y se pueden seleccionar para permitir la liberación del fármaco del anticuerpo anti-TF en un sitio diana y/o bajo condiciones particulares. Los ejemplos adicionales de agentes que pueden ser acoplados a un anticuerpo anti-TF incluyen lectinas y péptidos fluorescentes.

En una realización, se proporcionan anticuerpos anti-TF que comprenden uno o más aminoácidos radiomarcados. Un anticuerpo anti-TF radiomarcado puede ser utilizado tanto para fines de diagnóstico como terapéuticos (la conjugación con moléculas radiomarcadas es otra característica posible). Los ejemplos no limitantes de marcas para polipéptidos incluyen, pero no se limitan a <sup>3</sup>H, <sup>14</sup>C, <sup>15</sup>N, <sup>35</sup>S, <sup>90</sup>Y, <sup>99</sup>Tc, y <sup>125</sup>I, <sup>131</sup>I, y <sup>186</sup>Re. Los métodos para preparar los aminoácidos radiomarcados y derivados de péptidos relacionados son conocidos en la técnica (véanse, por ejemplo, Junghans et al., en Cancer Chemotherapy and Biotherapy 655-686 (2ª edición, Chafner y Longo, eds., Lippincott Raven (1996)) y los documentos US 4.681.581, US 4.735.210, US 5.101.827, US 5.102.990 (US RE35,500), US 5.648.471 y US 5.697.902. Por ejemplo, un radioisótopo puede ser conjugado mediante el método de la cloramina T.

En una realización, un anticuerpo anti-TF de la invención comprende un ácido nucleico conjugado o una molécula asociada a un ácido nucleico. En una de tales facetas de la presente invención, el ácido nucleico conjugado es una ribonucleasa citotóxica. En una realización, el ácido nucleico conjugado es un ácido nucleico antisentido (por ejemplo, una molécula antisentido dirigida a S100A10, que también puede ser un componente independiente en una composición combinada o un método de administración combinado de la presente invención - véase, por ejemplo Zhang et al., J Biol Chem. 279(3), 2053-62 (2004)). En una realización, el ácido nucleico conjugado es una molécula de ARN inhibidora (p. ej., una molécula de ARNip). En una realización, el ácido nucleico conjugado es un ácido nucleico inmunostimulador (p. ej., una molécula de ADN que contiene un motivo CpG inmunostimulador). En una realización, el ácido nucleico conjugado es un casete de expresión que codifica la expresión de un gen supresor de tumor, una vacuna contra el cáncer, una citoquina anti-cancerosa, o un agente apoptótico. Tales derivados pueden comprender también la conjugación de un ácido nucleico que codifica la expresión de una o más proteínas citotóxicas, tales como toxinas vegetales y bacterianas.

En una realización, un anticuerpo anti-TF se conjuga con una molécula de ácido nucleico funcional. Los ácidos nucleicos funcionales incluyen moléculas antisentido, moléculas de ácido nucleico de interferencia (p. ej., moléculas de ARNip), aptámeros, ribozimas, moléculas que forman tríplex, y secuencias guía externas. Las moléculas de ácido nucleico funcionales pueden actuar como efectores, inhibidores, moduladores, y estimuladores de una actividad específica poseída por una molécula diana, o las moléculas de ácido nucleico funcionales pueden poseer una actividad de novo independiente de cualquier otra molécula.

En otra realización, un anticuerpo anti-TF de la invención se conjuga con un aptámero.

En otra realización, la presente invención proporciona un anticuerpo anti-TF que se conjuga con una ribozima.

Se puede emplear cualquier método conocido en la técnica para conjugar el anticuerpo anti-TF a la molécula o las moléculas conjugadas, tales como los descritos anteriormente, incluyendo aquellos métodos descritos por Hunter et al., Nature 144, 945 (1962), David et al., Biochemistry 13, 1014 (1974), Pain et al., J. Immunol. Meth. 40, 219 (1981) y Nygren, J. Histochem. and Cytochem. 30, 407 (1982). Se pueden unir numerosos tipos de compuestos citotóxicos a las proteínas mediante el uso de un grupo reactivo en el compuesto citotóxico o mediante el uso de un agente de entrecruzamiento. Un grupo reactivo común que formará un enlace covalente estable *in vivo* con una amina es el isotiocianato (Means et al., Chemical modifications of proteins (Holden-Day, San Francisco 1971) págs. 105-110). Este grupo reacciona preferiblemente con el grupo ε-amino de la lisina. La maleimida es un grupo reactivo utilizado comúnmente para formar un enlace covalente estable *in vivo* con el grupo sulfhidrilo de la cisteína (Ji., Methods Enzymol 91, 580-609 (1983)). Los anticuerpos monoclonales normalmente no son capaces de formar enlaces covalentes con los iones de metales radiactivos, pero se pueden anclar al anticuerpo indirectamente a través del uso de agentes quelantes que están unidos covalentemente a los anticuerpos. Los agentes quelantes pueden estar unidos a través de aminas (Meares et al., Anal. Biochem. 142, 68-78 (1984)) y grupos sulfhidral (Koyama, Chem. Abstr. 120, 217262t (1994)) de residuos de aminoácidos y también a través de los grupos carbohidrato (Rodwell et al., PNAS USA 83, 2632-2636 (1986), Quadri et al., Nucl. Med. Biol. 20, 559-570 (1993)). Dado que estos agentes quelantes contienen dos tipos de grupos funcionales, uno para unirse a iones metálicos y el otro para unir el quelato al anticuerpo, son referidos comúnmente como agentes quelantes bifuncionales (Sundberg et al., Nature 250, 587-588 (1974)).



En una realización, la presente invención proporciona un anticuerpo anti-TF, tal como un anticuerpo anti-TF humano, conjugado con un radical terapéutico, tal como una citotoxina, un fármaco quimioterapéutico, un inmunosupresor, o un radioisótopo. Tales productos conjugados se denominan en la presente memoria "productos inmunoconjugados". Los productos inmunoconjugados que incluyen una o más citotoxinas se conocen como "inmunotoxinas".

Una citotoxina o agente citotóxico incluye cualquier agente que sea perjudicial (p. ej., destruye) para las células. Para una descripción de estas clases de fármacos que son bien conocidos en la técnica, y sus mecanismos de acción, véase Goodman et al., Goodman y Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics, 8ª Ed., Macmillan Publishing Co., 1990. Otras técnicas relevantes para la preparación de inmunotoxinas de anticuerpos son proporcionadas, por ejemplo, por Vitetta, Immunol. Today 14, 252 (1993) y en el documento US 5.194.594.

Los agentes terapéuticos adecuados para la formación de productos inmunoconjugados de la presente invención incluyen taxol, citocalasina B, gramicidina D, bromuro de etidio, emetina, mitomicina, etopósido, tenopósido, vincristina, vinblastina, colchicina, doxorubicina, daunorrubicina, dihidroxiantracina, mitoxantrona, mitramicina, actinomicina D, 1-deshidro-testosterona, glucocorticoides, procaína, tetracaína, lidocaína, propranolol, y puromicina, antimetabolitos (tales como metotrexato, 6-mercaptopurina, 6-tioguanina, citarabina, fludarabina, 5-fluorouracilo, descarbazina, hidroxiaurea, asparaginasa, gemcitabina, cladribina), agentes alquilantes (tales como mecloretamina, tioepa, clorambucilo, melfalán, carmustina (BSNU), lomustina (CCNU), ciclofosfamida, busulfán, dibromomanitol, estreptozotocina, dacarbazina (DTIC), procarbazona, mitomicina C, cisplatino y otros derivados de platino, tales como carboplatino), antibióticos (tales como dactinomicina (anteriormente actinomicina), bleomicina, daunorrubicina (anteriormente daunomicina), doxorubicina, idarrubicina, mitramicina, mitomicina, mitoxantrona, plicamicina, antramycin (AMC)), toxina de la difteria y moléculas relacionadas (tales como la cadena A de la difteria y activos fragmentos de la misma y las moléculas híbridas), la toxina ricina (tal como ricina A o una toxina de cadena A de ricina desglucosilada), toxina del cólera, una toxina similar a Shiga (SLT-I, SLT-II, SLT-III), toxina LT, toxina C3, toxina Shiga, toxina de pertussis, toxina del tétanos, inhibidor de la proteasa Bowman-Birk de la soja, exotoxina de Pseudomonas, alorin, saporina, modicina, gelanina, cadena A de abrina, cadena A de modeccina, alfa-sarcina, proteínas de Aleurites fordii, proteínas de diantina, proteínas de Phytolacca americana (PAPI, PAPII, y PAP-S), inhibidor de Momordica charantia, curcina, crotina, inhibidor de Saponaria officinalis, gelonina, mitogelina, restrictocina, fenomicina y toxinas de enomicina. Otras moléculas conjugadas adecuadas incluyen ribonucleasa (ARNasa), ADNasa I, enterotoxina A estafilocócica, proteína antiviral de hierba carmín, toxina difterina, y endotoxina de Pseudomonas. Véanse, por ejemplo, Pastan et al., Cell 47, 641 (1986) y Goldenberg, Calif. A Cancer Journal for Clinicians 44, 43 (1994). Los agentes terapéuticos, que se pueden administrar combinados con un anticuerpo anti-TF de la presente invención como se describe en la presente memoria en otra parte, también pueden ser candidatos para radicales terapéuticos útiles para la conjugación a un anticuerpo anti-TF de la presente invención.

En una realización, el anticuerpo anti-TF de la presente invención está unido a un conector quelante, p. ej., tiuxetano, lo que permite que el anticuerpo se conjugue con un radioisótopo.

En un aspecto adicional, la invención se refiere a una molécula biespecífica que comprende un anticuerpo anti-TF de la invención como se describe anteriormente en la presente memoria y una segunda especificidad de unión tal como una especificidad de unión para una célula efectora humana, un receptor de Fc humano o un receptor de células T. O una especificidad de unión para otro epítipo de TF.

Las moléculas biespecíficas de la presente invención pueden incluir además una tercera especificidad de unión, además de una especificidad de unión anti-TF y una especificidad de unión para una célula efectora humana, un receptor de Fc humano o un receptor de células T.

Las moléculas de anticuerpos biespecíficos ilustrativos de la invención comprenden (i) dos anticuerpos uno con una especificidad para TF y otro para una segunda diana que se conjugan entre sí, (ii) un único anticuerpo que tiene una cadena específica para TF y una segunda cadena específica para una segunda molécula, y (iii) un anticuerpo de cadena sencilla que tiene especificidad para TF y una segunda molécula. Normalmente, la segunda diana/segunda molécula es una molécula distinta de TF. En una realización, la segunda molécula es un antígeno de cáncer/antígeno asociado a un tumor, tales como el antígeno carcinoembrionario (CEA), antígeno específico de próstata (PSA), RAGE (antígeno renal),  $\alpha$ -fetoproteína, CAMEL (antígeno reconocido por CTL de melanoma), antígenos CT (tales como MAGE-B5, -B6, -C2, -C3 y D; Mage-12; CT10; NY-ESO-1, SSSX-2, GAGE, BAGE, MAGE, y SAGE), antígenos de mucina (p. ej., MUC1, mucina-CA125, etc.), antígenos gangliósidos, tirosinasa, gp75, C-myc, Mart1, MelanA, MUM-1, MUM-2, MUM-3, HLA-B7, y Ep-CAM. En una realización, la segunda molécula es una integrina asociada a un tumor, tal como la integrina  $\alpha 5 \beta 3$ . En una realización, la segunda molécula es un factor angiogénico o otro factor de crecimiento asociado al cáncer, tal como un factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), un factor de crecimiento de fibroblastos (FGF), factor de crecimiento epidérmico (EGF), receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR), angiogenina, y los receptores de los mismos, particularmente los receptores asociados con la progresión del cáncer (por ejemplo, uno de los receptores de HER1-HER4, c-met o RON). Otras proteínas asociadas a la progresión del cáncer comentadas en la presente memoria también pueden ser segundas moléculas adecuadas.

5 En una realización, el anticuerpo biespecífico de la presente invención es un diacuerpo. Los anticuerpos biespecíficos también incluyen anticuerpos entrecruzados o "heteroconjugados". Por ejemplo, uno de los anticuerpos de un producto heteroconjugado puede estar acoplado a avidina y el otro a biotina. Tales anticuerpos, por ejemplo, han sido propuestos para dirigirse a las células diana del sistema inmunitario no deseadas (véase, por ejemplo el documento US 4.676.980). Los anticuerpos heteroconjugados se pueden elaborar utilizando cualquier método de entrecruzamiento conveniente.

En un aspecto adicional, la invención se refiere a un vector de expresión que codifica un anticuerpo de la invención.

10 En una realización, el vector de expresión de la invención comprende una secuencia de nucleótidos que codifica una o más de las secuencias de aminoácidos seleccionadas del grupo que consiste en: los SEQ ID NO: 1 a 112.

15 En otra realización concreta, el vector de expresión de la invención comprende una secuencia de nucleótidos que codifica una o más de las secuencias de aminoácidos de VH seleccionadas del grupo que consiste en: los SEQ ID NO: 9, 1, 5, 13, 17, 21, 25, 29, 33, 37, 41, 45, 49 y 53.

20 En una realización concreta, el vector de expresión de la invención comprende una secuencia de nucleótidos que codifica una o más de las secuencias de aminoácidos CDR3 de VH seleccionadas del grupo que consiste en: los SEQ ID NO 4, 8, 12, 16, 20, 24, 28, 32, 36, 40, 44, 48, 52 y 56.

En otra realización particular, el vector de expresión de la invención comprende una secuencia de nucleótidos que codifica una o más de las secuencias de aminoácidos de VL seleccionadas del grupo que consiste en: los SEQ ID NO: 65, 57, 61, 69, 73, 77, 81, 85, 89, 93, 97, 101 y 105.

25 En otra realización, el vector de expresión de la invención comprende una secuencia de nucleótidos que codifica una o más de las secuencias de aminoácidos de CDR3 de VL seleccionadas del grupo que consiste en: los SEQ ID NO: 60, 64, 68, 72, 76, 80, 84, 88, 92, 96, 100, 104 y 108.

30 En una realización concreta, el vector de expresión de la invención, comprende una secuencia de nucleótidos que codifica variantes de una o más de las secuencias de aminoácidos anteriores, teniendo dichas variantes a lo sumo 25 modificaciones de aminoácidos, tal como 20, tal como a lo sumo 15, 14, 13, 12 u 11 modificaciones de aminoácidos, tal como 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 ó 1 modificaciones de aminoácidos, tales como deleciones o inserciones, preferiblemente sustituciones, tales como sustituciones conservativas o una identidad de al menos 80% con cualquiera de dichas secuencias, tal como una identidad de al menos 85% o una identidad de 90% o una identidad de 95%, tal como una identidad de 96% o una identidad de 97% o una identidad de 98% o una identidad de 99% con cualquiera de las secuencias de aminoácidos mencionadas anteriormente.

35 En una realización adicional, el vector de expresión comprende adicionalmente una secuencia de nucleótidos que codifica la región constante de una cadena ligera, una cadena pesada o ambas cadenas ligera y pesada de un anticuerpo, p. ej., un anticuerpo humano.

40 Tales vectores de expresión se pueden utilizar para la producción recombinante de anticuerpos de la invención.

45 Un vector de expresión en el contexto de la presente invención puede ser cualquier vector adecuado, incluyendo vectores cromosómicos, no cromosómicos, y de ácidos nucleicos sintéticos (una secuencia de ácido nucleico que comprende un conjunto adecuado de elementos de control de la expresión). Los ejemplos de tales vectores incluyen derivados de SV40, plásmidos bacterianos, ADN de fagos, baculovirus, plásmidos de levadura, vectores derivados de combinaciones de plásmidos y ADN de fagos, y vectores de ácido nucleico viral (ARN o ADN). En una realización, un ácido nucleico que codifica un anticuerpo anti-TF está incluido en un vector de ADN o ARN desnudo, incluyendo, por ejemplo, un elemento de expresión lineal (como describen, por ejemplo, Sykes y Johnston, Nat Biotech 17, 355-59 (1997)), un vector de ácido nucleico compactado (como se describe, por ejemplo, en los documentos US 6.077.835 y/o WO 00/70087), un vector plasmídico tal como pBR322, pUC 19/18, o pUC 118/119, un vector de ácido nucleico de tamaño mínimo "MIDGE" (como describen, por ejemplo, Schakowski et al., Mol Ther 3, 793-800 (2001)), o como un constructo de vector de ácido nucleico precipitado, tal como un constructo precipitado CaPO<sub>4</sub> (como se describe, por ejemplo, en el documento WO 00/46147, Benvenisty y Reshef, PNAS USA 83, 9551-55 (1986), Wigler et al., Cell 14, 725 (1978), y Coraro y Pearson, Somatic Cell Genetics 7, 603 (1981)). Tales vectores de ácido nucleico y el uso de los mismos son bien conocidos en la técnica (véanse, por ejemplo, los documentos US 5.589.466 y US 5.973.972).

60 En una realización, el vector es adecuado para la expresión del anticuerpo anti-TF en una célula bacteriana. Los ejemplos de tales vectores incluyen vectores de expresión tales como BlueScript (Stratagene), vectores pIN (Van Heeke & Schuster, J Biol Chem 264, 5503-5509 (1989). vectores pET (Novagen, Madison, WI).

Un vector de expresión puede ser también o alternativamente un vector adecuado para la expresión en un sistema de levadura. Se puede emplear cualquier vector adecuado para la expresión en un sistema de levadura. Los vectores

adecuados incluyen, por ejemplo, vectores que comprenden promotores constitutivos o inducibles tales como factor alfa, alcohol oxidasa y PGH (revisado en: F. Ausubel et al., Ed. Current Protocols in Molecular Biology, Greene Publishing y Wiley InterScience Nueva York (1987), y Grant et al., Methods in Enzymol 153, 516-544 (1987)).

5 Un ácido nucleico y/o vector puede también comprender una secuencia de ácido nucleico que codifica una secuencia de secreción/localización, que puede dirigirse a un polipéptido, tal como una cadena polipeptídica naciente, al espacio periplásmico o al medio de cultivo celular. Tales secuencias son conocidas en la técnica, e incluyen el líder de secreción o péptidos señal, secuencias de direccionamiento de orgánulos (p. ej., secuencias de localización nuclear, señales de retención ER, secuencias de tránsito mitocondrial, secuencias de tránsito del cloroplasto) y  
10 secuencias de localización/anclaje de la membrana (p. ej., secuencias de detención de la transferencia ("stop-transfer sequences"), secuencias de anclaje GPI).

En un vector de expresión de la invención, los ácidos nucleicos que codifican el anticuerpo anti-TF pueden incluir o estar asociados con cualquier promotor adecuado, potenciador, y otros elementos que faciliten la expresión. Los  
15 ejemplos de tales elementos incluyen promotores fuertes de la expresión (p. ej., promotor/potenciador de IE de CMV humano, así como promotores de RSV, SV40, SL3-3, MMTV, y LTR de VIH), secuencias de terminación poli (A) eficaces, un origen de replicación para el plásmido producto en E. coli, un gen de resistencia a antibióticos como marcador seleccionable, y/o un sitio de clonación conveniente (p. ej., un poliligador). Los ácidos nucleicos también pueden comprender un promotor inducible en lugar de un promotor constitutivo tal como IE de CMV (el experto en la  
20 técnica reconocerá que tales términos son en realidad descriptores de un grado de expresión de los genes en ciertas condiciones).

En una realización, el vector de expresión que codifica un anticuerpo anti-TF puede ser colocado y/o suministrado a la célula anfitriona o animal anfitrión a través de un vector viral.

25 En un aspecto adicional más, la invención se refiere a una célula anfitriona eucariota o procariota recombinante, tal como un transfectoma, que produce un anticuerpo de la invención como se define en la presente memoria o una molécula biespecífica de la invención como se define en la presente memoria. Los ejemplos de células anfitrionas incluyen levaduras, bacterias y células de mamíferos, tales como células CHO o HEK. Por ejemplo, en una  
30 realización, la presente invención proporciona una célula que comprende un ácido nucleico integrado de forma estable en el genoma celular que comprende una secuencia que codifica la expresión de un anticuerpo anti-TF de la presente invención. En otra realización, la presente invención proporciona una célula que comprende un ácido nucleico no integrado, tal como un plásmido, cósmido, fagémido, o elemento de expresión lineal, que comprende una secuencia que codifica la expresión de un anticuerpo anti-TF de la invención.

35 En un aspecto adicional, la invención se refiere a un hibridoma que produce un anticuerpo de la invención como se define en la presente memoria. En un aspecto adicional más, la invención se refiere a un animal no humano transgénico que comprende ácidos nucleicos que codifican una cadena pesada humana y una cadena ligera humana, en donde el animal o planta producen un anticuerpo de la invención de la invención. La generación de tales hibridomas y animales transgénicos se ha descrito anteriormente.

En un aspecto adicional, la invención se refiere a un método para producir un anticuerpo anti-TF de la invención, comprendiendo dicho método las etapas de

45 a) cultivar un hibridoma o una célula anfitriona de la invención como se ha descrito en la presente memoria anteriormente, y  
b) purificar el anticuerpo de la invención a partir de los medios de cultivo.

En un aspecto principal adicional, la invención se refiere a un anticuerpo anti-TF como se ha definido en la presente memoria o una molécula biespecífica como se ha definido en la presente memoria para su uso como un medicamento.

En un aspecto adicional más, la invención se refiere a una composición farmacéutica que comprende:  
55 - un anticuerpo anti-TF como se define en la presente memoria o una molécula biespecífica como se define en la presente memoria, y  
- un portador farmacéuticamente aceptable.

Las composiciones farmacéuticas se pueden formular con portadores o diluyentes farmacéuticamente aceptables, así como cualquier otro adyuvante y excipiente conocido de acuerdo con técnicas convencionales tales como las descritos en Remington: The Science and the Practice of Pharmacy, 19ª Edición, Gennaro, Ed, Mack Publishing Co.,  
60 Easton, PA, 1995.

Los portadores o diluyentes farmacéuticamente aceptables así como cualquier otro adyuvante y excipiente conocido deben ser adecuados para el compuesto seleccionado de la presente invención y el modo de administración elegida.

La idoneidad para los portadores y otros componentes de las composiciones farmacéuticas se determina basándose en la ausencia de impacto negativo significativo sobre las propiedades biológicas deseadas del compuesto o composición farmacéutica elegidos de la presente invención (p. ej., un impacto menos que sustancial (inhibición relativa de 10% o menos, inhibición relativa de 5% o menos, etc.)) sobre la unión al antígeno.

Una composición farmacéutica de la presente invención puede incluir también diluyentes, cargas, sales, tampones, detergentes (p. ej., un detergente no iónico, tal como Tween-20 o Tween-80), estabilizadores (p. ej., azúcares o aminoácidos libres de proteínas), conservantes, agentes de fijación de tejidos, solubilizantes, y/u otros materiales adecuados para su inclusión en una composición farmacéutica.

Se ha informado de que en las células cancerosas, tales como células de cáncer colorrectal humano, la expresión de TF está bajo control de 2 grandes eventos de transformación que conducen a la progresión de la enfermedad (la activación del oncogén K-ras y la inactivación del supresor de tumores p53), de una manera dependiente de MEK/proteína quinasa activada por mitógeno (MAPK) y fosfatidilinositol 3'-quinasa (PI3K) (Yu et al. (2005) Blood 105: 1734).

Las células cancerosas que expresan en exceso TF pueden ser dianas particularmente buenas para los anticuerpos anti-TF de la invención, ya que se pueden unir más anticuerpos por célula. Por lo tanto, en una realización, el paciente de cáncer que va a ser tratado con un anticuerpo anti-TF de la invención es un paciente, p. ej., un paciente con cáncer de páncreas, cáncer de pulmón o cáncer colorrectal que se ha diagnosticado que tiene una o más mutaciones en K-Ras y/o una o más mutaciones en p53 en sus células tumorales.

En una realización alternativa, el paciente que va a ser tratado con un anticuerpo anti-TF de la invención es un paciente, p. ej., un paciente con cáncer de páncreas, cáncer de pulmón o cáncer colorrectal, que no tiene una mutación en K-Ras. Sin estar limitado por ninguna teoría específica, es posible que algunas células tumorales que tienen la activación de K-Ras sean menos susceptibles de tratamiento con el anticuerpo anti-TF, debido a que los efectos de los anticuerpos anti-TF sobre los mecanismos de señalización intracelular pueden ser menos eficaces en células en las que K-Ras está activado.

Los niveles de dosificación reales de los ingredientes activos en las composiciones farmacéuticas de la presente invención pueden variarse con el fin de obtener una cantidad del ingrediente activo que sea eficaz para lograr la respuesta terapéutica deseada para un paciente en particular, la composición y el modo de administración, sin que sean tóxicos para el paciente. El nivel de dosificación seleccionado dependerá de una variedad de factores farmacocinéticos que incluyen la actividad de las composiciones particulares de la presente invención empleadas, o la amida de las mismas, la vía de administración, el tiempo de administración, la velocidad de excreción del compuesto particular que está siendo empleado, la duración del tratamiento, otros fármacos, compuestos y/o materiales usados combinados con las composiciones particulares empleadas, la edad, el sexo, el peso, el estado, la salud general e el historial médico previo del paciente que está siendo tratado, y factores similares bien conocidos en las técnicas médicas.

La composición farmacéutica se puede administrar por cualquier vía y modo adecuados. Las vías adecuadas de administración de un compuesto de la presente invención *in vivo* e *in vitro* son bien conocidos en la técnica y pueden ser seleccionadas por los expertos ordinarios en la técnica.

En una realización, una composición farmacéutica de la presente invención se administra parenteralmente.

Las expresiones "administración parenteral" y "administrado parenteralmente" según se utilizan en la presente memoria significan modos de administración distintos de la administración enteral y tópica, normalmente por medio de inyección, e incluyen la inyección e infusión epidérmica, intravenosa, intramuscular, intraarterial, intratecal, intracapsular, intraorbital, intracardiaca, intradérmica, intraperitoneal, intratendinosa, transtraqueal, subcutánea, subcuticular, intraarticular, subcapsular, subaracnoidea, intraespinal, intracraneal, intratorácica, epidural e intraesternal.

En una realización esa composición farmacéutica se administra por inyección o infusión intravenosa o subcutánea.

Los portadores farmacéuticamente aceptables incluyen todos y cada uno de los disolventes, medios de dispersión, recubrimientos, agentes antibacterianos y antifúngicos, agentes de isotonicidad, antioxidantes y agentes retardadores de la absorción adecuados que son fisiológicamente compatibles con un compuesto de la presente invención.

Los ejemplos de los portadores acuosos y no acuosos adecuados que se pueden emplear en las composiciones farmacéuticas de la presente invención incluyen agua, solución salina, solución salina tamponada con fosfato, etanol, dextrosa, polioles (tales como glicerol, propilenglicol, polietilenglicol), y mezclas adecuadas de los mismos, aceites vegetales, tales como aceite de oliva, aceite de maíz, aceite de cacahuete, aceite de semilla de algodón, y aceite de sésamo, soluciones coloidales de carboximetilcelulosa, goma de tragacanto y ésteres orgánicos inyectables, tales

como oleato de etilo, y/o diversos tampones. Otros portadores son bien conocidos en las técnicas farmacéuticas.

Los portadores farmacéuticamente aceptables incluyen soluciones o dispersiones acuosas estériles y polvos estériles para la preparación extemporánea de soluciones o dispersiones inyectables estériles. El uso de tales medios y agentes para sustancias farmacéuticamente activas es conocido en la técnica. Excepto en la medida en que cualquier medio o agente convencional sea incompatible con el compuesto activo, se contempla su uso en las composiciones farmacéuticas de la presente invención.

La fluidez apropiada se puede mantener, por ejemplo, por medio del uso de materiales de recubrimiento, tales como lecitina, mediante el mantenimiento del tamaño de partícula requerido en el caso de las dispersiones y mediante el uso de tensioactivos.

Las composiciones farmacéuticas de la presente invención también pueden comprender antioxidantes farmacéuticamente aceptables, por ejemplo (1) antioxidantes soluble en agua, tales como ácido ascórbico, hidrocloreuro de cisteína, bisulfato de sodio, metabisulfito de sodio, sulfito de sodio; (2) antioxidantes solubles en aceite, tales como palmitato de ascorbilo, hidroxianisol butilado (BHA), hidroxitolueno butilado (BHT), lecitina, galato de propilo, alfa-tocoferol; y (3) agentes quelantes de metales, tales como ácido cítrico, ácido etilendiaminotetraacético (EDTA), sorbitol, ácido tartárico y ácido fosfórico.

Las composiciones farmacéuticas de la presente invención también pueden comprender agentes de isotonicidad, tales como azúcares, polialcoholes, tales como manitol, sorbitol, glicerol o cloruro sódico en las composiciones.

Las composiciones farmacéuticas de la presente invención también pueden contener uno o más coadyuvantes apropiados para la vía de administración elegida, tales como conservantes, agentes humectantes, agentes emulsionantes, agentes dispersantes, conservantes o tampones, que pueden mejorar la vida útil o la eficacia de la composición farmacéutica. Los compuestos de la presente invención se pueden preparar con portadores que protegerán el compuesto contra la liberación rápida, tal como una formulación de liberación controlada, incluyendo implantes, parches transdérmicos, y sistemas de suministro microencapsulados. Tales portadores pueden incluir gelatina, monoestearato de glicerilo, diestearato de glicerilo, polímeros biodegradables, biocompatibles, tales como etilvinilacetato, polianhídridos, poli(ácido glicólico), colágeno, poliortoésteres, y poli(ácido láctico) solos o con una cera, u otros materiales bien conocidos en la técnica. Los métodos para la preparación de tales formulaciones son generalmente conocidos para los expertos en la técnica. Véase, p. ej., Sustained and Controlled Release Drug Delivery Systems, J. R. Robinson, ed., Marcel Dekker, Inc., Nueva York, 1978.

En una realización, los compuestos de la presente invención se pueden formular para asegurar la distribución adecuada *in vivo*. Los portadores farmacéuticamente aceptables para la administración parenteral incluyen soluciones o dispersiones acuosas estériles y polvos estériles para la preparación extemporánea de soluciones o dispersiones inyectables estériles. El uso de tales medios y agentes para sustancias farmacéuticamente activas es conocido en la técnica. Excepto en la medida en que cualquier medio o agente convencional sea incompatible con el compuesto activo, se contempla su uso en las composiciones farmacéuticas de la presente invención. También se pueden incorporar a las composiciones compuestos activos complementarios.

Las composiciones farmacéuticas para inyectables típicamente deben ser estériles y estables en las condiciones de fabricación y almacenamiento. La composición se puede formular como una solución, microemulsión, liposoma, u otra estructura ordenada adecuada para una alta concentración de fármaco. El portador puede ser un disolvente o medio de dispersión acuoso o no acuoso que contiene por ejemplo agua, etanol, polioles (tales como glicerol, propilenglicol y polietilenglicol), y mezclas adecuadas de los mismos, aceites vegetales, tales como aceite de oliva, y ésteres orgánicos inyectables, tales como oleato de etilo. La fluidez apropiada se puede mantener, por ejemplo, por medio del uso de un recubrimiento tal como lecitina, mediante el mantenimiento del tamaño de partícula requerido en el caso de la dispersión y mediante el uso de tensioactivos. En muchos casos, será preferible incluir agentes isotónicos, por ejemplo, azúcares, polialcoholes tales como glicerol, manitol, sorbitol, o cloruro de sodio en la composición. Se puede ocasionar una absorción prolongada de las composiciones inyectables incluyendo en la composición un agente que retrase la absorción, por ejemplo, sales de monoestearato y gelatina. Las soluciones inyectables estériles se pueden preparar incorporando el compuesto activo en la cantidad requerida en un disolvente apropiado con uno o una combinación de ingredientes, por ejemplo, como se especifica anteriormente, según se requiera, seguido de microfiltración de esterilización. Generalmente, las dispersiones se preparan incorporando el compuesto activo a un portador estéril que contiene un medio de dispersión alcalino y los otros ingredientes requeridos, por ejemplo, de los enumerados anteriormente. En el caso de los polvos estériles para la preparación de soluciones inyectables estériles, los ejemplos de los métodos de preparación son secado al vacío y secado por congelación (liofilización) que producen un polvo del ingrediente activo más cualquier ingrediente deseado adicional a partir de una solución previamente esterilizada por filtración de la misma.

Las soluciones inyectables estériles se pueden preparar incorporando el compuesto activo en la cantidad requerida a un disolvente apropiado con uno o una combinación de ingredientes enumerados anteriormente, según se requiera, seguido de microfiltración de esterilización. Generalmente, las dispersiones se preparan incorporando el compuesto

- 5 activo a un portador estéril que contiene un medio de dispersión alcalino y los otros ingredientes requeridos de los enumerados anteriormente. En el caso de los polvos estériles para la preparación de soluciones inyectables estériles, los ejemplos de los métodos de preparación son secado al vacío y secado por congelación (liofilización) que producen un polvo del ingrediente activo más cualquier ingrediente deseado adicional de una solución previamente esterilizada por filtración de la misma.
- La composición farmacéutica de la presente invención puede contener un compuesto de la presente invención o una combinación de compuestos de la presente invención.
- 10 Como se describió anteriormente, en otro aspecto, la invención se refiere al anticuerpo de la invención como se define en la presente memoria o una molécula biespecífica de la invención tal como se define en la presente memoria para su uso como medicamento.
- 15 Los anticuerpos anti-TF de la invención pueden ser utilizados para una serie de propósitos. En particular, los anticuerpos de la invención se pueden utilizar para el tratamiento de diversas formas de cáncer. En un aspecto, los anticuerpos monoclonales anti-TF de la invención se utilizan para el tratamiento de diversos tipos de cáncer sólido tales como: tumores del sistema nervioso central, cáncer de cabeza y cuello, cáncer de pulmón (tal como cáncer de pulmón de células no pequeñas), cáncer de mama, cáncer de esófago, cáncer de estómago, el cáncer de hígado y vesícula biliar, cáncer pancreático, cáncer colorrectal, cáncer de vejiga, cáncer de riñón, cáncer de próstata, cáncer endometrial, cáncer ovárico, melanoma maligno, sarcoma (tejido blando, p. ej., hueso y músculo), tumores primarios de origen desconocido (es decir primarios desconocidos), leucemia, cáncer de la médula ósea (tal como mieloma múltiple), leucemia linfoblástica aguda, leucemia linfoblástica crónica y linfoma no Hodgkin, cáncer de piel, glioma, cáncer de cerebro, útero, y recto.
- 20 Se pueden elegir otras inflamaciones autoinmunitarias, tales como las miopatías o la esclerosis múltiple con los anticuerpos monoclonales anti-TF de la presente invención.
- Los anticuerpos monoclonales anti-TF de la presente invención también pueden ser útiles para el tratamiento de la hemostasis.
- 30 También se pueden elegir como diana trastornos hemostáticos relacionados con el cáncer con la presente intervención.
- 35 Se pueden elegir como diana otras enfermedades con inflamación, tales como las miopatías, la artritis reumatoide, la osteoartritis, la espondilitis anquilosante, la gota, la espondilartropatías, la espondilitis anquilosante, el síndrome de Reiter, la artropatía psoriásica, la espondilitis enteropática, la artropatía juvenil, la artropatía reactiva, la artritis infecciosa o post-infecciosa, la artritis tuberculosa, la artritis viral, la artritis fúngica, la artritis sifilítica, la glomerulonefritis, la enfermedad renal en fase terminal, el lupus eritematoso sistémico, la enfermedad de Crohn, la colitis ulcerosa, la enfermedad inflamatoria intestinal, la fibrosis quística, la enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC), el asma, el asma alérgica, la bronquitis, la bronquiolitis aguda, la bronquiolitis crónica, la fibrosis pulmonar idiopática, o la esclerosis múltiple con los anticuerpos monoclonales anti-TF de la presente invención.
- 40 Los anticuerpos monoclonales anti-TF de la presente invención también pueden ser útiles para el tratamiento de hemostasis.
- 45 También se pueden elegir como diana trastornos hemostáticos relacionados con el cáncer con la presente intervención.
- 50 También se pueden tratar con los anticuerpos monoclonales anti-TF las enfermedades vasculares tales como laestenosis vascular, la enfermedad vascular de miocardio, la enfermedad vascular cerebral, la retinopatía y la degeneración macular, incluyendo, pero no limitada la DMAE húmeda.
- Los anticuerpos monoclonales anti-TF de la presente invención también pueden ser útiles para el tratamiento de pacientes con riesgo cardiovascular, tales como la aterosclerosis, la hipertensión, la diabetes, la dislipidemia y el síndrome coronario agudo, incluyendo, pero no limitado a, infarto agudo de miocardio, accidente cerebrovascular.
- 55 Los anticuerpos monoclonales anti-TF de la presente invención también pueden ser útiles para la inhibición de la trombosis, tales como la trombosis venosa profunda, la embolia renal, la embolia pulmonar, la trombosis arterial, o para tratar trombosis que se produce después de la cirugía arterial, los injertos de bypass vascular periférica o los injertos de bypass de la arteria coronaria, las derivaciones arterio-venosas, la eliminación de una aplicación, tal como un dispositivo intraluminal o un catéter.
- 60 Los anticuerpos monoclonales anti-TF de la presente invención también pueden ser útiles para la inhibición de la lesión por reperusión isquémica renal.

Los anticuerpos monoclonales anti-TF de la presente invención también pueden ser útiles para el tratamiento de la hiperlipoproteinemia, el hiperparatiroidismo.

5 Los anticuerpos monoclonales anti-TF de la presente invención también pueden ser útiles para el tratamiento de la vasculitis, la vasculitis ANCA-positiva, la enfermedad de Behcet.

10 Los anticuerpos monoclonales anti-TF de la presente invención también pueden ser útiles para el bloqueo de la insuficiencia respiratoria inducida por trauma, tal como el síndrome de insuficiencia respiratoria aguda, la lesión pulmonar aguda.

Los anticuerpos monoclonales anti-TF de la presente invención también pueden ser útiles para bloquear la disfunción orgánica inducida por infección, tales como la insuficiencia renal, el síndrome de insuficiencia respiratoria aguda, la lesión pulmonar aguda.

15 Los anticuerpos monoclonales anti-TF de la presente invención también pueden ser útiles para tratar diversos trastornos tromboembólicos tales como los derivados de la angioplastia, el infarto de miocardio, la angina inestable y la estenosis de la arteria coronaria.

20 Los anticuerpos monoclonales anti-TF de la presente invención también pueden ser útiles en un entorno profiláctico para tratar las complicaciones mediadas por TF de infecciones sistémicas, tales como la sepsis o la neumonía. Los anticuerpos monoclonales anti-TF de la presente invención también pueden ser útiles como tratamiento profiláctico de los pacientes con vasos ateroscleróticos en riesgo de trombosis.

25 Los anticuerpos monoclonales anti-TF de la presente invención también pueden ser útiles para el tratamiento de la enfermedad de injerto contra anfitrión.

Los anticuerpos monoclonales anti-TF de la presente invención también pueden ser útiles para aumentar el injerto de células beta en el trasplante de islotes, para prevenir la vasculopatía del injerto cardiaco (CAV), para prevenir el rechazo agudo del injerto.

30 Los anticuerpos monoclonales anti-TF de la presente invención también pueden ser útiles para el tratamiento de enfermedades en las que se encuentran presentes micropartículas que se exponen al factor tisular circulante, tales como, pero no limitadas a la trombosis vascular, la diabetes de tipo II, AMI, la hipertensión arterial pulmonar

35 Del mismo modo, la invención se refiere a un método para inhibir el crecimiento y/o proliferación de una célula de tumor que expresa TF, que comprende la administración, a un individuo que lo necesita, de un anticuerpo o una molécula biespecífica de la invención. En una realización, dicha célula tumoral está implicada en el cáncer, tal como cáncer de próstata, cáncer de pulmón (tal como cáncer de pulmón de células no pequeñas), cáncer de mama, cáncer colorrectal (tal como cáncer colorrectal metastásico), cáncer de páncreas, cáncer endometrial, cáncer de ovario, melanoma cutáneo, leucemia, cáncer de médula ósea (tal como mieloma múltiple), leucemia linfoblástica aguda, leucemia linfoblástica crónica y linfoma no Hodgkin, cáncer de piel, cáncer de próstata, glioma, cáncer de cerebro, riñones, útero, vejiga y recto.

40 Asimismo, la invención se refiere al uso de un anticuerpo monoclonal que se une a TF humano para la preparación de un medicamento para el tratamiento del cáncer, tal como una de las indicaciones para cánceres específicos mencionadas anteriormente.

50 En una realización, la selección de los pacientes que van a ser tratados con el anticuerpo anti-TF se basa en el nivel de factor tisular (TF) en la orina y/o sangre. En una realización concreta, el paciente que va a ser tratado tiene un nivel relativamente alto de TF en la orina y/o sangre. Por ejemplo, el paciente que se va a tratar puede tener un nivel de TF en la orina de más de 20 ng/mL, tal como más de 40 ng/mL. p.ej. más de 100 ng/mL, tal como más de 200 ng/mL. Alternativamente, o además, el nivel de TF en el suero de los pacientes puede ser de más de 100 pg/mL, tal como más de 200 pg/mL. Esto se puede determinar, por ejemplo, utilizando un ELISA.

55 En una realización adicional de los métodos de tratamiento de la presente invención, la eficacia del tratamiento está siendo controlada durante la terapia, p. ej., en puntos temporales definidos previamente. En una realización, la eficacia se puede controlar midiendo el nivel de TF en la orina o sangre, por ejemplo, por medio de ELISA. En otra realización, la eficacia se puede determinar mediante la visualización de la zona de la enfermedad, p. ej., mediante la realización de una o más exploraciones PET-CT, por ejemplo usando un anticuerpo anti-TF marcado, tal como un anticuerpo anti-TF marcado de la presente invención. Además, los anticuerpos anti-TF marcados, tales como los anticuerpos anti-TF marcados de la invención, se podrían utilizar para detectar tumores productores de TF p. ej., utilizando una exploración PET-CT.

60 Los regímenes de dosificación en los métodos de tratamiento y los usos anteriores se ajustan para proporcionar la respuesta óptima deseada (p. ej., una respuesta terapéutica). Por ejemplo, se puede administrar un único bolo, se

pueden administrar varias dosis divididas en el tiempo o se puede reducir o aumentar la dosis proporcionalmente según indiquen las exigencias de la situación terapéutica. Las composiciones parenterales se pueden formular en formas de dosificación unitarias para facilitar la administración y la uniformidad de la dosificación. Forma de dosificación unitaria tal como se utiliza en la presente memoria se refiere a unidades físicamente discretas adecuadas como dosificaciones unitarias para los sujetos a tratar; cada unidad contiene una cantidad predeterminada de compuesto activo calculada para producir el efecto terapéutico deseado en asociación con el portador farmacéutico requerido. Las especificaciones para las formas unitarias de dosificación de la presente invención están dictadas por y dependen directamente de (a) las características únicas del compuesto activo y el efecto terapéutico particular que se vaya a alcanzar, y (b) las limitaciones inherentes en la técnica de la composición de semejante compuesto activo para el tratamiento de la sensibilidad en los individuos.

Las dosificaciones eficaces y los regímenes de dosificación para los anticuerpos anti-TF dependen de la enfermedad o afección que se vaya a tratar y pueden ser determinadas por los expertos en la técnica. Un intervalo no limitante, ilustrativo para una cantidad terapéuticamente eficaz de un compuesto de la presente invención es de aproximadamente 0,1 a 100 mg/kg, tal como aproximadamente de 0,1 a 50 mg/kg, por ejemplo de aproximadamente 0,1 a 20 mg/kg, tal como aproximadamente de 0,1-10 mg/kg, por ejemplo aproximadamente 0,5, aproximadamente 0,3, tal como aproximadamente 1, o aproximadamente 3 mg/kg.

Un médico o veterinario experto en la técnica puede determinar fácilmente y prescribir la cantidad eficaz de la composición farmacéutica requerida. Por ejemplo, el médico o veterinario podría comenzar con dosis de anticuerpo anti-TF empleado en la composición farmacéutica a niveles más bajos que los requeridos con el fin de lograr el efecto terapéutico deseado e incrementar gradualmente la dosificación hasta que se consiga el efecto deseado. En general, una dosis diaria adecuada de una composición de la presente invención será aquella cantidad del compuesto que es la dosis más baja eficaz para producir un efecto terapéutico. Tal dosis eficaz dependerá generalmente de los factores descritos anteriormente. La administración puede ser, p. ej., intravenosa, intramuscular, intraperitoneal, o subcutánea, y por ejemplo se administra próxima al sitio de la diana. Si se desea, la dosis diaria eficaz de una composición farmacéutica se puede administrar en forma de dos, tres, cuatro, cinco, seis o más subdosis administradas por separado a intervalos apropiados durante todo el día, opcionalmente, en formas de dosificación unitarias. Mientras sea posible administrar solo un compuesto de la presente invención, es preferible administrar el compuesto en forma de una composición farmacéutica como se ha descrito anteriormente.

En una realización, los anticuerpos anti-TF se pueden administrar por infusión en una dosis semanal de 10 a 500 mg/m<sup>2</sup>, tal como de 200 a 400 mg/m<sup>2</sup>. Dicha administración se puede repetir, p. ej., de 1 a 8 veces, tal como 3 a 5 veces. La administración se puede realizar por infusión continua durante un período de 2 a 24 horas, tal como de 2 a 12 horas.

En una realización, los anticuerpos anti-TF se pueden administrar por infusión continua lenta durante un largo período de tiempo, tal como más de 24 horas, con el fin de reducir los efectos secundarios tóxicos.

En una realización, los anticuerpos anti-TF se pueden administrar a una dosis semanal de entre 250 mg y 2000 mg, tal como por ejemplo 300 mg, 500 mg, 700 mg, 1000 mg, 1500 mg o 2000 mg, durante un máximo de 8 veces, tal como de 4 a 6 veces. La administración se puede realizar por infusión continua durante un período de 2 a 24 horas, tal como de 2 a 12 horas. Semejante régimen se puede repetir una o más veces según sea necesario, por ejemplo, después de 6 meses o 12 meses. La dosificación se puede determinar o ajustar midiendo la cantidad de compuesto de la presente invención en la sangre después de la administración, por ejemplo, sacando una muestra biológica y utilizando anticuerpos anti-idiotípicos que dirigen la región de unión al antígeno de los anticuerpos anti-TF de la presente invención.

En una realización, los anticuerpos anti-TF se pueden administrar por terapia de mantenimiento, tal como, p. ej., una vez a la semana durante un período de 6 meses o más.

En una realización, los anticuerpos anti-TF se pueden administrar mediante un régimen que incluye una infusión de un anticuerpo anti-TF de la presente invención seguido de una infusión de un anticuerpo anti-TF de la presente invención conjugado con un radioisótopo. El régimen se puede repetir, por ejemplo, 7 a 9 días después.

Como ejemplos no limitantes, el tratamiento de acuerdo con la presente invención se puede proporcionar en forma de una dosificación diaria de un compuesto de la presente invención en una cantidad de aproximadamente 0,1 a 100 mg/kg, tal como 0,5, 0,9, 1,0, 1,1, 1,5, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 40, 45, 50, 60, 70, 80, 90 o 100 mg/kg, por día, en al menos uno de los días 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, o 40, o alternativamente, al menos una de las semanas 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 o 20 después del inicio del tratamiento, o cualquier combinación de los mismos, utilizando dosis únicas o divididas cada 24, 12, 8, 6, 4, ó 2 horas, o cualquier combinación de los mismos.

Una "cantidad eficaz" para la terapia tumor también se puede medir por su capacidad para estabilizar la progresión



de la enfermedad. La capacidad de un compuesto para inhibir el cáncer se puede evaluar en un sistema modelo animal predictivo de la eficacia en tumores humanos. Alternativamente, esta propiedad de una composición se puede evaluar examinando la capacidad del compuesto para inhibir el crecimiento celular o para inducir la apoptosis mediante análisis *in vitro* conocidos por el experto en la materia. Una cantidad terapéuticamente eficaz de un compuesto terapéutico puede disminuir el tamaño del tumor, o mejorar de otra manera los síntomas en un sujeto. Un experto normal en la técnica sería capaz de determinar tales cantidades basándose en factores tales como el tamaño del sujeto, la gravedad de los síntomas del sujeto, y la composición concreta o la vía de administración seleccionada.

Un anticuerpo anti-TF también se puede administrar profilácticamente con el fin de reducir el riesgo de desarrollar cáncer, retrasar la aparición de un evento en la progresión del cáncer, y/o reducir el riesgo de recurrencia cuando un cáncer está en remisión. Esto puede ser especialmente útil en pacientes en los que es difícil de localizar un tumor que se sabe que está presente debido a otros factores biológicos.

Los anticuerpos anti-TF también se pueden administrar en una terapia combinada, es decir, combinados con otros agentes terapéuticos relevantes para la enfermedad o afección que se vaya a tratar. De acuerdo con ello, en una realización, el medicamento que contiene el anticuerpo es para combinarlo con uno o más agentes terapéuticos adicionales, tales como un agente citotóxico, quimioterapéutico o anti-angiogénico.

Tal administración combinada puede ser simultánea, separada o secuencial. Para la administración simultánea los agentes se pueden administrar en forma de una composición o en forma de composiciones separadas, según sea apropiado. La presente invención también proporciona métodos para tratar un trastorno que afecta a células que expresan TF como se ha descrito anteriormente, cuyos métodos comprenden la administración de un anticuerpo anti-TF de la presente invención combinado con uno o más agentes terapéuticos adicionales tal como se describe a continuación.

En una realización, la presente invención proporciona un método para el tratamiento de un trastorno que afecta a las células que expresan TF en un sujeto, cuyo método que comprende la administración de una cantidad terapéuticamente eficaz de un anticuerpo anti-TF de la presente invención y al menos un agente quimioterapéutico a un sujeto que lo necesite.

En una realización, la presente invención proporciona un método para el tratamiento o la prevención del cáncer, cuyo método comprende la administración de una cantidad terapéuticamente eficaz de un anticuerpo anti-TF de la presente invención y al menos un agente quimioterapéutico a un sujeto que lo necesite.

En una realización, la presente invención proporciona el uso de un anticuerpo anti-TF de la presente invención para la preparación de una composición farmacéutica que se va a administrar con al menos un agente quimioterapéutico para el tratamiento del cáncer.

En una realización, tal agente quimioterapéutico se puede seleccionar entre un antimetabolito, tal como metotrexato, 6-mercaptopurina, 6-tioguanina, citarabina, fludarabina, 5-fluorouracilo, decarbazina, hidroxiaurea, asparraginas, gemcitabina, cladribina y agentes similares.

En una realización, semejante agente quimioterapéutico se puede seleccionar entre un agente de alquilación, tal como mecloretamina, tioepa, clorambucilo, melfalán, carmustina (BSNU), lomustina (CCNU), ciclofosfamida, busulfán, dibromomanitol, estreptozotocina, dacarbazina (DTIC), procarbazona, mitomicina C, cisplatino y otros derivados de platino, tales como carboplatino, y agentes similares.

En una realización, semejante agente quimioterapéutico se puede seleccionar entre un agente anti-mitótico, tal como taxanos, por ejemplo docetaxel y paclitaxel, y alcaloides de vinca, por ejemplo vindesina, vincristina, vinblastina y vinorelbina.

En una realización, semejante agente quimioterapéutico se puede seleccionar entre un inhibidor de la topoisomerasa, tal como topotecán o irinotecán.

En una realización, semejante agente quimioterapéutico se puede seleccionar entre un fármaco citostático, tal como etopósido y tenipósido.

En una realización, semejante agente quimioterapéutico se puede seleccionar entre un inhibidor de factor del crecimiento, tal como un inhibidor de ErbB1 (EGFR) (tal como Iressa, Erbitux (cetuximab), Tarceva y agentes similares), un inhibidor de ErbB2 (Her2/neu) (tal como Herceptin y agentes similares) y agentes similares.

En una realización, semejante agente quimioterapéutico se puede seleccionar entre un inhibidor de tirosina quinasa, tal como imatinib (Glivec, Gleevec STI571), lapatinib, PTK787/ZK222584 y agentes similares.

En una realización, la presente invención proporciona un método para el tratamiento de un trastorno que afecta a las

células que expresan TF en un sujeto, cuyo método comprende la administración de una cantidad terapéuticamente eficaz de un anticuerpo anti-TF de la presente invención y al menos un inhibidor de la angiogénesis, la neovascularización, y/u otra vascularización a un sujeto que lo necesite.

- 5 Los ejemplos de tales inhibidores de la angiogénesis son los inhibidores de uroquinasa, inhibidores de metaloproteasa de la matriz (tales como marimastat, neovastat, BAY 12-9566, AG 3340, BMS-275291 y agentes similares), inhibidores de migración de células endoteliales y la proliferación (tales como, TNP-470, escualamina, 2-metoxiestradiol, combretastatinas, endostatina, angiostatina, penicilamina, SCH66336 (Schering-Plough Corp, Madison, NJ), R115777 (Janssen Pharmaceutica, Inc, Titusville, NJ) y agentes similares), antagonistas de factores de crecimiento angiogénicos (tales como ZD6474, SU6668, anticuerpos contra agentes angiogénicos y/o sus receptores (tales como, VEGF, bFGF, y angiopoyetina-1), talidomida, análogos de talidomida (tales como, CC-5013), Sugen 5416, SU5402, ribozima antiangiogénica (tal como angiozima), interferón  $\alpha$  (tal como interferón  $\alpha$ 2a), suramina y agentes similares), inhibidores de la quinasa VEGF-R y otros inhibidores de la tirosina quinasa anti-angiogénicos (tales como SU011248), inhibidores de la señalización de integrina específica de endotelio/supervivencia (tales como vitaxina y agentes similares), antagonistas/quelantes de cobre (tales como tetratiomolibdato, captopril y agentes similares), carboxiamido-triazol (CAI), ABT-627, CM101, interleuquina-12 (IL-12), IM862, PNU145156E, así como moléculas de nucleótidos inhibidoras de la angiogénesis (tales como ADNc de VEGF antisentido, ADNc que codifica angiostatina, ADNc que codifica p53 y ADNc que codifica el receptor-2 de VEGF defectuoso) y agentes similares.
- 10
- 15
- 20 Otros ejemplos de tales inhibidores de la angiogénesis, la neovascularización, y/u otra vascularización son los derivados de heparina anti-angiogénicos y moléculas relacionadas (p. ej., heparinas III), temozolomida, NK4, factor inhibidor de la migración de macrófagos (MIF), inhibidores de la ciclooxigenasa-2, inhibidores del factor 1 inducible por hipoxia, isoflavonas de soja anti-angiogénicas, oltipraz, fumagilina y análogos de los mismos, análogos de somatostatina, polisulfato de pentosano, tecogalán sodio, dalteparina, tumstatina, trombospondina, NM-3, combrestatina, canstatina, avastatina, anticuerpos contra otras dianas relevantes (tales como anti-integrina alfa-v/beta-3 y mAb anti-kininostatina) y agentes similares.
- 25

En una realización, un agente terapéutico para su uso combinado con un anticuerpo anti-TF para el tratamiento de los trastornos descritos anteriormente puede ser un inmunógeno anti-canceroso, tal como un antígeno canceroso/antígeno asociado a tumor (p. ej., molécula de adherencia celular epitelial (EpCAM/TACSTD1), mucina 1 MUC1), antígeno carcinoembrionario (CEA), glicoproteína 72 asociada a tumor (TAG-72), gp 100, Melan-AMART-1, KDR, RCAS1, MDA7, vacunas virales asociadas con el cáncer (p. ej., vacunas contra el virus del papiloma humano), proteínas de choque térmico derivadas de tumores y agentes similares. Otros numerosos antígenos cancerosos/antígenos asociados a tumores adecuados descritos en otra parte en la presente memoria y moléculas similares conocidas en la técnica se pueden utilizar también o alternativamente en dicha realización. Los péptidos inmunogénicos contra el cáncer también incluyen las "vacunas" antiidiotípicas tales como los anticuerpos anti-idiotípicos BEC2, Mitumomab, CeaVac y anticuerpos anti-idiotípicos relacionados, el anticuerpo anti-idiotípico para el anticuerpo MG7, y otros anticuerpos anti-idiotípicos contra el cáncer (véanse por ejemplo Birebent et al., Vaccine. 21(15), 1601-1612 (2003), Li et al., Chin Med J (Engl). 114(9), 962-6 (2001), Schmitt et al., Hybridoma. 13(5), 389-96 (1994), Maloney et al., Hybridoma. 4(3), 191-209 (1985), Raychardhuri et al., J Immunol. 137(5), 1743-9 (1986), Pohl et al., Int J Cancer. 50(6), 958-67 (1992), Bohlen et al., Cytokines Mol Ther. 2(4), 231-8 (1996) y Maruyama, J Immunol Methods. 264(1-2), 121-33 (2002)). Tales Ab antiidiotípicos pueden estar opcionalmente conjugado con un portador, que puede ser un portador de molécula sintética (típicamente inerte), una proteína (por ejemplo hemocianina de lapa californiana (KLH) (véase, por ejemplo, Ochi et al., Eur J Immunol. 17(11), 1645-8 (1987)), o una célula (por ejemplo, un glóbulo rojo - véase, por ejemplo Wi et al., Methods J Immunol. 122(2), 227-34 (1989)).

30

35

40

45

En una realización, un agente terapéutico para su uso combinado con un anticuerpo anti-TF para el tratamiento de trastornos como los descritos anteriormente puede ser una citoquina anti-cancerosa, una quimioquina, o una combinación de las mismas. Los ejemplos de las citoquinas y los factores de crecimiento adecuados incluyen IFN $\gamma$ , IL-2, IL-4, IL-6, IL-7, IL-10, IL-12, IL-13, IL-15, IL-18, IL-23, IL-24, IL-27, IL-28a, IL-28b, IL-29, KGF, IFN $\alpha$  (p. ej., IFN $\alpha$ 2b), IFN $\beta$ , GM-CSF, CD40L, ligando Flt3, factor de células madre, ancestim, y TNF $\alpha$ . Las quimioquinas adecuadas pueden incluir quimioquinas Glu-Leu-Arg (ELR)-negativas tales como IP-10, MCP-3, MIG, y SDF-1 $\alpha$  de las familias de quimioquinas CXC y C-C humanas. Las citoquinas adecuadas incluyen derivados de citoquinas, variantes de citoquinas, fragmentos de citoquinas, y proteínas de fusión de citoquinas. Estos y otros métodos o usos que implican ácidos nucleicos que codifican péptidos de origen natural en la presente memoria se pueden llevar a cabo alternativamente o adicionalmente mediante "activación génica" y técnicas de regulación al alza de genes por recombinación homóloga, tales como las descritas en los documentos US 5.968.502, US 6.063.630 y US 6.187.305 y EP 0505500.

50

55

En una realización, un agente terapéutico para su uso combinado con un anticuerpo anti-TF para el tratamiento de los trastornos descritos anteriormente puede ser un control del ciclo celular/regulador de la apoptosis (o "agente regulador"). Un control del ciclo celular/regulador de la apoptosis puede incluir moléculas que eligen como diana y modulan el control del ciclo celular/regulador de la apoptosis tales como (i) cdc-25 (tales como NSC 663284), (ii) quinasas dependientes de ciclina que sobre-estimulan el ciclo celular (tales como flavopiridol (L868275, HMR1275),

60

7-hidroxiestaurosporina (UCN-01, KW-2401), y roscovitina (R-roscovitina, CYC202)), y (iii) moduladores de la telomerasa (tales como BIBR1532, SOT-095, GRN163 y composiciones descritas por ejemplo en los documentos US 6.440.735 y US 6.713.055). Los ejemplos no limitantes de las moléculas que interfieren en las rutas apoptóticas incluyen ligando de induce la apoptosis relacionado con TNF (TRAIL)/ligando de apoptosis-2 (Apo-2L), anticuerpos que activan los receptores TRAIL, IFN, y Bcl-2 anti-sentido.

En una realización, el agente terapéutico para su uso combinado con un anticuerpo anti-TF para el tratamiento de los trastornos descritos anteriormente puede ser un agente regulador hormonal, tal como los agentes útiles para la terapia anti-andrógenos y anti-estrógenos. Los ejemplos de tales agentes reguladores hormonales son tamoxifeno, idoxifeno, fulvestrant, droloxifeno, toremifeno, raloxifeno, dietilestilbestrol, etinil/etinil estradiol, un antiandrógeno (tal como flutamida/Eulexin), una progestina (tal como caproato de hidroxiprogesterona, medroxi-progesterona/provera, acetato de megestrol/Megace), un adrenocorticosteroide (tal como hidrocortisona, prednisona), hormona liberadora de hormona luteinizante (y análogos de la misma y otros agonistas de LHRH tales como buserelina y goserelina), un inhibidor de aromatasa (tal como anastrozole/Arimidex, aminoglutetimida/Cytraden, exemestano), un inhibidor hormonal (tal como octreotida/Sandostatina) y agentes similares.

En una realización, el agente terapéutico para su uso combinado con un anticuerpo anti-TF para el tratamiento de los trastornos descritos anteriormente puede ser un agente anti-anérgico (por ejemplo compuestos de molécula pequeña, proteínas, glicoproteínas, o anticuerpos que interrumpen la tolerancia a antígenos tumorales y cancerosos). Los ejemplos de tales compuestos son moléculas que bloquean la actividad de CTLA-4, tales como MDX-010 (ipilimumab) (Phan et al., PNAS USA 100, 8372 (2003)).

En una realización, el agente terapéutico para su uso combinado con un anticuerpo anti-TF para el tratamiento de los trastornos descritos anteriormente puede ser un ácido nucleico que contiene un gen supresor tumoral o un vector tal como un adenovirus de replicación deficiente que codifica p53/SCH58500 de tipo salvaje recombinante humano, etc.; ácidos nucleicos antisentido dirigidos a oncogenes, genes mutados o desregulados; o ARNip dirigido a genes mutados o desregulados. Los ejemplos de las dianas de supresores tumorales incluyen, por ejemplo, BRCA1, RB1, BRCA2, DPC4 (Smad4), MSH2, MLH1, y DCC.

En una realización, el agente terapéutico para su uso combinado con un anticuerpo anti-TF para el tratamiento de los trastornos descritos anteriormente puede ser un ácido nucleico anti-canceroso, tal como Genasense (augmerosen/G3139), LY900003 (ISIS 3521), ISIS 2503, OGX-011 (ISIS 112989), LE-AON/LEraf-AON (oligonucleótido antisentido c-raf encapsulado en liposomas/ISIS-5132), MG98, y otros ácidos nucleicos antisentido que eligen como diana PKC $\alpha$ , clusterina, IGF1BP, proteína quinasa A, ciclina D1, o Bcl-2h.

En una realización, el agente terapéutico para su uso combinado con un anticuerpo anti-TF para el tratamiento de los trastornos descritos anteriormente puede ser una molécula de ARN inhibidora anti-cancerosa (véanse por ejemplo Lin et al., Curr Cancer Drug Targets. 1(3), 241-7 (2001), Erratum en: Curr Cancer Drug Targets. 3(3), 237 (2003), Lima et al., Cancer Gene Ther. 11(5), 309-16 (2004), Grzmil et al., Int J Oncol. 4(1), 97-105 (2004), Collis et al., Int J Radiat Oncol Biol Phys. 57(2 Suppl), S144 (2003), Yang et al., Oncogene. 22(36), 5694-701 (2003) y Zhang et al., Biochem Biophys Res Commun. 303(4), 1169-78 (2003)).

Las composiciones y los métodos de administración combinada de la presente invención también incluyen la administración de vacunas de ácido nucleico, tales como vacunas de ADN desnudo que codifican tales antígenos cancerosos/antígenos asociados a tumores (véanse por ejemplo los documentos US 5.589.466, US 5.593.972, US 5.703.057, US 5.879.687, US 6.235.523, y US 6.387.888). En una realización, el método de administración combinada y/o la composición combinada comprenden una composición de vacuna autóloga. En una realización, la composición combinada y/o el método de administración combinada comprenden una vacuna de células completas o una célula que expresa citoquinas (por ejemplo un fibroblasto que expresa IL-2 recombinante o una célula dendrítica que citoquina recombinante) (véanse por ejemplo Kowalczyk et al., Acta Biochim Pol. 50(3), 613-24 (2003), Reilly et al., Methods Mol Med. 69, 233-57 (2002) y Tirapu et al., Curr Gene Ther. 2(1), 79-89 (2002). Otro ejemplo de semejante enfoque de células autólogas que puede ser útil en los métodos combinados de la presente invención es el método de Inmunoterapia Personalizada MyVax® (referido previamente como GTO-99) (Genitope Corporation - Redwood City, CA, USA).

En una realización, la presente invención proporciona composiciones combinadas y métodos de administración combinada en donde un anticuerpo anti-TF se combina o se administra simultáneamente con un virus o proteínas virales. Los virus de replicación deficiente, que generalmente son capaces de una o solamente unas pocas rondas de replicación *in vivo*, y que se dirigen a células tumorales, pueden ser, por ejemplo, componentes útiles de tales composiciones y métodos. Tales agentes virales pueden comprender o estar asociados con ácidos nucleicos que codifican inmunoestimulantes, tales como GM-CSF y/o IL-2. Tanto los virus naturalmente oncolíticos como los virus oncolíticos recombinantes (por ejemplo los virus HSV-1, los reovirus, los adenovirus de replicación deficiente y de replicación sensible, etc.) pueden ser componentes útiles de tales métodos y composiciones. Por consiguiente, en una realización, la presente invención proporciona composiciones combinadas y métodos de administración

combinada en donde un anticuerpo anti-TF se combina o se administra simultáneamente con un virus oncolítico. Los ejemplos de tales virus incluyen adenovirus oncolíticos y herpes virus, que pueden ser o no virus modificados (véanse por ejemplo Shah et al., *J Neurooncol.* 65(3), 203-26 (2003), Stiles et al., *Surgery.* 134(2), 357-64 (2003), Sunarmura et al., *Pancreas.* 28(3), 326-9 (2004), Teshigahara et al., *J Surg Oncol.* 85(1), 42-7 (2004), Varghese et al., *Cancer Gene Ther.* 9(12), 967-78 (2002), Wildner et al., *Cancer Res.* 59(2), 410-3 (1999), Yamanaka, *Int J Oncol.* 24(4), 919-23 (2004) y Zwiebel et al., *Semin Oncol.* 28(4), 336-43 (2001).

Las composiciones combinadas y los métodos de administración combinada de la presente invención también pueden implicar métodos de inmunoterapia "de células completas" y "adoptiva". Por ejemplo, tales métodos pueden comprender infusión o re-infusión de células de sistema inmunitario (por ejemplo linfocitos infiltrantes de tumores (TIL), tales como células T CD4<sup>+</sup> y/o CD8<sup>+</sup> (por ejemplo células T expandidas con antígenos específicos de tumores y/o mejora genética), células B que expresan anticuerpos u otras células productoras/presentadoras de anticuerpos, células dendríticas (p. ej., células dendríticas recombinantes que expresan anti-citoquinas, células dendríticas cultivadas con un agente de expansión de DC tal como GM-CSF y/o Flt3-L, y/o células dendríticas cargadas con antígenos asociados a tumores), células NK anti-tumorales, células denominadas híbridas, o combinaciones de las mismas. Los productos lisados celulares también pueden ser útiles en tales métodos y composiciones. Las "vacunas" celulares en pruebas clínicas que pueden ser útiles en tales aspectos incluyen productos lisados celulares de Canvaxin™, APC-8015 (Dendreon), HSPPC-96 (Antigenics), y Melacine®. Los antígenos desprendidos de las células cancerosas, y las mezclas de los mismos (véase por ejemplo Bystryn et al., *Clinical Cancer Research* Vol. 7, 1882-1887, Julio 2001), opcionalmente mezclados con coadyuvantes tales como alumbre, también pueden ser componentes de tales métodos y composiciones combinadas.

En una realización, se puede suministrar un anticuerpo anti-TF a un paciente combinado con la aplicación de un método de vacunación interna. La vacunación interna hace referencia a la muerte inducida de células tumorales o cancerosas, tal como la muerte celular inducida por fármacos o inducida por radiación de células tumorales, en un paciente, que conduce típicamente a la provocación de una respuesta inmunitaria dirigida a (i) las células tumorales en su totalidad o (ii) partes de las células tumorales incluyendo (a) proteínas, glicoproteínas u otros productos secretados, (b) proteínas o glicoproteínas asociadas a la membrana u otros componentes asociados con o insertados en las membranas, y/o (c) proteínas intracelulares u otros componentes intracelulares. Una respuesta inmunitaria inducida por vacunación interna puede ser humoral (es decir, anticuerpo - mediada por el complemento) o mediada por células (p. ej., el desarrollo y/o incremento de linfocitos T citotóxicos endógenos que reconocen las células tumorales destruidas internamente o porciones de las mismas). Además de la radioterapia, los ejemplos no limitantes de los fármacos y agentes que se pueden utilizar para inducir dicha muerte de células tumorales y vacunación interna son los agentes quimioterapéuticos convencionales, los inhibidores del ciclo celular, los fármacos anti-angiogénesis, los anticuerpos monoclonales, los agentes inductores de la apoptosis, y los inhibidores de la transducción de la señal.

Los ejemplos de otros agentes anti-cancerosos, que pueden ser relevantes como agentes terapéuticos para su uso combinado con un anticuerpo anti-TF para el tratamiento de los trastornos descritos anteriormente son agentes que inducen la diferenciación, análogos del ácido retinoico (tales como ácido todo-trans-retinoico, ácido 13-cis retinoico y agentes similares), análogos de la vitamina D (como seocalcitol y agentes similares), inhibidores de ErbB3, ErbB4, IGF-IR, receptor de insulina, PDGFRa, PDGFRbeta, Flk2, Flt4, FGFR1, FGFR2, FGFR3, FGFR4, TRKA, TRKC, c-met, Ron, Sea, Tie, Tie2, Eph, Ret, Ros, Alk, LTK, PTK7 y agentes similares.

Los ejemplos de otros agentes anti-cancerosos, que pueden ser relevantes como agentes terapéuticos para su uso combinado con un anticuerpo anti-TF para el tratamiento de los trastornos descritos anteriormente son la catepsina B, los moduladores de la actividad deshidrogenasa D de la catepsina, la glutatión-S-transferasa (tal como glutacilcisteína sintetasa y lactato deshidrogenasa), y agentes similares.

Los ejemplos de otros agentes anti-cancerosos, que pueden ser relevantes como agentes terapéuticos para su uso combinado con un anticuerpo anti-TF para el tratamiento de los trastornos descritos anteriormente son estramustina y epirubicina.

Los ejemplos de otros agentes anti-cancerosos, que pueden ser relevantes como agentes terapéuticos para su uso combinado con un anticuerpo anti-TF para el tratamiento de los trastornos descritos anteriormente son un inhibidor de HSP90 como 17-alilamino geldanamicina, anticuerpos dirigidos contra un antígeno tumoral tal como PSA, CA125, KSA, etc., integrinas como la integrina β1, inhibidores de VCAM y agentes similares.

Los ejemplos de otros agentes anti-cancerosos, que pueden ser relevantes como agentes terapéuticos para su uso combinado con un anticuerpo anti-TF para el tratamiento de los trastornos descritos anteriormente son los inhibidores de calcineurina (tales como valsopodar, PSC 833 y otros inhibidores de MDR-1 o p-glicoproteína), inhibidores de Tor (tales como sirolimus, everolimus y rapamicina), e inhibidores de mecanismos de "anidamiento de linfocitos" (tales como FTY720), y agentes con efectos sobre la señalización celular, tales como inhibidores de moléculas de adherencia (por ejemplo anti-LFA, etc.).

En una realización, el anticuerpo anti-TF de la invención es para uso combinado con uno o más de otros anticuerpos

- terapéuticos, tales como bevacizumab (Avastin®), zalutumumab, cetuximab (Erbitux®), panitumumab (Vectibix™), ofatumumab, zanolimumab, daratumumab, ranibizumab (Lucentis®), Zenapax, Simulect, Remicade, Humira, Tysabri, Xolair, raptiva, nimotuzumab, rituximab y/o trastuzumab (Herceptin®). Otros anticuerpos terapéuticos que se pueden utilizar combinados con el anticuerpo de la presente invención son los descritos en los documentos WO98/40408 (anticuerpos que se pueden unir a TF humano nativo), WO04/094475 (anticuerpos capaces de unirse al factor tisular humano, que no inhiben la coagulación sanguínea mediada por el factor en comparación con un control de plasma normal), WO03/093422 (anticuerpos que se unen con mayor afinidad al complejo TF:VIIa que a TF solo), o WO03/037361 (agonista o antagonista de TF para el tratamiento relacionado con la apoptosis).
- 5 En otra realización, se utilizan dos o más anticuerpos diferentes de la invención como se describe en la presente memoria combinados para el tratamiento de la enfermedad. Las combinaciones particularmente interesantes incluyen dos o más anticuerpos que no compiten entre sí. Por lo tanto, en una realización, un paciente es tratado con una combinación de un anticuerpo del Grupo I de bloque cruzado definido en la presente memoria con un anticuerpo del Grupo II o III, como se define en la presente memoria. En otra realización, un paciente es tratado con una combinación de un anticuerpo del Grupo II como se define en la presente memoria más abajo, con un anticuerpo del Grupo III. Semejante terapia combinada puede conducir a la unión de un mayor número de moléculas de anticuerpo por célula, lo que puede proporcionar un aumento de la eficacia, p. ej., través de la activación de la lisis mediada por el complemento.
- 10 En una realización, se puede administrar un anticuerpo anti-TF en relación con el suministro de uno o más agentes que promueven el acceso del anticuerpo anti-TF o la composición combinada al interior de un tumor. Tales métodos se pueden llevar a cabo, por ejemplo, en asociación con el suministro de una relaxina, que es capaz de relajar un tumor (véase, por ejemplo, el documento US 6.719.977). En una realización, un anticuerpo anti-TF de la presente invención puede estar unido a un péptido de penetración en las células (CPP). Los péptidos de penetración en las células y péptidos relacionados (tales como anticuerpos de penetración en células modificados) son descritos, por ejemplo, por Zhao et al., *J Immunol. Methods* 254(1-2), 137-45 (2001), Hong et al., *Cancer Res.* 60(23), 6551-6 (2000). Lindgren et al., *Biochem J.* 377 (Pt 1), 69-76 (2004), Buerger et al., *J Cancer Res Clin Oncol.* 129(12), 669-75 (2003), Pooga et al., *FASEB J.* 12 (1), 67-77 (1998) y Tseng et al., *Mol Pharmacol.* 62(4), 864-72 (2002).
- 20 En una realización, la presente invención proporciona un método para el tratamiento de un trastorno que afecta a las células que expresan TF en un sujeto, cuyo método comprende la administración de una cantidad terapéuticamente eficaz de un anticuerpo anti-TF y al menos un agente antiinflamatorio a un sujeto que lo necesite.
- 25 En una realización semejante agente anti-inflamatorio se puede seleccionar entre aspirina y otros salicilatos, inhibidores de Cox-2 (tales como rofecoxib y celecoxib), AINE (tales como ibuprofeno, fenoprofeno, naproxeno, sulindac, diclofenaco, piroxicam, ketoprofeno, diflunisal, nabumetona, etodolaco, oxaprozina, e indometacina), anticuerpos anti-IL6R, anticuerpos anti-IL8 (p. ej., los anticuerpos descritos en los documentos WO2004058797, p.ej. 10F8), anticuerpos anti-IL15 (p. ej. los anticuerpos descritos en los documentos WO03017935 y WO2004076620), los anticuerpos anti-IL15R, los anticuerpos anti-CD4 (p. ej., zanolimumab), los anticuerpos anti-CD11a (p. ej., efalizumab), los anticuerpos anti-alfa-4/beta-1 integrina (VLA4) (p. ej. natalizumab), CTLA4-Ig para el tratamiento de enfermedades inflamatorias, prednisolona, prednisona, fármacos antirreumáticos modificadores de la (FAME) tales como metotrexato, hidroxicloroquina, sulfasalazina, inhibidores de la síntesis de pirimidina (tales como leflunomida), agentes de bloqueo de los receptores de IL-1 (tales como anakinra), agentes de bloqueo de TNF- $\alpha$  (tales como etanercept, infliximab y adalimumab) y agentes similares.
- 30 En una realización, semejante agente inmunosupresor y/o inmunomodulador se puede seleccionar entre ciclosporina, azatioprina, ácido micofenólico, micofenolato de mofetilo, corticosteroides tales como prednisona, metotrexato, sales de oro, sulfasalazina, antimaláricos, brequinar, leflunomida, mizoribina, 15-desoxiespergualina, 6-mercaptopurina, ciclofosfamida, rapamicina, tacrolimus (FK-506), OKT3, globulina anti-timocitos, timopentina, timosina- $\alpha$  y agentes similares.
- 35 En una realización, semejante agente inmunosupresor y/o inmunomodulador se puede seleccionar entre anticuerpos inmunosupresores, tales como anticuerpos de unión a p75 del receptor de IL-2, anticuerpos contra CD25 (p. ej., los descritos en los documentos WO2004045512, tales como AB1, AB7, AB11 y AB12), o anticuerpos que se unen, por ejemplo, a MHC, CD2, CD3, CD4, CD7, CD28, B7, CD40, CD45, IFN $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-4, IL-5, IL-6R, IL-7, IL-8, IL-10, CD11a, CD58 o, anticuerpos que se unen a sus ligandos.
- 40 En una realización, semejante agente inmunosupresor y/o inmunomodulador se puede seleccionar entre IL-15R soluble, IL-10, moléculas de B7 (B7-1, B7-2, variantes de las mismas, y fragmentos de las mismas), ICOS, y OX40, una inhibidor de un regulador negativo de las células T (tal como un anticuerpo contra CTLA4) y agentes similares.
- 45 En una realización, la presente invención proporciona un método para el tratamiento de un trastorno que afecta a las células que expresan TF en un sujeto, cuyo método comprende la administración de una cantidad terapéuticamente eficaz de un anticuerpo anti-TF y un anticuerpo anti-C3b(i) a un sujeto que lo necesite.
- 50 En una realización, la presente invención proporciona un método para el tratamiento de un trastorno que afecta a las células que expresan TF en un sujeto, cuyo método comprende la administración de una cantidad terapéuticamente eficaz de un anticuerpo anti-TF y un anticuerpo anti-C3b(i) a un sujeto que lo necesite.
- 55 En una realización, la presente invención proporciona un método para el tratamiento de un trastorno que afecta a las células que expresan TF en un sujeto, cuyo método comprende la administración de una cantidad terapéuticamente eficaz de un anticuerpo anti-TF y un anticuerpo anti-C3b(i) a un sujeto que lo necesite.
- 60 En una realización, la presente invención proporciona un método para el tratamiento de un trastorno que afecta a las células que expresan TF en un sujeto, cuyo método comprende la administración de una cantidad terapéuticamente eficaz de un anticuerpo anti-TF y un anticuerpo anti-C3b(i) a un sujeto que lo necesite.

En una realización, el agente terapéutico para su uso combinado con los anticuerpos anti-TF para el tratamiento de los trastornos descritos anteriormente puede ser seleccionado entre inhibidores de histona desacetilasa (por ejemplo fenilbutirato) y/o agentes de reparación del ADN (por ejemplo enzimas de reparación del ADN y composiciones relacionadas tales como Dimericina).

5 Los métodos de la presente invención para el tratamiento de un trastorno como se describe anteriormente que comprende la administración de una cantidad terapéuticamente eficaz de un anticuerpo anti-TF pueden comprender también la terapia fotodinámica dirigida anti-cancerosa (por ejemplo la terapia láser anti-cancerosa - que  
10 opcionalmente se puede poner en práctica con el uso de un agente fotosensibilizante, véase, por ejemplo, Zhang et al., J. Control Release. 93(2), 141-50 (2003)), ondas de sonido anti-cancerosas y terapias de ondas de choque (véase, por ejemplo, Kambe et al., Hum Cell. 10(1), 87-94 (1997)), y/o terapia nutracéutica anti-cancerosa (véanse, por ejemplo Roudebush et al., Vet Clin North Am Small Anim Pract. 34 (1), 249-69, viii (2004) y Rafi, Nutrition. 20(1), 78-82 (2004). Del mismo modo, se puede utilizar un anticuerpo anti-TF para la preparación de una composición  
15 farmacéutica para el tratamiento de un trastorno como se describe anteriormente para su administración con una terapia fotodinámica anti-cancerosa dirigida (por ejemplo terapia láser anti-cancerosa - que opcionalmente se puede poner en práctica con el uso de un agente fotosensibilizante, terapias de ondas de sonido anti-cancerosas y de ondas de choque, y/o terapia nutracéutica anti-cancerosa.

20 En una realización, la presente invención proporciona un método para el tratamiento de un trastorno que afecta a las células que expresan TF en un sujeto, cuyo método comprende la administración de una cantidad terapéuticamente eficaz de un anticuerpo anti-TF, tal como un anticuerpo anti-TF de la presente invención, y radioterapia a un sujeto que lo necesite.

25 En una realización, la presente invención proporciona un método para el tratamiento o la prevención del cáncer, cuyo método comprende la administración de una cantidad terapéuticamente eficaz de un anticuerpo anti-TF, tal como un anticuerpo anti-TF de la presente invención, y radioterapia a un sujeto que lo necesite.

30 En una realización, la presente invención proporciona el uso de un anticuerpo anti-TF, tal como un anticuerpo anti-TF de la presente invención, para la preparación de una composición farmacéutica para el tratamiento del cáncer para ser administrada combinada con radioterapia.

35 La radioterapia puede comprender radiación o administración asociada de radiofármacos proporcionados a un paciente. La fuente de radiación puede ser externa o interna al paciente que está siendo tratado (el tratamiento de radiación puede estar, por ejemplo, en forma de terapia de radiación de haz externo (RHE) o braquiterapia (BT)). Los elementos radiactivos que se pueden utilizar en la práctica de tales métodos incluyen, p. ej., radio, cesio-137, iridio-192, americio-241, oro-198, cobalto-57, cobre-67, tecnecio-99, yodo-123, yodo-131, e indio-111.

40 En una realización adicional, la presente invención proporciona un método para el tratamiento o la prevención del cáncer, cuyo método comprende la administración a un sujeto que lo necesite de una cantidad terapéuticamente eficaz de un anticuerpo anti-TF, tal como un anticuerpo anti-TF de la presente invención, combinada con la cirugía.

45 Como se describió anteriormente, una composición farmacéutica de la presente invención se puede administrar en terapia combinada, es decir, combinada con uno o más agentes relevantes para la enfermedad o afección que se vaya a tratar o bien en forma de composiciones farmacéuticas separadas o con un compuesto de la presente invención coformulado con uno o más agentes terapéuticos adicionales como se ha descrito anteriormente. Tales terapias combinadas pueden requerir dosificaciones menores del compuesto de la presente invención y/o de los agentes coadministrados, evitando de este modo posibles toxicidades o complicaciones asociadas con las diversas monoterapias.

50 Además de lo anterior, otras terapias combinadas interesantes incluyen las siguientes:

- Para el tratamiento del cáncer de páncreas un anticuerpo anti-TF combinado con un antimetabolito, tal como 5-fluorouracilo y/o gemcitabina, posiblemente combinado con uno o más compuestos seleccionados entre: 90Y-hPAM4, ARC-100, ARQ-197, AZD-6244, bardoxolona metilo, cixutumumab, (IMC-A12), folitixorin calcio, GVAX, ipilimumab, KRX-0601, merbarona, MGCD-0103, MORAb-009, PX-12, Rh-Apo2L, TLN-4601, trabedersén, volociximab (M200), WX-671, pemetrexed, rubitecan, ixabepilona, OCX-0191 Vion, 216586-46-8, lapatinib, matuzumab, imatinib, sorafinib, trastuzumab, exabepilona, erlotinib, bevacizumab y cetuximab
- Para el tratamiento del cáncer colorrectal un anticuerpo anti-TF combinado con uno o más compuestos seleccionados entre: gemcitabina, bevacizumab, FOLFOX, FOLFIRI, XELOX, LIF, oxaliplatino, irinotecan, 5-FU/LV, Capecitabina, UFT, agentes de direccionamiento de EGFR, tales como cetuximab, panitumumab, zalutumumab, nimotuzumab; inhibidores de VEGF, o inhibidores de la tirosina quinasa tales como sunitinib.
- Para el tratamiento del cáncer de mama un anticuerpo anti-TF combinado con uno o más compuestos seleccionados entre: antimetabolitos, antraciclinas, taxanos, agentes alquilantes, epotilonas anti-hormonales (femar, tamoxifeno, etc.), inhibidores de ErbB2 (Her2/neu) (tales como Herceptin y agentes similares), CAF/FAC

(ciclofosfamida, doxorubicina, 5FU) AC (ciclo, doxo), CMF (ciclo, metotrexato, 5-FU), Docetaxel + capecitabina, GT (paclitaxel, gemcitabina) FEC (ciclo, epi, 5FU) combinados con herceptina: Paclitaxel +/- carboplatino, Vinorelbina, Docetaxel, CT combinado con lapatinib; Capecitabina

• Para el tratamiento de la vejiga un anticuerpo anti-TF combinado con uno o más compuestos seleccionados entre: antimetabolitos (gemcitabina, pemetrexed, metotrexato), análogos de platino (cisplatino, carboplatino), inhibidores de EGFr (tales como cetuximab o zalutumumab), inhibidores de VEGF (tales como Avastina), doxorubicina, inhibidores de tirosina quinasa tales como gefitinib, trastuzumab, agentes anti-mitótico, tales como taxanos, por ejemplo paclitaxel, y alcaloides de la vinca, por ejemplo vinblastina.

• Para el tratamiento de cáncer de próstata un anticuerpo anti-TF combinado con uno o más compuestos seleccionados entre: terapias hormonales/antihormonales; tales como antiandrógenos, agonistas de hormona liberadora de hormona luteinizante (LHRH), y agentes quimioterápicos, tales como taxanos, mitoxantrona, estramustina, 5FU, vinblastina, ixabepilona,

• Para el tratamiento del cáncer de ovario un anticuerpo anti-TF combinado con uno o más compuestos seleccionados entre: un agente anti-mitótico, tales como taxanos y alcaloides de la vinca, caelyx, topotecan.

#### Usos de diagnóstico

Los anticuerpos anti-TF de la invención también se pueden utilizar con fines de diagnóstico. Por lo tanto, en un aspecto adicional, la invención se refiere a una composición de diagnóstico que comprende un anticuerpo anti-TF como se define en la presente memoria.

En una realización, los anticuerpos anti-TF de la presente invención se pueden utilizar *in vivo* o *in vitro* para el diagnóstico de enfermedades en las que las células activadas que expresan TF desempeñan un papel activo en la patogénesis, mediante la detección de los niveles de TF, o los niveles de células que contienen TF sobre su superficie de membrana. Esto se puede conseguir, por ejemplo, poniendo en contacto una muestra que se va a someter a ensayo, opcionalmente junto con una muestra de control, con el anticuerpo anti-TF en condiciones que permiten la formación de un complejo entre el anticuerpo y TF. Después se detecta la formación de complejos (p. ej. utilizando un ELISA). Cuando se utiliza una muestra de control junto con la muestra de ensayo, el complejo se detecta en ambas muestras y cualquier diferencia estadísticamente significativa en la formación de complejos entre las muestras es indicativa de la presencia de TF en la muestra de ensayo.

Por lo tanto, en un aspecto adicional, la invención se refiere a un método para detectar la presencia de un antígeno TF, o una célula que expresa TF, en una muestra, que comprende:

- poner en contacto la muestra con un anticuerpo anti-TF de la invención o una molécula biespecífica de la invención, en condiciones que permiten la formación de un complejo entre el anticuerpo y TF; y
- analizar si se ha formado un complejo.

En una realización, el método se realiza *in vitro*.

Más específicamente, la presente invención proporciona métodos para la identificación, y el diagnóstico de células y tejidos invasivos y otras células elegidas como diana por los anticuerpos anti-TF de la presente invención, y para el control de la progresión de los tratamientos terapéuticos, el estado después del tratamiento, el riesgo de desarrollar cáncer y la progresión del cáncer.

En un ejemplo de semejante análisis de diagnóstico, la presente invención proporciona un método para diagnosticar el nivel de células invasivas en un tejido que comprende la formación de un inmunocomplejo entre un anticuerpo anti-TF y potenciales tejidos que contienen TF, y la detección de la formación del inmunocomplejo, en donde la formación del inmunocomplejo se correlaciona con la presencia de células invasivas en el tejido. La puesta en contacto se puede llevar a cabo *in vivo*, utilizando anticuerpos marcados aislados y técnicas de formación de imágenes convencionales, o se puede llevar a cabo *in vitro* sobre muestras de tejido.

Los anticuerpos anti-TF se pueden utilizar para detectar péptidos que contienen TF y fragmentos de péptidos en cualquier muestra biológica adecuada mediante cualquier técnica adecuada. Los ejemplos de los inmunoanálisis convencionales proporcionados por la presente invención incluyen, sin limitación, un ELISA, un RIA, análisis FACS, análisis de resonancia de plasmón, análisis cromatográficos, inmunohistoquímica de tejidos, transferencia Western, y/o inmunoprecipitación utilizando un anticuerpo anti-TF. Los anticuerpos anti-TF de la presente invención se pueden usar para detectar TF y TF-fragmentos de seres humanos. Las marcas adecuadas para el anticuerpo anti-TF y/o los anticuerpos secundarios utilizados en tales técnicas incluyen, sin limitación, diversas enzimas, grupos prostéticos, materiales fluorescentes, materiales luminiscentes y materiales radiactivos. Los ejemplos de las enzimas adecuadas incluyen peroxidasa de rábano picante, fosfatasa alcalina,  $\beta$ -galactosidasa, o acetilcolinesterasa; los ejemplos de los complejos de grupos prostéticos adecuados incluyen estreptavidina/biotina y avidina/biotina; los ejemplos de los materiales fluorescentes adecuados incluyen umbeliferona, fluoresceína, isotiocianato de fluoresceína, rodamina, diclorotriazinilamina fluoresceína, cloruro de dansilo o ficoeritrina; un ejemplo de un material luminiscente incluye

luminol; y los ejemplos de los materiales radiactivos adecuados incluyen  $^{125}\text{Y}$ ,  $^{131}\text{I}$ ,  $^{35}\text{S}$ , y  $^3\text{H}$ .

Los anticuerpos anti-TF también se pueden analizar en una muestra biológica por medio de un inmunoanálisis de competición utilizando péptidos TF patrón marcados con una sustancia detectable y un anticuerpo anti-TF no marcado. En tal análisis, la muestra biológica, el patrón o los patrones de péptido TF marcado y los anticuerpos anti-TF se combinan y se determina la cantidad de patrón de Rf marcado unido al anticuerpo anti-TF no marcado. La cantidad de péptido TF en la muestra biológica es inversamente proporcional a la cantidad de patrón de TF marcado unido al anticuerpo anti-TF.

Los anticuerpos anti-TF son particularmente útiles en la formación de imágenes de tumores *in vivo*. La formación de imágenes de tumores asociados con TF *in vivo* se puede realizar por medio de cualquier técnica adecuada. Por ejemplo, el marcaje con  $^{99}\text{Tc}$  o el marcaje con otro isótopo emisor de rayos gamma se pueden utilizar para marcar los anticuerpos anti-TF en los tumores o complejos de anticuerpo anti-TF:TF marcados secundarios (p. ej., marcados con FITC) anti-TF anticuerpo: complejos de TF de tumores formar imágenes con una cámara de centelleo gamma (p. ej., un dispositivo Elscint Apex 409ECT), utilizando típicamente un colimador de alta resolución, de baja energía, o un colimador para todo uso de baja energía. Los tejidos teñidos pueden ser evaluados a continuación para el recuento de la radiactividad como un indicador de la cantidad de péptidos asociados a TF en el tumor. Las imágenes obtenidas mediante la utilización de tales técnicas se pueden utilizar para evaluar la biodistribución de TF en un paciente, mamífero, o tejido, por ejemplo en el contexto de la utilización de TF o fragmentos de TF como un biomarcador para determinar la presencia de células cancerosas invasivas. Las variaciones en esta técnica pueden incluir el uso de imágenes de resonancia magnética (MRI) para mejorar la formación de imágenes a través de técnicas con cámaras gamma. Se describen métodos de inmunocentelleo y principios similares, por ejemplo, por Srivastava (ed.), Radiolabeled Monoclonal Antibodies For Imaging And Therapy (Plenum Press 1988), Chase, "Medical Applications of Radioisotopes", en Remington Pharmaceutical Sciences, 18ª Edición, Gennaro et al., (Eds.), págs. 624-652 (Mack Publishing Co., 1990), y Brown, "Clinical Use of Monoclonal Antibodies" en Biotechnology and Pharmacy 227-49, Pezzuto et al., (Eds.) (Chapman y Hall 1993). Tales imágenes también se pueden utilizar para el suministro dirigido de otros agentes anti-cancerosos, cuyos ejemplos se describen en la presente memoria (p. ej., agentes apoptóticos, toxinas, o composiciones quimioterapéuticas CHOP). Por otra parte, tales imágenes pueden servir también o alternativamente como base para las técnicas quirúrgicas para eliminar tumores. Además, tales técnicas de formación de imágenes *in vivo* puede permitir la identificación y localización de un tumor en una situación en la que se identifica que un paciente tiene un tumor (debido a la presencia de otro biomarcadores, metástasis, etc.), pero el tumor no puede ser identificado mediante las técnicas analíticas convencionales. Todos estos métodos son elementos de la presente invención.

La formación de imágenes *in vivo* y otros métodos de diagnóstico proporcionados por la presente invención son particularmente útiles en la detección de micrometástasis en un paciente humano (p. ej., un paciente al que no se había diagnosticado previamente cáncer o un paciente en un período de recuperación/remisión de un cáncer). Se ha demostrado que las células cancerosas de carcinoma, que pueden representar hasta 90% de todas las células cancerosas, por ejemplo, se tiñen muy bien con composiciones de productos conjugados de anticuerpos anti-TF. La detección con anticuerpos monoclonales anti-TF descrita en la presente memoria puede ser indicativa de la presencia de carcinomas que son agresivos/invasivos y puede proporcionar también o alternativamente una indicación de la viabilidad de la utilización de un anticuerpo monoclonal anti-TF relacionado contra tales micrometástasis.

En una realización, la presente invención proporciona un método de formación de imágenes *in vivo* en donde un anticuerpo anti-TF de la presente invención se conjuga con agente radio-opaco promotor de la detección, el anticuerpo conjugado se administra a un anfitrión, por ejemplo mediante inyección en el torrente sanguíneo, y se analiza la presencia y localización del anticuerpo marcado en el anfitrión. A través de esta técnica y de cualquier otro método de diagnóstico proporcionado en la presente memoria, la presente invención proporciona un método para el escrutinio de la presencia de células relacionadas con enfermedades en un paciente humano o una muestra biológica tomada de un paciente humano.

Para la formación de imágenes de diagnóstico, los radioisótopos se pueden unir a un anticuerpo anti-TF o bien directamente, o bien indirectamente utilizando un grupo funcional intermediario. Los grupos funcionales intermediarios útiles incluyen quelantes, tales como ácido etilendiaminotetraacético y ácido dietilentriamino-pentaacético (véase por ejemplo el documento US 5.057.313).

Además de los radioisótopos y los agentes radio-opacos, se pueden realizar métodos de diagnóstico utilizando anticuerpos anti-TF que están conjugados con colorantes (por ejemplo con el complejo de biotina-estreptavidina), agentes de contraste, compuestos o moléculas fluorescentes y agentes potenciadores (p. ej., iones paramagnéticos) para la formación de imágenes por resonancia magnética (MRI) (véase, p. ej., la Patente de los Estados Unidos Núm. 6.331.175, que describe técnicas de MRI y la preparación de anticuerpos conjugados con un agente potenciador de MRI). Tales agentes de diagnóstico/detección se pueden seleccionar entre los agentes para su utilización en la formación de imágenes por resonancia magnética, y compuestos fluorescentes. Con el fin de cargar un anticuerpo



anti-TF con metales radiactivos o iones paramagnéticos, puede ser necesario hacerlo reaccionar con un reactivo que tenga una cola larga a la cual se ancla una multiplicidad de grupos quelantes para la unión de los iones. Semejante cola puede ser un polímero tal como una polilisina, un polisacárido, u otra cadena derivatizada o derivatizable que tenga grupos pendientes a lo cuales se pueden unir grupos quelantes tales como p. ej., porfirinas, poliaminas, éteres corona, bistiosemicarbazonas, polioximas, y grupos similares conocidos por ser útiles para este propósito. Los quelatos se pueden acoplar a anticuerpos anti-TF utilizando químicas convencionales.

De este modo, la presente invención proporciona productos conjugados de anticuerpo anti-TF de diagnóstico, en donde el anticuerpo anti-TF se conjuga con un agente de contraste (por ejemplo para la formación de imágenes por resonancia magnética, la tomografía computarizada, o un agente potenciador del contraste de ultrasonidos) o un radionúclido que puede ser, por ejemplo, un isótopo emisor de gamma, beta, alpha, electrones Auger, o positrones.

En un aspecto adicional, la invención se refiere a un kit para la detección de la presencia del antígeno TF, o una célula que expresa TF, en una muestra que comprende

- un anticuerpo anti-TF de la invención o una molécula biespecífica de la invención; y
- instrucciones para la utilización del kit.

En una realización, la presente invención proporciona un kit para el diagnóstico del cáncer que comprende un recipiente que comprende un anticuerpo anti-TF, y uno o más reactivos para la detección de la unión del anticuerpo anti-TF a un péptido TF. Los reactivos pueden incluir, por ejemplo, etiquetas fluorescentes, etiquetas enzimáticas, u otras etiquetas detectables. Los reactivos también pueden incluir anticuerpos secundarios o terciarios o reactivos para reacciones enzimáticas, en donde las reacciones enzimáticas producen un producto que puede ser visualizado. En una realización, la presente invención proporciona un kit de diagnóstico que comprende uno o más anticuerpos anti-TF, de la presente invención en forma marcada o no marcada en uno o varios recipientes adecuados, reactivos para la incubación durante un análisis indirecto, y sustratos o agentes de derivatización para la detección en semejante análisis, dependiendo de la naturaleza de la marca. También se pueden incluir los reactivos de control y las instrucciones para su uso.

Los kits de diagnóstico también pueden ser suministrados para su uso con un anticuerpo anti-TF, tal como un anticuerpo anti-TF conjugado/marcado, para la detección de una actividad celular o para la detección de la presencia de péptidos TF en una muestra de tejido o un anfitrión. En tales kits de diagnóstico, así como en kits para uso terapéutico descritos en otra parte en la presente memoria, se puede proporcionar un anticuerpo anti-TF típicamente en una forma liofilizada en un recipiente, ya sea solo o junto con anticuerpos adicionales específicos para una célula o péptido diana. Típicamente, también se incluyen un portador farmacéuticamente aceptable (p. ej., un diluyente inerte) y/o componentes del mismo, tal como tampón Tris, fosfato, o carbonato, estabilizadores, conservantes, biocidas, biocidas, proteínas inertes, p. ej., albúmina de suero, o similares (típicamente en un recipiente separado para el mezclado) y reactivos adicionales (también típicamente en recipientes separados). En ciertos kits, también se incluye un anticuerpo secundario capaz de unirse al anticuerpo anti-TF, que típicamente está presente en un recipiente separado que típicamente está presente en un recipiente separado. El segundo anticuerpo está conjugado típicamente con una marca y se formula de una manera similar al anticuerpo anti-TF de la presente invención. Utilizando los métodos descritos anteriormente y en otra parte en la presente memoria se pueden utilizar los anticuerpos anti-TF para definir subgrupos de células cancerosas/tumorales y caracterizar tales células y tejidos/crecimientos relacionados.

La detección *in situ* se puede completar retirando un espécimen histológico de un paciente, y proporcionando la combinación de anticuerpos anti-TF marcados, de la presente invención a semejante espécimen. El anticuerpo anti-TF de la presente invención se puede proporcionar aplicando o superponiendo el anticuerpo anti-TF marcado de la presente invención a una muestra biológica. Por medio de la utilización de semejante procedimiento, es posible determinar no solamente la presencia de TF o fragmentos de TF sino también la distribución de tales péptidos en el tejido examinado (p. ej., en el contexto de la evaluación de la diseminación de las células cancerosas). Utilizando la presente invención, los expertos en la técnica percibirán fácilmente que cualquiera de una amplia variedad de métodos histológicos (tales como los procedimientos de tinción) puede ser modificado con el fin de lograr semejante detección *in situ*.

En un aspecto adicional, la invención se refiere a un anticuerpo anti-idiotípico que se une a un anticuerpo anti-TF de la invención como se describe en la presente memoria.

Un anticuerpo anti-idiotípico (Id) es un anticuerpo que reconoce determinantes únicos generalmente asociados con el sitio de unión al antígeno de un anticuerpo. Un anticuerpo Id se puede preparar inmunizando un animal de la misma especie y tipo genético que la fuente de un mAb anti-TF con el mAb para el cual se está preparando un anti-Id. El animal inmunizado puede reconocer y responder típicamente a los determinantes idiotípicos del anticuerpo inmunizante produciendo un anticuerpo para estos determinantes idiotípicos (el anticuerpo anti-Id). Tales anticuerpos se describen por ejemplo en el documento US 4.699.880. Tales anticuerpos se adicionalmenet característicos de la presente invención.

También se puede utilizar un anticuerpo anti-Id como un "inmunógeno" para inducir una respuesta inmunitaria en otro animal más, produciendo un denominado anticuerpo anti-anti-Id. Un anti-anti-Id puede ser epitópicamente idéntico al mAb original, que indujo el anti-Id. De este modo, utilizando anticuerpos para los determinantes idiotípicos de un mAb, es posible identificar otros clones que expresan anticuerpos de idéntica especificidad. Los anticuerpos anti-Id se pueden variar (produciendo de ese modo variantes de anticuerpos anti-Id) y/o derivatizar mediante cualquier técnica adecuada, tales como las descritas en otra parte en la presente memoria con respecto a anticuerpos anti-TF de la presente invención. Por ejemplo, los mAb anti-Id se pueden acoplar a un portador tal como hemocianina de lapa californiana (KLH) y se pueden utilizar para inmunizar ratones BALB/c. Los sueros de estos ratones contendrán típicamente anticuerpos anti-anti-Id que tengan propiedades de unión similares, sino idénticas, a un anticuerpo TF original/parental.

La presente invención se ilustra adicionalmente por medio de los siguientes ejemplos que no deben considerarse una limitación adicional.

## 15 Ejemplos

### Ejemplo 1

#### Constructos de expresión para el factor tisular (TF)

Se generaron constructos de codón completamente optimizado para la expresión de TF o sus dominios extracelulares en células HEK, NSO o CHO. Las proteínas codificadas por estos constructos son idénticas al Acceso GenBank NP\_001984 para TF. Los constructos contenían sitios de restricción adecuados para la clonación y una secuencia de Kozak óptima (Kozak, 1987). Los constructos se clonaron en el vector de expresión de mamífero pEE13.4 (Lonza Biologics) (Bebington, Renner et al. 1992), obteniendo pEE13.4TF. Se utilizó PCR para amplificar la parte, que codifica el dominio extracelular (ECD) (amino ácido 1-251) de TF, del constructo sintético, añadiendo una etiqueta de His C-terminal que contenía 6 residuos de His (TFECDHis). La construcción se clonó en pEE13.4 y se secuenció completamente para confirmar la corrección del constructo.

### 30 Ejemplo 2

#### Expresión transitoria en células HEK-293F

Las células Freestyle™ 293-F (un subclón de HEK-293 adaptado al medio Freestyle de crecimiento en suspensión y químicamente definido, (HEK-293F)) se obtuvieron de Invitrogen y se transfectaron con el ADN plasmídico apropiado, utilizando 293fectin (Invitrogen) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. En el caso de la expresión del anticuerpo, se co-expresaron los vectores de cadena pesada y de cadena ligera apropiados, como se describe en el Ejemplo 10.

### 40 Ejemplo 3

#### Expresión semi-estable en células NSO

Se transfectó de forma estable pEE13.4TF en células NSO y los clones estables se seleccionaron durante el crecimiento en ausencia de glutamina y en presencia de metilsulfoximina (MSX) 7,5 M. Un agrupamiento de clones se desarrolló en cultivo en suspensión, mientras se mantenía la presión de selección. Los agrupamientos se sometieron a análisis para determinar la expresión de FT mediante análisis FACS y se aseguraron para su uso adicional.

### 50 Ejemplo 4

#### Expresión estable en células CHO

Se transfectó de forma estable pEE13.4TF en células CHO-K1SV (Lonza Biologics) y los clones estables se seleccionaron durante el crecimiento en ausencia de glutamina y en presencia de MSX 50 µM. Los clones individuales se seleccionaron y se expandieron y se sometieron a análisis para determinar la expresión de TF mediante análisis FACS como se describe a continuación. Se seleccionaron los clones de alta expresión y se aseguraron para su uso adicional.

### 60 Ejemplo 5

#### Purificación de TF etiquetado con His

Se expresó TFECDHis en células HEK-293F. La etiqueta de His en TFECDHis permite la purificación por medio de

5 cromatografía de afinidad con metal inmovilizado. En este procedimiento, se carga un quelante fijado sobre la resina cromatográfica con cationes  $\text{Co}^{2+}$ . Se incubó el sobrenadante que contiene TFECDDHis con la resina en el modo por lotes (es decir, solución). La proteína etiquetada con His se une fuertemente a las esferas de resina, mientras que otras proteínas presentes en el sobrenadante de cultivo no se unen fuertemente. Después de la incubación las esferas se recuperan del sobrenadante y se empaquetan en una columna. La columna se lava con el fin de eliminar las proteínas débilmente unidas. Las proteínas TFECDDHis fuertemente unidas se eluyen a continuación con un tampón que contiene imidazol, que compite con la unión de His a  $\text{Co}^{2+}$ . El eluyente se retira de la proteína mediante intercambio de tampón en una columna de desalación.

10 Ejemplo 6

Procedimiento de inmunización de ratones transgénicos

15 Los ratones HuMab fueron inmunizados cada quince días alternando con  $5 \times 10^6$  células NSO-TF transfectadas semi-estables, o con 20  $\mu\text{g}$  de proteína TFECDDHis. Se realizaron ocho inmunizaciones en total, cuatro inmunizaciones intraperitoneales (IP) y cuatro subcutánea (SC) en la base de la cola. La primera inmunización con células se llevó a cabo en adyuvante completo de Freund (CFA; Difco Laboratories, Detroit, MI, EE.UU.). Para todas las otras vacunas, se inyectaron células IP en PBS y se inyectó TFECDDHis SC utilizando coadyuvante incompleto de Freund (IFA; Difco Laboratories, Detroit, MI, USA). Cuando se encontró que los títulos séricos eran suficientes (dilución de suero de 1/50 o menor que de positivo en análisis de escrutinio específico de antígeno como se describe en el Ejemplo 7 durante al menos 2 eventos de escrutinio secuenciales, cada dos semanas), los ratones fueron reforzados dos veces por vía intravenosa (IV) con 10  $\mu\text{g}$  de la proteína TFECDDHis en 100  $\mu\text{l}$  de PBS, 4 y 3 días antes de la fusión.

25 La primera inmunización con células se realizó en CFA, para todas las demás (7) inmunizaciones las células se inyectaron IP en PBS. Cuando se encontró que los títulos en suero eran suficientes, los ratones fueron reforzados adicionalmente dos veces IV con  $1 \times 10^6$  células NSO-TF transfectadas transitoriamente semi-estables en 100  $\mu\text{l}$  de PBS, 4 y 3 días antes de la fusión.

30 Cuando se encontró que los títulos séricos eran suficientes (definido como antes), los ratones fueron reforzados adicionalmente dos veces por vía intravenosa (IV) con 10  $\mu\text{g}$  de la proteína TFECDDHis en 100  $\mu\text{l}$  de PBS, 4 y 3 días antes de la fusión.

35 Ejemplo 7

Análisis de escrutinio específico de antígeno homogéneo

40 Se determinó la presencia de anticuerpos anti-TF en el suero de ratones inmunizados o sobrenadante de cultivo de hibridoma o transfectoma HuMab (anticuerpo monoclonal humano) por medio de análisis de escrutinio específicos de antígeno homogéneos (cuatro cuadrantes) utilizando Fluorometric Micro volume Assay Technology (FMAT; Applied Biosystems, Foster City, CA, EE.UU.).

45 Para esto, se utilizó una combinación de 3 análisis basados en células y un análisis basado en esferas. En los análisis basados en células, se determinó la unión a células TH1015-TF (células HEK-293F que expresan transitoriamente TF; producidas tal como se describe más arriba) y A431 (que expresan TF en la superficie celular), así como HEK293 de tipo salvaje (no expresan TF, control negativo). En el análisis basado en esferas, se determinó la unión a TF biotinilado acoplado sobre una esfera de estreptavidina (SB1015-TF).

50 Las muestras se añadieron a las células/cuentas para permitir la unión a TF. Posteriormente, la unión del HuMab se detectó utilizando un producto conjugado fluorescente (anti-IgG humana-Cy5 de cabra; Jackson ImmunoResearch). El anticuerpo anti-TF humano de ratón (ERL; acoplado a Alexa-647 en Genmab) se utilizó como control positivo, el suero agrupado HuMab-ratón y el anticuerpo de ratón-chrompure-Alexa647 se utilizaron como controles negativos. Las muestras fueron barridas utilizando un Applied Biosystems 8200 Cellular Detection System (8200 CDS) y los 'recuentos x fluorescencia' se utilizaron como lectura.

55 Ejemplo 8

Generación de hibridoma HuMab

60 Los ratones HuMab con suficiente desarrollo de título específico de antígeno (definido como antes) fueron sacrificados y se recogieron el bazo y los ganglios que flanquean la aorta y la vena cava abdominal. La fusión de los esplenocitos y las células de ganglios linfáticos a una línea celular de mieloma de ratón preparada mediante electrofusión usando un CEEF 50 Electrofusion System (Cyto Pulse Sciences, Glen Burnie, MD, EE.UU.), esencialmente de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Selección y cultivo de los hibridomas HuMab

resultantes se realizó basándose en protocolos convencionales (p. ej., como describen Coligan J.E., Bierer, B.E., Margulies, D.H., Shevach, E.M. y Strober, W., eds., *Current Protocols in Immunology*, John Wiley & Sons, Inc., 2006).

## 5 Ejemplo 9

### Espectrometría de masas de anticuerpos purificados

10 Se purificaron pequeñas alícuotas de 0,8 ml de sobrenadante que contenía anticuerpo de la fase de 6 pocillos o Hyperflask utilizando columnas PhyTip que contenían resina de Proteína G (PhyNexus Inc., San José, EE.UU.) en una estación de trabajo SciClone ALH 3000 (Caliper Lifesciences, Hopkinton, EE.UU.). Las columnas PhyTip se utilizaron de acuerdo con las instrucciones del fabricante, pero los tampones se sustituyeron por: Binding Buffer PBS (B. Braun, Medical BV, Oss, Países Bajos) y Tampón de Elución glicina-HCl 0,1 M pH 2,7 (Fluka Riedel-de Haen, Buchs, Alemania). Después de la purificación, las muestras se neutralizaron con Tris-HCl 2 M pH 9,0 (Sigma-Aldrich, Zwijndrecht, Países Bajos). Alternativamente, en algunos casos se purificaron mayores volúmenes de sobrenadante de cultivo utilizando cromatografía en columna de afinidad con Proteína A.

20 Después de la purificación, las muestras se colocaron en una placa de 384 pocillos (Waters, placa cuadrada de 100 µl, parte Núm. 186002631). Las muestras se desglucosilaron durante la noche a 37°C con N-glicosidasa F (Roche Núm. Cat. 11365177001). Se añadió DTT (15 mg/ml) (1 µl/pocillo) y se incubó durante 1 h a 37°C. Las muestras (5 o 6 µl) se desalaron en una Acquity UPLC™ (Waters, Milford, EE.UU.) con una columna BEH300 C18, 1,7 µm, 2,1x50 mm a 60°C. Se utilizaron MQ agua y acetonitrilo de calidad LC-MS (Biosolve, Núm. Cat. 01204101, Valkenswaard, Países Bajos) ambos con ácido fórmico al 0,1% (Fluka, Núm. Cat. 56302, Buchs, Alemania), como Eluyentes A y B, respectivamente. Los espectros de masas de ionización por electrospray con tiempo de vuelo se registraron en línea sobre un espectrómetro de masas micrOTOF™ (Bruker, Bremen, Alemania) funcionando en el modo de iones positivos. Antes del análisis, se calibró una escala de 900 a 3000 m/z con mezcla de sintonización ES (Agilent Technologies, Santa Clara, EE.UU.). Los espectros de masas se desconvolucionaron con soporte lógico DataAnalysis™ v. 3.4 (Bruker) utilizando el algoritmo de Máxima Entropía en busca de pesos moleculares comprendidos entre 5 y 80 kDa.

30 Después de la desconvolución se compararon las masas de la cadena pesada y ligera resultantes para todas las muestras con el fin de encontrar anticuerpos duplicados. En la comparación de las cadenas pesadas se tuvo en cuenta la posible presencia de variantes de lisina C-terminal. Esto dio como resultado una lista de anticuerpos únicos, donde único se define como una combinación única de las cadenas pesadas y ligeras. En caso de que se encontraran anticuerpos duplicados, se utilizaron los resultados de otras pruebas para decidir cuál era el mejor material para continuar con los experimentos.

40 El análisis MS de los pesos moleculares de las cadenas pesada y ligera de los 118 hibridomas específicos de TF produjo 70 anticuerpos únicos (combinación única de cadena pesada/cadena ligera).

Estos se caracterizaron en diversos análisis funcionales, identificando 14 anticuerpos específicos de TF candidatos principales.

## 45 Ejemplo 10

### Análisis de secuencia de los dominios variables de HuMab anti-TF y clonación en vectores de expresión

50 Se preparó el ARN total de los HuMab anti-TF a partir 5x10<sup>6</sup> células de hibridoma y ADN complementario (ADNc) de 5'-RACE a partir de 100 ng de ARN total, utilizando el SMART RACE cDNA Amplification Kit (Clontech), de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Las regiones codificantes de VH (región variable de cadena pesada) y VL (región variable de cadena ligera) fueron amplificadas mediante PCR y se clonaron en el vector pCR-Blunt II-TOPO (Invitrogen) utilizando el kit de clonación Zero Blunt PCR (Invitrogen). Para cada HuMab, se secuenciaron 16 clones de VL y 8 clones de VH. Las secuencias se proporcionan en la Lista de Secuencias y la Figura 1 en la presente memoria. La Tabla 1A y la Tabla 1B (a continuación) proporcionan una visión general de la información de las secuencias de anticuerpos y las secuencias de la línea germinal más homólogas.

ES 2 604 635 T3

Tabla 1 A Homologías de la cadena pesada

Ab	GEN V y alelo	Identidad de la REGIÓN V, %	GEN J y alelo	GEN D y alelo	longitudes CDR-IMGT
003	IGHV1-69*02, o IGHV1-69*04	97,57% (nt 281/288)	IGHJ4*02	IGHD6-13*01	[8,8,11]
098	IGHV1-69*04	95,49% (nt 275/288)	IGHJ3*02	IGHD2-21*02	[8,8,11]
011	IGHV3-23*01	96,53% (nt 278/288)	IGHJ4*02	IGHD1-26*01	[8,8,11]
017	IGHV3-23*01	98,26% (nt 283/288)	IGHJ2*01	IGHD2-15*01	[8,8,13]
092	IGHV3-23*01	97,92% (nt 282/288)	IGHJ4*02	IGHD7-27*01	[8,8,11]
101	IGHV3-23*01	95,83% (nt 276/288)	IGHJ4*02	IGHD7-27*01	[8,8,11]
025	IGHV3-30-3*01	97,57% (nt 281/288)	IGHJ4*02	IGHD7-27*01	[8,8,13]
109	IGHV3-30-3*01	96,18% (nt 277/288)	IGHJ4*02	IGHD7-27*01	[8,8,13]
111	IGHV3-30-3*01	97,57% (nt 281/288)	IGHJ4*02	IGHD3-10*01	[8,8,13]
114	IGHV3-33*01, o IGHV3-33*03	94,44% (nt 272/288)	IGHJ6*02	IGHD3-10*01	[8,8,12]
013	IGHV5-51*01	99,65% (nt 287/288)	IGHJ3*02	IGHD6-13*01	[8,8,19]

Tabla 1 B Homologías de la cadena ligera

Ab	GEN V y alelo	Identidad de la REGIÓN V, % (nt)	GEN J y alelo	Longitudes de CDR-IMGT
003	IGKV1-13*02	99,28% (nt 277/279)	IGKJ4*01	[6.3.9]
011	IGKV1D-16*01	98,57% (nt 275/279)	IGKJ2*01	[6.3.9]
013	IGKV1D-16*01	98,57% (nt 275/279)	IGKJ5*01	[6.3.9]
092	IGKV1D-16*01	99,28% (nt 277/279)	IGKJ2*01	[6.3.10]
098	IGKV1D-16*01	100,00% (nt 279/279)	IGKJ2*01	[6.3.9]
101	IGKV1D-16*01	100,00% (nt 279/279)	IGKJ2*01	[6.3.10]
025	IGKV3-11*01	100,00% (nt 279/279)	IGKJ4*01	[6.3.9]
109	IGKV3-11*01	99,64% (nt 278/279)	IGKJ4*01	[6.3.9]
017	IGKV3-20*01	99,29% (nt 280/282)	IGKJ1*01	[7.3.9]
114	IGKV3-20*01	99,65% (nt 281/282)	IGKJ4*01	[7.3.8]

## ES 2 604 635 T3

Referencias a la lista de secuencias:

Región VH	
SEQ ID NO: 1	VH 013
SEQ ID NO: 2	VH 013, CDR1
SEQ ID NO: 3	VH 013, CDR2
SEQ ID NO: 4	VH 013, CDR3
SEQ ID NO: 5	VH 114
SEQ ID NO: 6	VH 114, CDR1
SEQ ID NO: 7	VH 114, CDR2
SEQ ID NO: 8	VH 114, CDR3
SEQ ID NO: 9	VH 011
SEQ ID NO: 10	VH 011, CDR1
SEQ ID NO: 11	VH 011, CDR2
SEQ ID NO: 12	VH 011, CDR3
SEQ ID NO: 13	VH 017-D12
SEQ ID NO: 14	VH 017-D12, CDR1
SEQ ID NO: 15	VH 017-D12, CDR2
SEQ ID NO: 16	VH 017-D12, CDR3
SEQ ID NO: 17	VH 042
SEQ ID NO: 18	VH 042, CDR1
SEQ ID NO: 19	VH 042, CDR2
SEQ ID NO: 20	VH 042, CDR3
SEQ ID NO: 21	VH 092-A09
SEQ ID NO: 22	VH 092-A09, CDR1
SEQ ID NO: 23	VH 092-A09, CDR2
SEQ I D No: 24	VH 092-A09, CDR3

## ES 2 604 635 T3

Región VH	
SEQ ID NO: 25	VH 101
SEQ ID NO: 26	VH 101, CDR1
SEQ ID No: 27	VH 101, CDR2
SEQ ID NO: 28	VH 101, CDR3
SEQ ID NO: 29	VH 003
SEQ ID NO: 30	VH 003, CDR1
SEQ ID NO: 31	VH 003, CDR2
SEQ ID NO: 32	VH 003, CDR3
SEQ ID NO: 33	VH 025
SEQ ID NO: 34	VH 025, CDR1
SEQ ID NO: 35	VH 025, CDR2
SEQ ID NO: 36	VH 025, CDR3
SEQ ID NO: 37	VH 109
SEQ ID NO: 38	VH 109, CDR1
SEQ ID NO: 39	VH 109, CDR2
SEQ ID NO: 40	VH 109, CDR3
SEQ ID NO: 41	VH 044
SEQ ID NO: 42	VH 044, CDR1
SEQ ID NO: 43	VH 044, CDR2
SEQ ID NO: 44	VH 044, CDR3
SEQ I D No: 45	VH 087-Lg6
SEQ ID NO: 46	VH 087-Lg6, CDR1
SEQ ID NO: 47	VH 087-Lg6, CDR2

## ES 2 604 635 T3

Región VH	
SEQ ID NO: 48	VH 087-Lg6, CDR3
SEQ ID NO: 49	VH 098
SEQ ID NO: 50	VH 098, CDR1
SEQ I D No: 51	VH 098, CDR2
SEQ ID NO: 52	VH 098, CDR3
SEQ I D No: 53	VH 111
SEG ID No: 54	VH 111, CDR1
SEQ I D No: 55	VH 111, CDR2
SEQ ID NO: 56	VH 111, CDR3
Región VL	
SEQ ID NO: 57	VL 013
SEQ ID NO: 58	VL 013, CDR1
SEQ ID NO: 59	VL 013, CDR2
SEQ ID NO: 60	VL 013, CDR3
SEQ ID NO: 61	VL 114
SEQ ID NO: 62	VL 114, CDR1
SEQ ID NO: 63	VL 114, CDR2
SEQ ID NO: 64	VL 114, CDR3
SEQ ID NO: 65	VL 011
SEQ ID NO: 66	VL 011, CDR1
SEQ ID NO: 67	VL 011, CDR2
SEQ ID NO: 68	VL 011, CDR3
SEQ ID NO: 69	VL 017-D12



## ES 2 604 635 T3

Región VH	
SEQ ID NO: 70	VL 017-D12, CDR1
SEQ ID NO: 71	VL 017-D12, CDR2
SEQ ID NO: 72	VL 017-D12, CDR3
SEQ ID NO: 73	VL 042
SEQ ID No: 74	VL 042, CDR1
SEQ ID NO: 75	VL 042, CDR2
SEQ ID NO: 76	VL 042, CDR3
SEG ID No: 77	VL 092-A09
SEQ ID NO: 78	VL 092-A09, CDR1
SEQ ID NO: 79	VL 092-A09, CDR2
SEQ ID NO: 80	VL 092-A09, CDR3
SEQ ID NO: 81	VL 101
SEQ ID NO: 82	VL 101, CDR1
SEQ ID NO: 83	VL 101, CDR2
SEQ ID NO: 84	VL 101, CDR3
SEQ ID NO: 85	VL 003
SEQ ID NO: 86	VL 003, CDR1
SEQ ID NO: 87	VL 003, CDR2
SEG ID No: 88	VL 003, CDR3
SEQ ID NO: 89	VL 025
SEQ ID NO: 90	VL 025, CDR1
SEQ ID NO: 91	VL 025, CDR2
SEQ ID NO: 92	VL 025, CDR3

## ES 2 604 635 T3

Región VH	
SEQ ID NO: 93	VL 109
SEQ ID NO: 94	VL 109, CDR1
SEQ ID NO: 95	VL 109, CDR2
SEQ ID NO: 96	VL 109, CDR3
SEQ ID NO: 97	VL 044
SEQ ID No: 98	VL 044, CDR1
SEQ ID NO: 99	VL 044, CDR2
SEQ ID NO: 100	VL 044, CDR3
SEQ ID NO: 101	VL 087
SEQ ID NO: 102	VL 087, CDR1
SEQ ID NO: 103	VL 087, CDR2
SEQ ID NO: 104	VL 087, CDR3
SEQ ID NO: 105	VL 098
SEQ ID NO: 106	VL 098, CDR1
SEQ ID NO: 107	VL 098, CDR2
SEQ ID NO: 108	VL 098, CDR3
SEQ ID NO: 109	VL 111
SEQ ID NO: 110	VL 111, CDR1
SEQ ID NO: 111	VL 111, CDR2
SEQ ID NO: 112	VL 111, CDR3

### Ejemplo 11

#### Purificación de anticuerpos

5 El sobrenadante del cultivo se filtró sobre filtros directos de 0,2 µm y se cargó en columnas de Proteína A de 5 ml (rProteína A FF, Amersham Bioscience) y se eluyó con ácido cítrico-NaOH 0,1 M, pH 3. El eluato se neutralizó inmediatamente con Tris-HCl 2M, pH 9 y se sometió a diálisis durante la noche a 12,6 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, NaCl 140 mM, pH 7,4 (B. Braun). Después de la diálisis muestras se esterilizaron mediante filtración sobre filtros directos de 0,2

10 µm. La pureza se determinó mediante SDS-PAGE y la concentración se midió mediante nefelometría y absorbancia a 280 nm. Los anticuerpos purificados se dividieron en alícuotas y se almacenaron a -80°C. Una vez descongeladas, las alícuotas de los anticuerpos purificados se mantuvieron a 4°C. Se realizó la espectrometría de masas para identificar la masa molecular de las cadenas pesadas y ligeras de los anticuerpos expresadas por los hibridomas como se describe en el Ejemplo 9.

Ejemplo 12

Estudios de competición cruzada de anticuerpos utilizando ELISA sándwich

5 Los pocillos de la placa de ELISA se recubrieron durante la noche a +4°C con cada uno de los HuMAbs anti-TF (0,5 ó 2 µg/ml 100 µl/pocillo) diluidos en PBS. Los pocillos de ELISA se lavaron con PBS, se bloquearon durante una hora a temperatura ambiente con de suero de pollo al 2% (v/v) (Gibco, Paisley, Escocia) en PBS y se lavaron de nuevo con PBS. Posteriormente, se añadieron 50 µl de HuMab anti-TF (10 µg/mL), seguido de 50 µl de TFECdHis (0,5 ó 1 µg/ml) (generado en Genmab; Ejemplo 5), y se incubaron durante 1 hora a RT (con agitación). Las placas se lavaron 3 veces con PBST (PBS + Tween al 0,05%), y se incubaron con biotina BAM050 anti-His diluido 1:2000 durante una hora a RT (con agitación). Las placas se lavaron y se incubaron con estreptavidina-poli-HRP (Sanquin, 10 Amsterdam, Países Bajos) durante 20 minutos a RT, y se lavaron de nuevo. La reacción se desarrolló adicionalmente con ABTS (Roche Diagnostics) a RT en la oscuridad, se detuvo después de 15 minutos mediante la adición de ácido oxálico al 2% (p/v) y se midió la absorbancia a 405 nm.

15 La Tabla 2 muestra que pudieron ser identificados 3 grupos de bloqueo cruzado (grupos de anticuerpos que competían entre sí por la unión a TFECdHis), perteneciendo los anticuerpos 013, 044 y 087-LG6 a un grupo de bloqueo cruzado (grupo I), perteneciendo los anticuerpos 011, 017-D12, 42, 092-A09 y 101 a otro grupo de bloqueo cruzado (grupo II), y perteneciendo los anticuerpos 003, 025, 109 y 111 a un tercer grupo de bloqueo cruzado (grupo III). Se encontró que el anticuerpo 114 competía por la unión a TFECdHis con anticuerpos, del grupo II y III de bloqueo cruzado. La unión del anticuerpo 098 a TFECdHis podría experimentar competición por anticuerpos del grupo II y III de bloqueo cruzado.

20

Anticuerpo competidor (10 µg/ml)	I			II				
	recubrimiento 0,5 µg	recubrimiento 2 µg	recubrimiento 2 µg	recubrimiento 0,5 µg	recubrimiento 0,5 µg	recubrimiento 0,5 µg	recubrimiento 0,5 µg	recubrimiento 0,5 µg
	13	44	087-LG6	11	017-D12	42	092-A09	101
13	19	5	28	101	100	98	110	98
44	93	40	29	109	96	96	103	109
087-LG6	91	54	41	103	93	95	109	93
11	96	143	929	20	34	35	21	23
017-D12	97	143	995	14	25	20	8	12
42	99	143	931	18	28	27	10	17
092-A09	95	143	995	22	37	37	32	24
101	96	100	714	10	15	15	10	12
114	101	143	995	21	34	34	19	22
098	95	143	995	90	93	97	91	86
3	84	118	770	100	95	91	96	88
25	102	143	995	117	96	108	111	100
109	96	143	995	101	100	101	99	102
111	89	143	995	110	93	102	95	108

	II/III		III			
Anticuerpo competidor (10 µg/ml)	114	98	3	26	109	113
13	105	320	85	89	110	175
44	105	330	80	108	94	175
87-Lg6	107	210	88	105	103	115
11	19	9	103	104	109	175
017-012	9	9	100	108	97	175
42	24	8	98	93	111	155
092-A09	22	10	103	108	101	175
101	11	7	96	108	106	118
114	13	9	100	47	26	5
96	94	24	103	94	86	35
5	102	10	33	22	10	6
26	28	10	48	34	11	6
109	44	9	62	51	17	6
113	99	37	89	104	93	43

Tabla 2 - Competición de anticuerpos anti-TF por la unión a TFECdHis.

5 Las casillas de color blanco indican que no hay competición por la unión, las casillas de color gris claro indican competición parcial por la unión, y las casillas de color gris oscuro indican competición por la unión a TFECdHis.

Ejemplo 13

Unión de los HuMAb anti-TF al dominio extracelular de TF en el ELISA

10 La especificidad de los HuMAbs anti-TF obtenidos se evaluó mediante ELISA. Las placas de ELISA (Microton; Greiner Bio-One) se recubrieron durante la noche a +4°C con 0,5 µg/ml de TFECdHis en PBS, pH 7,4. Las placas de ELISA recubiertas se vaciaron y se bloquearon durante una hora a temperatura ambiente con suero de pollo al 2% (v/v) (Gibco, Paisley, Escocia) en PBS y se lavaron con PBS que contenía Tween 20 al 0,05% (PBST).  
 15 Posteriormente, se incubaron HuMAb, diluidos seriadamente en PBSTC (PBS con un suplemento de 2% (v/v) de suero de pollo y Tween-20 al 0,05% (v/v)), durante 1 hora a RT bajo condiciones de agitación (300 rpm). Los HuMAb unidos se detectaron utilizando anticuerpos de cabra anti-IgG humana conjugados con HRP (Jackson ImmunoResearch) diluidos 1: 5000 en PBSTC, que se incubaron durante 1 hora a RT bajo condiciones de agitación (300 rpm). La reacción se desarrolló adicionalmente con ABTS (Roche Diagnostics) a TA en la oscuridad, se detuvo  
 20 después de 15-30 minutos mediante la adición de ácido oxálico al 2% (p/v) y a continuación se midió la absorbancia a 405 nm. Se utilizó HuMAb-KLH (un anticuerpo monoclonal humano contra KLH (hemocianina de lapa de ojo de cerradura)), como control negativo. se utilizó anti-TF humano de ratón (ERL) como control positivo (anti-IgG de ratón marcado con HRP como producto conjugado). Las curvas de unión se analizaron mediante regresión no lineal (dosis-respuesta sigmoidea con pendiente variable) usando el soporte lógico GraphPad Prism V4.03.

25 Como se puede observar en la Figura 3, todos los anticuerpos anti-TF se unieron a TFECdHis. Los valores de CE<sub>50</sub> para los HuMAb son la media de 3 experimentos y variaron entre 0,09 y 0,46 nM (Tabla 3 a continuación).

Tabla 3

grupo	HuMAb	CE50 nM
	13	0,24
I	44	0,14
I	87-Lg6	0,09

grupo	HuMab	CE50 nM
II	11	0,16
II	017-D12	0,25
II	42	0,23
II	092-A09	0,18
II	101	0,28
II/III	98	0,13
II/III	114	0,17
III	3	0,46
III	25	0,34
III	109	0,27
III	111	0,11

Ejemplo 14

Unión de los HuMAb anti-TF a TF unido a membrana

5

La unión de los HuMAb anti-TF a TF unido a la membrana se determinó mediante análisis FACS, utilizando células CHO transfectadas con TF, o líneas de células tumorales que expresan TF MDA-MB-231, (transfectadas con luciferasa) A431 y Bx-PC3.

10

Las células se resuspendieron en PBS ( $2 \times 10^6$  células/ml), se pusieron en placas de 96 pocillos de fondo en V (50  $\mu$ l/pocillo). Se añadieron 50  $\mu$ l de HuMab diluido seriadamente en tampón FACS (PBS con un suplemento de BSA al 0,1% y azida sódica al 0,02%) a las células y se incubaron durante 30 minutos en hielo. Después de lavar tres veces con tampón FACS, se añadieron 50  $\mu$ l de anti-IgGfC humano de cabra conjugado con ficoeritrina (PE) (Jackson ImmunoResearch), diluido 1:100 en tampón FACS. Después de 30 minutos en hielo (en la oscuridad), las células se lavaron tres veces, y la unión específica de los HuMAb se detectó mediante citometría de flujo en un FACSCalibur (BD Biosciences). El HuMab-KLH se usó como control negativo. El anti-TF de ratón seguido del anti-IgGfC de ratón conjugado con PE se utilizó como control positivo. Las curvas de unión se analizaron mediante regresión no lineal (dosis-respuesta sigmoidea con pendiente variable) utilizando el soporte lógico GraphPad Prism V4.03 (GraphPad Software, San Diego, CA, EE.UU.).

20

La Figura 4 muestra un ejemplo de curvas de unión de los HuMAb específicos de TF a las células MDA-MB-231. La Tabla 4 presenta un resumen de los valores de CE50 de la unión de los HuMAb específicos de TF a células CHO transfectadas con TF (S1015-TF), células MDA-MB-231, A431 y Bx-PC3.

25

Tabla 4 - Resumen de CE50 y valores del índice máximo de fluorescencia media (IMF max) determinados mediante análisis FACS de la unión de los HuMAb específicos del TF a diferentes tipos de células.

		MDA-MB-231		Bx-PC3		A431		S1015-TF-012	
grupo	HuMab TF	CE50	IMF Max	CE50	IMF Max	CE50	IMF Max	CE50	IMF Max
I	13	1,58	2451	1,86	1305	8,04	3622	1,07	5207
I	44	0,87	1881	1,88	1136	1,45	2646	2,13	5021
I	87-Lq6	8,28	1107	7,19	1030	nt	nt	nt	nt
II	11	0,47	2143	1,01	1280	0,20	2606	1,32	5654

		MDA-MB-231		Bx-PC3		A431		S1015-TF-012	
grupo	HuMab TF	CE50	IMF Max	CE50	IMF Max	CE50	IMF Max	CE50	IMF Max
II	017-D12	1,33	2401	1,61	1422	1,24	3296	1,21	5792
II	42	0,25	1518	2,45	1701	nt	nt	nt	nt
II	092-A09	0,53	2290	0,84	1262	0,83	3137	1,32	5409
II	101	0,85	2071	2,25	1220	3,16	2934	1,77	5859
II/III	98	0,99	1956	1,38	1151	1,40	2755	0,96	5229
II/III	114	0,47	2438	0,80	1407	0,90	3433	1,72	6095
III	3	3,20	1798	4,98	1106	6,94	2530	2,06	4247
III	25	0,69	2254	0,88	1320	5,19	3170	0,73	5808
III	109	2,16	2052	4,04	1324	1,74	3124	0,92	5629
III	111	1,03	1774	1,83	1128	2,88	3043	0,55	5353

Los valores de CE50 están en nM. El IMF Max para las células MDA-MB-231, BxPC3 y A431 con el anticuerpo a 30 µg/mL, para S1015-TF con el anticuerpo a 7,5 µg/ml.

5 Ejemplo 15

Inhibición de la unión de FVI a TF

10 La inhibición de la unión de FVIIa a TFECDis mediante TF-HuMab se midió mediante ELISA. Las placas de ELISA se recubrieron durante la noche con TFECDis (0,5 µg/ml, 100 µL por pocillo). Las placas se vaciaron, se bloquearon con PBS que contenía suero de pollo al 2% (v/v) (1 hora, RT), y se vaciaron de nuevo. Se añadieron a los pocillos diluciones seriadas 1:4 de TF-HuMab o HuMab-KLH (control negativo), seguido de FVIIa a una concentración CE50 (100 nM), y las placas se incubaron durante 1 hora a temperatura ambiente (mientras se agitaba, 300 rpm). Las placas se lavaron y se incubaron con anti-FVIIa de conejo (2,5 µg/ml; Abcam) como antes.

15 Las placas se lavaron y se incubaron con anticuerpo porcino anti-IgG de conejo conjugado con HRP (1:2500; DAKO). Después de lavar, los complejos inmunes se visualizaron utilizando ABTS como sustrato. La reacción se detuvo mediante la adición de ácido oxálico al 2% v/v, seguido por medición de la densidad óptica a 405 nm utilizando un lector de ELISA. La concentración de anticuerpo necesaria para obtener una inhibición de 50% (CI50) se calculó utilizando GraphPad Prism (análisis de regresión no lineal).

20 La Figura 5 muestra que los anticuerpos de los grupos II y III de bloqueo cruzado inhibieron eficazmente la unión de FVIIa a TF, mientras que los anticuerpos del grupo I de bloqueo cruzado no inhibieron (o lo hicieron en un grado mucho menor) la unión de FVIIa.

25 La Tabla 5 muestra los valores de CI50 y valores de inhibición máxima (porcentaje) de inhibición de la unión de FVIIa a TF por los HuMab específicos de TF.

Tabla 5 - Valores de CI50 y valores de inhibición máxima (porcentaje) de inhibición de la unión de FVI a TF por los HuMab específicos de TF

30

grupo	HuMab TF	CI50 nM	Inhibición máx
I	13	19,3	27
I	44	0,8	54
I	87-Lg6	na	35

grupo	HuMab TF	CI50 nM	Inhibición máx
II	11	1,1	91
II	017-D12	1,9	90
II	42	2,7	88
II	092-A09	1,5	90
II	101	0,6	84
II/III	98	0,8	85
II/III	114	1,3	90
III	3	1,9	89
III	25	2,1	90
III	109	1,7	90
III	111	1,7	79

## Ejemplo 16

## Inhibición de la fosforilación de ERK inducida por FVIIa

5 Tras la unión del factor de coagulación Vila (FVIIa) a TF, se activa la fosforilación de la quinasa activada por mitógenos (MAPK p42 y p44 o ERK1 y ERK2). La línea celular A431 de carcinoma epidermoide expresa altos niveles de TF, y después de la estimulación con FVIIa se induce una fosforilación de ERK (ERK-P) óptima (3 a 5 veces), medida utilizando el análisis AlphaScreen Surefire ERK (Perkin Elmer), en el plazo de 10 minutos.

10 Las células A431 (30.000 células por pocillo) se sembraron en placas TC de 96 pocillos, y se cultivaron O/N (37°C, 5% de CO<sub>2</sub>, 85% de humedad) en medio libre de suero (RPMI que contenía HSA al 20% y penicilina/estreptomicina). A continuación, se sustituyó el medio por DMEM (sin aditivos) y se incubaron las células durante 1,5 horas. Se añadieron diluciones seriadas 1:3 de HuMab TF o HuMab-KLH y las células se incubaron durante 0,5 horas. Las células se estimularon a continuación con FVIIa a una concentración EC80 (50 nM; 10 minutos; 37°C, 5% de CO<sub>2</sub>, 85% de humedad). Las células se lavaron una vez con PBS, y se lisaron usando 25 µl de tampón de lisis (Perkin Elmer, kit Surefire). Los productos lisados se centrifugaron (3 minutos, 330 x g, RT). Se transfirieron 4 µl de sobrenadante a Proxiplates de 384 pocillos (Perkin Elmer). Se añadieron 7 µl de mezcla de tampón de Reacción/tampón de Activación que contenía esferas AlphaScreen (kit Surefire de Perkin Elmer), y las placas se incubaron en la oscuridad durante 2 horas a RT. Las placas se leyeron usando el protocolo "Surefire Plus" de la tecnología Envision.

15 La Figura 6 muestra que, medido utilizando el análisis para ERK AlphaScreen Surefire, el anticuerpo 013 no inhibe la fosforilación de ERK inducida por FVIIa, 044 y 111 inhiben moderadamente la fosforilación de ERK, y todos los demás anticuerpos bloquean eficazmente la fosforilación de ERK.

25 La Tabla 6 muestra los valores de CI50 y los valores de inhibición máxima (en porcentaje) de la inhibición de la fosforilación de ERK inducida por VIIa por los HuMab específicos de TF, medida usando el análisis AlphaScreen Surefire ERK.

grupo	HuMab TF	CI50 nM	% inhibición máx
I	13	9,11	26
I	44	> 66,6	45
I	87-Lg6	nt	nt
II	11	0,79	69

grupo	HuMab TF	CI50 nM	% inhibición máx
II	017-D12	2,01	65
II	42	nt	nt
II	092-A09	1,27	68
II	101	1,05	57
II/III	98	1,89	64
II/III	114	1,08	68
III	3	7,99	63
III	25	2,16	66
III	109	2,42	72
III	111	> 66,6	52

Tabla 6 - Valores CI50 y valores de inhibición máxima (porcentaje) de inhibición de la fosforilación de ERK inducida por FVIIa (medida utilizando el análisis para ERK AlphaScreen Surefire) por los HuMab específicos de TF.

5 Los resultados obtenidos en el análisis para ERK AlphaScreen Surefire se confirmaron mediante análisis de  
 10 Transferencia Western, utilizando líneas celulares HaCaT y BxPC3. Se sembraron 30.000 células/pocillo en DMEM  
 que contenía concentraciones mínimas de suero (medio de inanición) y se cultivaron durante la noche. Las células  
 se cultivaron adicionalmente durante 2 horas en DMEM sin suero, se añadieron anticuerpos anti-TF durante los  
 últimos 30 minutos de cultivo. Las células se estimularon con FVIIa 0, 10 o 50 nM durante 10 minutos (37°C), y con  
 15 posterioridad se lisaron en tampón de lisis celular (tampón de lisis de 50 µL por pocillo, lisis de 30-60 minutos en  
 condiciones agitación, RT). Se añadieron a cada muestra 25 µL de tampón de muestra que contenía SDS. Las  
 muestras se cargaron en geles de SDS-PAGE, se hicieron migrar y se transfirieron utilizando procedimientos  
 convencionales para la transferencia Western. Las transferencias se bloquearon con TBST1x que contenía proteína  
 irrelevante al 5% (ELK) durante 1 hora a RT. Las transferencias se incubaron con anticuerpo de conejo anti-ERK-P  
 (O/N, 4°C). Las transferencias se lavaron con TBST1x, y se incubaron con anti-IgG de conejo HRP (1 hora, RT), se  
 lavaron, se revelaron utilizando sustrato de HRP y se obtuvo la imagen utilizando el sistema Optigo Ultima Imaging  
 (Isogen Life Sciences).

20 La Figura 6A muestra los resultados en células BxPC3 para un sub-panel de anticuerpos. La fosforilación de ERK  
 inducida por 10 nM de FVIIa no fue inhibida por el anticuerpo 013, mientras que fue inhibida de manera eficiente por  
 los anticuerpos 111, 044 y 025 (este último como un ejemplo para todos los demás HuMab específicos de TF  
 descritos aquí). La fosforilación más fuerte de ERK inducida (FVIIa 50 nM) no fue inhibida por los anticuerpos 013,  
 111 y 044, pero fue inhibida por el anticuerpo 025.

25 Ejemplo 17

#### Inhibición de la liberación de IL-8 inducida por FVIIa

30 La capacidad de los HuMab específicos de TF para inhibir la liberación inducida por FVIIa de IL-8 se sometió a  
 ensayo utilizando células MDA-MB-231. Las células se sembraron en placas de 96 pocillos (60.000 células/pocillo) y  
 se cultivaron (O/N, 37°C, 5% de CO<sub>2</sub>) en CS que contenía DMEM, piruvato de sodio, L-glutamina, MEM NEAA y  
 penicilina/estreptomina. El medio de cultivo de tejidos se retiró, las células se lavaron dos veces en medio libre de  
 35 suero, con alto contenido de calcio (DMEM que contenía penicilina/estreptomina), y se cultivaron en este medio  
 durante 105 minutos adicionales. Se añadieron diluciones seriadas de anticuerpos, y las células se cultivaron  
 cultivadas durante 15 minutos. Se añadió FVIIa (Novo Nordisk; concentración final 10 nM) y las células se cultivaron  
 durante 5 horas. El sobrenadante se retiró y se centrifugó (300 xg, RT). Se midieron las concentraciones de IL-8 en  
 el sobrenadante utilizando un kit de ELISA de IL-8 de acuerdo con el protocolo del fabricante (Sanquin).

40 La Figura 7 muestra que los anticuerpos de los grupos II y III de bloqueo cruzado inhibían eficazmente la liberación  
 de IL-8 inducida por FVIIa por las células MDA-MB-231, con la excepción del anticuerpo 111 del grupo III de bloqueo  
 cruzado. Ninguno de los anticuerpos del grupo I de bloqueo cruzado (013, 044 y 87-LG6) inhibió la liberación de IL-8



inducida por FVIIa.

La Tabla 7 muestra los valores de CI50 y los valores de inhibición máxima (en porcentaje) de la inhibición de la liberación de IL-8 inducida por FVIIa por los HuMAb específicos de TF.

5

Tabla 7 - Valores de CI50 y valores de inhibición máxima (porcentaje) de la inhibición de la liberación de IL-8 inducida por FVIIa por los HuMAb específicos de TF.

grupo	HuMab TF	CI50 nM	inhibición máx
I	13	na	-0,3
I	44	74,6	17,2
I	87-Lg6	na	4,3
II	11	9,4	61,7
II	017-D12	9,0	65,8
II	42	14,9	53,7
II	092-A09	28,2	66,6
II	101	22,7	74,9
II/III	98	9,3	59,0
II/III	114	9,2	71,5
III	3	23,7	76,2
III	25	23,1	75,6
III	109	13,6	70,4
III	111	>200	<u>40,1</u>

#### 10 Ejemplo 18

##### Inhibición de la generación de Fxa

15 La capacidad de los HuMAb específicos de TF para inhibir la generación de FXa se sometió a ensayo en un análisis en el que se mide la conversión de FX en FXa por el complejo TF/FVIIa utilizando un sustrato específico de FXa colorimétrico. Se añadió TF (Innovin) a placas de 96 pocillos de fondo plano, junto con una dilución seriada de los HuMAb específicos de TF, control positivo (anti-TF de ratón), control negativo (HuMab-KLH) (todo diluido en tampón Hepes que contenía CaCl<sub>2</sub> 3 mM. Las placas se incubaron durante 30 minutos a RT, y se añadieron FVIIa (concentración final 1 nM) y FX (ERL; concentración final 200 nM). Las placas se incubaron durante 30 minutos a 20 37°C. Se transfirieron 50 µl de cada pocillo a una placa de 96 pocillos que contenía tampón de parada (EDTA 5 mM en 100 ml de tampón Hepes) (pre-calentado, 37°C). Se añadió sustrato específico de FXa Chromogenix-2765 (Instrumentation Laboratory Company), las placas se incubaron durante 60 minutos a 37°C y se midió la DO405 nm a 37°C.

25 La Figura 8 muestra que el anticuerpo 017-D12 inhibía fuertemente la generación de FXa, 013 demostró inhibición intermedia y los demás anticuerpos mostraron de baja a ninguna inhibición de la generación de FXa.

La Tabla 8 muestra los valores de CI50 y los valores de inhibición máxima (porcentaje) de la inhibición de la generación de FXa por los HuMAb específicos de TF.

30

Tabla 8 - Valores de CI50 y valores de inhibición máxima (en porcentaje) de la inhibición de la generación de FXa por los HuMAb específicos de TF.

grupo	HuMab TF	CI50 nM	% inhibición máx
I	13	0,05	31
I	44	NA	3
I	87-Lg6	nt	nt
II	11	0,05	26
II	017-D12	0,28	84
II	42	nt	nt
II	092-A09	0,30	21
II	101	nt	nt
II/III	98	0,43	14
II/III	114	0,24	21
III	3	0,07	21
III	25	0,30	19
III	109	0,09	18
III	<u>111</u>	<u>0,07</u>	7

Ejemplo 19

5

Inhibición de la coagulación sanguínea

10

La inhibición de la coagulación de la sangre por los HuMAb TF se midió en un análisis de determinación del tiempo de coagulación inducido por TF. Las mezclas de 17 µl de CaCl<sub>2</sub> 100 mM (conc. final de 17 mM), 10 µl de Innovin 1:100 (conc. final 1:1000), 23 µl de 1x tampón HEPES y se prepararon 50 µl anticuerpo diluido seriadamente en placas de 96 pocillos. Se añadieron 50 µl de plasma humano agrupado a pocillos de placas Immulon 2B (Thermo Electron). Se añadieron 50 µl de las mezclas de anticuerpos preparadas a las placas Immulon 2b, y se midió el desarrollo de la coagulación a 405 nm cada 15 s durante 25 min utilizando un lector de placas cinético. Se representó el aumento de la densidad óptica a lo largo del tiempo y se calculó el tiempo de coagulación (t1/2). El tiempo de coagulación se representó frente a la concentración de anticuerpo. La CI50 de la inhibición de la coagulación inducida por anticuerpos se calculó a partir de esto mediante análisis de regresión no lineal utilizando GraphPad Prism.

15

20

La Figura 9 muestra que los anticuerpos 044, 087 y 111 no inhibieron la coagulación de la sangre inducida por TF, mientras que todos los demás anticuerpos si lo hicieron.

La Tabla 9 muestra los valores de CI50 de inhibición de la coagulación de la sangre por los HuMAb específicos de TF.

25

Tabla 9 - Valores de CI50 de la inhibición de la coagulación de la sangre por los HuMAb específicos de TF.

grupo	HuMab TF	CI50 nM
I	13	0,6
I	44	NA

grupo	HuMab TF	CI50 nM
I	87-Lg6	NA
II	11	1,6
II	017-D12	2,6
II	42	1,5
II	092-A09	0,2
II	101	0,7
II/III	98	1,1
II/III	114	0,4
III	3	7,3
III	25	2,3
III	109	7,6
III	111	NA I

## Ejemplo 20

Citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpos

5

Preparación de las células diana:

Se cosecharon células diana que expresaban TF ( $5 \times 10^6$  células Bx-PC3, células MDA-MB-231 o células A431), se lavaron (dos veces en PBS, 1500 rpm, 5 min) y se recogieron en 1 ml de medio de cultivo RPMI 1640 con un suplemento de Cosmic Calf Serum, Piruvato de Sodio, L-Glutamina, MEM NEAA y Penicilina/Estreptomicina, a lo que se añadieron 100  $\mu$ Ci de  $^{51}\text{Cr}$  (cromo-51; Amersham Biosciences Europe GmbH, Roosendaal, Países Bajos). La mezcla se incubó en un baño de agua con sacudimiento durante 1 hora a 37°C. Después del lavado de las células (dos veces en PBS, 1500 rpm, 5 min), las células se resuspendieron en medio de cultivo y las células viables se contaron mediante exclusión de azul de tripano. Las células viables se llevaron a una concentración de  $1 \times 10^5$  células/ml.

15

Preparación de células efectoras:

Se aislaron células mononucleares de sangre periférica (PBMC) a partir de capas leucocitarias de nueva aportación (Sanquin, Ámsterdam, Países Bajos) utilizando centrifugación por gradiente de densidad Ficoll convencional de acuerdo con las instrucciones del fabricante (medio de separación de linfocitos; Lonza, Verviers, Francia). Después de la resuspensión de las células en medio de cultivo, las células se contaron mediante exclusión de azul de tripano y se llevaron a una concentración de  $1 \times 10^7$  células/ml.

20

25 Establecimiento de la ADCC:

Se transfirieron 50  $\mu$ l de células dianas marcadas con  $^{51}\text{Cr}$  a pocillos de microtitulación, y se añadieron 50  $\mu$ l de anticuerpo diluido seriadamente, diluidos en medio de cultivo. Se incubaron las células (RT, 15 min), y se añadieron 50  $\mu$ l de células efectoras, dando como resultando una razón de efector a diana de 100:1. Para determinar el máximo nivel de lisis, se añadieron 100  $\mu$ l de Triton-X100 al 5% en lugar de las células efectoras; para determinar el nivel espontáneo de la lisis, se añadieron 100  $\mu$ l de medio de cultivo; para determinar el nivel de anticuerpos independiente de la lisis, se añadieron 50  $\mu$ l de células efectoras y 50  $\mu$ l de medio de cultivo). Con posterioridad, las células se incubaron O/N a 37°C, 5% de  $\text{CO}_2$ . Después centrifugar las células (1200 rpm, 3 min), se transfirieron 75  $\mu$ l de sobrenadante a tubos micrónicos. El  $^{51}\text{Cr}$  liberado se contó en un contador gamma y se calculó el porcentaje de lisis mediada por anticuerpo de la siguiente manera:

35

$$\left( \frac{\text{Cpm de la muestra} - \text{cpm de la lisis independiente de anticuerpo}}{\text{cpm de la lisis máxima} - \text{cpm de la lisis espontánea}} \right) \times 100\%$$

en donde es cpm cuentas por minuto.

5 La Figura 10 muestra que todos los HuMAb TF sometidos a ensayo indujeron la lisis de células PC3-Bx por ADCC, aunque con diferentes eficacias (CE50).

10 La Tabla 10 muestra los valores de CE50 (nM) de ADCC de diferentes líneas celulares por HuMAbs específicos de TF.

Tabla 10 - Valores de CE50 (nM) de ADCC de diferentes líneas celulares de HuMAb específicos de TF.

		MDA-MB-231	Bx-PC3	A431
grupo	HuMab TF	CE50	CE50	CE50
I	13	0,06	0,07	0,11
I	44	0,08	0,12	0,19
I	87-Lg6	nt	nt	nt
II	11	0,07	0,22	0,06
II	017-D12	0,14	0,13	0,18
II	42	nt	nt	nt
II	092-A09	0,11	0,13	0,22
II	101	0,10	0,09	0,01
II/III	98	0,15	0,02	0,07
II/III	114	0,07	0,07	0,08
III	3	0,29	0,17	0,58
III	25	0,24	0,15	0,16
III	109	0,12	0,06	0,13
III	111	0,84	0,22	1,56

Ejemplo 21

15 Depósito de complemento

20 El depósito de los fragmentos del complemento C3c y C4c en células diana incubadas con HuMab TF se midió mediante análisis FACS. Se sembraron células diana que expresaban TF (células Bx-PC3 o MDA-MB-231) en placas de fondo redondo de 96 pocillos ( $1 \times 10^5$  células/pocillo) en RPMI que contenía BSA al 1%. Se añadió anticuerpo (30  $\mu\text{g/ml}$ ) y las células se incubaron a RT durante 15 minutos. Se añadieron 25  $\mu\text{L}$  de suero humano reunido como fuente de complemento, el suero humano inactivado por calor se utilizó para determinar la unión espontánea del complemento. Las células se incubaron a 37°C durante 45 minutos. Las células se lavaron una vez, y se incubaron con anti-C3c humano FITC o anti-C4c humano FITC (DAKO) en tampón FACS, y se incubaron durante 30 minutos en hielo. Las muestras se analizaron mediante FACS Canto.

30 La Figura 11 muestra que los anticuerpos de grupo I de bloqueo cruzado no indujeron el depósito de C3c o C4c en ninguna de las células BxPC3 o MDA-MB-231. Todos los anticuerpos sometidos a ensayo de grupo II de bloqueo cruzado indujeron depósito de C3c y C4c, al igual que los anticuerpos de grupo III de bloqueo cruzado, con la excepción del anticuerpo 003.

Ejemplo 22:

Estudios avides/afinidad

5 Determinación de la afinidad:

10 La unión del anticuerpo a TF se analizó mediante resonancia de plasmón superficial en un BIAcore 3000 (GE Healthcare). Se utilizó TFECdHis para el análisis. Los anticuerpos HuMab (500 unidades de resonancia) se inmovilizaron sobre el chip sensor CM-5 de acuerdo con el procedimiento recomendado por el fabricante. En pocas palabras, después de activación de la superficie mediante EDC y NHS el anticuerpo HuMab se inyectó sobre la superficie CM-5 activada en acetato de sodio 10 mM, oscilando el pH de 4,0 a 5,5 a 5 µl/min, seguido de etanolamina 1 M para la desactivación. Se inyectaron una serie de concentraciones de TFECdHis en tampón HBS-EP sobre los anticuerpos inmovilizados a una velocidad de flujo de 30 µl/min durante 180 seg. La regeneración de la superficie de HuMab se realizó mediante la inyección de glicina-HCl 10 mM pH 2,0 o acetato de sodio 10 mM de pH 3,0. El análisis cinético se realizó utilizando la resta doble de referencia y el modelo de análisis de unión 1:1 (Langmuir).

20 La Tabla 1 muestra 1 para la mayoría de los HuMab la afinidad determinada en el intervalo (sub)nanomolar. Los parámetros cinéticos no se pudieron determinar a partir de todos los anticuerpos. 044 produjo una alta variación en las tasas de disociación (kd) y tuvo un elevado nivel de residuos, lo que significa que el ajuste de las curvas no fue bueno. 098, 111 y 087-LG6 tuvieron tasas de disociación, que fueron demasiado altas para el Biacore 3000 para medirlas.

25 Tabla 11. Constantes cinéticas de HuMAbs TF para determinar la reactividad con mediciones de afinidad de TFECdHis.

grupo	HuMab TF	afinidad nM	ka (1/Ms)	kd (1/s)
I	13	2,78	5,67E+05	1,57E-03
I	44	n.a.	8,77E+04	variable
I	87-Lg6	n.a.	5,91E+05	n.a.
II	11	3,15	2,86E+05	9,02E-04
II	017-D12	2,55	1,02E+05	2,59E-04
II	42	4,22	1,64E+05	6,90E-04
II	092-A09	14,1	1,42E+05	2,00E-03
II	101	3,4	3,18E+05	1,07E-03
II/II	98	n.a.	2,90E+05	n.a.
II/II	114	11	1,77E+05	1,95E-03
III	3	4,51	2,33E+05,	1,26E-03
III	25	1,97	3,29E+05	6,50E-04
III	109	4,75	1,65E+05	7,77E-04
III	111	n.a.	2,13E+05	n.a.
n.a. no evaluable = > 10 <sup>-3</sup> sec <sup>-1</sup>				

Determinación de la avides:

30 El TF (TFECdHis) que se une a los HuMab específicos de TF se determinó esencialmente como se ha descrito anteriormente, inmovilizando TFECdHis sobre en el chip sensor CM-5 (300 unidades de resonancia), y la serie de concentraciones de los anticuerpos HuMab utilizados para el análisis cinético. El análisis cinético se realizó

utilizando la resta doble de referencia y el modelo de análisis de unión 1:1 (Langmuir). La Tabla 12 muestra las mediciones de avidéz de los anticuerpos 11, 98, 109 y 111. Mientras que las mediciones de afinidad para 98 y 111 indicaron altas tasas de disociación (más allá de los límites de determinación de Biacore (es decir,  $> 10^{-3}$ )), la determinación de la avidéz reveló interacción en el rango nanomolar.

5

Tabla 12. Constantes cinéticas de TFECdHis para determinar la reactividad con mediciones de avidéz de los HuMAb TF.

Grupo	HuMAb TF	avidéz nM
II	11	0,47
II/III	98	4,85
III	109	0,01
III	111	0,11

Ejemplo: 23

10

Análisis inmunohistoquímico de la unión a tejidos humanos normales y tumores pancreáticos

La unión de los HuMAb TF a diversos tejidos humanos que se sabe que expresan TF (colon, corazón, riñón, piel, pulmón y cerebro) se determinó por medio de inmunohistoquímica (IHC).

15

IHC en tejido congelado

Se cortaron secciones de tejido congelado (4-6  $\mu\text{m}$  de espesor) y se fijaron en acetona. Se bloqueó la peroxidasa (PO) endógena de tejido y se incubaron previamente secciones de tejido con suero humano normal para evitar la unión inespecífica de anticuerpos aplicados con posterioridad a los receptores de Fc endógenos. Se aplicó Ab de ratón dirigido contra TF humano (y Ab de ratón de control negativo) a los tejidos a una dilución óptima y posteriormente se detectó con Powervision-PO (IgG anti-ratón/conejo de cabra)-PO. Los HuMAb específicos de TF se acoplaron a Fab' anti-IgG (Fc) humano-FITC de cabra y, después de eso se aplicaron a los portaobjetos de tejido congelado en 3 diluciones, incluyendo una dilución óptima predeterminada. Con posterioridad, el complejo de HuMAb - Fab-FITC se detectó mediante anti-FITC de conejo y Powervision-PO. La actividad PO se visualizó con AEC como sustrato y los núcleos se visualizaron con hematoxilina. La tinción se analizó mediante microscopio de campo claro.

20

25

IHC con Ab de ratón en tejido fijado con formalina e incluido en parafina (FFPE)

30

Se cortaron biopsias de tejido FFPE a 4  $\mu\text{m}$ , se desparafinaron, se bloquearon para determinar la peroxidasa endógena del tejido y se sometieron a recuperación de antígenos (pH 6, tampón citrato). Antes de la incubación con el tejido con Ab de ratón los portaobjetos se preincubaron en suero humano normal para evitar la unión inespecífica a los receptores de Fc endógenos. El Ab de ratón dirigido contra TF humano (y el Ab de ratón de control negativo) se aplicó a los portaobjetos de tejido a una dilución óptima y posteriormente se detectó con Powervision-PO (anti-IgG de ratón/conejo de cabra)-PO. La actividad PO se visualizó con AEC como sustrato y los núcleos se visualizaron con hematoxilina. La tinción se analizó mediante microscopio de campo claro.

35

La Figura 12 muestra un ejemplo de la unión del anticuerpo 013 (tinción positiva), aceite (tinción positiva), 114 (tinción positiva) y 111 (tinción intermedia) a los glomérulos del riñón. Los anticuerpos 098 y 044 no se unieron a los glomérulos.

40

La Tabla 13 proporciona una visión general de los resultados de la tinción para todos los HuMAb TF de riñón humano en todos los tejidos examinados.

45

Tabla 13. Tinción IHC de glomérulos humanos

Grupo	HuMAb TF	IHC de glomérulos humanos
I 13	13	
I	44	-

Grupo	HuMab TF	IHC de glomérulos humanos
I	87-Lg6	nt
II	11	+
II	017-D12	+
II	42	nt
II	092-A09	nt
II	101	+
II/III	98	-
II/III	114	+
III	3	+
III	25	nt
III	109	+
III	111	+/-

La Tabla 14 proporciona una visión general de los resultados de la tinción de HuMAB específicos de TF en riñón, colon, corazón, cerebro y piel humanos, así como en tumores pancreáticos humanos.

5 Tabla 14. Tinción IHC de tejido humano normal y tumores pancreáticos.

Ab	Riñón Hu	Colon Hu	Corazón Hu	Cerebro Hu	Piel Hu	tumor panc
13	corpúsculo renal +	membrana basal ++	-	+	epidermis +	+++
114	corpúsculo renal ++	membrana basal ++	-	++	epidermis ++	++++
11	corpúsculo renal +	membrana basal ++	-	++	n.a. (+)	+++
44	-	membrana basal +	-	+/-	n.a.	++
98	-	membrana basal +	-	+/-	n.a. (+)	+++
111	corpúsculo renal +/-	membrana basal +	-	+	n.a.	+++

10 El análisis IHC de la unión de HuMAB TF a tumores pancreáticos humanos reveló una tinción positiva para todos los HuMAB TF (ilustrado en la figura 13).

Ejemplo 24:

15 Tratamiento de xenoinjerto de tumor MDA-MB-231 establecido en almohadillas de grasa mamarias de ratones SCID

La eficacia in vivo de los HuMAB TF se determinó en los tumores de xenoinjertos MDA-MB-231 ortotópicos establecidos en ratones SCID. Se inyectaron s.c.  $2 \times 10^6$  células tumorales en PBS en la segunda almohadilla de grasa mamaria de ratones SCID hembra, seguido de tratamiento con HuMAB TF o mAb de control (HuMab-KLH), partiendo de un momento en el que los tamaños tumorales se volvieron medibles. Los anticuerpos se inyectaron el día 21 (260 µg/ratón), día 28 (130 µg/ratón) y el día 42 (130 µg/ratón). El volumen del tumor se determinó al menos 2

veces/semana. Los volúmenes ( $\text{mm}^3$ ) se calcularon a partir de mediciones con calibre (PLEXX) como  $0,52 \times (\text{longitud}) \times (\text{anchura})^2$ .

La Figura 14 muestra que los anticuerpos 114, 111, 013, 098, 011 y 044 eran todos eficaces en la inhibición del crecimiento de tumores MDA-MB-231 ortotópicos establecidos.

Ejemplo 25:

Dosificación repetida piloto de un HuMab específico de TF en monos cynomolgus

Para obtener información inicial sobre la toxicología de los HuMab específicos de TF, incluyendo una evaluación de la capacidad de los anticuerpos para interferir en la cascada de coagulación y por lo tanto aumentar potencialmente el riesgo de hemorragia en los animales expuestos, se llevó a cabo un estudio de dosificación repetida piloto en monos cynomolgus.

Dos monos cynomolgus (*Macaca fascicularis*) macho y dos hembra, de aproximadamente 2 años de edad, recibieron inyecciones intravenosas de anticuerpo 011:

- día 1 de estudio: 0 mg/kg (sólo vehículo)
- día 8: 1 mg/kg; 1 mL/minuto
- día 15: 10 mg/kg; 1 mL/minuto
- día 22: 100 mg/kg; 1 mL/minuto

Los animales fueron seguidos hasta día 27, momento en el cual, los animales fueron sacrificados para la evaluación por necropsia e histológica de los órganos.

Los criterios de valoración principales del estudio fueron:

- observaciones clínicas: determinadas diariamente, signos de sangrado de las encías, ojos.
- tiempo de hemorragia funcional y pérdida de sangre: determinados los días 1, 8, 15 y 22 (1, 24 y 120 h después de la dosificación) y en dos momentos anteriores a la prueba.
- sangre/rastros de sangre/coágulos: Tinción HE de todos los tejidos (determinada en los tejidos obtenidos en el sacrificio final)
- sangre en la orina, heces, vómito: determinado diariamente/semanalmente.

No se observó toxicidad aparente de la dosificación repetida, creciente del anticuerpo 011. Los animales no mostraron signos clínicos y no hubo ninguna indicación de liberación de citoquinas. Además, no hubo signos clínicos aparentes de un sistema de coagulación comprometido o hemorragias sistémicas. En el momento de 1 h después de la dosis, la media del tiempo de sangrado el día 22 fue significativamente mayor que la observada el día 1 ( $p = 0,012$ ). No hubo otras diferencias estadísticamente significativas entre los días 8, 15 y 22 en comparación con el Día 1. Además, se encontró que no hubo toxicidad aparente para los órganos importantes y no hubo efectos hematológicos adversos. La conclusión preliminar sobre la evaluación histológica de los tejidos de este estudio es que no hubo hallazgos histológicos en los cuatro animales tratados que pudieran atribuirse al tratamiento con el elemento de análisis.

La Figura 15 muestra los puntos de datos individuales para cada animal (muestras duplicadas) como una función del tiempo. Los tiempos de sangrado de 4 animales se determinaron los días 1, 8, 15 y 22 (1, 24 y 120 h) y en dos momentos previos a la prueba.

Ejemplo 26

Tratamiento preventivo y terapéutico de xenoinjertos de tumor BxPC3 en ratones SCID

Se determinó la eficacia in vivo de los HuMab TF en el tratamiento preventivo o terapéutico de xenoinjertos de células BxPC3 en ratones SCID. Se inyectaron s.c.  $10 \times 10^6$  células tumorales BxPC3 en PBS en ratones SCID hembra, seguido de tratamiento con HuMab TF o mAb de control (HuMab-KLH). Para el tratamiento preventivo, los anticuerpos (400  $\mu\text{g}/\text{ratón}$ ) se inyectaron i.p. 1 hora después de la inducción del tumor. Para el tratamiento terapéutico, se inició la inyección del anticuerpo (300  $\mu\text{g}/\text{ratón}$ ) el día 8 después de la inducción del tumor, seguida de inyecciones de anticuerpos semanales (150  $\mu\text{g}/\text{ratón}$ ). El volumen del tumor se determinó al menos 2 veces a la semana. Los volúmenes ( $\text{mm}^3$ ) se calcularon a partir de mediciones con calibre (PLEXX) como  $0,52 \times (\text{longitud}) \times (\text{anchura})^2$ .

La Figura 16 muestra que los HuMab específicos de TF son susceptibles de tratamiento preventivo así como de terapéutico de tumores de xenoinjertos BxPC3.



Ejemplo 27

Barajado de ADN entre TF murino y humano para determinar dominios importantes para la unión de los HuMAb anti-TF

5 Para determinar los dominios importantes para la unión de los HuMAb anti-TF a TF humano, se llevó a cabo el barajado de ADN entre TF humano y murino. Los constructos barajados se prepararon a partir de ADN que codificaba TF humano, mediante la sustitución de dominios humanos por dominios murinos y de ADN que codificaba TF murino mediante la sustitución de dominios murinos por dominios humanos. Si un dominio de TF humano es importante para la unión de un HuMab anti-TF, la unión se perderá después del reemplazo de ese dominio por el dominio murino. Los TF humano y murino son homólogos en 57% a nivel de proteína. Las Figuras 17A y 17B muestran los constructos de TF humano que contienen dominios TF murinos (TFhs, que contienen dominios TFmm) y para TF murino que contiene dominios de TF humano. Las células HEK293F fueron transfectadas transitoriamente con los constructos o con el vector solo (pcDNA3.3SP; simuladamente). El análisis FACS se realizó esencialmente como se ha descrito anteriormente, con 30 µg/ml de material parental purificado. Se utilizó HuMab-KLH como un control de Ab.

La Figura 17 muestra que todos los HuMAb anti-TF menos uno se unen únicamente a TF humano y no a TF murino. El HuMab-TF-003 muestra algunos unión a TF murino.

20 La Figura 18 A a O muestra los resultados para la unión de los diferentes HuMAb anti-TF a los constructos expresados en las células HEK293F. Estos resultados se resumen en la Tabla 15. En esta tabla los HuMAb anti-TF se clasifican en grupos, basándose en los dominios de TF humano que son importantes para la unión de estos HuMAb.

25

Tabla 15

Constructos barajados: TFhs-	HuMab que muestran disminución de la unión
1-41 mm	Ninguno
42-84 mm	11, 17, 42, 92, 98, 101, 111
85-122 mm	25, 42, 98, 109, 111
123-137 mm	44, 114
185-225 mm	13, 27, 44, 87
226-250 mm	44
Grupos basados en la unión a constructos barajados	HuMab en el grupo
1. 42-84	11, 17, 92, 101
2. 42-84 + 85-122	42, 98, 111
3. 85-122	25, 109
4. 123-137	114
5. 185-225	13, 27, 87
6. 123-137 + 185-225 + 226-250	44

Ejemplo 28

30 Unión de fragmentos Fab de los HuMAb anti-TF al dominio extracelular de TF determinado mediante ELISA, y a TF celular en células BxPC3, determinado mediante FACS

La unión de los fragmentos Fab de los HuMAb anti-TF a TF se midió mediante ELISA (dominio extracelular recubierto de TF) y mediante FACS (TF en células BxPC3). El ELISA se realizó esencialmente como se ha descrito anteriormente. Los fragmentos Fab unidos se detectaron utilizando anti-H+L humano de burro conjugado con HRP. El análisis FACS se realizó esencialmente como se ha descrito anteriormente. Se utilizó anti- IgG humana (H+L) de

35

cabra conjugado con FITC (Jackson) para detectar candidatos principales unidos. La fluorescencia se midió en un FACSCantol I. Las curvas de unión se analizaron como se ha descrito anteriormente, utilizando el soporte lógico GraphPad Prism 5.

5 La Figura 19 muestra menos unión de fragmentos Fab de HuMab-TF-098 y -111 al dominio extracelular de TF, en comparación con los fragmentos Fab -011, medido mediante ELISA.

La Figura 20 muestra menos unión de fragmentos Fab de HuMab-TF-098 y -111 a TF celular y, en comparación con los fragmentos Fab -011, medido mediante FACS en células BxPC3.

10 La Tabla 16 muestra los valores de CE50 de fragmentos Fab de HuMab-TF para la unión al dominio extracelular de TF mediante ELISA y para TF celular mediante FACS en células BxPC3.

15 Tabla 16 - Visión general de los valores de CE50 para la unión de Fragmentos Fab de HuMab-TF al dominio extracelular de TF, determinada mediante ELISA, y a TF celular en las células BxPC3, determinada mediante FACS.

HuMab-TF	CE50 (ELISA)	CE50 (FACS)
011	0,04	0,132
013	0,03	0,301
044	0,59	8,040
098	1,98	n.a.
109	0,02	0,143
111	3,14	n.a.
Los valores de CE50 son en µg/mL. na - no pudo ser calculado.		

#### Ejemplo 29

Unión de los HuMab anti-TF a líneas celulares que expresan diferentes niveles de TF

20 La unión de los HuMab anti-TF a TF unido a la membrana en las líneas celulares que expresan diferentes niveles de TF se determinó mediante análisis FACS, esencialmente como se ha descrito anteriormente. El anticuerpo anti-TF de ratón seguido de anti-Fc de IgG de ratón conjugado con PE se utilizó como control positivo. Se midió la fluorescencia en un FACSCantol I. Las curvas de unión se analizaron esencialmente como se ha descrito anteriormente, utilizando el soporte lógico GraphPad Prism 5. La cantidad de moléculas de TF en las líneas celulares se determinó mediante el kit Qifi (Dako, Glostrup, Dinamarca), de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Se determinó que las células SW480 expresaban ~ 20.000 moléculas de TF por célula, células SK-OV-3 expresaban ~ 60.000 moléculas por célula, las células AsPC-I expresaban ~ 175.000 moléculas por célula y las células MDA-MB-231 expresaban ~ 900.000 moléculas por célula.

30 Figura 21 Los HuMab-TF-98 y -111 presentan características de unión similares a los HuMab-TF-11, - 13 y 109 en la línea celular MDA-MD-231 con alta expresión de TF. En las líneas de células con menos moléculas de TF por célula, por ejemplo las líneas celulares SK-OV-3 y SW480, los HuMab-TF-98 y 111 presentaban diferentes características de unión en comparación con los otros anticuerpos HuMab-TF.

#### 35 LISTA DE SECUENCIAS

<110> Genmab

40 <120> Factor tisular

<130> P57

<160> 112

45 <170> PatentIn version 3.2

ES 2 604 635 T3

<210> 1  
 <211> 126  
 <212> PRT  
 5 <213> Homo sapiens  
 <400> 1  
 Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Glu  
 1 5 10 15  
 Ser Leu Lys Ile Ser Cys Lys Gly Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Ser Tyr  
 20 25 30  
 Trp Ile Gly Trp Val Arg Gln Met Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Met  
 35 40 45  
 Gly Ile Ile Tyr Pro Gly Asp Ser Asp Thr Arg Tyr Ser Pro Ser Phe  
 50 55 60  
 Gln Gly Gln Val Thr Ile Ser Ala Asp Lys Ser Ile Ser Thr Ala Tyr  
 65 70 75 80  
 Leu Gln Trp Ser Ser Leu Lys Ala Ser Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys  
 85 90 95  
 Ala Arg Ile His Arg Gly Ala Gly Tyr Ser Ser Ser Trp Pro Gly Ala  
 100 105 110  
 Phe Asp Ile Trp Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser  
 115 120 125  
 10 <210> 2  
 <211> 8  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens  
 15 <400> 2  
 Gly Tyr Ser Phe Thr Ser Tyr Trp  
 1 5  
 20 <210> 3  
 <211> 8  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens  
 25 <400> 3  
 Ile Tyr Pro Gly Asp Ser Asp Thr  
 1 5  
 30 <210> 4  
 <211> 19  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens  
 35 <400> 4  
 Ala Arg Ile His Arg Gly Ala Gly Tyr Ser Ser Ser Trp Pro Gly Ala  
 1 5 10 15

ES 2 604 635 T3

Phe Asp Ile

5 <210> 5  
 <211> 119  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

10 <400> 5

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

Thr Thr Val Thr Val Ser Ser  
 115

15 <210> 6  
 <211> 8  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

20 <400> 6

Gly Phe Thr Val Ser Asn Asp Gly  
 1 5

25 <210> 7  
 <211> 8  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

30 <400> 7

Ile Trp Tyr Asp Gly Val Asn Lys  
 1 5

35 <210> 8  
 <211> 12  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

ES 2 604 635 T3

<400> 8

Ala Arg Arg Pro Gly Thr Phe Tyr Gly Leu Asp Val  
 1 5 10

5 <210> 9  
 <211> 118  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

10 <400> 9

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

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

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

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

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

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

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

Leu Val Thr Val Ser Ser  
 115

15 <210> 10  
 <211> 8  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

20 <400> 10

Gly Phe Thr Phe Ser Asn Tyr Ala  
 1 5

25 <210> 11  
 <211> 8  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

30 <400> 11

Ile Ser Gly Ser Gly Asp Tyr Thr  
 1 5

35 <210> 12  
 <211> 11  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

<400> 12

ES 2 604 635 T3

Ala Arg Ser Pro Trp Gly Tyr Tyr Leu Asp Ser  
 1 5 10

5 <210> 13  
 <211> 120  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

10 <400> 13

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

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

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

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

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

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

Ala Lys Asp Gly Tyr Phe Leu Leu Trp Tyr Phe Asp Leu Trp Gly Arg  
 100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser  
 115 120

15 <210> 14  
 <211> 8  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

20 <400> 14

Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr Ala  
 1 5

25 <210> 15  
 <211> 8  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

30 <400> 15

Ile Ser Gly Ser Gly Asp Ser Thr  
 1 5

35 <210> 16  
 <211> 13  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

ES 2 604 635 T3

<400> 16

Ala Lys Asp Gly Tyr Phe Leu Leu Trp Tyr Phe Asp Leu  
1 5 10

5 <210> 17  
<211> 118  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

10 <400> 17

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

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

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

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

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

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

Ala Lys Ala Pro Trp Thr Tyr Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr  
100 105 110

Leu Val Thr Val Ser Ser  
115

15 <210> 18  
<211> 8  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

20 <400> 18

Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr Gly  
1 5

25 <210> 19  
<211> 8  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

30 <400> 19

Ile Ser Gly Ser Gly Gly Thr Thr  
1 5

<210> 20  
<211> 11

ES 2 604 635 T3

<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 20

5

Ala Lys Ala Pro Trp Thr Tyr Tyr Phe Asp Tyr  
1 5 10

<210> 21  
<211> 118  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

10

<400> 21

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

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

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

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

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

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

Ala Lys Thr Pro Trp Gly Tyr Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr  
100 105 110

Leu Val Thr Val Ser Ser  
115

15

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

20

<400> 22

Gly Phe Thr Phe Asn Asn Tyr Ala  
1 5

25

<210> 23  
<211> 8  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

30

<400> 23

Ile Ser Gly Ser Gly Gly Arg Thr  
1 5

35

<210> 24  
<211> 11



ES 2 604 635 T3

<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 24

5

Ala Lys Thr Pro Trp Gly Tyr Tyr Phe Asp Tyr  
1 5 10

<210> 25  
<211> 118  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

10

<400> 25

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

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

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

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

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

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

Ala Lys Thr Pro Trp Gly Tyr Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Ile  
100 105 110

Leu Val Ala Val Ser Ser  
115

15

<210> 26  
<211> 8  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

20

<400> 26

Gly Phe Thr Phe Ser Asn Tyr Ala  
1 5

25

<210> 27  
<211> 8  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

30

<400> 27

Ile Ser Gly Ser Gly Val Thr Thr  
1 5

35

<210> 28

ES 2 604 635 T3

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

5 <400> 28

Ala Lys Thr Pro Trp Gly Tyr Tyr Phe Asp Tyr  
 1 5 10

<210> 29  
 <211> 118  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

10 <400> 29

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 Pro Arg Gly Thr Phe Ser Tyr Tyr  
 20 25 30

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

Gly Arg Ile Ile Pro Ile Leu Gly Val Ala Asn Tyr Ala Gln Lys Phe  
 50 55 60

Gln Gly 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 Glu Gly Asp Arg Arg Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr  
 100 105 110

Leu Val Thr Val Ser Ser  
 115

15 <210> 30  
 <211> 8  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

20 <400> 30

Arg Gly Thr Phe Ser Tyr Tyr Thr  
 1 5

25 <210> 31  
 <211> 8  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

30 <400> 31

Ile Ile Pro Ile Leu Gly Val Ala  
 1 5

<210> 32

ES 2 604 635 T3

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

5 <400> 32

Ala Arg Glu Gly Asp Arg Arg Tyr Phe Asp Tyr  
 1 5 10

<210> 33  
 <211> 120  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

10

<400> 33

15

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

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

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

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

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

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

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

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser  
 115 120

20 <210> 34  
 <211> 8  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

25 <400> 34

Gly Phe Thr Phe Ser Arg Tyr Ala  
 1 5

<210> 35  
 <211> 8  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

30

<400> 35

35

ES 2 604 635 T3

Ile Ser Asn Asp Gly Tyr Asn Asp  
 1 5

5 <210> 36  
 <211> 13  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

<400> 36

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

15 <210> 37  
 <211> 120  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

<400> 37

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

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

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

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

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

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

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

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser  
 115 120

20 <210> 38  
 <211> 8  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

25 <400> 38

Gly Phe Thr Phe Ser Ile Tyr Ala  
 1 5

30 <210> 39  
 <211> 8  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

35 <400> 39

ES 2 604 635 T3

Val Ser Asn Asp Gly Tyr Asn Lys  
1 5

5 <210> 40  
<211> 13  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 40

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

15 <210> 41  
<211> 118  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 41

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

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

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

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

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

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

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

Leu Val Thr Val Ser Ser  
115

20 <210> 42  
<211> 8  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

25 <400> 42

Gly Phe Thr Phe Ser Asp Tyr Ala  
1 5

30 <210> 43  
<211> 8  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

35 <400> 43

ES 2 604 635 T3

Ile Pro Tyr Asp Gly Asp Asn Lys  
1 5

5 <210> 44  
<211> 11  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 44

10 Ala Arg Glu Asp Trp Gly Leu Glu Val Asp Tyr  
1 5 10

15 <210> 45  
<211> 121  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 45

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

Ser Leu Lys Ile Ser Cys Lys Gly Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Ser Cys  
20 25 30

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

Gly Ile Ile Tyr Pro Gly Asp Ser Asp Thr Arg Tyr Ser Pro Ser Phe  
50 55 60

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

Leu Gln Trp Ser Ser Leu Lys Ala Ser Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys  
85 90 95

Ala Arg His Lys Leu Gly Met Asp His Asp Ala Phe Asp Ile Trp Gly  
100 105 110

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

25 <210> 46  
<211> 8  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 46

30 Gly Tyr Ser Phe Thr Ser Cys Trp  
1 5

35 <210> 47  
<211> 8  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

ES 2 604 635 T3

<400> 47

Ile Tyr Pro Gly Asp Ser Asp Thr  
1 5

5 <210> 48  
<211> 14  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

10 <400> 48

Ala Arg His Lys Leu Gly Met Asp His Asp Ala Phe Asp Ile  
1 5 10

15 <210> 49  
<211> 118  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

20 <400> 49

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

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

Pro Ile Phe Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Phe Glu Trp Met  
35 40 45

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

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

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

Ala Gly Gly Asp Asp Leu Asp Ala Phe Asp Ile Trp Gly Gln Gly Thr  
100 105 110

Met Val Ser Val Ser Ser  
115

25 <210> 50  
<211> 8  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

30 <400> 50

Gly Gly Ser Phe Asn Asn Tyr Pro  
1 5

35 <210> 51  
<211> 8  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

ES 2 604 635 T3

<400> 51

Ile Ile Pro Ile Leu Gly Ile Thr  
1 5

5 <210> 52  
<211> 11  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

10 <400> 52

Ala Gly Gly Asp Asp Leu Asp Ala Phe Asp Ile  
1 5 10

15 <210> 53  
<211> 120  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 53

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

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

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

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

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

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

Ala Arg Asp His Thr Met Val Arg Gly Ala Phe Asp Tyr Trp Gly Gln  
100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser  
115 120

25 <210> 54  
<211> 8  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

30 <400> 54

Gly Phe Thr Phe Asn Arg Tyr Ala  
1 5

35 <210> 55  
<211> 8  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens



ES 2 604 635 T3

<400> 55

Ile Ser Asn Asp Gly Ile Asn Lys  
1 5

5

<210> 56  
<211> 13  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

10

<400> 56

Ala Arg Asp His Thr Met Val Arg Gly Ala Phe Asp Tyr  
1 5 10

15

<210> 57  
<211> 107  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

20

<400> 57

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

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

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Glu Lys Ala Pro Lys Ser Leu Ile  
35 40 45

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

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

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Asp Ser Asp Pro Ile  
85 90 95

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

25

<210> 58  
<211> 6  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

30

<400> 58

Gln Gly Ile Ser Arg Trp  
1 5

35

<210> 59  
<211> 3  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

40

<400> 59

ES 2 604 635 T3

Ala Ala Ser  
1

5 <210> 60  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens  
  
<400> 60

10 Gln Gln Tyr Asp Ser Asp Pro Ile Thr  
1 5

15 <210> 61  
<211> 107  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens  
  
<400> 61

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

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

Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu  
35 40 45

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

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

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

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

25 <210> 62  
<211> 7  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens  
  
<400> 62

Gln Ser Val Ser Ser Ser Tyr  
1 5

30 <210> 63  
<211> 3  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

35 <400> 63

Gly Ala Ser  
1

ES 2 604 635 T3

<210> 64  
 <211> 8  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

5

<400> 64

Gln Gln Tyr Gly Ser Ser Leu Thr  
 1 5

10

<210> 65  
 <211> 107  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

15

<400> 65

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

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

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Glu Lys Ala Pro Lys Ser Leu Ile  
 35 40 45

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

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

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Asn Ser Tyr Pro Tyr  
 85 90 95

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

20

<210> 66  
 <211> 6  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

25

<400> 66

Gln Gly Ile Ser Ser Arg  
 1 5

30

<210> 67  
 <211> 3  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

<400> 67

35

Ala Ala Ser  
 1

<210> 68  
 <211> 9  
 <212> PRT

ES 2 604 635 T3

<213> Homo sapiens

<400> 68

5 Gln Gln Tyr Asn Ser Tyr Pro Tyr Thr  
1 5

<210> 69

<211> 108

<212> PRT

10 <213> Homo sapiens

<400> 69

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

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

Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu  
35 40 45

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

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

Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Gly Ser Ser Pro  
85 90 95

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

15

<210> 70

<211> 7

<212> PRT

<213> Homo sapiens

20

<400> 70

Gln Ser Val Arg Ser Ser Tyr  
1 5

25

<210> 71

<211> 3

<212> PRT

<213> Homo sapiens

30

<400> 71

Gly Ala Ser  
1

35

<210> 72

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 72

ES 2 604 635 T3

Gln Gln Tyr Gly Ser Ser Pro Arg Thr  
1 5

5 <210> 73  
<211> 108  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

10 <400> 73

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

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Gly Ser Ser  
20 25 30

Ser Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu  
35 40 45

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

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

Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Gly Ser Ser Pro  
85 90 95

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

15 <210> 74  
<211> 7  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 74

20 Gln Ser Val Gly Ser Ser Ser  
1 5

25 <210> 75  
<211> 3  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 75

30 Gly Ala Ser  
1

<210> 76  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

35 <400> 76

Gln Gln Tyr Gly Ser Ser Pro Arg Thr  
1 5

ES 2 604 635 T3

<210> 77  
 <211> 107  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

5

<400> 77

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

10 <210> 78  
 <211> 6  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

15 <400> 78

Gln Gly Ile Ser Ser Arg  
 1 5

20 <210> 79  
 <211> 3  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

25 <400> 79

Ala Ala Ser  
 1

30 <210> 80  
 <211> 9  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

<400> 80

35 Gln Gln Tyr Asn Ser Tyr Pro Tyr Thr  
 1 5

<210> 81  
 <211> 108  
 <212> PRT

ES 2 604 635 T3

<213> Homo sapiens

<400> 81

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

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

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Glu Lys Ala Pro Lys Ser Leu Ile  
35 40 45

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

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

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

5 Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys

100 105

<210> 82

<211> 6

10 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 82

15 Gln Gly Ile Ser Ser Trp  
1 5

<210> 83

<211> 3

20 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 83

25 Ala Ala Ser  
1

<210> 84

<211> 10

30 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 84

35 Gln Gln Tyr Asn Ser Tyr Pro Leu Tyr Thr  
1 5 10

<210> 85

<211> 107

40 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 85

ES 2 604 635 T3

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

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

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

Tyr Asp Ala Ser Ile Leu Glu Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly  
 50 55 60

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

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

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

5

<210> 86  
 <211> 6  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

10

<400> 86

Gln Asp Ile Ser Ser Ala  
 1 5

15

<210> 87  
 <211> 3  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

20

<400> 87

Asp Ala Ser  
 1

25

<210> 88  
 <211> 9  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

30

<400> 88

Gln Gln Phe Asn Ser Tyr Pro Leu Thr  
 1 5

35

<210> 89  
 <211> 107  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

<400> 89



ES 2 604 635 T3

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

5 <210> 90  
 <211> 6  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

10 <900> 90

Gln Ser Val Ser Ser Tyr  
 1 5

15 <210> 91  
 <211> 3  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

20 <400> 91

Asp Ala Ser  
 1

25 <210> 92  
 <211> 9  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

<400> 92

30 Gln Gln Arg Ser Asn Trp Pro Leu Thr  
 1 5

35 <210> 93  
 <211> 107  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

<400> 93

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

ES 2 604 635 T3

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

5 <210> 94  
 <211> 6  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

<400> 94

10 Gln Ser Val Ser Ser Tyr  
 1 5

15 <210> 95  
 <211> 3  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

<400> 95

20 Asp Ala Ser  
 1

<210> 96  
 <211> 9  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

25 <400> 96

Gln Gln Arg Ser Asn Trp Pro Leu Thr  
 1 5

30 <210> 97  
 <211> 107  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

35 <900> 97

ES 2 604 635 T3

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

5 <210> 98  
 <211> 6  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

<400> 98

10 Gln Gly Ile Asn Ser Ala  
 1 5

15 <210> 99  
 <211> 3  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

<400> 99

20 Asp Ala Ser  
 1

25 <210> 100  
 <211> 9  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

<400> 100

30 Gln Gln Phe Asn Ser Tyr Pro Leu Thr  
 1 5

35 <210> 101  
 <211> 107  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

<400> 101

ES 2 604 635 T3

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

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

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Glu Lys Ala Pro Lys Ser Leu Ile  
 35 40 45

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

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

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Asn Ser Tyr Pro Pro  
 85 90 95

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

5 <210> 102  
 <211> 6  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

<900> 102

10 Gln Gly Ile Ser Ser Trp  
 1 5

15 <210> 103  
 <211> 3  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

<400> 103

20 Ala Ala Ser  
 1

25 <210> 104  
 <211> 9  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

<400> 104

30 Gln Gln Tyr Asn Ser Tyr Pro Pro Thr  
 1 5

35 <210> 105  
 <211> 107  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

<400> 105

ES 2 604 635 T3

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

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

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Glu Lys Ala Pro Lys Ser Leu Ile  
 35 40 45

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

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

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Asn Ser Tyr Pro Tyr  
 85 90 95

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

5 <210> 106  
 <211> 6  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

<400> 106

10 Gln Gly Ile Ser Ser Trp  
 1 5

15 <210> 107  
 <211> 3  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

<400> 107

20 Ala Ala Ser  
 1

25 <210> 108  
 <211> 9  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

<400> 108

30 Gln Gln Tyr Asn Ser Tyr Pro Tyr Thr  
 1 5

35 <210> 109  
 <211> 107  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

<400> 109

ES 2 604 635 T3

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

5 <210> 110  
 <211> 6  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens  
 <400> 110

Gln Ser Val Ser Ser Tyr  
 1 5

10 <210> 111  
 <211> 3  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens  
 15 <400> 111

Asp Ala Ser  
 1

20 <210> 112  
 <211> 9  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens  
 25 <400> 112

Gln Gln Arg Ser Asn Trp Pro Leu Thr  
 1 5

## REIVINDICACIONES

1. Un anticuerpo humano que se une al Factor Tisular, en donde el anticuerpo comprende una región VH que comprende las secuencias de CDR1, 2 y 3 de los SEQ ID NO: 10, 11 y 12 y una región VL que comprende las secuencias de CDR1, 2 y 3 de los SEQ ID NO: 66, 67 y 68.
2. El anticuerpo de la reivindicación 1, en donde el anticuerpo tiene una o más de las siguientes características:
- a) se une al dominio extracelular del Factor Tisular con una afinidad aparente ( $CE_{50}$ ) de 3 nM o menos, tal como 0,50 nM o menos, p. ej., 0,35 nM o menos, tal como 0,20 nM o menos, por ejemplo, 0,1 nM o menos, cuando se determina como se describe en el análisis en el Ejemplo 13,
  - b) se une a las células de mamífero que expresan el Factor Tisular, tal como las células A431 transfectadas con un constructo que codifica el Factor Tisular, preferiblemente con una afinidad aparente ( $CE_{50}$ ) de 10 nm o menos, p. ej., 8 nM o menos, tal como 5 nM o menos, p. ej., 2 nM o menos, tal como 1 nM o menos, p. ej., 0,5 nM o menos, tal como 0,3 nM o menos, cuando se determina como se describe en el análisis en el Ejemplo 14,
  - c) es capaz de inducir citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos en las células A431, preferiblemente con un valor de  $CE_{50}$  de 2 nM o menos, por ejemplo, 1 nM o menos, tal como 0,7 nM o menos, o 0,3 nM o menos, tal como 0,2 nM o menos, o 0,1 nM o menos, o 0,05 nM o menos, cuando se determina como se describe en el análisis en el Ejemplo 20,
  - d) el anticuerpo es eficaz para inhibir el crecimiento de tumores MDA-MB-231 establecidos, cuando se determina por el método descrito en el Ejemplo 24 y/o para inhibir el crecimiento de tumores BxPC3 establecidos, cuando se determina por el método descrito en el Ejemplo 26,
  - e) inhibe el factor tisular inducido por coagulación de la sangre, preferiblemente con una concentración media de inhibición de menos de 10 nM, tal como menos de 5 nM, por ejemplo, menos de 2 nM, tal como menos de 1 nM cuando se determina como se describe en el análisis en el Ejemplo 19,
  - f) en donde el anticuerpo inhibe la conversión de FX en FXa por el complejo TF/FVIIa, preferiblemente en menos de 50%, por ejemplo menos de 40%, tal como en el intervalo de 1 a 30%, cuando se determina como se describe en el análisis en el Ejemplo 18, o
  - g) inhibe liberación de IL-8 inducida por FVIIa por las células MDA-MB-231, preferiblemente con un valor máximo de inhibición de la inhibición de más de 40%, tal como más de 50%, p. ej. más de 60%, cuando se determina en como se describe en el análisis en el Ejemplo 17.
3. El anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde dicho anticuerpo tiene una o más de las siguientes características:
- a) inhibe la fosforilación de ERK inducida por FVIIa, preferiblemente con una concentración media de inhibición de menos de 10 nM, tal como menos de 5 nM, p. ej., menos de 2 nM cuando se determina como se describe en el análisis en el Ejemplo 16,
  - b) es capaz de inducir el depósito de C3c y C4c, preferiblemente en donde el anticuerpo es capaz de inducir el depósito de C3c y C4c tal como se determina en el Ejemplo 21,
  - c) los fragmentos Fab de anticuerpo se unen al dominio extracelular del factor tisular como se ha descrito en el ejemplo 28 con un valor de  $CE_{50}$  de menos de 0,1  $\mu\text{g/ml}$ , tal como menos de 0,05  $\mu\text{g/ml}$ , p. ej., menos de 0,04  $\mu\text{g/ml}$  medida por ELISA,
  - d) los fragmentos Fab de anticuerpo se unen al dominio extracelular del factor tisular como se ha descrito en el ejemplo 28 con un valor de  $CE_{50}$  de más de 1,0  $\mu\text{g/ml}$ , medido por ELISA,
  - e) los fragmentos Fab de anticuerpo se unen al dominio extracelular del factor tisular como se ha descrito en el ejemplo 28 con un valor de  $CE_{50}$  de menos de 10  $\mu\text{g/ml}$ , tal como menos de 1  $\mu\text{g/ml}$ , p. ej., menos de 0,5  $\mu\text{g/ml}$ , o menos de 0,2  $\mu\text{g/ml}$ , o
  - f) se une al factor tisular humano y al factor tisular no murino y muestra una reducción de la unión en comparación con la unión a TF humano al constructo barajado de 42-84 mm, que contiene la secuencia humana para TF excepto para el aminoácido 42-84, que ha sido remplazado por la secuencia de ratón, como se describe en el ejemplo 27.
4. El anticuerpo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-3, que comprende una región VH que tiene
- a) al menos 80% de identidad, tal como al menos 90%, al menos 95%, o al menos 98% o 100% de identidad con una región VH que comprende la secuencia del SEQ ID NO: 9. o
  - b) como máximo 20, tal como 15, o 10, o 5, 4, 3, 2 o 1 modificaciones de aminoácidos, más preferiblemente sustituciones de aminoácidos, tal como sustituciones de aminoácidos conservativas en comparación con una región VH que comprende la secuencia del SEQ ID NO: 9.
5. El anticuerpo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-4, que comprende una región VL que tiene
- a) al menos 80% de identidad, tal como al menos 90%, al menos 95%, o al menos 98% o 100% de identidad

con una región VL que comprende la secuencia del SEQ ID NO: 65 o

b) como máximo 20, como 15, o 10, o 5, 4, 3, 2 o 1 modificaciones de aminoácidos, más preferiblemente sustituciones de aminoácidos, tal como sustituciones de aminoácidos conservativas en comparación con una región VL que comprende la secuencia del SEQ ID NO: 65.

5 6. El anticuerpo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-5, que comprende una región VH que comprende la secuencia del SEQ ID NO: 9 y una región VL que comprende la secuencia del SEQ ID NO: 65.

10 7. El anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones 1-6, en donde el anticuerpo tiene una o más de las siguientes características:

a) una afinidad por el factor tisular que es de menos de 5 nM, tal como menos de 3,5 nM, p. ej., menos de 2 nM cuando se determina por el método descrito en el Ejemplo 22 en la presente memoria,

15 b) una kd de más de  $10^{-3}$  seg<sup>-1</sup>, cuando se determina por el método descrito en el Ejemplo 22 en la presente memoria y/o una ka de más de  $5 \times 10^4$ , mol<sup>-1</sup>seg<sup>-1</sup> cuando se determina por el método descrito en el Ejemplo 22 en la presente memoria, o

20 c) una kd de más de  $10^{-3}$  seg<sup>-1</sup> cuando se determina por el método de afinidad descrito en el Ejemplo 22 en la presente memoria, y una avidéz de menos de 5 nM, tal como menos de 1 nM, p. ej., menos de 0,2 nM cuando se determina por el método de avidéz descrito en el Ejemplo 22 en la presente memoria.

8. El anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde el anticuerpo está conjugado con otro radical, tal como un radical citotóxico, un radioisótopo o un fármaco.

25 9. Una molécula biespecífica que comprende un anticuerpo de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8 y una segunda especificidad unión, tal como una especificidad de unión para una célula efectora humana, un receptor de Fc humano o un receptor de células T.

30 10. Un vector de expresión que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica un anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 1, que comprende una o más de las secuencias de aminoácidos seleccionadas del grupo que consiste en los SEQ ID NO: 9 - SEQ ID NO: 12, y el SEQ ID NO: 65-68.

11. Una célula anfitriona eucariótica o procariótica huésped que produce un anticuerpo como se define en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8.

35 12. Una composición farmacéutica que comprende un anticuerpo como se define en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8 o una molécula biespecífica como se define en la reivindicación 9, y un portador farmacéuticamente aceptable.

40 13. El anticuerpo como se define en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8 o una molécula biespecífica como se define en la reivindicación 9 para su uso como medicamento.

14. El uso del anticuerpo como se define en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8 o una molécula biespecífica como se define en la reivindicación 9 para la fabricación de un medicamento para el tratamiento del cáncer.

45 15. Un método para producir un anticuerpo de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, comprendiendo dicho método las etapas de

a) cultivar una célula anfitriona de la reivindicación 11, y

50 b) purificar el anticuerpo de los medios de cultivo.

16. Una composición de diagnóstico que comprende un anticuerpo como se ha definido en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9.

55 17. Un método para detectar la presencia de Factor Tisular en una muestra, que comprende:

- poner en contacto la muestra con un anticuerpo de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8 o una molécula biespecífica de la reivindicación 9 en condiciones que permitan la formación de un complejo entre el anticuerpo o las moléculas biespecíficas y el Factor Tisular; y

- Analizar si se ha formado un complejo.

60 18. Un kit para detectar la presencia de Factor Tisular en una muestra que comprende

- un anticuerpo de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8 o una molécula biespecífica de la reivindicación 9; y  
- instrucciones para el uso del kit.



19. Un anticuerpo anti-idiotípico que se une a cualquier anticuerpo de cualquiera de las reivindicaciones 1-7.



QVQLVESGGVVQFGRSRLRSCAASGKASDYL~~LN~~HHVVRQAPGKLEWVAV~~EVYGGD~~Y~~ADSVKGRFTISRDNKNTLYIQMNSLR~~AE~~DTAVY~~CA~~RED~~NG~~IF~~~~PK~~~~TK~~~~LEVDYWGQCALVT~~VSS VH1015-044 (41)

EVQLVDSGAEVKKPESLKITCKSGSE~~ET~~IS~~GM~~HWVRQMPGKLEWNGI~~YV~~PS~~DT~~RY~~SP~~SG~~Q~~VTISADKSI~~STAY~~LQ~~NS~~SL~~KAS~~DT~~AN~~Y~~CA~~RED~~NG~~~~IF~~~~PK~~~~TK~~~~LEVDYWGQCALVT~~VSS VH1015-087 (45)

QVQLVDSGAEVKKPESLVK~~AS~~SG~~SE~~ET~~IS~~GM~~HW~~V~~RQ~~MPGKLEWNGI~~YV~~PS~~DT~~RY~~SP~~SG~~Q~~VTITADKSI~~STAY~~ME~~LNS~~LR~~SE~~DT~~AV~~Y~~CA~~RED~~NG~~~~IF~~~~PK~~~~TK~~~~LEVDYWGQCALVT~~VSS VH1015-098 (49)

QVQLVESGGVVQFGRSRLRSCAGS~~GG~~LEWVAV~~EVYGGD~~Y~~ADSVKGRFTISRDNKNTLYIQMNSLR~~AE~~DTAVY~~CA~~RED~~NG~~IF~~~~PK~~~~TK~~~~LEVDYWGQCALVT~~VSS VH1015-111 (53)

Figura 1 continuación

VL:

I---CIR1---I  
 I---CIR3---I  
 I---CIR2 I  
 DIQWTSPLSASVGDRTITCRASGATISGSLAHYQQRPEKAPKPSLIVKSSLSQGVPSRFSGSGGTDFLTISLQPEDFATYYCQDTHKSTPEVYFGGTRLEIK VL1015-013 (57)  
 EIVLTQSPGTLSPGERATLSCRASGATISGSLAHYQQRPEKAPKPSLIVKSSLSQGVPSRFSGSGGTDFLTISRLEPEDFANVYCCQDTHKSTPEVYFGGTRVEIK VL1015-114 (61)  
 DIQWTSPLSASVGDRTITCRASGATISGSLAHYQQRPEKAPKPSLIVKSSLSQGVPSRFSGSGGTDFLTISLQPEDFATYYCQDTHKSTPEVYFGGTRLEIK VL1015-011 (65)  
 EIVLTQSPGTLSPGERATLSCRASGATISGSLAHYQQRPEKAPKPSLIVKSSLSQGVPSRFSGSGGTDFLTISRLEPEDFANVYCCQDTHKSTPEVYFGGTRVEIK VL1015-017 (69)  
 EIVLTQSPGTLSPGERATLSCRASGATISGSLAHYQQRPEKAPKPSLIVKSSLSQGVPSRFSGSGGTDFLTISRLEPEDFANVYCCQDTHKSTPEVYFGGTRVEIK VL1015-042 (73)  
 DIQWTSPLSASVGDRTITCRASGATISGSLAHYQQRPEKAPKPSLIVKSSLSQGVPSRFSGSGGTDFLTISRLEPEDFATYYCQDTHKSTPEVYFGGTRLEIK VL1015-092 (77)  
 DIQWTSPLSASVGDRTITCRASGATISGSLAHYQQRPEKAPKPSLIVKSSLSQGVPSRFSGSGGTDFLTISRLEPEDFATYYCQDTHKSTPEVYFGGTRLEIK VL1015-101 (81)  
 AIQLTQSPGTLSPGERATLSCRASGATISGSLAHYQQRPEKAPKPSLIVKSSLSQGVPSRFSGSGGTDFLTISRLEPEDFATYYCQDTHKSTPEVYFGGTRVEIK VL1015-003 (85)  
 EIVLTQSPGTLSPGERATLSCRASGATISGSLAHYQQRPEKAPKPSLIVKSSLSQGVPSRFSGSGGTDFLTISRLEPEDFANVYCCQDTHKSTPEVYFGGTRVEIK VL1015-025 (89)  
 EIVLTQSPGTLSPGERATLSCRASGATISGSLAHYQQRPEKAPKPSLIVKSSLSQGVPSRFSGSGGTDFLTISRLEPEDFANVYCCQDTHKSTPEVYFGGTRVEIK VL1015-109 (93)  
 AIQLTQSPGTLSPGERATLSCRASGATISGSLAHYQQRPEKAPKPSLIVKSSLSQGVPSRFSGSGGTDFLTISRLEPEDFATYYCQDTHKSTPEVYFGGTRVEIK VL1015-044 (97)  
 DIQWTSPLSASVGDRTITCRASGATISGSLAHYQQRPEKAPKPSLIVKSSLSQGVPSRFSGSGGTDFLTISRLEPEDFATYYCQDTHKSTPEVYFGGTRVEIK VL1015-087 (101)  
 DIQWTSPLSASVGDRTITCRASGATISGSLAHYQQRPEKAPKPSLIVKSSLSQGVPSRFSGSGGTDFLTISRLEPEDFATYYCQDTHKSTPEVYFGGTRLEIK VL1015-098 (105)  
 EIVLTQSPGTLSPGERATLSCRASGATISGSLAHYQQRPEKAPKPSLIVKSSLSQGVPSRFSGSGGTDFLTISRLEPEDFANVYCCQDTHKSTPEVYFGGTRVEIK VL1015-111 (109)

**Figura 2**

**SEQ ID NO: 113:** La secuencia de aminoácidos de la región C<sub>H</sub> de tipo salvaje de IgG4 humana

1 *ASTKGPSVFP LAPCSRSTSE STAALGCLVK DYFPEPVTVS WNSGALTSGV*  
 51 *HTFPAVLQSS GLYSLSSVVT VPSSSLGTKT YTCNVDHKPS NTKVDKRVES*  
 101 *KYGPPCPSCCPAPSEELGGPSV* FLFPPKPKDT LMISRTPEVT CVVVDVSQED  
 151 PEVQFNWYVD GVEVHNAKTK PREBQFNSTY RVVSVLTVLH QDWLNGKEYK  
 201 CKVSNKGLPS SIEKTISKAK QOPREPOVYT LPPSOEEMTK NOVSLTCLVK  
 251 GFYPSDIAVE NESNGQPENN YKTPPVLDSDG SFFFLYSRL TVDKSRWQEG  
 301 NVFCSCVMHE ALHNHYTOKS LSLSLGK

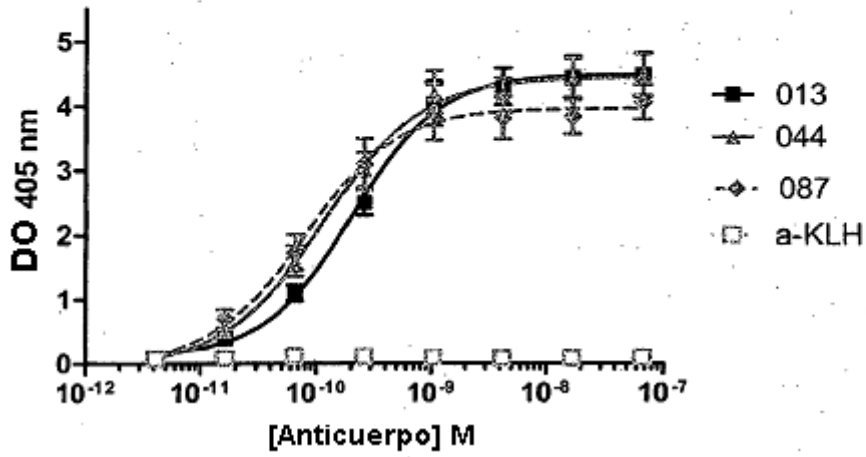
La secuencia en cursiva representa la región CH1, la secuencia destacada representa la región bisagra, la secuencia regular representa la región CH2 y la secuencia subrayada representa la región CH3.

**SEQ ID NO: 114:** La secuencia de aminoácidos de la región C<sub>H</sub> sin bisagra de una IgG4 humana

1 *ASTKGPSVFP LAPCSRSTSE STAALGCLVK DYFPEPVTVS WNSGALTSGV*  
 51 *HTFPAVLQSS GLYSLSSVVT VPSSSLGTKT YTCNVDHKPS NTKVDKRVAP*  
 101 *EFLGGPSVFL FPPKPKDTLM ISRTPEVTCV VVDVSQEDPE VQFNWYVDGV*  
 151 *EVHNAKTKPR EBQFNSTYRV VSVLTVLHQD WLNKEYKCK VSNKGLPSSI*  
 201 *EKTISKAKGQ PREPQVYITLP PSQEEMTKNQ VSLTCLVKGF YPSDIAVEWE*  
 251 *SNGQPENNYK TTPPVLDSDG SFFFLYSRLTV DKSRWQEGNV FSCSVMHEAL*  
 301 *HNHYTQKSL SLSLGK*

**Figura 3**

**ELISA TFECDhis  
grupo I de bloqueo cruzado**



**ELISA TFECDhis  
grupo II de bloqueo cruzado**

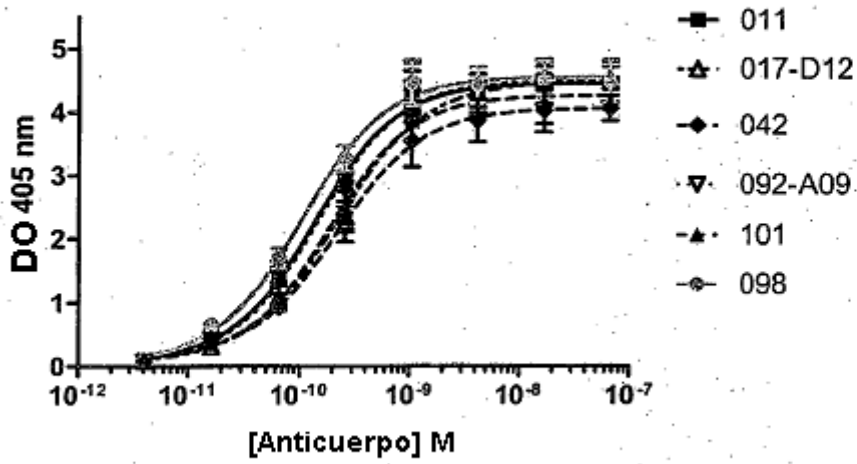


Figura 3 continuación

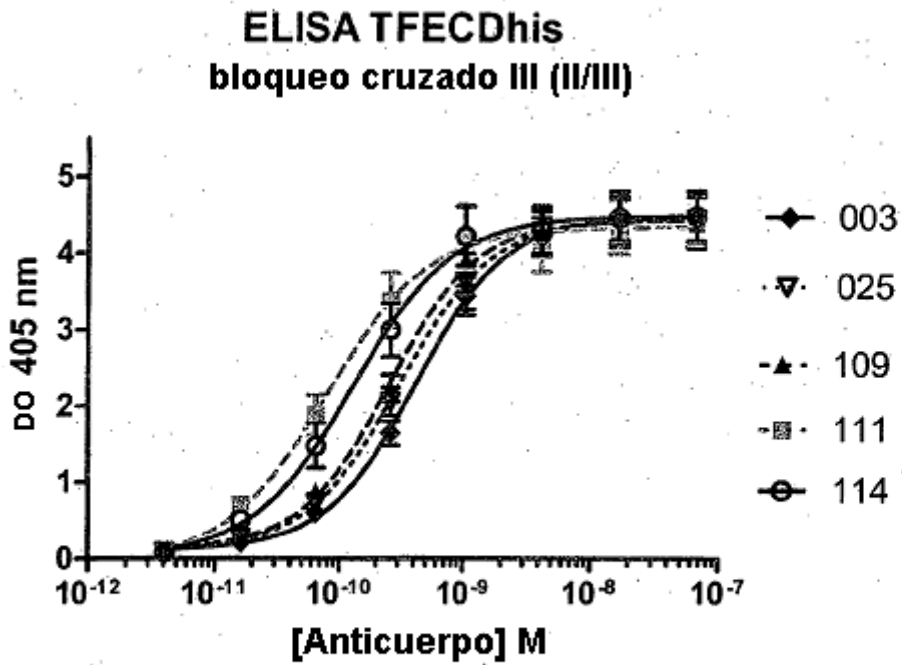
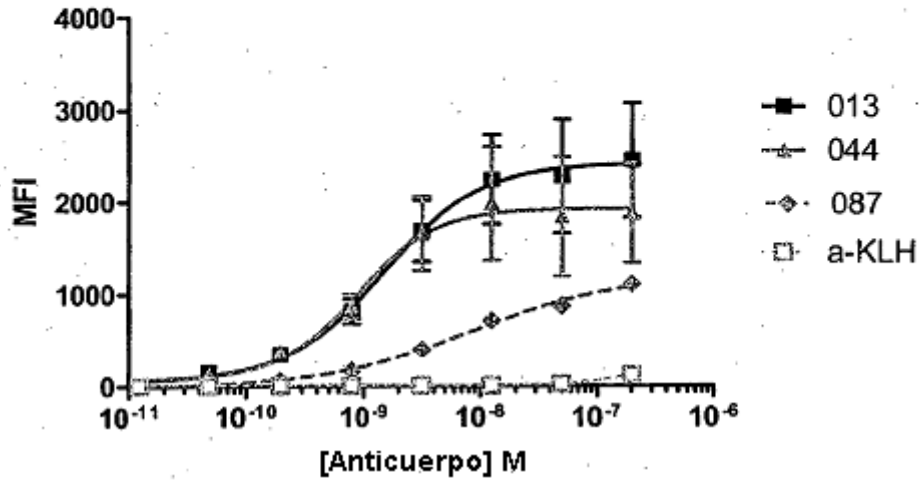


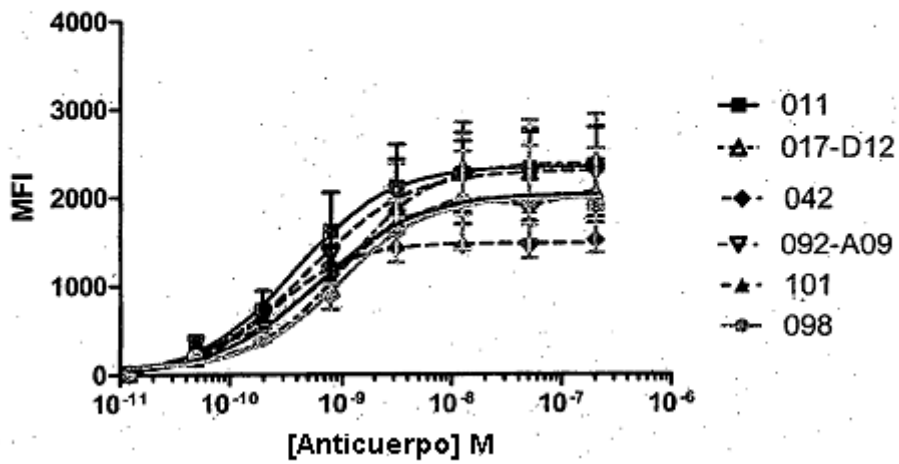
Figura 3: La unión de los HuMab anti-TF al dominio extracelular de TF en ELISA\_Unión se determinó mediante ELISA.

**Figura 4**

**FACS MDA-MB-231**  
**grupo I bloqueo cruzado**



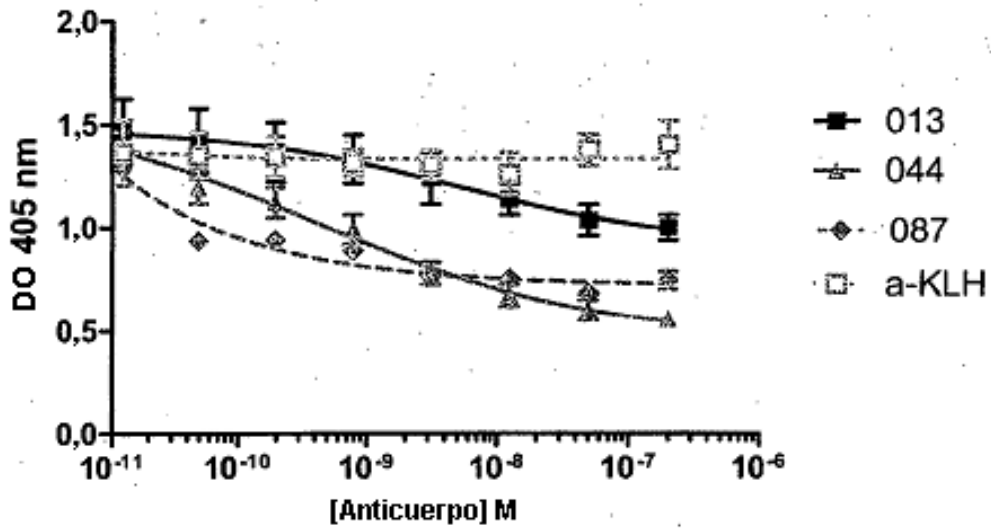
**FACS MDA-MB-231**  
**grupo II bloqueo cruzado**



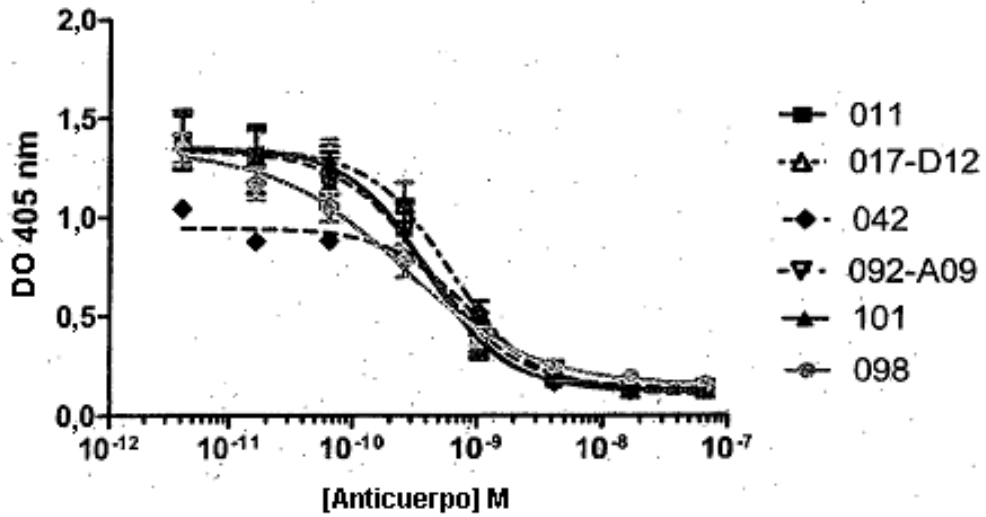


**Figura 5**

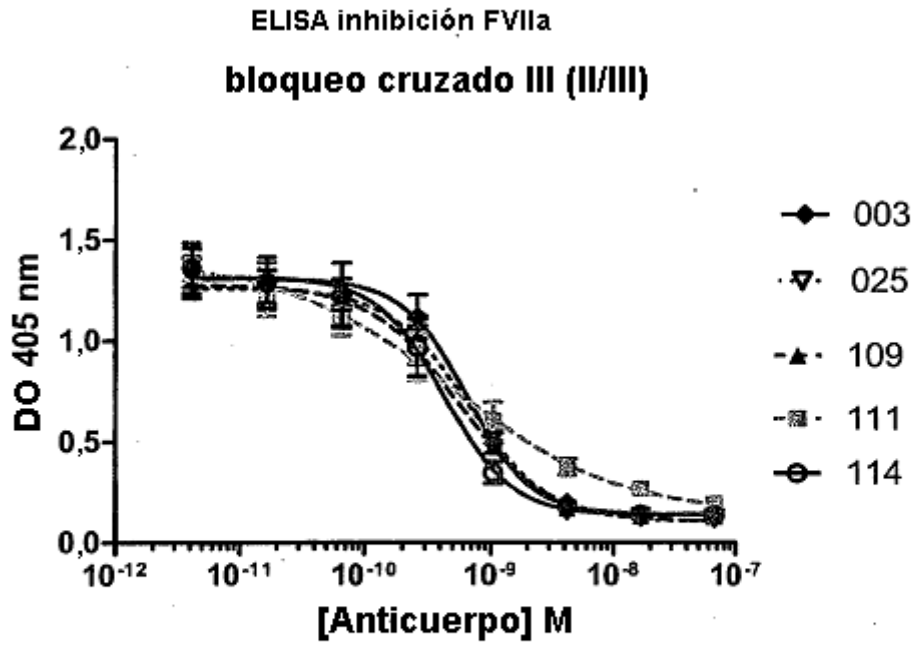
**ELISA inhibición FVIIa  
grupo I bloqueo cruzado**



**ELISA inhibición FVIIa  
grupo II bloqueo cruzado**



**Figura 5 continuación**



**Figura 5: Inhibición de la unión de FVIIa a TF.** La unión de FVIIa, y la inhibición por HuMAb específicos del TF de esta unión, se midieron por medio de ELISA

Figura 6

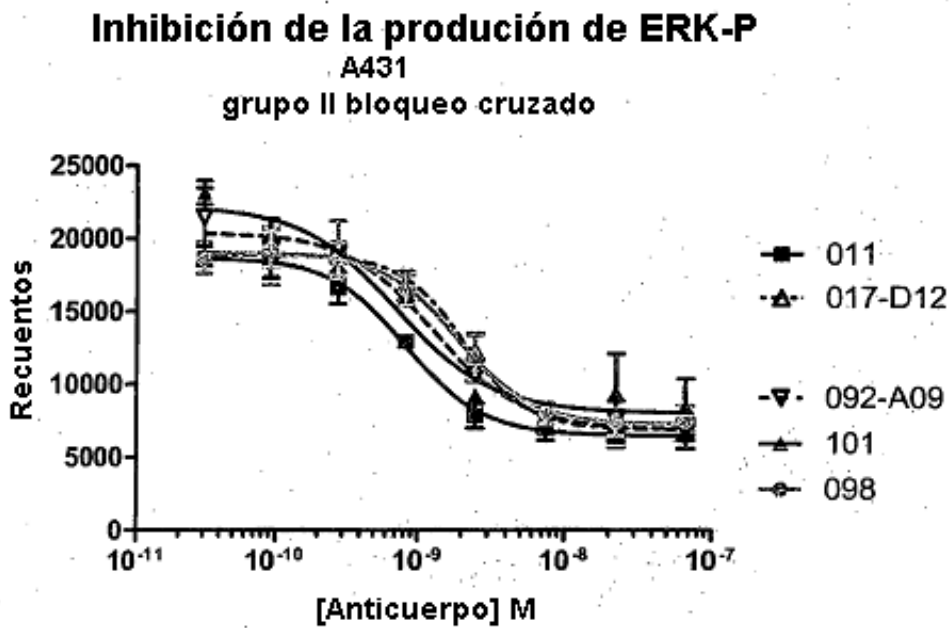
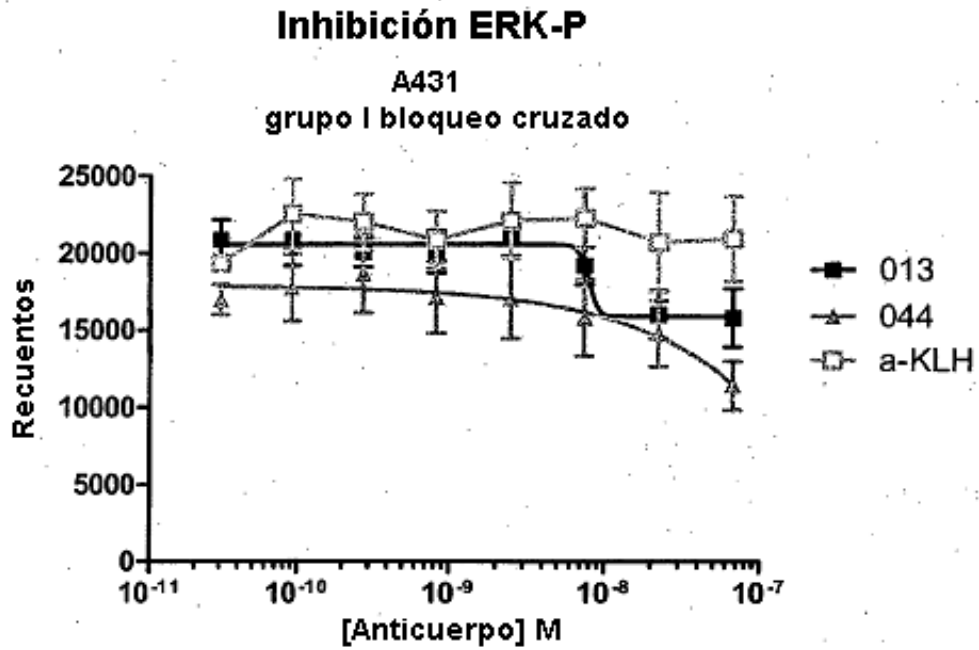


Figura 6 continuación

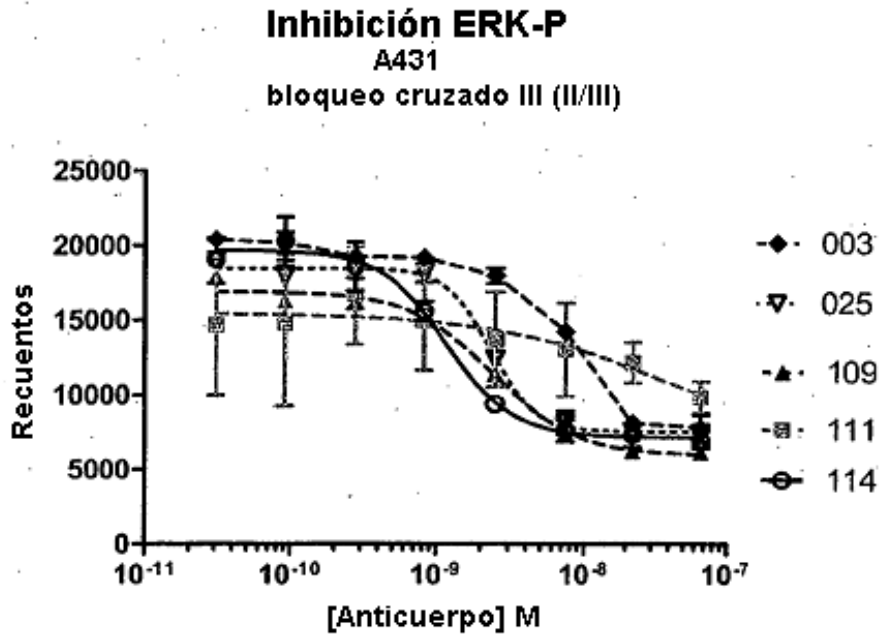


Figura 6: Inhibición de la fosforilación de ERK inducida por FVIIa

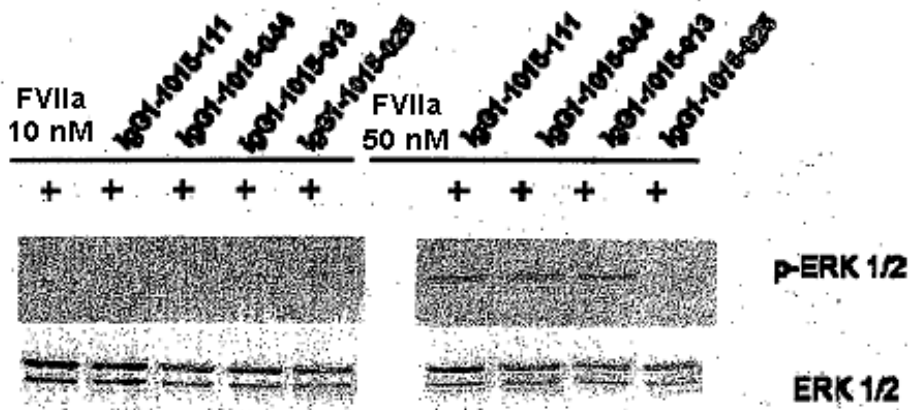
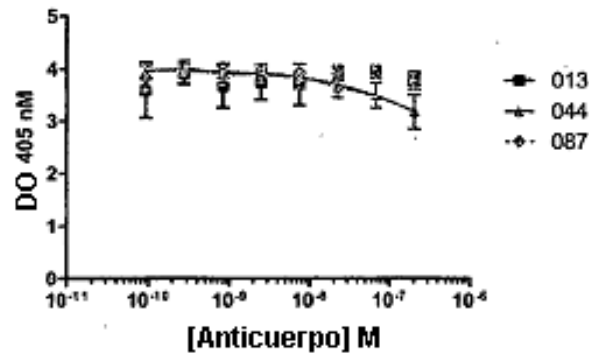


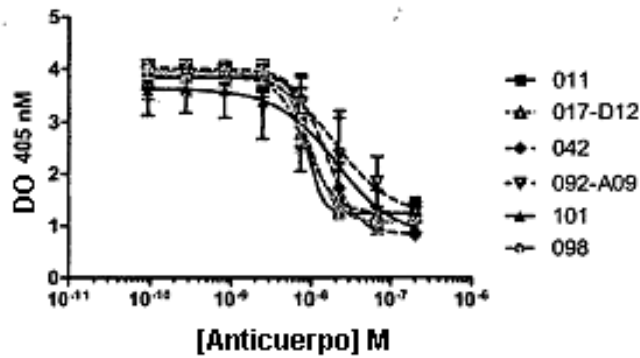
Figura 6a. Inhibición de la fosforilación de ERK inducida por FVIIa, utilizando análisis de transferencia Western

**Figura 7**

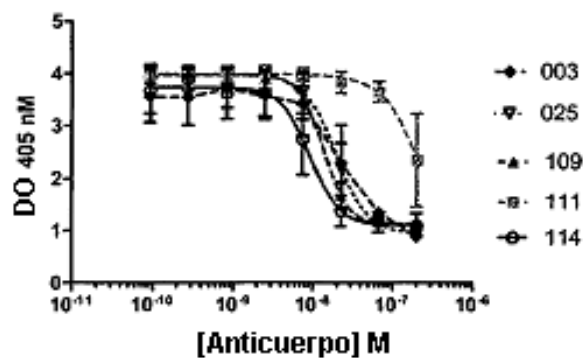
**Inhibición de la producción de IL-8  
MDA-MB-231  
grupo I bloqueo cruzado**



**Inhibición de la producción de IL-8  
MDA-MB-231  
grupo II bloqueo cruzado**



**Inhibición de la producción de IL-8  
MDA-MB-231  
bloqueo cruzado III (II/III)**

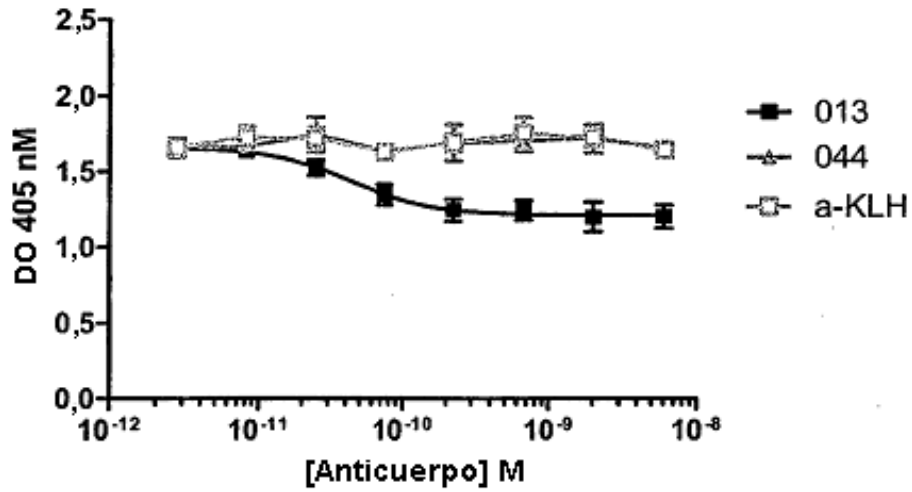


**Figura 7 continuación ...**

**Figura 7. Inhibición de la liberación de IL-8 inducida por FVIIa.** Se cultivaron MDA-MB-231 en medio libre de suero, se añadieron anticuerpos específicos de TF y FVIIa. Se midió la IL-8 inducida por FVIIa por medio de ELISA.

**Figura 8**

**Inhibición de la generación de FXa  
grupo I bloqueo cruzado**



**Inhibición de la generación de FXa  
grupo II bloqueo cruzado**

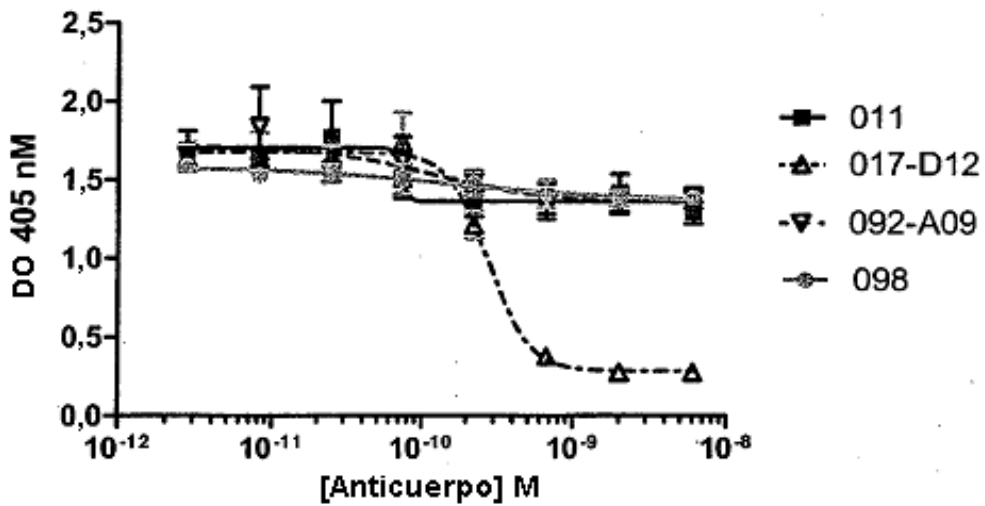
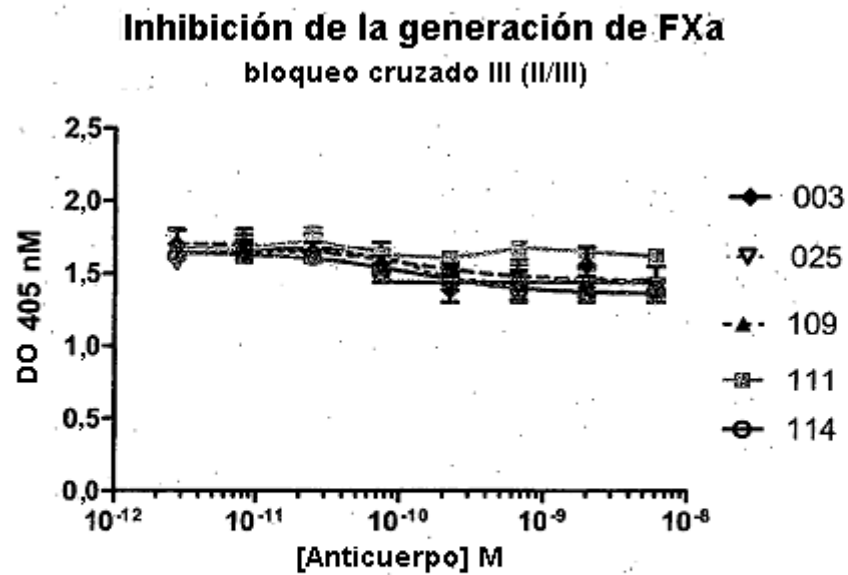


Figura 8 continuación....



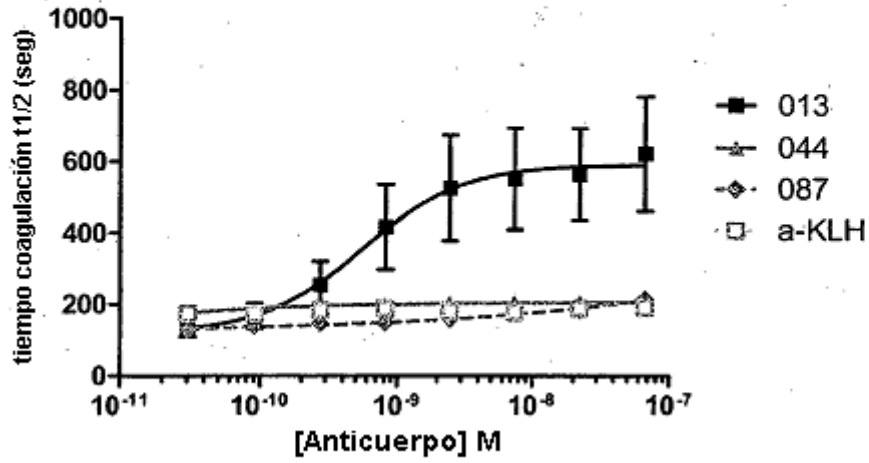
**Figura 8. Inhibición de la generación de FXa.** Se sometió a ensayo la capacidad de los HuMab específicos de TF para inhibir la generación de FXa en un análisis en el que la conversión de Fx en FXa por el complejo TF/FVIIa se mide utilizando un sustrato específico de FXa colorimétrico.



**Figura 9**

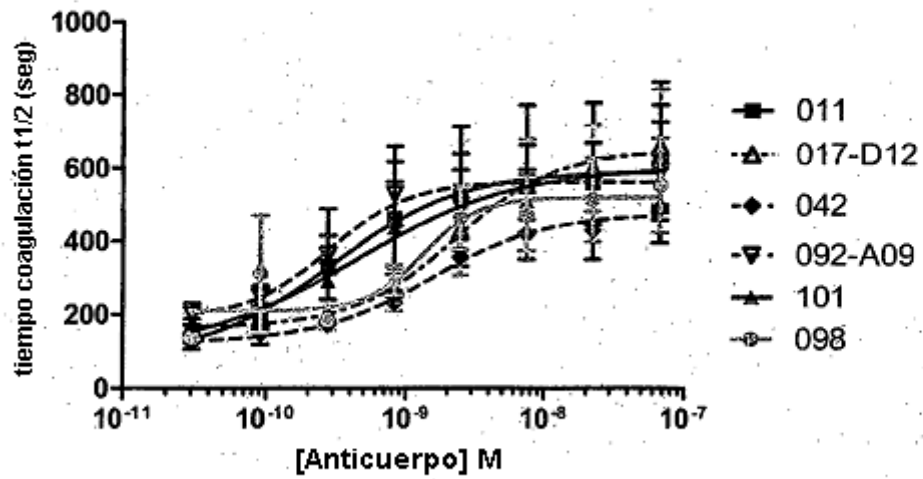
**Tiempo coagulación**

grupo I bloqueo cruzado

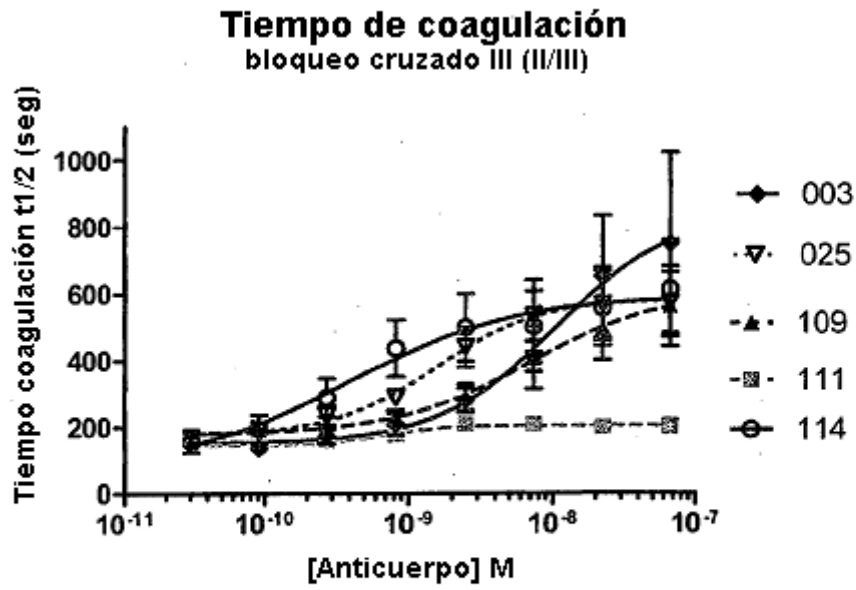


**Tiempo coagulación**

grupo II bloqueo cruzado



**Figura 9 continuación...**

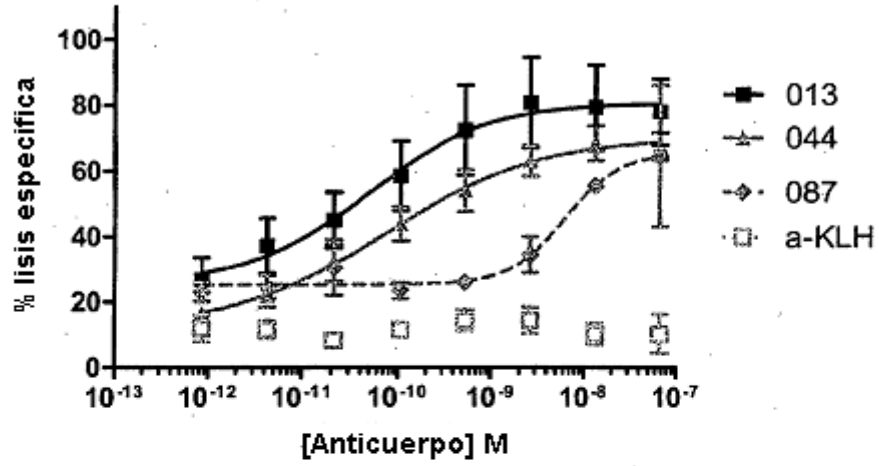


**Figura 9. Inhibición de coagulación sanguínea.** La inhibición de la coagulación sanguínea por TF-HuMAb se midió en un análisis que determinaba el tiempo de coagulación inducida por TF.

**Figura 10**

**Células Bx-PC3 con ADCC**

grupo I bloqueo cruzado



**Células Bx-PC3 con ADCC**

bloqueo cruzado II

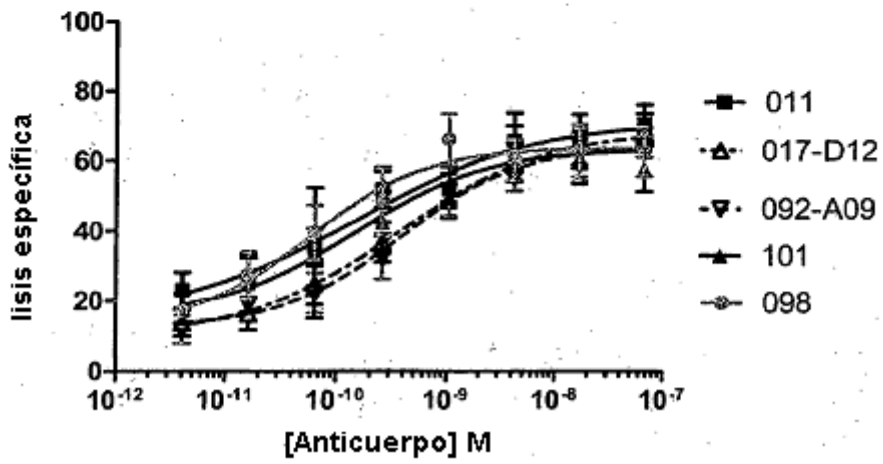
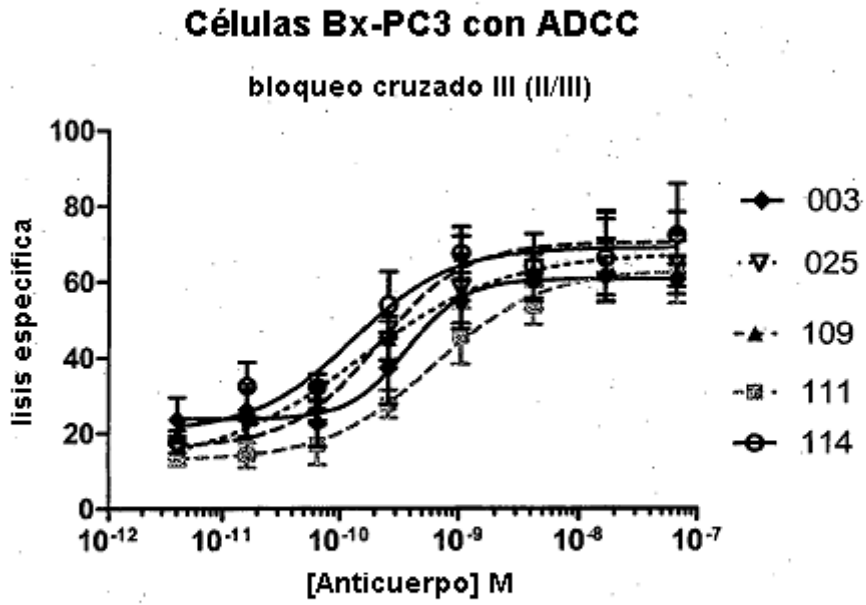


Figura 10 continuación...



**Figura 10:** Lisis inducida por TF-HuMAb de células Bx-PC3 por ADCC.

**Figura 11**

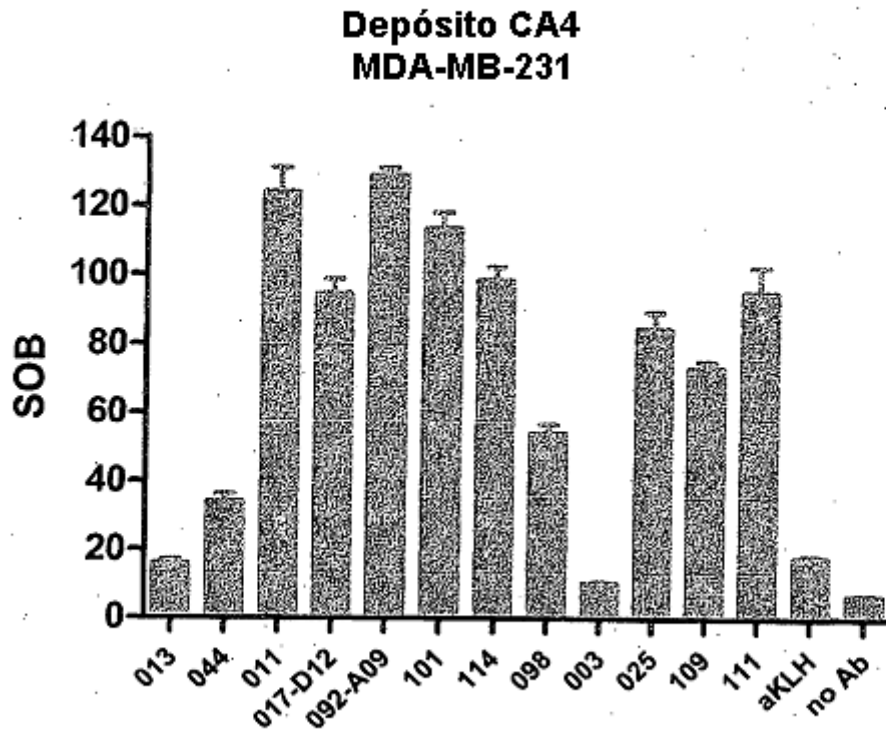


Figura 11 continuación ...

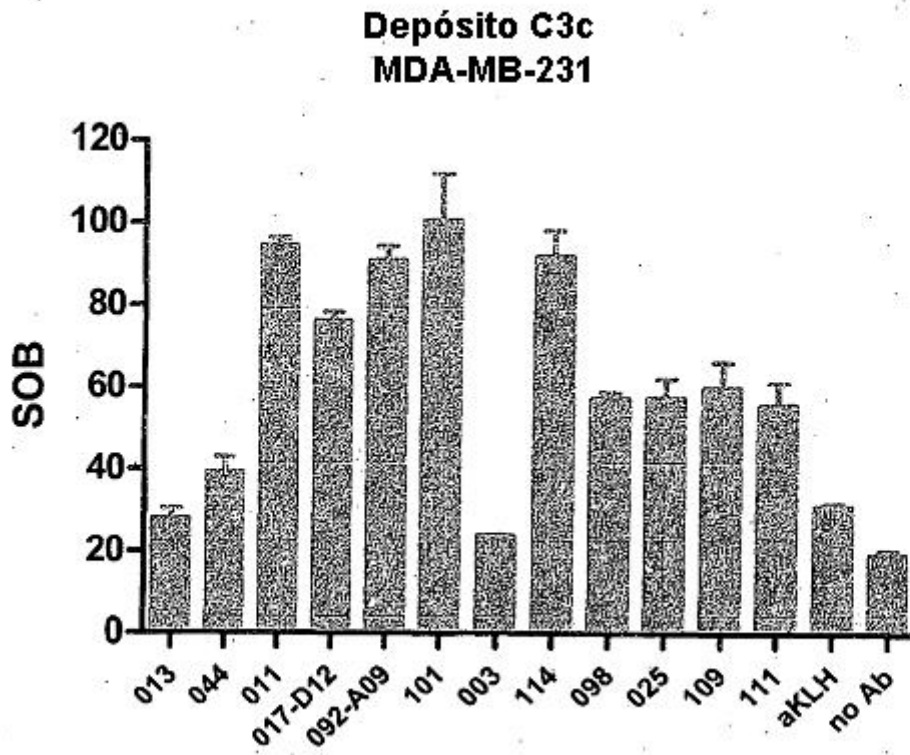


Figura 11 continuación...

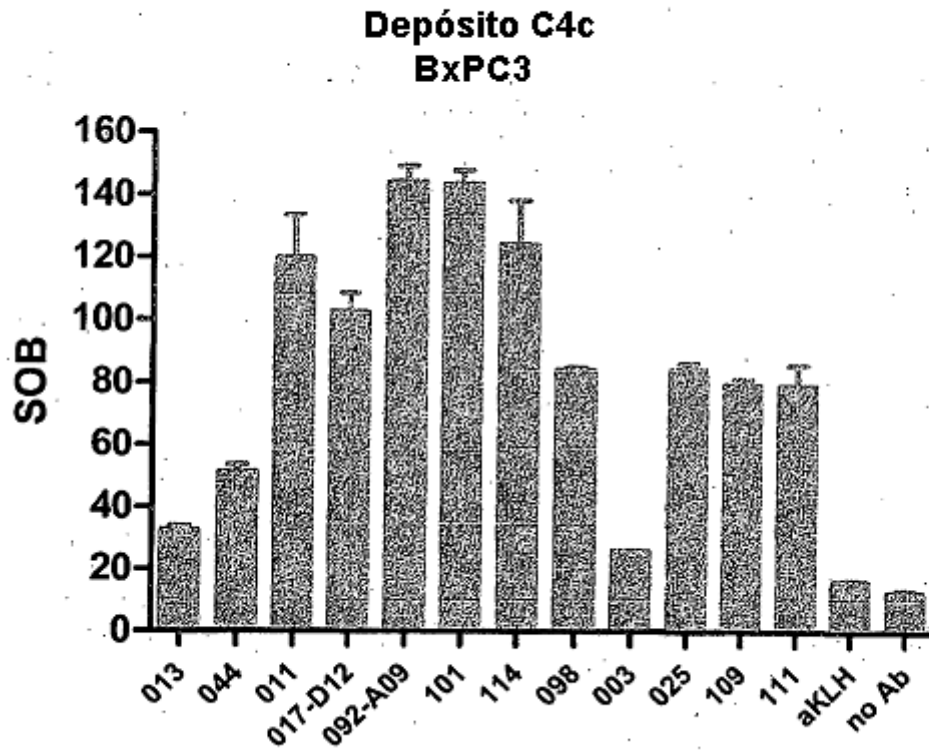


Figura 11 Continuación...

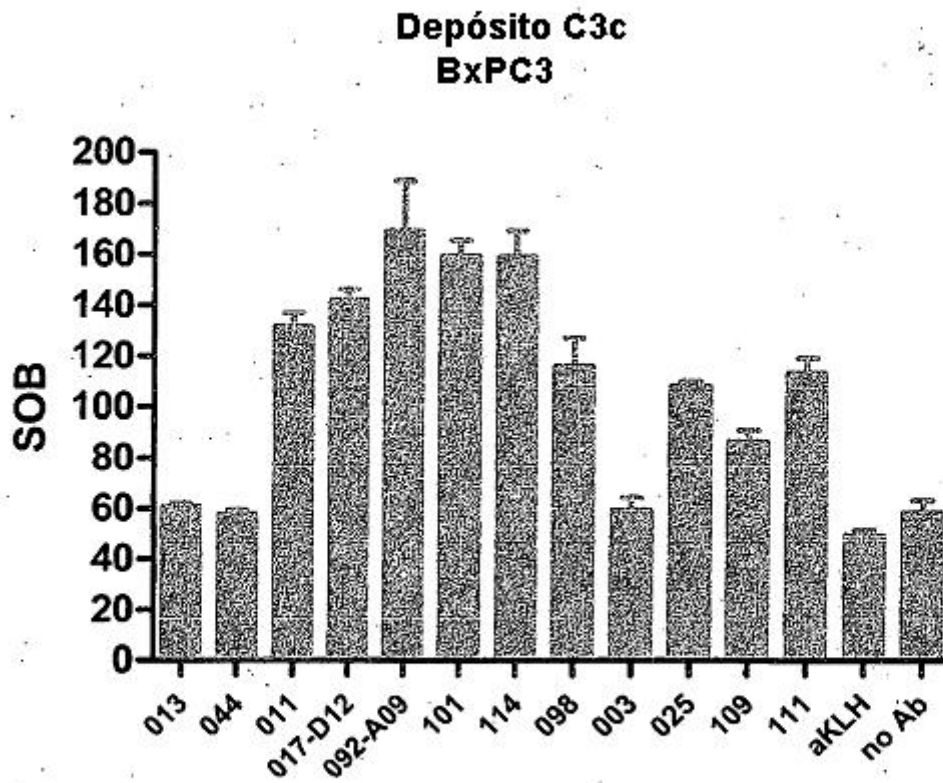
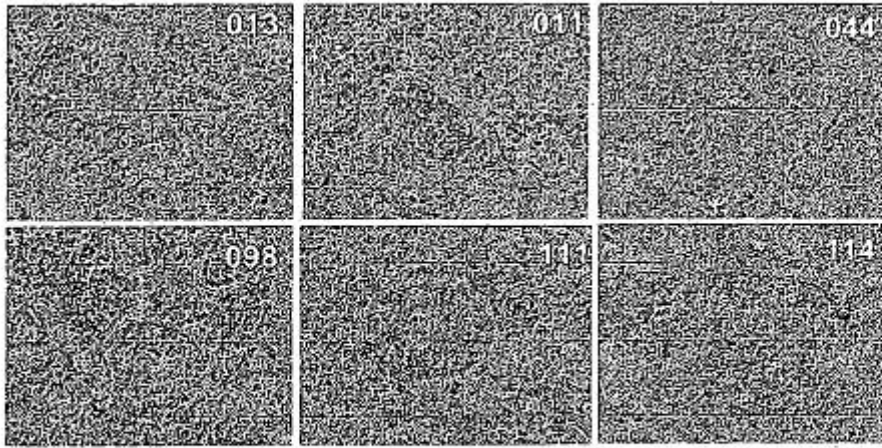


Figura 11: Depósito de complemento

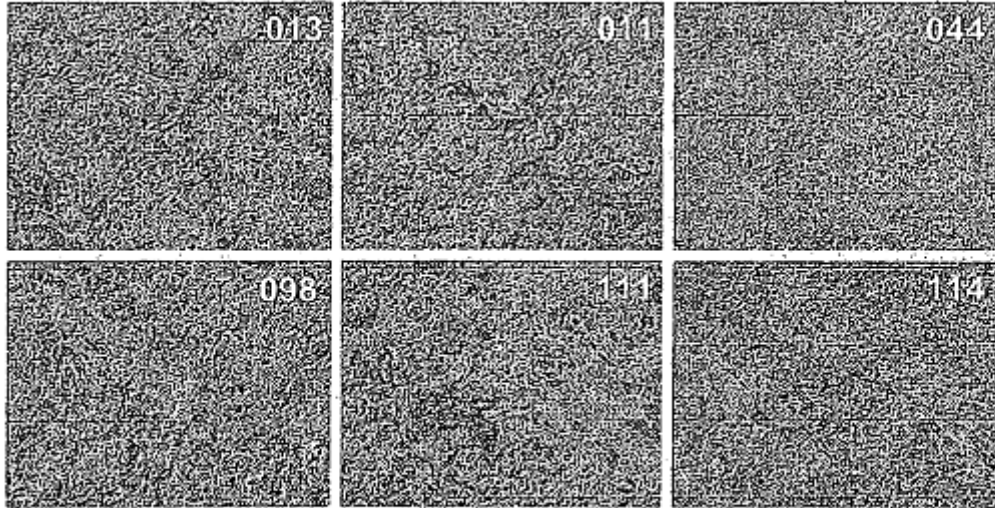


**Figura 12**



**Figura 12:** Análisis inmunohistoquímico de la unión de TF-HuMab a riñón humano normal

**Figura 13**



**Figura 13:** Análisis inmunohistoquímico de la unión de TF-HuMab a tumores pancreáticos

**Figura 14**

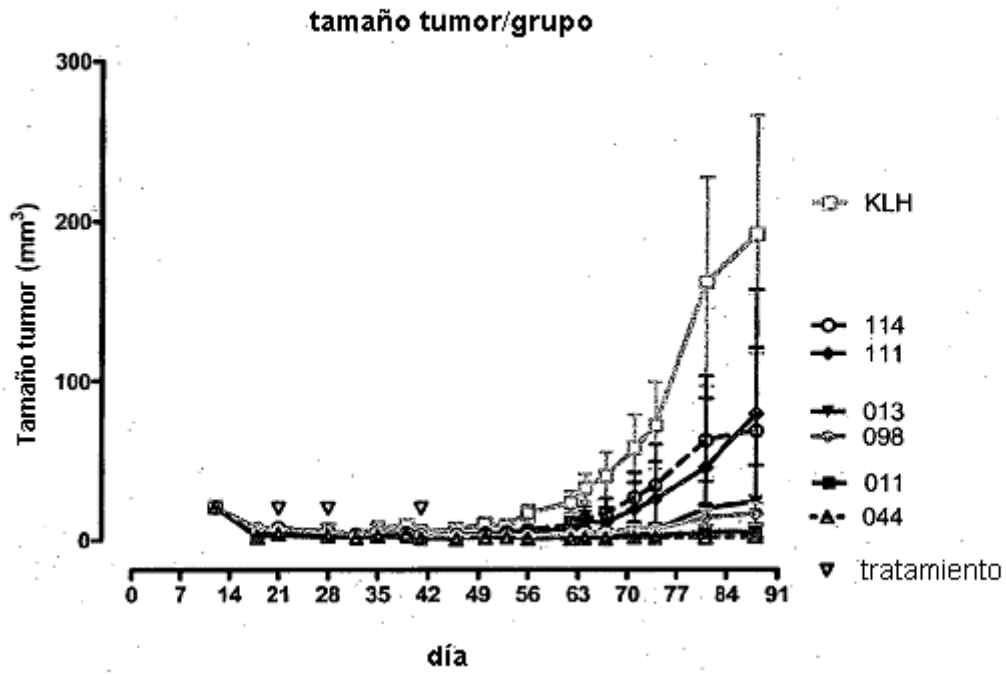
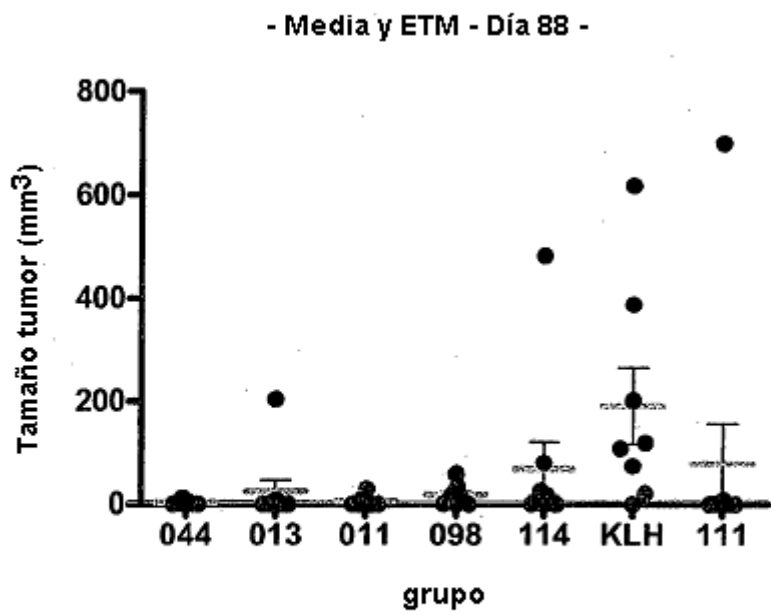
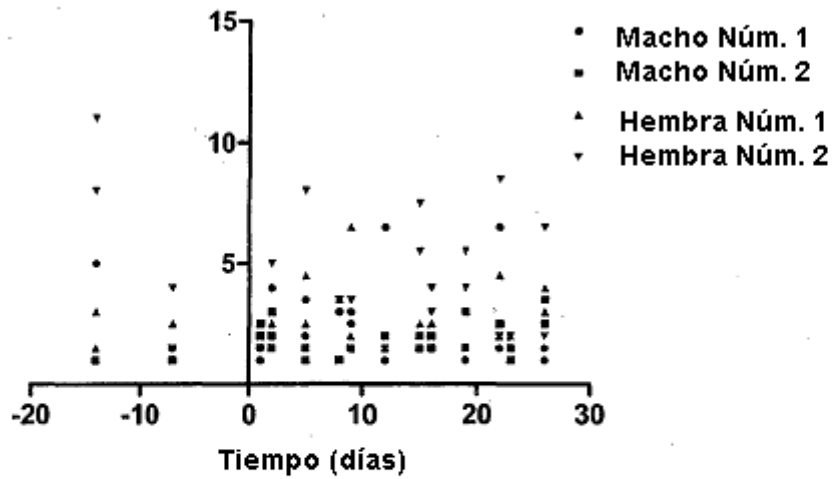


Figura 14 continuación...



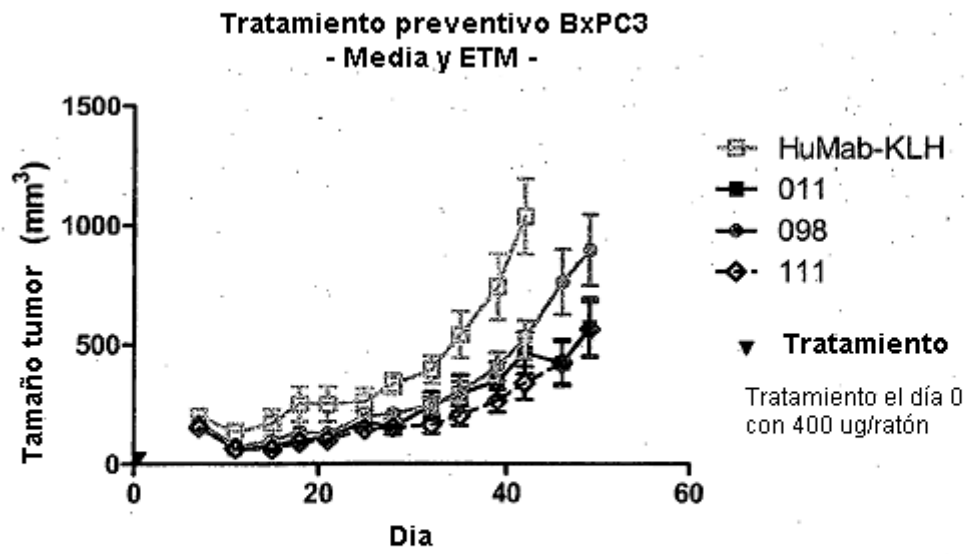
**Figura 14.** Eficacia in vivo de TF-HuMab en xenoinjerto de tumor MDA-MB-231 en almohadillas de grasa mamarias de ratones SCID

**Figura 15**

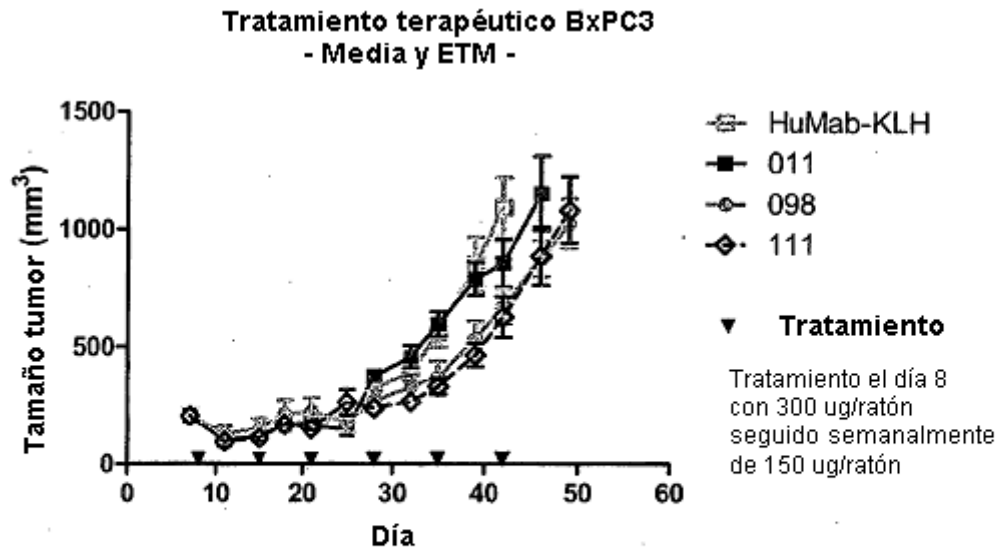


**Figura 15:** Tiempo de sangrado (minutos), determinado en monos cynomolgus después de inyecciones intravenosas de HuMab 01 específico de TF. El anticuerpo se administró el día 1 (0 mg/kg), 8 (1 mg/kg), 15 (10 mg/kg) y 22 (100 mg/kg). Se determinaron el tiempo de sangrado funcional y la pérdida de sangre 1, 24 y 120 horas después de la dosificación

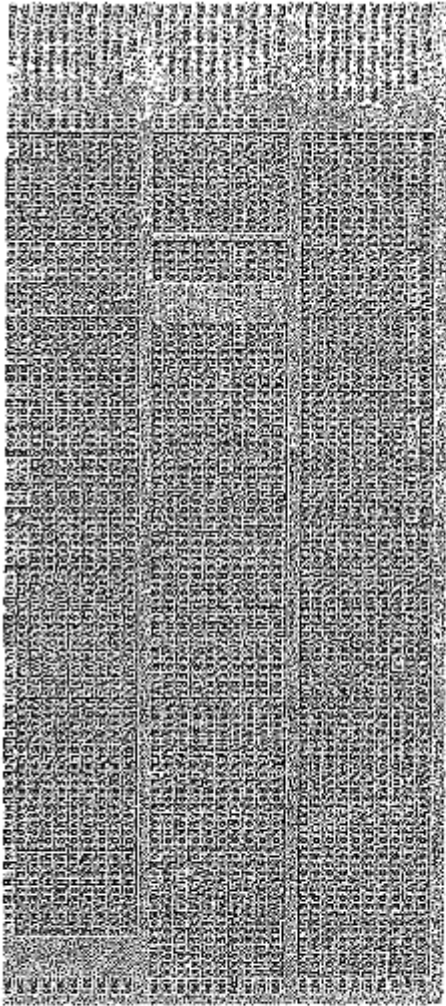
**Figura 16**



Medidas repetidas ANOVA de 2 vías, seguido de prueba post hoc de Bonferroni:  
111 vs KLH: a partir del d28:  $P < 0,05$ , a partir del d32:  $P < 0,01$

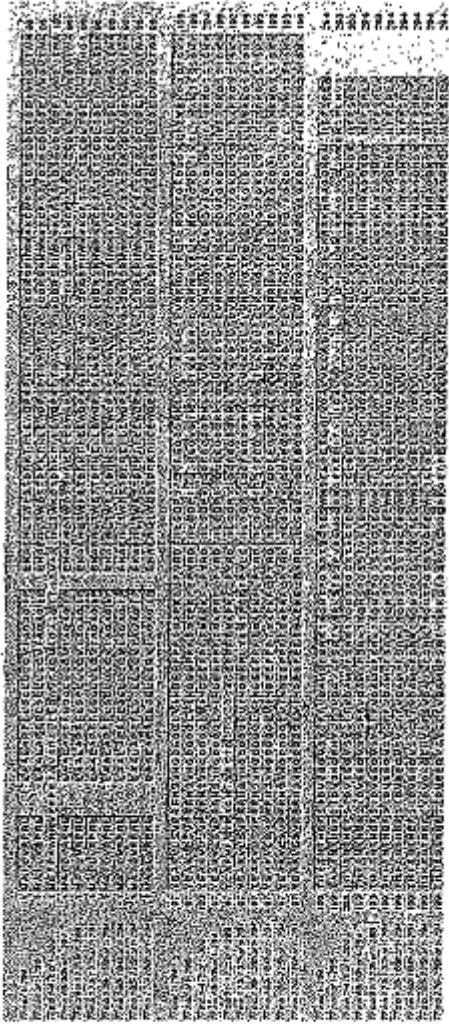


Medidas repetidas ANOVA 2 vías, seguido de prueba posthoc de Bonferroni:  
 111 vs KLH: a partir del d35: P<0,05



**Figura 17 A. Constructo barajado TFh, que contiene dominios TFmm**





**Figura 17 B. Constructo barajado TFmm, que contiene dominios TFh**

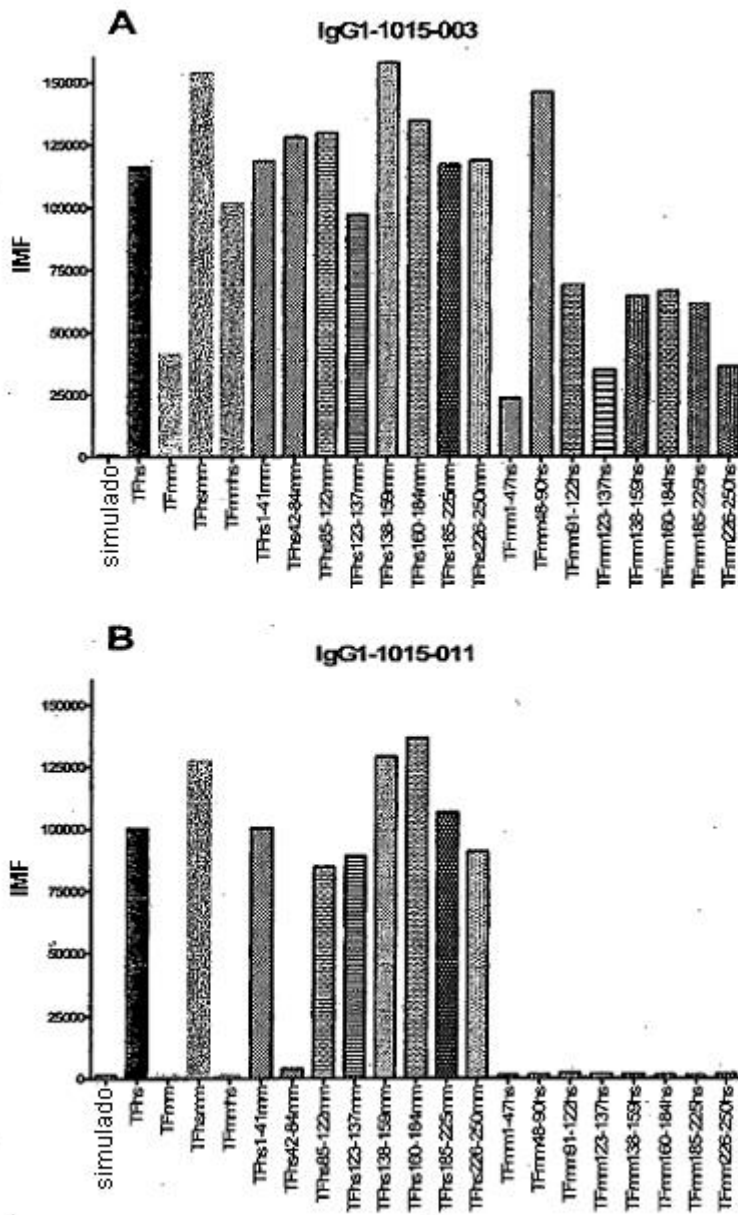


Figura 18 - continuación

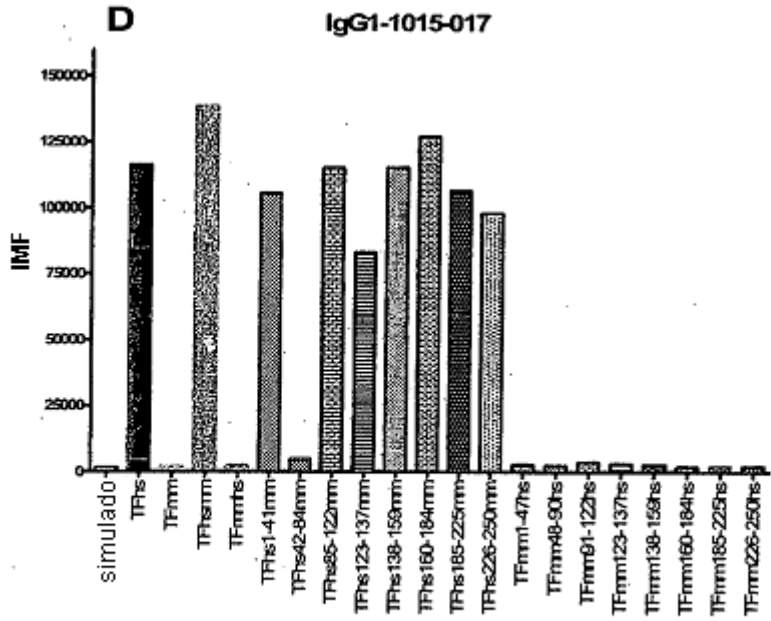
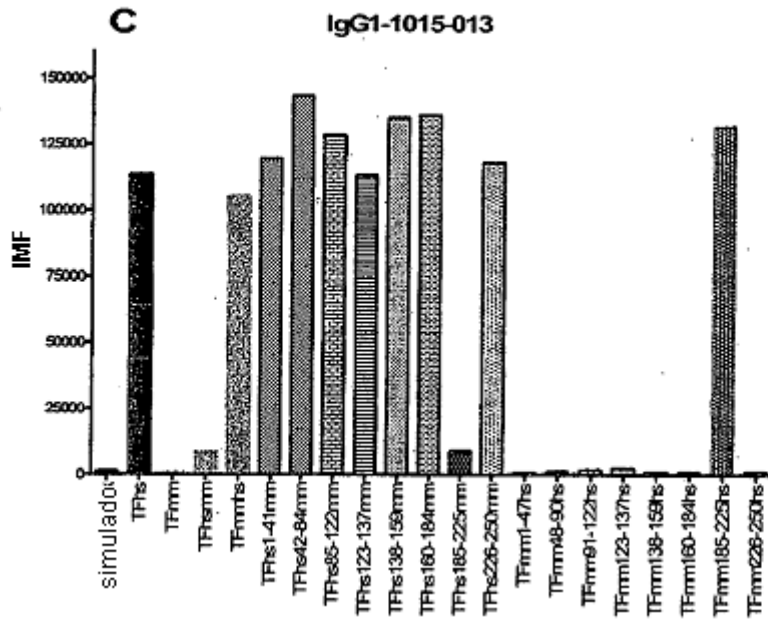


Figura 18 - continuación

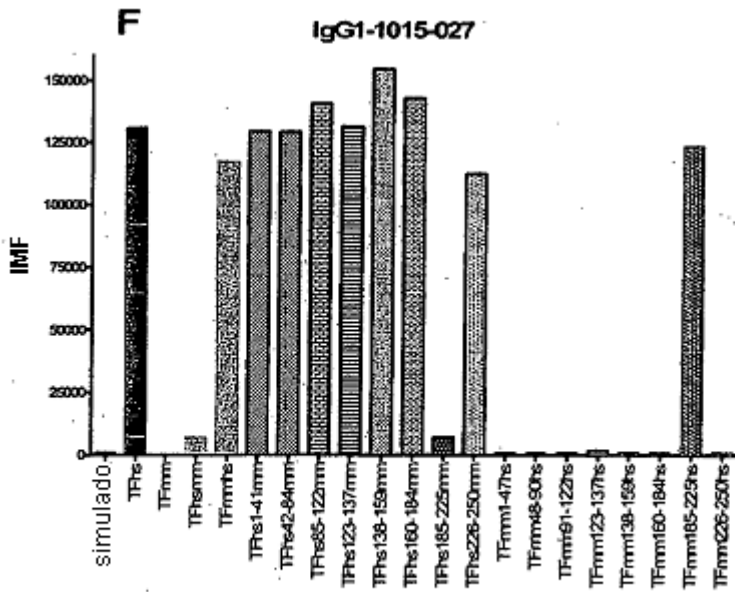
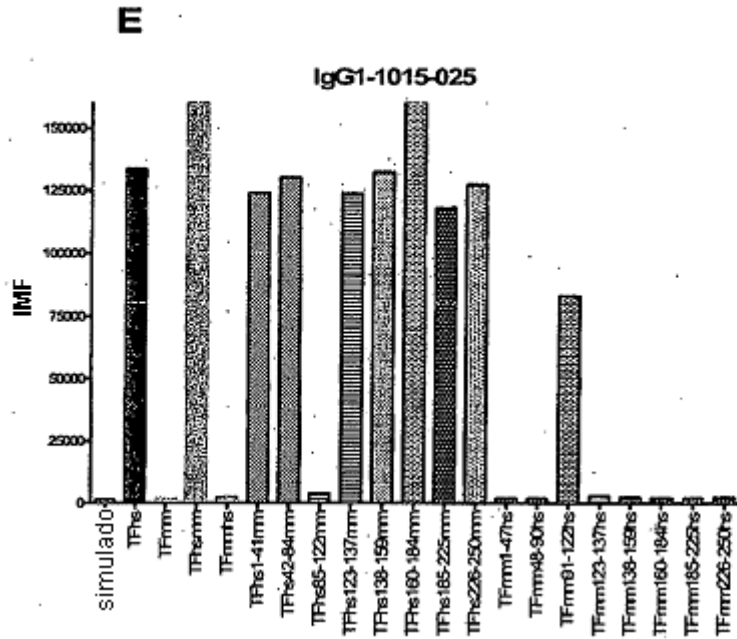


Figura 18 - continuación

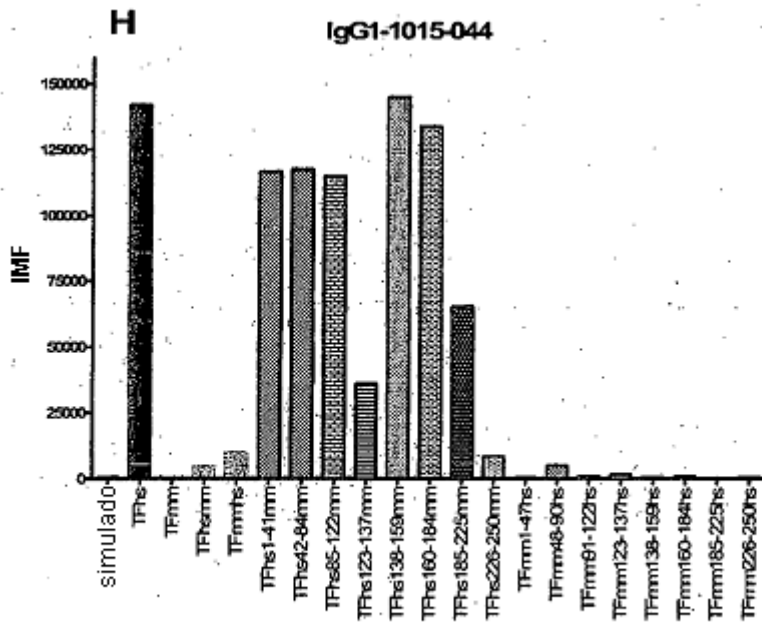
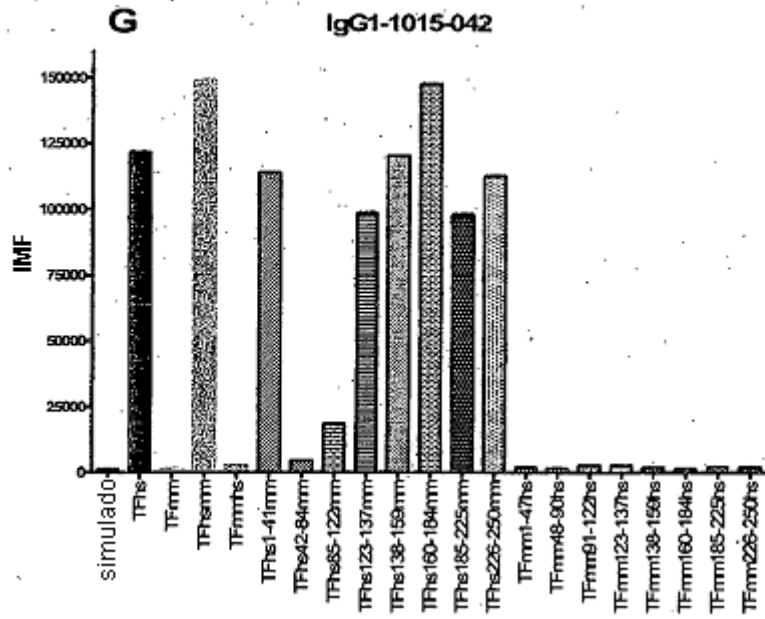


Figura 18 - continuación

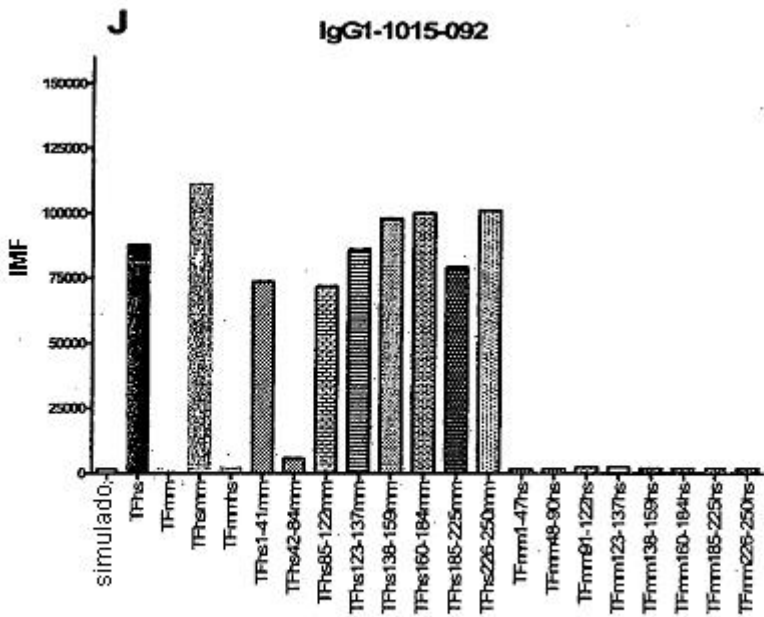
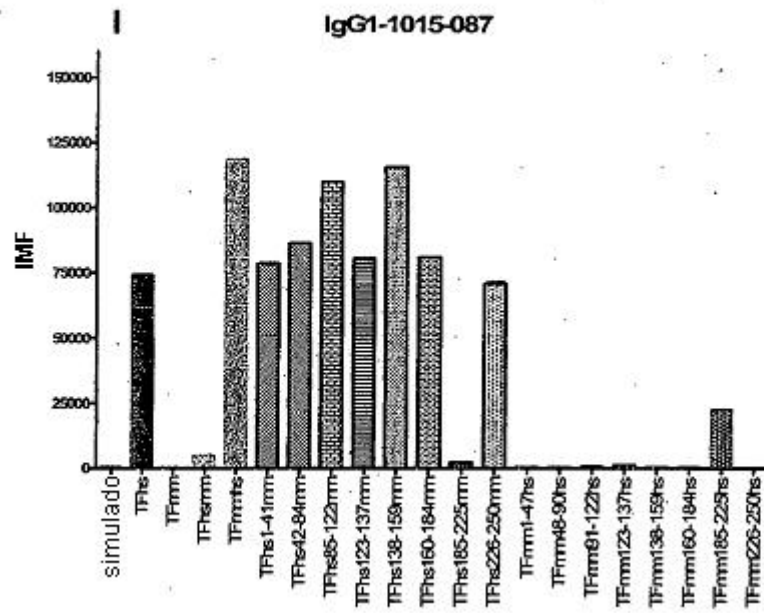


Figura 18 - continuación

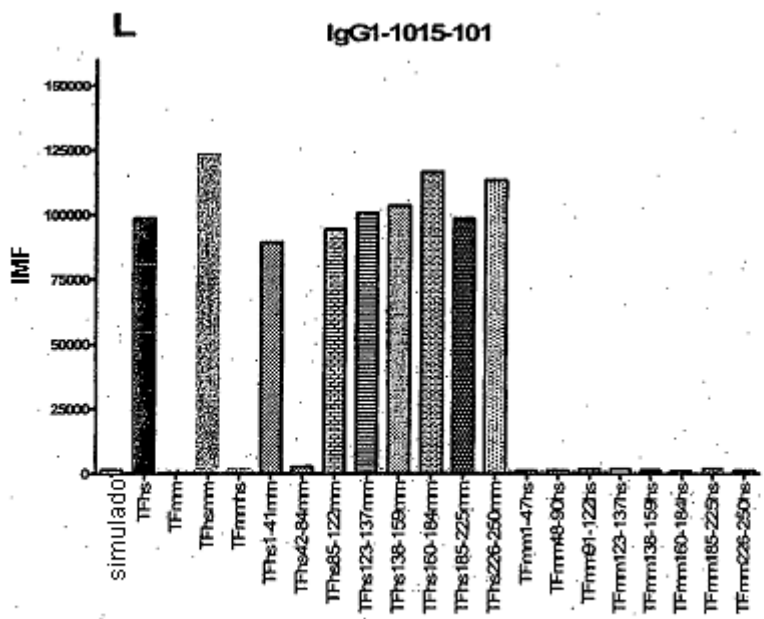
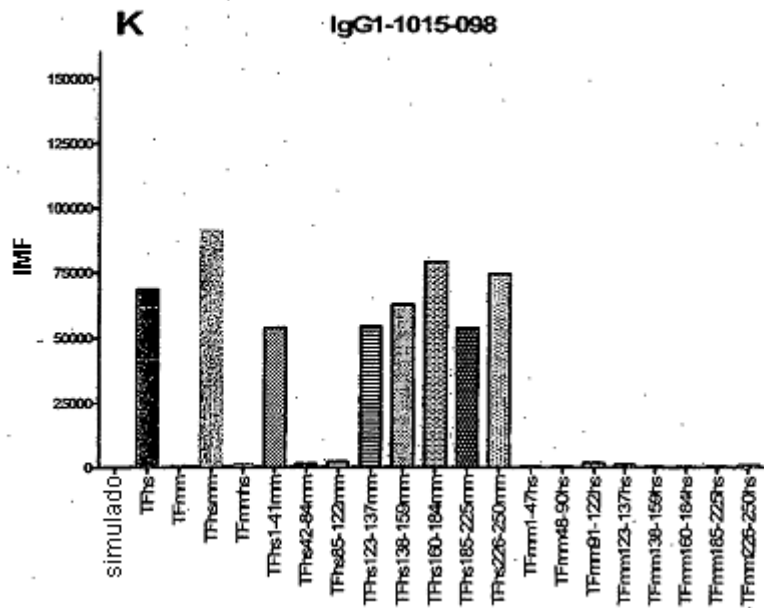


Figura 18 - continuación

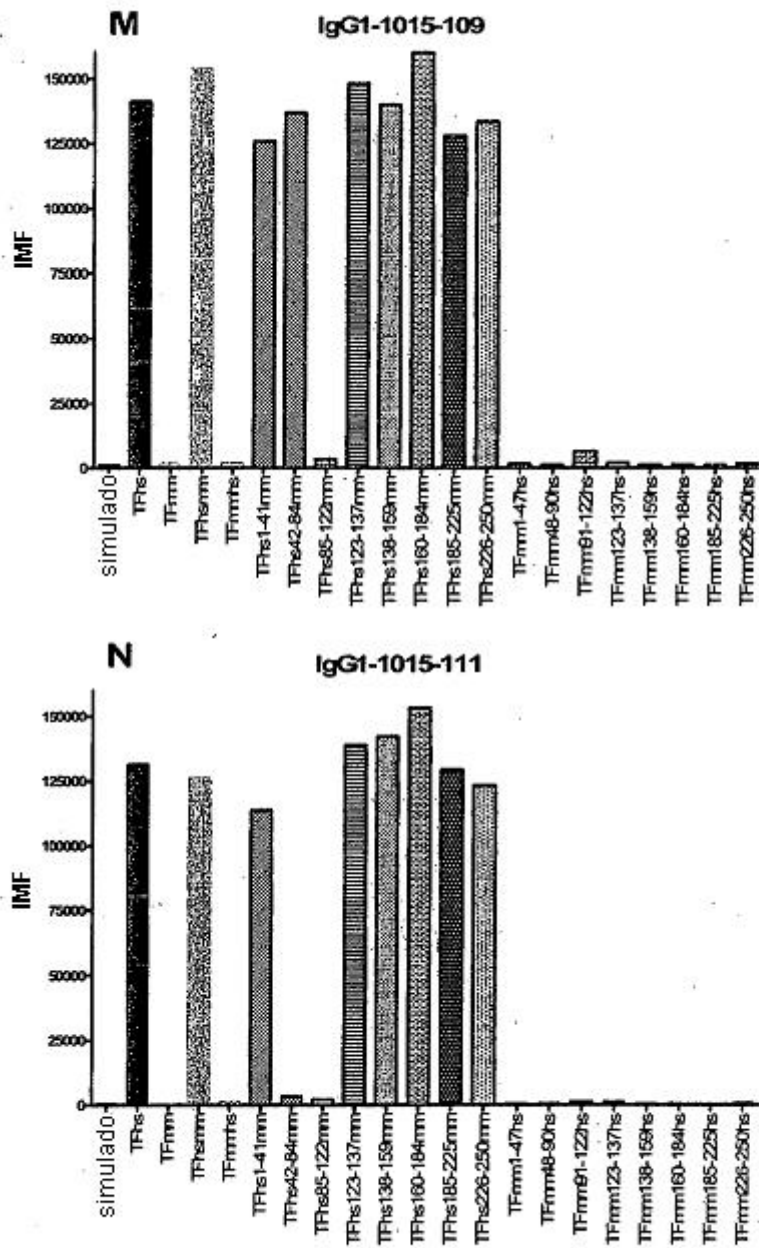




Figura 18 - continuación

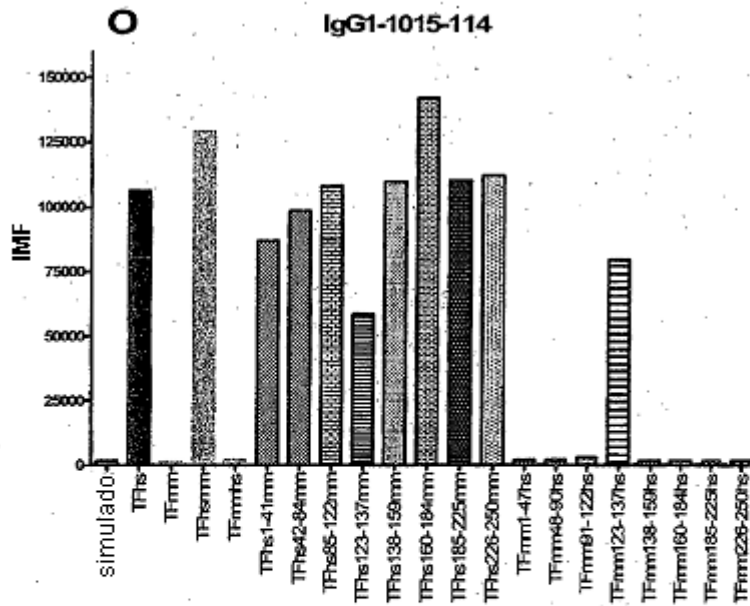


Figura 18 - Unión de HuMab anti-TF a constructos barajados TF expresados en células HEK293F

Se muestran perfiles de unión de los HuMab anti-TF a los diferentes constructos barajados TF expresados sobre células HEK293F, medidos mediante FACS. Cada panel muestra datos de un clon principal. En el eje de la x se representan diferentes constructos: simulado, TFhs, TFmm, TFhsmm, TFmmhs, TFhs1-41mm, TFhs42-84mm, TFhs85-122mm, TFhs123-137mm, TFhs138-159mm, TFhs160-184mm, TFhs185-225mm, TFhs226-250mm, TFmm1-47hs, TFmm48-90hs, TFmm91-122hs, TFmm123-137hs, TFmm138-159hs, TFmm160-184hs, TFmm185-225hs, TFmm226-250hs.

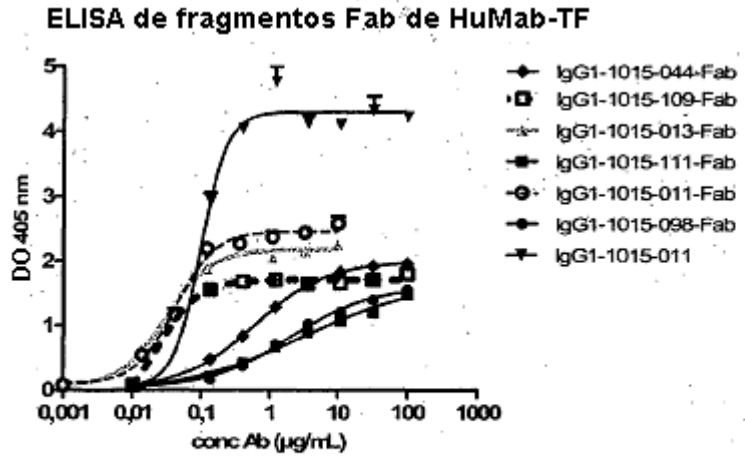


Figura 19. Unión de fragmentos Fab de HuMab-TF al dominio extracelular de TF, determinada mediante ELISA.

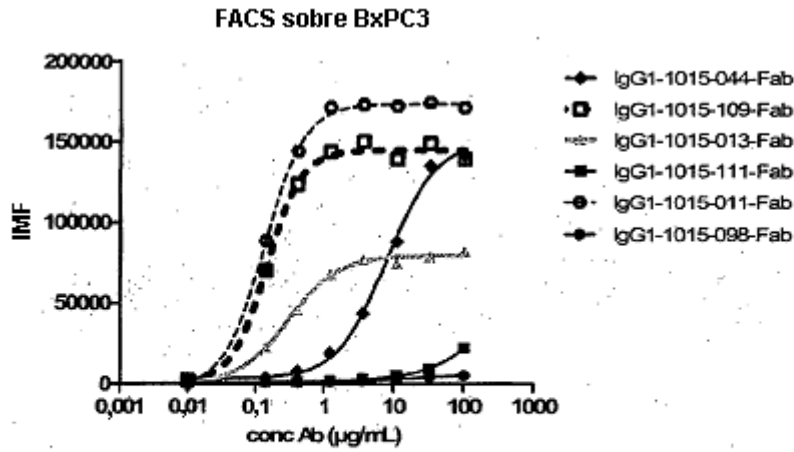
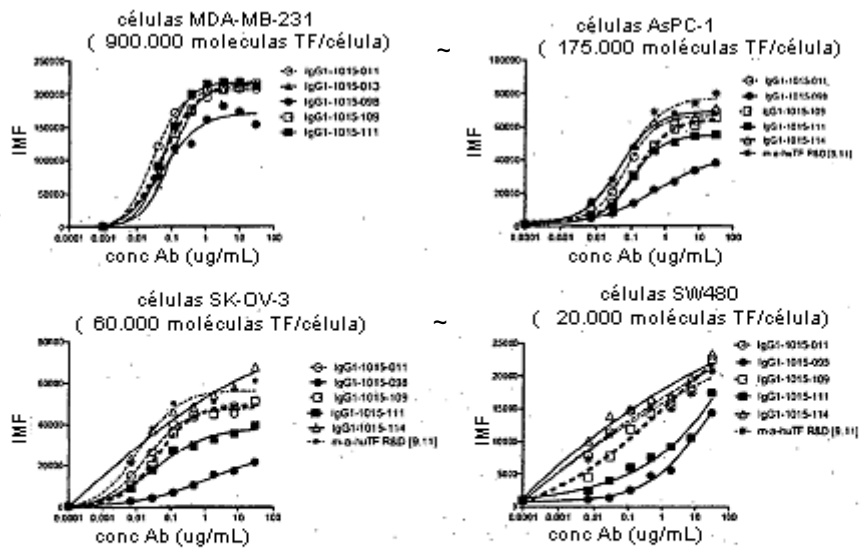


Figura 20. Unión de fragmentos Fab de HuMab-TF a TF celular, determinada mediante FACS sobre células BxPC3.



**Figura 21. El perfil de unión de HuMab anti-TF es dependiente del número de moléculas de TF expresadas.**

La unión de HuMab anti-TF a líneas celulares que expresan diferentes niveles de TF se determinó por medio de FACS