

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 632 748**

51 Int. Cl.:

C07K 16/30 (2006.01)

A61K 39/395 (2006.01)

G01N 33/53 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **08.12.2010 PCT/EP2010/069216**

87 Fecha y número de publicación internacional: **16.06.2011 WO11070088**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **08.12.2010 E 10798996 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **19.04.2017 EP 2510012**

54 Título: **Anticuerpos anti-C4.4a y usos de los mismos**

30 Prioridad:

09.12.2009 EP 09178474
26.07.2010 EP 10170797

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
15.09.2017

73 Titular/es:

BAYER PHARMA AKTIENGESELLSCHAFT
(100.0%)
Müllerstrasse 178
13353 Berlin, DE

72 Inventor/es:

LINDEN, LARS;
CAO, YONG-JIANG;
LEDER, GABRIELE;
STELTE-LUDWIG, BEATRIX;
HARRENGA, AXEL;
FINNERN, RICARDA;
DITTMER, FRANK;
MAYER-BARTSCHMID, ANKE;
FRANZ, JUERGEN;
GREVEN, SIMONE;
WILLUDA, JÖRG y
TEBBE, JAN

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 632 748 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 anti-C4.4a y usos de los mismos

La presente invención proporciona regiones de unión a antígeno y anticuerpos recombinantes y fragmentos funcionales que contienen tales regiones de unión a antígeno que son específicos del polipéptido anclado a la membrana de 29 kDa llamado C4.4a, el cual tiene expresión aumentada en tumores.

Adicionalmente, tiene una elevada abundante en metástasis de estos tipos de cáncer. En consecuencia, los anticuerpos se pueden utilizar para tratar éstos y otros trastornos y afecciones. Los anticuerpos de la invención también se pueden utilizar en el campo del diagnóstico, así como para investigar adicionalmente el papel de C4.4a en la evolución de los trastornos asociados con el cáncer. La invención también proporciona secuencias de ácido nucleico que codifican los anticuerpos anteriores, vectores que contienen las mismas, composiciones farmacéuticas y kits con instrucciones de uso.

Antecedentes de la invención

La terapia basada en anticuerpos está demostrando ser muy eficaz en el tratamiento de diversos cánceres, incluyendo los tumores sólidos. Por ejemplo, HERCEPTIN® se ha utilizado de forma satisfactoria para tratar el cáncer de mama y RITUXAN® es eficaz en los tipos de cáncer relacionados con los linfocitos B. Es importante para el desarrollo de una terapia basada en anticuerpos satisfactoria el aislamiento de anticuerpos frente a proteínas de superficie celular que se ha descubierto que se expresan de forma preferente en las células tumorales. El polipéptido C4.4a (nombre del gen: LYPD3) es una proteína de superficie celular altamente glucosilada anclada por glucosilfosfatidilinositol (GPI). C4.4a de rata se describió en primer lugar como una proteína de superficie celular asociada a metástasis, en la metástasis de células de tumor pancreático de rata (Rösel M. y col., *Oncogene* 1998,17(15):1989-2002). C4.4a humana se clonó a partir de una biblioteca de ADNc de placenta (Würfel, J. y col. *Gene* 2001,262:35-41). C4.4a presenta una homología estructural con el receptor uPAR y contiene dos dominios LY6, que presentan el típico pliegue de proteína en tres dedos (Jacobsen B. y Ploug M., *Current Medicinal Chemistry* 2008, 15:2559-2573). La proteína está altamente glucosilada y contiene 6 sitios predichos de N-glucosilación y varios sitios de O-glucosilación. Además, C4.4a contiene, en total, 9 puentes disulfuro emplazados en los dos dominios Ly6 (Hansen L. y col., *Biochem J.* 2004, 380:845-857). C4.4a muestra una fuerte expresión en células tumorales, como cáncer de pulmón, cáncer colorrectal, cáncer de mama, cáncer de cuello de útero, cáncer de páncreas, cáncer renal, cáncer de cabeza y cuello y melanomas. Los análisis de transferencia de tipo Northern demostraron la expresión de C4.4a en ~ 50 % de los tumores de pulmón primarios y en ~ 75 % de las metástasis de tumor pulmonar, mientras que la expresión en tejido pulmonar no enfermo fue indetectable (Würfel J. y col., *Gene* 2001, 262:35-41). En el carcinoma de pulmón amicrocítico, C4.4a puede utilizarse como un marcador pronóstico. En el presente documento, los datos clínicos muestran claramente que una expresión elevada de C4.4a se correlaciona con un mal pronóstico (Hansen L. y col., *Lung Cancer* 2007, 58:260-266). En melanoma, un análisis detallado de la expresión reveló que C4.4a no se expresa en melanocitos y lunares, pero sí se expresa en ~ 60 % de los melanomas malignos primarios y en el 100 % de las metástasis en ganglios linfáticos y de piel (Seiter S. y col., *J Invest Dermatol.* 2001, 116(2):344-347). Además, se encontró regulación por incremento de la expresión del gen de C4.4a en tejido de cáncer de mama en comparación con el correspondiente tejido de mama normal adyacente (Fletcher G.C., Br. *J. Cancer* 2003, 88(4):579-585), en diversas líneas celulares de cáncer de mama y en cáncer de urotelio (Smith B. A. y col., *Cancer Res* 2001, 61(4):1678-1685). La expresión de C4.4a se demostró mediante FACS con un anticuerpo policlonal en diversas líneas de células tumorales de cáncer colorrectal, cáncer de páncreas, cáncer de mama y cáncer de próstata. En estudios de IHQ de muestras de cáncer colorrectal, cáncer de páncreas y cáncer de mama, la glucosilación variable de C4.4a en líneas de células tumorales humanas interfiere con la unión de estos anticuerpos. Por lo tanto, C4.4a tiene que estar, al menos parcialmente, desglucosilada para permitir la unión de estos anticuerpos policlonales. En pacientes de cáncer colorrectal, la expresión de C4.4a es altamente prevalente y C4.4a se desprende de la superficie celular, lo que la hace en un marcador pronóstico tumoral en suero. La expresión de C4.4a en el frente invasivo es un nuevo marcador pronóstico de recidiva de la enfermedad del cáncer colorrectal (K. Konishi y col., *Cancer Science* 2010). No se han descrito anticuerpos diagnósticos frente a C4.4a soluble en suero (Paret C. y col., *British Journal of Cancer* 2007, 97:1146-1156). En tejido normal, la expresión de C4.4a se limita a los queratinocitos de la piel, las células endoteliales del esófago y las células placentarias (Würfel J. y col., *Gene* 2001, 262:35-41), lo que la hace una diana ideal para la terapia tumoral. El documento WO01/23553 sugiere el uso de un inhibidor de C4.4a (por ejemplo, un anticuerpo anti-C4.4a) que disminuye o inhibe la expresión o actividad de C4.4a para el tratamiento del cáncer.

La función exacta de C4.4a es desconocida; sin embargo está regulada por incremento en los queratinocitos en migración en la cicatrización (Hansen L. y col., *Biochem J.* 2004, 380:845-857). A la luz de la asociación con las metástasis y la homología estructural con el uPAR, se ha propuesto que esta molécula está implicada en la invasión de las células tumorales, probablemente a través de la interacción con la matriz extracelular (Rösel M. y col., *Oncogene* 1998, 17(15):1989-2002; Paret C. y col., *British Journal of Cancer* 2007, 97:1146-1156). Los posibles ligandos son Laminina 1 y 5, Galectina 3 (Paret C., *Int. J. Cancer* 2005, 115:724-733), así como agr2 y agr3 (Fletcher GC., *Brit. J. Cancer* 2003, 88:579-585).

El valor pronóstico de los modelos de cáncer de xenoinjertos murinos para determinar el resultado clínico de la terapia contra el cáncer con inmunotoxinas a menudo está limitado por una falta de reactividad cruzada de los

anticuerpos terapéuticos con sus ortólogos murinos, lo que conduce a una unión inespecífica al tejido normal reducida. Por otro lado, los anticuerpos Fv neutralizantes anti-ratón que se forman en pacientes que se tratan con anticuerpos murinos o quiméricos, pueden tener como resultado una toxicidad limitante de la dosis o una potencia terapéutica reducida. Por lo tanto, para explotar completamente el potencial de la expresión específica de C4.4a en la terapia contra el cáncer, se necesitan anticuerpos dirigidos que combinen las ventajas de una elevada afinidad de unión de C4.4a con un formato de anticuerpo completamente humano o humanizado, y con reactividad cruzada con murinos.

Una característica necesaria adicional de los nuevos anticuerpos es la elevada unión de afinidad a distintas líneas celulares de cáncer que expresan C4.4a en su superficie. C4.4a está glucosilada de forma distinta en las células tumorales (Paret C. y col., British Journal of Cancer 2007 97:1146-1156). Por lo tanto, los anticuerpos anti-C4.4a eficaces deben unirse a un epítipo presentado por las células tumorales de distintos pacientes, con independencia de la variación individual incluyendo, pero sin limitación, las variaciones en los patrones de glucosilación, lo que conduce a la expresión de distintas formas de C4.4a.

En el presente documento se proporcionan anticuerpos, fragmentos de anticuerpo de unión a antígeno de los mismos, o variantes de los mismos, que se unen a C4.4a con afinidad alta, se internalizan de forma eficaz y que, preferentemente, reaccionan de forma cruzada con C4.4a de otras especies. También se proporcionan terapias basadas en anticuerpos para el cáncer, en particular para tumores que expresan C4.4a, tales como los cánceres de mama, del tracto respiratorio, cerebral, de órganos reproductores, del tracto digestivo, del tracto urinario, ocular, de hígado, de piel, de cabeza y cuello, de tiroides, de paratiroides, y sus metástasis a distancia, y también incluyen linfomas, sarcomas y leucemias. Estas terapias utilizan anticuerpos, fragmentos de anticuerpo de unión a antígeno de los mismos, o variantes de los mismos, que facilitan la entrega de agentes terapéuticamente activos contra células cancerosas.

Sumario de la invención

Es un objeto de la invención proporcionar anticuerpos, fragmentos de anticuerpo de unión a antígeno de los mismos, o variantes de los mismos, que son altamente selectivos para el polipéptido C4.4a anclado por GPI en la superficie celular o soluble, mediante la eliminación de la porción GPI, en suero de pacientes y que pueden emplearse en procedimientos para la detección de la expresión de C4.4a, la cual se asocia con patologías tales como cáncer de pulmón, de colon, de mama, de cuello de útero, de páncreas, de riñón, de cabeza y cuello o melanomas, y en el tratamiento de tales patologías. Con estos fines, es un objeto de la invención proporcionar anticuerpos humanos, humanizados o quiméricos, o fragmentos de anticuerpo de unión a antígeno de los mismos, que se unen de forma específica a un epítipo de C4.4a presente en distintas formas del polipéptido C4.4a humano maduro de 278 aminoácidos (SEQ ID 1), que presentan las líneas celulares de cáncer que expresan C4.4a y/o al que se unen estos anticuerpos con afinidades elevadas. Como se utiliza en el presente documento, distintas 'formas' de C4.4a incluye, pero sin limitación, distintas glucoformas, distintas isoformas o polipéptidos de C4.4a que experimentan distintas modificaciones traduccionales y postraduccionales. Es otro objeto de la invención proporcionar anticuerpos, o fragmentos de anticuerpo de unión a antígeno de los mismos, o variantes de los mismos, que son seguros para administración al ser humano.

Es un objeto de la presente divulgación proporcionar anticuerpos, o fragmentos de anticuerpo de unión a antígeno de los mismos, o variantes de los mismos, que se unen a C4.4a humana y reaccionan de forma cruzada con C4.4a de otras especies. Preferentemente, dicha otra especie es un roedor, tal como, por ejemplo, un ratón o una rata. Muy preferentemente, los anticuerpos, o fragmentos de anticuerpo de unión a antígeno de los mismos, o variantes de los mismos, se unen a C4.4a humana y reaccionan de forma cruzada con C4.4a murina.

Es otro objeto de la presente divulgación proporcionar anticuerpos, o fragmentos de anticuerpo de unión a antígeno de los mismos, o variantes de los mismos, que se unen a una amplia variedad de distintas líneas celulares que expresan C4.4a. Se desvelan anticuerpos o variantes de los mismos que se unen a distintas células cancerosas o células tumorales que expresan C4.4a y suscitan una actividad efectora inmunitaria (por ejemplo, CCDA o CDC) frente a células cancerosas que expresan C4.4a, mediante el uso de uno o más anticuerpos de la invención o variantes de los mismos.

Es un objetivo de la invención proporcionar anticuerpos, o fragmentos de anticuerpo de unión a antígeno de los mismos, o variantes de los mismos, que se internalizan de forma eficaz tras la unión a una célula que expresa C4.4a. Un anticuerpo desvelado en el presente documento podría coadministrarse con medicamentos conocidos y, en algunos casos, el propio anticuerpo podría estar modificado. Por ejemplo, un anticuerpo podría estar conjugado con un agente citotóxico, una inmunotoxina, un toxóforo o un radioisótopo para potencialmente aumentar adicionalmente la eficacia.

Es otro objetivo de la invención proporcionar anticuerpos que constituyen una herramienta para el diagnóstico de afecciones malignas o displásicas en las que la expresión de C4.4a está elevada en comparación con el tejido normal o en donde C4.4a se desprende de la superficie celular y pasa a ser detectable en suero. Se proporcionan anticuerpos anti-C4.4a conjugados con un marcador detectable. Los marcadores preferentes son un radiomarcador, una enzima, un cromóforo o uno fluorescente.

La invención también se refiere a polinucleótidos que codifican los anticuerpos de la invención, o fragmentos de unión a antígeno de los mismos, a células que expresan los anticuerpos de la invención, o fragmentos de unión a antígeno de los mismos, a procedimientos para producir los anticuerpos de la invención, o fragmentos de unión a antígeno de los mismos, a procedimientos para inhibir el crecimiento de células displásicas utilizando los anticuerpos de la invención, o fragmentos de unión a antígeno de los mismos, y a procedimientos para tratar y detectar el cáncer utilizando los anticuerpos de la invención o fragmentos de unión a antígeno de los mismos.

La invención proporciona anticuerpos que se distinguen de los anticuerpos contra C4.4a existentes descritos por Paret (Paret C. y col., British Journal of Cancer 2007 97:1146-1156) en que a) se unen a C4.4a nativa, expresada en la superficie celular y completamente glucosilada, al dominio S1 de C4.4a nativa, expresada en la superficie celular y completamente glucosilada, b) reaccionan de forma cruzada con C4.4a murina y c) se internalizan de forma eficaz en las células que expresan C4.4a. Hansen y col. (Thrombosis and Haemostasis, Vol. 93, n.º 4, 2005 página A33) desvelan en un resumen de sesión breve dos anticuerpos monoclonales que se unen al dominio 1 (S1) de C4.4a. Se menciona que los dos anticuerpos reconocen epítopos no solapante. No se describe que estos anticuerpos tengan reactividad cruzada con los murinos y no se proporcionan características farmacológicas. Estos anticuerpos solo se describen como herramientas de investigación. A partir de Hansen y col. o Paret y col., la presente invención proporciona anticuerpos que son adecuados para un tratamiento o un fin diagnóstico.

Éstos y otros objetivos de la invención se describen más extensamente en el presente documento.

La presente divulgación proporciona un anticuerpo aislado o fragmento de unión a antígeno del mismo que contiene una región de unión a antígeno que se une de forma específica a C4.4a nativa, expresada en la superficie celular y completamente glucosilada, preferentemente que se une de forma específica al dominio S1 (aminoácidos 1-85 de C4.4a; SEQ ID NO: 1) del polipéptido C4.4a nativo, expresado en la superficie celular y completamente glucosilado. En otra realización, los anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno se internalizan en una célula que expresa C4.4a tras la unión del anticuerpo, o fragmento de unión a antígeno, a la célula mencionada con anterioridad. En una realización preferente adicional de la presente divulgación, los anticuerpos, o fragmentos de unión a antígeno, compiten por la unión a C4.4a con los anticuerpos M31-B01 o M20-D02 S-A. En una realización preferente adicional de la presente divulgación, los anticuerpos, o fragmentos de unión a antígeno, compiten por la unión a C4.4a humana con los anticuerpos M31-B01 o M20-D02 S-A. En una realización preferente adicional de la presente divulgación, los anticuerpos, o fragmentos de unión a antígeno, compiten por la unión a C4.4a humana y de roedor con los anticuerpos M31-B01 o M20-D02 S-A, una realización preferente adicional es en la que la C4.4a de roedor es C4.4a de ratón.

El anticuerpo de la invención, o fragmento de unión a antígeno del mismo, comprende una región de unión a antígeno de la cadena pesada que comprende la SEQ ID NO: 5 (H-CDR1), la SEQ ID NO: 9 (H-CDR2) y la SEQ ID NO: 13 (H-CDR3) y comprende una región de unión a antígeno de la cadena ligera que comprende la SEQ ID NO: 17 (L-CDR1), la SEQ ID NO: 21 (L-CDR2) y la SEQ ID NO: 25 (L-CDR3).

En una realización más preferente, el anticuerpo de la divulgación, o fragmento de unión a antígeno del mismo, comprende una región de unión a antígeno de la cadena pesada que comprende la SEQ ID NO: 6 (H-CDR1), la SEQ ID NO: 10 (H-CDR2) y la SEQ ID NO: 14 (H-CDR3), y comprende una región de unión a antígeno de la cadena ligera que comprende la SEQ ID NO: 18 (L-CDR1), la SEQ ID NO: 22 (L-CDR2) y la SEQ ID NO: 26 (L-CDR3).

En una realización más preferente, el anticuerpo de la divulgación, o fragmento de unión a antígeno del mismo, comprende una región de unión a antígeno de la cadena pesada que comprende la SEQ ID NO: 7 (H-CDR1), la SEQ ID NO: 11 (H-CDR2) y la SEQ ID NO: 15 (H-CDR3), y comprende una región de unión a antígeno de la cadena ligera que comprende la SEQ ID NO: 19 (L-CDR1), la SEQ ID NO: 23 (L-CDR2) y la SEQ ID NO: 27 (L-CDR3).

En una realización más preferente, el anticuerpo de la divulgación, o fragmento de unión a antígeno del mismo, comprende una región de unión a antígeno de la cadena pesada que comprende la SEQ ID NO: 8 (H-CDR1), la SEQ ID NO: 12 (H-CDR2) y la SEQ ID NO: 16 (H-CDR3), y comprende una región de unión a antígeno de la cadena ligera que comprende la SEQ ID NO: 20 (L-CDR1), la SEQ ID NO: 24 (L-CDR2) y la SEQ ID NO: 28 (L-CDR3).

Un anticuerpo de la invención, o fragmento de unión a antígeno del mismo, comprende una región de unión a antígeno de la cadena pesada que comprende la SEQ ID NO: 45 (H-CDR1), la SEQ ID NO: 46 (H-CDR2) y la SEQ ID NO: 47 (H-CDR3), y comprende una región de unión a antígeno de la cadena ligera que comprende la SEQ ID NO: 48 (L-CDR1), la SEQ ID NO: 49 (L-CDR2) y la SEQ ID NO: 50 (L-CDR3).

En una realización más preferente, el anticuerpo de la divulgación, o fragmento de unión a antígeno del mismo, comprende una región de unión a antígeno de la cadena pesada que comprende la SEQ ID NO: 55 (H-CDR1), la SEQ ID NO: 56 (H-CDR2) y la SEQ ID NO: 57 (H-CDR3), y comprende una región de unión a antígeno de la cadena ligera que comprende la SEQ ID NO: 58 (L-CDR1), la SEQ ID NO: 59 (L-CDR2) y la SEQ ID NO: 60 (L-CDR3).

En una realización más preferente, el anticuerpo de la divulgación, o fragmento de unión a antígeno del mismo, comprende una región de unión a antígeno de la cadena pesada que comprende la SEQ ID NO: 65 (H-CDR1), la SEQ ID NO: 66 (H-CDR2) y la SEQ ID NO: 67 (H-CDR3), y comprende una región de unión a antígeno de la cadena

ligera que comprende la SEQ ID NO: 68 (L-CDR1), la SEQ ID NO: 69 (L-CDR2) y la SEQ ID NO: 70 (L-CDR3).

- 5 En una realización más preferente adicional, el anticuerpo de la divulgación, o fragmento de unión a antígeno del mismo, comprende una región de unión a antígeno de la cadena pesada que comprende la SEQ ID NO: 75 (H-CDR1), la SEQ ID NO: 76 (H-CDR2) y la SEQ ID NO: 77 (H-CDR3), y comprende una región de unión a antígeno de la cadena ligera que comprende la SEQ ID NO: 78 (L-CDR1), la SEQ ID NO: 79 (L-CDR2) y la SEQ ID NO: 80 (L-CDR3).
- 10 En una realización más preferente, el anticuerpo de la divulgación, o fragmento de unión a antígeno del mismo, comprende una región de unión a antígeno de la cadena pesada que comprende la SEQ ID NO: 85 (H-CDR1), la SEQ ID NO: 86 (H-CDR2) y la SEQ ID NO: 87 (H-CDR3), y comprende una región de unión a antígeno de la cadena ligera que comprende la SEQ ID NO: 88 (L-CDR1), la SEQ ID NO: 89 (L-CDR2) y la SEQ ID NO: 90 (L-CDR3).
- 15 En una realización más preferente, el anticuerpo de la divulgación, o fragmento de unión a antígeno del mismo, comprende una región de unión a antígeno de la cadena pesada que comprende la SEQ ID NO: 95 (H-CDR1), la SEQ ID NO: 96 (H-CDR2) y la SEQ ID NO: 97 (H-CDR3), y comprende una región de unión a antígeno de la cadena ligera que comprende la SEQ ID NO: 98 (L-CDR1), la SEQ ID NO: 99 (L-CDR2) y la SEQ ID NO: 100 (L-CDR3).
- 20 En una realización más preferente, el anticuerpo de la divulgación, o fragmento de unión a antígeno del mismo, comprende una región de unión a antígeno de la cadena pesada que comprende la SEQ ID NO: 105 (H-CDR1), la SEQ ID NO: 106 (H-CDR2) y la SEQ ID NO: 107 (H-CDR3), y comprende una región de unión a antígeno de la cadena ligera que comprende la SEQ ID NO: 108 (L-CDR1), la SEQ ID NO: 109 (L-CDR2) y la SEQ ID NO: 110 (L-CDR3).
- 25 En una realización más preferente, el anticuerpo de la divulgación, o fragmento de unión a antígeno del mismo, comprende una región de unión a antígeno de la cadena pesada que comprende la SEQ ID NO: 115 (H-CDR1), la SEQ ID NO: 116 (H-CDR2) y la SEQ ID NO: 117 (H-CDR3), y comprende una región de unión a antígeno de la cadena ligera que comprende la SEQ ID NO: 118 (L-CDR1), la SEQ ID NO: 119 (L-CDR2) y la SEQ ID NO: 120 (L-CDR3).
- 30 En una realización más preferente, el anticuerpo de la divulgación, o fragmento de unión a antígeno del mismo, comprende una región de unión a antígeno de la cadena pesada que comprende la SEQ ID NO: 125 (H-CDR1), la SEQ ID NO: 126 (H-CDR2) y la SEQ ID NO: 127 (H-CDR3), y comprende una región de unión a antígeno de la cadena ligera que comprende la SEQ ID NO: 128 (L-CDR1), la SEQ ID NO: 129 (L-CDR2) y la SEQ ID NO: 130 (L-CDR3).
- 35 En una realización más preferente, el anticuerpo de la divulgación, o fragmento de unión a antígeno del mismo, comprende una región de unión a antígeno de la cadena pesada que comprende la SEQ ID NO: 135 (H-CDR1), la SEQ ID NO: 136 (H-CDR2) y la SEQ ID NO: 137 (H-CDR3), y comprende una región de unión a antígeno de la cadena ligera que comprende la SEQ ID NO: 138 (L-CDR1), la SEQ ID NO: 139 (L-CDR2) y la SEQ ID NO: 140 (L-CDR3).
- 40 Un anticuerpo de la invención puede ser una IgG (por ejemplo, IgG₁, IgG₂, IgG₃, IgG₄), mientras que un fragmento de anticuerpo puede ser, por ejemplo, una Fab, Fab', F(ab')₂ o scFv. En consecuencia, un fragmento de anticuerpo de la invención puede ser, o puede contener, una región de unión a antígeno que se comporta de uno o más modos como se describen en el presente documento.
- 45 La invención también se refiere a secuencias de ácido nucleico aisladas, cada una de las cuales puede codificar un anticuerpo, o fragmento de unión a antígeno del mismo, mencionado anteriormente que es específico de un epítipo de C4.4a. Los ácidos nucleicos de la invención son adecuados para la producción recombinante de anticuerpos o fragmentos de anticuerpo de unión a antígeno. Por lo tanto, la invención también se refiere a vectores y células hospedadoras que contienen una secuencia de ácido nucleico de la invención.
- 50 Las composiciones de la invención se pueden utilizar para aplicaciones terapéuticas o profilácticas. Por lo tanto, la invención incluye una composición farmacéutica que comprende un anticuerpo (o fragmento de unión a antígeno del mismo) de la invención y, por lo tanto, un vehículo o excipiente farmacéuticamente aceptable. En un aspecto relacionado, la invención proporciona un procedimiento para tratar un trastorno o afección asociado con la indeseada presencia de células que expresan C4.4a. En una realización preferente, el trastorno mencionado anteriormente es cáncer. Dicho procedimiento contiene las etapas de administrar a un sujeto que lo necesite una cantidad eficaz de la composición farmacéutica que contiene un anticuerpo de la invención, como se describe o contempla en el presente documento.
- La divulgación también proporciona instrucciones para utilizar una biblioteca de anticuerpos para aislar uno o más miembros de tal biblioteca que se unen de forma específica a C4.4a.

Descripción de las figuras

La Figura 1 muestra el resultado de un experimento de agrupación de epítipo realizado utilizando análisis de resonancia de plasmón superficial de tipo sándwich. Y son unidades de resonancia, X es el tiempo en segundos. El chip se recubrió con uno de los anticuerpos de la divulgación. A indica el momento en el que se añadió C4.4a. B indica el momento en el que se añadió el otro anticuerpo de la divulgación. Los anticuerpos no pudieron unirse de forma simultánea a C4.4a, lo que indica solapamiento de al menos un epítipo.

La Figura 2 proporciona datos de la unión de los anticuerpos anti-C4.4a de la divulgación a C4.4a humana recombinante (a) y de ratón (b) en formato de IgG1 humano. Los valores de CE_{50} se determinaron mediante ELISA como se describe en el Ejemplo 4. M31-B01 (A) se une con una CE_{50} de 0,24 y 0,29 nM a C4.4a murina y humana, respectivamente. M20 B02 S-A (B) se une con una CE_{50} de 0,3 y 0,38 nM a C4.4a murina y humana, respectivamente. X es log nM; Y es Extinción a 360 nM.

La Figura 3 proporciona datos sobre la unión específica de los anticuerpos de la divulgación a distintas líneas de células tumorales, bien transfectadas con hC4.4a como A549:hC4.4a (a) o líneas de células tumorales que expresan de forma nativa C4.4a, como NCI H322 (b) NCI H292 (c), H1975/BCRP (d) o BxPC3 (e). Los valores de CE_{50} para la unión de M31-B01 (círculos vacíos) y M20-D02 S-A (círculos rellenos) se resumen en (f). El control de isotipo IgG1 (triángulos rellenos) no mostró ninguna unión a las células. Todos los datos se generaron mediante titulación por FACS. X es la concentración (log nM) e Y es la media geométrica de la fluorescencia ($\times 10^3$).

La Figura 4(a) proporciona datos sobre la internalización específica de anticuerpos anti-C4.4a marcados con fluoróforo en células A549:hC4.4a. La figura 4 (b) proporciona datos sobre células A549 no transfectadas como un control negativo. A es M31-B01 (cuadrados rellenos); B es M20-D02 S-A (cuadrados vacíos); C es un control de isotipo para IgG1h (estrellas); X es el tiempo en minutos e Y es el recuento de gránulos/célula [$\times 10^3$]. Ambos anticuerpos frente a C4.4a se internalizan de forma específica, eficaz y rápida en células tumorales portadoras de C4.4a.

La Figura 4 (c) y (d) proporciona datos sobre la internalización de M31-B01 en células A549:hC4.4a. Después de 5 minutos (c) sólo se puede observar una débil tinción de la superficie celular. Después de 90 min son claramente visibles (d) endosomas intensamente coloreados que contienen el anticuerpo M31-B01 internalizado, que porta el colorante de fluorescencia dependiente de pH, e indica una internalización eficaz.

La Figura 5 proporciona datos sobre el epítipo al que M31-B01 y M20-D02 S-A se unen, como se determina mediante transferencia de tipo western. A) muestra un SDS-PAGE con tinción con azul de Coomassie 250 de distintas especies de C4.4a (calles 2+7 hC4.4a, calles 3+8 mC4.4a, calles 4+9 dominio S1-Fc-his6 de hC4.4a, calles 5+10 dominio S2-Fc-his6 de hC4.4a; las calles 1, 6 y 11 contienen marcadores de peso molecular; las calles 2-5 contienen muestras no reducidas; las calles 6-10 contienen muestras reducidas) B) y C) muestran las respectivas transferencias de tipo western con la carga de muestras idéntica a la de A). B) se incubó con M31-B01 y C) se incubó con M20-D02 S-A como anticuerpo de detección. Ambos anticuerpos muestran tinción específica dependiente de reducción, lo que indica un epítipo conformacional. Sin embargo, ambos se unen a C4.4a de longitud completa humana y de ratón, y al dominio S1 de C4.4a humana, pero no al dominio S2 de C4.4a humana.

La Figura 6 proporciona datos sobre la inhibición de la proliferación de células tumorales *in vitro* por un anticuerpo de la invención (B01-3), determinada mediante la medición con un analizador xCELLigence. Las células A549:hC4.4a se coincubaron con 100 nM de un anticuerpo de control de isotipo IgG1 de no unión (A) o con B01-3 100 nM (B) en pocillos individuales de una placa E durante el tiempo indicado en las condiciones descritas en el ejemplo 15. X es el tiempo en horas, Y es la tasa relativa de proliferación celular. Las células A549:hC4.4a incubadas con B01-3 mostraron una proliferación celular reducida con respecto a la IgG1 de control.

La Figura 7 muestra las secuencias de la divulgación.

Descripción detallada de la invención

La presente invención es a base del descubrimiento de nuevos anticuerpos que son específicos de, o tienen una elevada afinidad por, C4.4a y pueden impartir un beneficio terapéutico a un sujeto. Los anticuerpos de la invención, que pueden ser humanos, humanizados o quiméricos, se pueden utilizar en muchos contextos, los cuales se describen de un modo más completo en el presente documento.

Definiciones

En el presente documento, un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo "humano" se define como uno que no es quimérico (por ejemplo, no "humanizado") y que no procede de (por completo o en parte) una especie no humana. Un anticuerpo humano, o fragmento de unión a antígeno del mismo, puede obtenerse de un ser humano o puede ser un anticuerpo humano sintético. En el presente documento, un "anticuerpo humano sintético" se define

como un anticuerpo que tiene una secuencia obtenida, por completo o en parte, *in silico* de secuencias sintéticas que son a base de los análisis de secuencias de anticuerpos humanos conocidas. El diseño *in silico* de una secuencia de anticuerpo humano, o un fragmento del mismo, se puede conseguir mediante, por ejemplo, analizando una base de datos de secuencias de anticuerpo humano o de fragmento de anticuerpo, e ideando una secuencia polipeptídica utilizando los datos obtenidos de ellas. Otro ejemplo de un anticuerpo humano, o fragmento de unión a antígeno del mismo, es uno que codifica un ácido nucleico aislado de una biblioteca de secuencias de anticuerpo de origen humano (por ejemplo, estando tal biblioteca basada en anticuerpos tomados de una fuente natural humana). Los ejemplos de anticuerpos humanos incluyen anticuerpos como se describe en Söderlind y col., Nature Biotech. 2000, 18:853-856.

Un “anticuerpo humanizado”, o fragmento de unión a antígeno humanizado del mismo, se define en el presente documento como uno que se (i) obtiene de una fuente no humana (por ejemplo, un ratón transgénico que porta un sistema inmunitario heterólogo), en el que el anticuerpo está basado en una secuencia de línea germinal humana; (ii) en donde los aminoácidos de las regiones marco conservadas de un anticuerpo humano están parcialmente intercambiadas con las secuencias de aminoácidos humanas mediante ingeniería genética es o (iii) está injertado con CDR, en el que las CDR del dominio variable son de origen no humano, mientras que un o más armazones del dominio variable son de origen humano y el dominio constante (en su caso) es de origen humano.

En el presente documento, un “anticuerpo quimérico”, o fragmento de unión a antígeno del mismo, se define como uno en el que los dominios variables se obtienen de un origen no humano y algunos o todos los dominios constantes se obtienen de un origen humano.

La expresión “anticuerpo monoclonal”, como se utiliza en el presente documento, se refiere a un anticuerpo obtenido de una población de anticuerpos sustancialmente homogénea, es decir, los anticuerpos individuales que comprende la población son idénticos excepto por posibles mutaciones, por ejemplo mutaciones de origen natural, que pueden estar presentes en cantidades minoritarias. Por lo tanto, el término “monoclonal” indica que la naturaleza del anticuerpo no es una mezcla de anticuerpos distintos. En contraste con las preparaciones de anticuerpos policlonales, que normalmente incluyen anticuerpos distintos dirigidos contra determinantes distintos (epítomos), cada anticuerpo monoclonal de una preparación de anticuerpo monoclonal está dirigido frente un único determinante en un antígeno. Además de su especificidad, las preparaciones de anticuerpo monoclonal son ventajosas en cuando a que normalmente no están contaminadas con otras inmunoglobulinas. El término “monoclonal” no debe interpretarse como que se requiere la producción del anticuerpo mediante algún procedimiento particular. La expresión anticuerpo monoclonal incluye de forma específica anticuerpos quiméricos, humanizados y humanos.

Como se utiliza en el presente documento, un anticuerpo que “se une de forma específica a”, es “específico de/para” o “reconoce de forma específica” un antígeno de interés, por ejemplo una diana antigénica polipeptídica asociada con tumor (en el presente documento, C4.4a), es uno que se une al antígeno con suficiente afinidad, de forma tal que el anticuerpo es útil como agente terapéutico en cuanto a que está dirigido a un tejido o célula que expresa el antígeno, y reacciona de forma cruzada de forma significativa con otras proteínas o no reacciona de forma cruzada con proteínas que no son ortólogas y variantes (por ejemplo, formas mutantes, variantes de corte y empalme o formas truncadas de forma proteolítica) de la diana antigénica mencionada anteriormente. La expresión “reconoce de forma específica” o “se une de forma específica a” o es “específico de/para” un polipéptido particular o un epítipo en una diana polipeptídica particular, como se utiliza en el presente documento, puede estar presentada por, por ejemplo, un anticuerpo, o fragmento de unión a antígeno del mismo, que tiene una K_D monovalente por el antígeno inferior a aproximadamente 10^{-4} M, como alternativa inferior a aproximadamente 10^{-5} M, como alternativa inferior a aproximadamente 10^{-6} M, como alternativa inferior a aproximadamente 10^{-7} M, como alternativa inferior a aproximadamente 10^{-8} M, como alternativa inferior a aproximadamente 10^{-9} M, como alternativa inferior a aproximadamente 10^{-10} M, como alternativa inferior a aproximadamente 10^{-11} M, como alternativa inferior a aproximadamente 10^{-12} M, o menos. Un anticuerpo “se une de forma específica a”, es “específico de/para” o “reconoce de forma específica” un antígeno si tal anticuerpo tiene la capacidad de discriminar entre tal antígeno y uno o más antígeno(s) de referencia. En su forma más general, “unión específica”, “se une de forma específica a”, es “específico de/para” o “reconoce de forma específica” se refiere a la capacidad del anticuerpo para discriminar entre el antígeno de interés y un antígeno no relacionado, como se determina, por ejemplo, en conformidad con uno de los procedimientos siguientes. Dichos procedimientos comprenden, pero sin limitación, transferencias tipo Western, pruebas de ELISA, RIA, ECL, IRMA y barridos peptídicos. Por ejemplo, se puede llevar a cabo un ensayo ELISA convencional. La valoración se puede llevar a cabo mediante desarrollo de color convencional (por ejemplo, anticuerpo secundario con peroxidasa de rábano picante y bencidina de tetrametilo con peróxido de hidrógeno). La reacción en determinados pocillos se puntúa mediante la densidad óptica, por ejemplo a 450 nM. El fondo típico (= reacción negativa) puede ser una DO de 0,1; la reacción positiva típica puede ser una DO de 1. Esto significa que la diferencia positivo/negativo es de más de 5 veces, 10 veces, 50 veces y, preferentemente, de más de 100 veces. Normalmente, la determinación de la especificidad de unión se realiza utilizando no un único antígeno de referencia sino un grupo de aproximadamente tres a cinco antígenos no relacionados, tal como leche en polvo, BSA, transferrina o similares.

“Afinidad de unión” se refiere a la fuerza de la suma total de interacciones no covalentes entre un único sitio de unión de una molécula y su compañero de unión. A menos que se indique otra cosa, como se utiliza en el presente documento, “afinidad de unión” se refiere a la afinidad de unión intrínseca que refleja una interacción 1: 1 entre los

miembros de un par de unión (por ejemplo, un anticuerpo y un antígeno). Normalmente, la constante de disociación " K_D " se utiliza para describir la afinidad entre una molécula (tal como un anticuerpo) y su compañero de unión (tal como un antígeno), es decir, qué tan estrechamente se une un ligando a una proteína particular. Las afinidades ligando-proteína están influidas por interacciones intermoleculares no covalentes entre las dos moléculas. La afinidad se puede medir mediante procedimientos habituales conocidos en la técnica, incluyendo los descritos en el presente documento. En una realización, la " K_D " o el "valor de K_D " de acuerdo con la presente invención se mide utilizando ensayos de resonancia de plasmón superficial utilizando un instrumento Biacore T100 (GE Healthcare Biacore, Inc.), de acuerdo con el Ejemplo 3. En resumen, los anticuerpos se inmovilizaron sobre un chip sensor CM5 a través de un reactivo de captura indirecta, Fc de IgG anti ser humano. Los reactivos del "Human Antibody Capture Kit" (BR-1008-39, GE Healthcare Biacore, Inc.) se utilizaron como describe el fabricante. Aproximadamente se inmovilizaron 5000 unidades de resonancia (UR) por célula del anticuerpo monoclonal anti IgG de ser humano (Fc) en ratón. Los anticuerpos anti C4.4 se inyectaron para alcanzar un nivel de captura de aproximadamente 200 a 600 UR. Se inyectaron diversas concentraciones de C4.4a humana o murina sobre los anticuerpos anti-C4.4a inmovilizados. Se generaron sensogramas tras la corrección de células de referencia en línea, seguido de la resta de la muestra de tampón. La constante de disociación en equilibrio (K_D) se calculó a base de la proporción de las constantes de asociación (k_{on}) y la de disociación (k_{off}), obtenidas ajustando los sensogramas con un modelo de unión 1:1 de primer orden utilizando el programa informático Biacore Evaluation. Otros dispositivos adecuados son BIACORE(R)-2000, BIACORE (R)-3000 (BIAcore, Inc., Piscataway, NJ) o el instrumento ProteOn XPR36 (Bio-Rad Laboratories, Inc.).

El término "anticuerpo", como se utiliza en el presente documento, pretende hacer referencia a moléculas de inmunoglobulina compuestas preferentemente por cuatro cadenas polipeptídicas, dos cadenas pesadas (H) y dos cadenas ligeras (L), que normalmente están interconectadas por puentes disulfuro. Cada cadena pesada está compuesta por una región variable de la cadena pesada (en el presente documento abreviado como VH) y una región constante de la cadena pesada. La región constante de la cadena pesada puede comprender, por ejemplo, tres dominios CH1, CH2 y CH3. Cada cadena ligera está compuesta por una región variable de la cadena ligera (en el presente documento abreviado como VL) y una región constante de la cadena ligera. La región constante de la cadena ligera está compuesta por un dominio (CL). Las regiones VH y VL pueden subdividirse adicionalmente en regiones de hipervariabilidad denominadas regiones determinantes de complementariedad (CDR), intercaladas con regiones que están más conservadas que se denominan regiones marco conservadas (FR). Cada VH y VL consta, normalmente, de tres CDR y hasta cuatro FR, dispuestas desde el extremo amino al extremo carboxi, por ejemplo en el orden siguiente: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4.

Como se utiliza en el presente documento, la expresión "regiones determinantes de complementariedad" (las CDR; por ejemplo, CDR1, CDR2 y CDR3) se refiere a los restos de aminoácido de un dominio variable de anticuerpo cuya presencia es necesaria para la unión al antígeno. Normalmente, cada dominio variable tiene tres regiones CDR identificadas como CDR1, CDR2 y CDR3. Cada región determinante de complementariedad puede comprender restos de aminoácido de una "región determinante de complementariedad" como define Kabat (por ejemplo, aproximadamente los restos 24-34 (L1), 50-56 (L2) y 89-97 (L3) en el dominio variable de la cadena ligera y 31-35 (H1), 50-65 (H2) y 95-102 (H3) en el dominio variable de la cadena pesada; (Kabat y col., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5ª Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD. (1991)) y/o los restos de un "bucle hipervariable" (por ejemplo, aproximadamente los restos 26-32 (L1), 50-52 (L2) y 91-96 (L3) en el dominio variable de la cadena ligera y 26-32 (H1), 53-55 (H2) y 96-101 (H3) en el dominio variable de la cadena pesada (Chothia y Lesk; J Mol Biol 196: 901-917 (1987)). En algunos casos, una región determinante de complementariedad puede incluir aminoácidos de una región CDR definida de acuerdo con Rabat y de un bucle hipervariable. Dependiendo de la secuencia de aminoácidos del dominio constante de sus cadenas pesadas, los anticuerpos intactos se pueden asignar a distintas "clases". Hay cinco clases principales de anticuerpos intactos: IgA, IgD, IgE, IgG e IgM, y varios de éstos pueden además dividirse en "subclases" (isotipos), por ejemplo IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA e IgA2. Los dominios constantes de la cadena pesada que corresponden a las distintas clases de anticuerpos se llaman [alfa], [delta], [épsilon], [gamma] y [mu], respectivamente. Las estructuras de las subunidades y las configuraciones tridimensionales de distintas clases de inmunoglobulinas son bien conocidas. Como se utiliza en el presente documento, los anticuerpos son anticuerpos conocidos de forma convencional y fragmentos funcionales de los mismos.

Un "fragmento funcional" o "fragmento de anticuerpo de unión a antígeno" de un anticuerpo/inmunoglobulina del presente documento se define como un fragmento de un anticuerpo/inmunoglobulina (por ejemplo, una región variable de una IgG) que conserva la región de unión a antígeno. Normalmente, una "región de unión a antígeno" de un anticuerpo se encuentra en una o más regiones hipervariables de un anticuerpo, por ejemplo las regiones CDR-1, -2 y/o -3; sin embargo, las regiones "armazón" variables también pueden desempeñar un papel importante en la unión al antígeno, tal como proporcionando una estructura para las CDR. Preferentemente, la "región de unión a antígeno" comprende al menos los restos de aminoácido 4 a 103 de la cadena ligera variable (VL) y 5 a 109 de la cadena pesada variable (VH), más preferentemente los restos de aminoácido 3 a 107 de VL y 4 a 111 de VH y particularmente preferentes son las cadenas completas VL y VH (las posiciones de aminoácidos 1 a 109 de VL y 1 a 113 de VH; numeración de acuerdo con el documento WO 97/08320). Una clase preferente de inmunoglobulinas para su uso en la presente invención es IgG.

"Fragmentos funcionales" o "fragmentos de anticuerpo de unión a antígeno" de la invención incluyen fragmentos Fab, Fab', F(ab')₂ y Fv; diacuerpos; anticuerpos de dominio único (DAb), anticuerpos lineales; moléculas de anticuerpo monocatenario (scFv) y anticuerpos multiespecíficos, tales como bi y triespecíficos, formados a partir de

fragmentos de anticuerpos (C. A. K Borrebaeck, editor (1995) *Antibody Engineering (Breakthroughs in Molecular Biology)*, Oxford University Press; R. Kontermann & S. Duebel, editors (2001) *Antibody Engineering (Springer Laboratory Manual)*, Springer Verlag). Se entiende que un anticuerpo que no es un anticuerpo "multiespecífico" o "multifuncional" tiene cada uno de sus sitios de unión idénticos. El $F(ab')_2$ o Fab puede diseñarse por ingeniería para minimizar o eliminar completamente las interacciones disulfuro intermoleculares que se producen entre los dominios C_{H1} y C_L .

Un anticuerpo de la invención puede obtenerse de una biblioteca de anticuerpos recombinante que sea a base de secuencias de aminoácidos que se han aislado de los anticuerpos de un gran número de voluntarios sanos. Utilizando la tecnología n-CoDeR®, las CRD completamente humanas se recombinan en nuevas moléculas de anticuerpo. El procedimiento de recombinación exclusivo permite que la biblioteca contenga una variedad más amplia de anticuerpos de lo que podría haber creado de forma natural el sistema inmunitario humano.

Como se utiliza en el presente documento, se definen 'formas' distintas de antígeno, por ejemplo C4.4a, en el presente documento como distintas moléculas de proteínas resultantes de distintas modificaciones traduccionales y postraduccionales, tales como, pero sin limitación, diferencias en el corte y empalme del transcrito primario de C4.4a, diferencias en la glucosilación y diferencias en la escisión proteolítica postraduccionales.

Como se utiliza en el presente documento, el término 'epítipo' incluye cualquier determinante proteico capaz de unirse de forma específica a una inmunoglobulina o receptores de células T. Los determinantes epitópicos normalmente consisten en agrupaciones de moléculas de superficie activas de forma química, tales como aminoácidos o cadenas laterales de azúcar, o combinaciones de las mismas, y normalmente tienen características estructurales tridimensionales, así como características de carga específicas. Se dice que dos anticuerpos 'se unen al mismo epítipo' si se muestra que un anticuerpo compite con el segundo anticuerpo en un ensayo de unión competitivo, mediante cualquiera de los procedimientos bien conocidos para los expertos en la materia.

Un "anticuerpo aislado" es uno que se ha identificado y separado de un componente de la célula que lo ha expresado. Los componentes contaminantes de la célula son materiales que interferirían con los usos diagnósticos o terapéuticos del anticuerpo y pueden incluir enzimas, hormonas y otros solutos proteináceos o no proteináceos. En realizaciones preferentes, el anticuerpo se purifica (1) hasta más del 95 % en peso del anticuerpo, como se determina mediante, por ejemplo, el método de Lowry, espectroscopia UV-Vis o mediante electroforesis en gel SDS-capilar (por ejemplo en un Caliper LabChip GXII, GX 90 o dispositivo Biorad Bioanalyzer) y en realizaciones preferentes adicionales más del 99 % en peso, (2) hasta un punto suficiente como para obtener al menos 15 restos de la secuencia de aminoácidos N terminal o interna, o (3) hasta la homogeneidad mediante SDS-PAGE en condiciones reductoras o no reductoras utilizando tinción con azul de Coomassie o, preferentemente, de plata. Anticuerpo de origen natural aislado incluye el anticuerpo *in situ* dentro de las células recombinantes, ya que al menos un componente del entorno natural del anticuerpo no estará presente. Sin embargo, habitualmente el anticuerpo aislado se preparará al menos mediante una etapa de purificación.

La "citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos" o "CCDA" se refiere a una forma de citotoxicidad en la que la Ig secretada unida a receptores Fc gamma ($Fc\gamma R$) presentes en determinadas células citotóxicas (por ejemplo, células NK, neutrófilos y macrófagos) permite que estas células efectoras citotóxicas se unan de forma específica a una célula diana portadora de antígeno y, posteriormente, destruyan la célula diana, por ejemplo con citotoxinas. Para evaluar la actividad CCDA de un anticuerpo de interés se puede realizar un ensayo de CCDA *in vitro*, tal como el descrito en la patente de Estados Unidos nº 5.500.362 o 5.821.337 o la patente de Estados Unidos nº 6.737.056 (Presta). Las células efectoras útiles para tales ensayos incluyen CMSP y linfocitos NK.

"Citotoxicidad dependiente del complemento" o "CDC" se refiere a la lisis de una célula diana en presencia del complemento. La activación de la ruta clásica del complemento se inicia mediante la unión del primer componente del sistema del complemento (C1q) a los anticuerpos (de la subclase apropiada), que se unen a su antígeno afín. Para evaluar la activación del complemento se puede realizar un ensayo CDC, como el descrito en, por ejemplo Gazzano-Santoro y col., *J. Immunol. Methods* 202: 163 (1996). Las variantes polipeptídicas con las secuencias de aminoácidos de la región Fc modificadas (polipéptidos con una región Fc variante) y unión a C1q aumentada o disminuida se describen en, por ejemplo, la patente de Estados Unidos nº 6.194.551 B1 y el documento WO 1999/51642.

El término inmunoconjugado (denominado de forma indistinta como "conjugado anticuerpo-fármaco" o "CAF") se refiere a un anticuerpo conjugado con uno o más agentes citotóxicos, tales como un agente quimioterapéutico, un fármaco, un agente inhibidor del crecimiento, una toxina (por ejemplo, una toxina proteica, una toxina enzimáticamente activa de origen bacteriano, fúngico, vegetal o animal, fragmentos de los mismos) o un isótopo radioactivo (es decir, un radioconjugado). Los inmunoconjugados se han utilizado para la entrega local de agentes citotóxicos, es decir, fármacos que destruyen o que inhiben el crecimiento o la proliferación de células, en el tratamiento del cáncer (por ejemplo, Liu y col., *Proc Natl. Acad. Sci.* (1996), 93, 8618-8623)). Los inmunoconjugados permiten la entrega dirigida de una fracción de fármaco en un tumor, y la acumulación intracelular allí, en donde la administración sistémica de fármacos no conjugados puede dar como resultado niveles inaceptables de toxicidad en células y/o tejidos normales. Las toxinas utilizadas en los conjugados anticuerpo-toxina incluyen toxinas bacterianas tales como la toxina diftérica, toxinas vegetales tales como ricina, toxinas de molécula pequeña tales como geldanamicina. Las toxinas pueden ejercer sus efectos citotóxicos mediante mecanismos que incluyen la unión a

tubulina, la unión a ADN o la inhibición de topoisomerasa.

“Porcentaje (%) de identidad de secuencia” con respecto a una secuencia polinucleotídica o polipeptídica de referencia, respectivamente, se define como el porcentaje de restos de ácido nucleico o de aminoácido, respectivamente, en una secuencia candidata que son idénticos a los restos de ácido nucleico o de aminoácidos, respectivamente, en la secuencia polinucleotídica o polipeptídica de referencia, respectivamente, después de alinear las secuencias e introducir huecos, en caso necesario, para alcanzar el porcentaje máximo de identidad de secuencia. Las sustituciones conservadoras no se consideran parte de la identidad de secuencia. Son preferentes los alineamientos sin huecos. El alineamiento con el fin de determinar el porcentaje de identidad de secuencia de aminoácidos se puede conseguir de diversos modos dentro de la experiencia en la técnica utilizando, por ejemplo, un programa informático disponible públicamente tal como los programas informáticos BLAST, BLAST-2, ALIGN o Megalign (DNASTAR). Los expertos en la materia pueden determinar los parámetros adecuados para alinear las secuencias, incluidos los algoritmos necesarios para conseguir el alineamiento máximo a lo largo de toda la longitud de las secuencias que se están comparando.

Anticuerpos de la invención

La presente invención se refiere a procedimientos para inhibir el crecimiento de células cancerosas positivas para C4.4a y la evolución de la enfermedad neoplásica proporcionando anticuerpos anti-C4.4a. Se proporcionan anticuerpos, fragmentos de anticuerpo de unión a antígeno de los mismos y variantes de los anticuerpos y fragmentos, que se unen de forma específica al polipéptido C4.4a humano de 29 kDa (SEQ ID NO: 1, o fragmentos de la misma). Los anticuerpos, fragmentos de unión a antígeno o variantes de los mismos se unen de forma específica al dominio extracelular S1 del polipéptido C4.4a. En el presente documento, el polipéptido C4.4a se denomina ‘C4.4a’.

Los anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno de los mismos se internalizan en una célula que expresa C4.4a tras la unión del anticuerpo, o fragmento de unión a antígeno del mismo, a la célula mencionada anteriormente. En una realización adicional preferente de la presente divulgación, los anticuerpos, o fragmentos de unión a antígeno de los mismos, compiten en la unión a C4.4a con los anticuerpos M31-B01 o M20-D02 S-A. En una realización adicional preferente de la presente divulgación, los anticuerpos, o fragmentos de unión a antígeno de los mismos, compiten en la unión a C4.4a humana con los anticuerpos M31-B01 o M20-D02 S-A. En una realización adicional preferente de la presente divulgación, los anticuerpos, o fragmentos de unión a antígeno de los mismos, compiten en la unión a C4.4a humana y de roedor con los anticuerpos M31-B01 o M20-D02 S-A, una realización adicional preferente es una en la que C4.4a de roedor es C4.4a de ratón.

En una realización adicional preferente de la presente divulgación, los anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno de los mismos comprenden secuencias de CDR de cadena pesada o ligera que son al menos el 50 %, 55 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 % o 95 % idénticas a al menos una, preferentemente que corresponden con, secuencia de CDR como se representa en la tabla 7, o que comprenden secuencias variables de cadena pesada o ligera que son al menos el 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 92 % o 95 % idénticas a una secuencia de VH o VL representada en la tabla 7, respectivamente.

En una realización adicional preferente de la presente divulgación, los anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno de los mismos comprenden secuencias de CDR de cadena pesada y/o ligera que son, al menos, el 50 %, 55 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 % o 95 % idénticas a al menos una, preferentemente que corresponde con, secuencia de CDR de los anticuerpos M31-B01 o M20-D02 S-A, respectivamente.

En una realización adicional preferente de la presente divulgación, los anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno de los mismos comprenden secuencias de CDR de cadena pesada y/o ligera que son, al menos, el 50 %, 55 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 % o 95 % idénticas a las, preferentemente que corresponde con, secuencias de CDR de cadena pesada y/o ligera de los anticuerpos M31-B01 o M20-D02 S-A, respectivamente.

En una realización adicional preferente de la presente divulgación, los anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno de los mismos comprenden secuencias de la CDR2 y 3 de la cadena pesada que son, al menos, el 50 %, 55 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 % o 95 % idénticas a las secuencias de la CDR2 y 3 de la cadena pesada, y secuencias de la CDR1 y 3 de la cadena ligera que son al menos el 50 %, 55 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 % o 95 % idénticas a las secuencias de la CDR1 y 3 de la cadena ligera de los anticuerpos M31-B01. En una realización adicional preferente de la presente divulgación, los anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno de los mismos comprenden secuencias de la CDR2 y 3 de la cadena pesada que son, al menos, el 50 %, 55 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 % o 95 % idénticas a las secuencias de la CDR2 y 3 de la cadena pesada y secuencias de la CDR1 y 3 de la cadena ligera que son al menos el 50 %, 55 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 % o 95 % idénticas a las secuencias de la CDR1 y 3 de la cadena ligera de los anticuerpos M20-D02 S-A.

En una realización adicional preferente de la presente divulgación, los anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno de los mismos comprenden una secuencia variable de cadena pesada que es al menos del 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 92 % o 95 % idénticas a una secuencia de VH desvelada en la tabla 7 o la tabla 4, preferentemente de los anticuerpos M31-B01 o M20-D02 S-A. En una realización adicional preferente de la presente divulgación, los

anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno de los mismos comprenden una secuencia variable de cadena ligera que es al menos el 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 92 % o 95 % idénticas a una secuencia de VL desvelada en la tabla 7 o la tabla 3, preferentemente de los anticuerpos M31-B01 o M20-D02 S-A.

5 En una realización adicional preferente de la presente divulgación, los anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno de los mismos comprenden secuencias variables de cadena pesada y de cadena ligera que son al menos el 50 %, 60 % 70 %, 80 %, 90 %, 92 % o 95 % idénticas a la secuencia VH y VL de los anticuerpos M31-B01 o M20-D02 S-A, respectivamente.

10 En una realización adicional preferente de la presente divulgación, los anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno de los mismos comprenden secuencias de CDR de cadena pesada y ligera que se adaptan a las secuencias consenso de CDR obtenidas, preferentemente correspondientes, de M31-B01 o M20-D02 S-A, como se representa en la tabla 15. Una realización adicional preferente de la presente divulgación son anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno de los mismos que comprenden secuencias de CDR de cadena pesada que se adaptan a las correspondientes secuencias de CDR de cadena pesada como se representan en las secuencias consenso SEQ ID NO: 297 (CDR H1), SEQ ID NO: 298 (CDR H2) y SEQ ID NO: 299 (CDR H3), y las secuencias de CDR de cadena ligera de acuerdo con las correspondientes secuencias de CDR de cadena ligera como se representa por las secuencias consenso SEQ ID NO: 300 (CDR L1), SEQ ID NO: 22 (CDR L2) y SEQ ID NO: 301 (CDR L3), o que comprenden las secuencias de la CDR de cadena pesada de acuerdo con las correspondientes secuencias de la CDR de cadena pesada como se representa por las secuencias consenso SEQ ID NO: 302 (CDR H1), SEQ ID NO: 303 (CDR H2) y SEQ ID NO: 304 (CDR H3), y las secuencias de CDR de cadena ligera de acuerdo con las correspondientes secuencias de CDR de cadena ligera como se representa por las secuencias consenso SEQ ID NO: 305 (CDR L1), SEQ ID NO: 306 (CDR L2) y la SEQ ID NO: 307 (CDR L3).

25 En una realización adicional preferente de la presente divulgación, los anticuerpos o fragmentos de anticuerpo de unión a antígeno comprenden al menos una, preferentemente correspondientes, secuencia de CDR de cadena pesada y/o ligera como se desvela en la tabla 7 o las tablas 3 y 4, o, preferentemente, de un anticuerpo tal como se representa en la tabla 7 o las tablas 3 y 4. En una realización adicional preferente de la presente divulgación, los anticuerpos o fragmentos de anticuerpo de unión a antígeno comprenden al menos una, dos, tres, cuatro, cinco o seis, preferentemente correspondientes, secuencias de CDR de cadena pesada y ligera como se desvela en la tabla 7 o las tablas 3 y 4, o, preferentemente, de un anticuerpo como se representa en la tabla 7 o las tablas 3 y 4. En una realización adicional preferente, los anticuerpos o fragmentos de anticuerpo de unión a antígeno comprenden las secuencias de la CDR1, CDR2 o CDR3 de cadena pesada o ligera de un anticuerpo como se representa en la tabla 7 o las tablas 3 y 4, las secuencias de las CDR1 y CDR2 de cadena pesada o ligera de un anticuerpo como se representa en la tabla 7 o las tablas 3 y 4, las secuencias de las CDR1 y CDR3 de cadena pesada o ligera de un anticuerpo como se representa en la tabla 7 o las tablas 3 y 4, las secuencias de las CDR2 y CDR3 de cadena pesada o ligera de un anticuerpo como se representa en la tabla o las tablas 3 y 4, las secuencias de las CDR1, CDR2 y CDR3 de cadena pesada o ligera de un anticuerpo como se representa en la tabla o las tablas 3 y 4. En una realización adicional preferente de la presente divulgación, los anticuerpos o fragmentos de anticuerpo de unión a antígeno comprenden las secuencias de CDR de cadena pesada CDR1 y CDR2 y las secuencias de CDR de cadena ligera CDR1, CDR2, CDR3 de un anticuerpo, como se representa en la tabla 7 o las tablas 3 y 4. En una realización adicional preferente de la presente divulgación, los anticuerpos o fragmentos de anticuerpo de unión a antígeno comprenden las secuencias de la CDR1, CDR2 o CDR3 de cadena pesada y ligera de un anticuerpo como se representa en la tabla 7 o las tablas 3 y 4, las secuencias de las CDR1 y CDR2 de cadena pesada y ligera de un anticuerpo como se representa en la tabla o las tablas 3 y 4, las secuencias de las CDR1 y CDR3 de cadena pesada y ligera de un anticuerpo como se representa en la tabla 7 o las tablas 3 y 4, las secuencias de las CDR2 y CDR3 de cadena pesada y ligera de un anticuerpo como se representa en la tabla 7 o las tablas 3 y 4, las secuencias de las CDR1, CDR2 y CDR3 de cadena pesada y ligera de un anticuerpo como se representa en la tabla 7 o las tablas 3 y 4. En una realización adicional preferente de la presente divulgación, los anticuerpos o fragmentos de anticuerpo de unión a antígeno comprenden las secuencias de CDR de cadena pesada y ligera de un anticuerpo como se representa en la tabla 7 o las tablas 3 y 4.

50 En una realización adicional preferente de la presente divulgación, los anticuerpos o fragmentos de anticuerpo de unión a antígeno comprenden una secuencia de VH y/o VL desvelada en la tabla 7 o las tablas 3 y 4. En una realización adicional preferente de la presente divulgación, los anticuerpos o fragmentos de anticuerpo de unión a antígeno comprenden la secuencia de VH y VL de un anticuerpo representada en la tabla 7 o las tablas 3 y 4.

55 En una realización preferente, los anticuerpos o fragmentos de anticuerpo de unión a antígeno de la invención son monoclonales. En una realización adicional preferente, los anticuerpos o fragmentos de anticuerpo de unión a antígeno de la invención son humanos, humanizados o quiméricos.

Las variantes de los anticuerpos o fragmentos de anticuerpos de unión al antígeno contemplados en la divulgación son moléculas en las cuales se mantiene la actividad de unión del anticuerpo o fragmento de anticuerpo de unión al antígeno para C4.4a. En una realización preferente de la presente divulgación, las variantes compiten en la unión a C4.4a con un anticuerpo representado en la tabla 7, preferentemente con el anticuerpo M31-B01 o M20-D02 S-A.

60

A lo largo del presente documento se hace referencia a los siguientes anticuerpos preferentes: "M31-B01", "M20-D02 S-A", "M60-G03" y "M36-H02", "B01-3", "B01-5", "B01-7", "B01-10", "B01-12", "D02-4", "D02-6", "D02-7", "D02-11" y "D02-13".

5 M31-B01 representa un anticuerpo que comprende una región variable de la cadena pesada que corresponde con la SEQ ID NO: 41 (ADN)/SEQ ID NO: 33 (proteína) y una región variable de la cadena ligera que corresponde con la SEQ ID NO: 37 (ADN)/SEQ ID NO: 29 (proteína).

M20-D02 S-A representa un anticuerpo que comprende una región variable de la cadena pesada que corresponde con la SEQ ID NO: 42 (ADN)/SEQ ID NO: 34 (proteína) y una región variable de la cadena ligera que corresponde con la SEQ ID NO: 38 (ADN)/SEQ ID NO: 30 (proteína).

10 M60-DG03 representa un anticuerpo que comprende una región variable de la cadena pesada que corresponde con la SEQ ID NO: 43 (ADN)/SEQ ID NO: 35 (proteína) y una región variable de la cadena ligera que corresponde con la SEQ ID NO: 39 (ADN)/SEQ ID NO: 31 (proteína).

15 M36-H02 representa un anticuerpo que comprende una región variable de la cadena pesada que corresponde con la SEQ ID NO: 44 (ADN)/SEQ ID NO: 36 (proteína) y una región variable de la cadena ligera que corresponde con la SEQ ID NO: 40 (ADN)/SEQ ID NO: 32 (proteína).

B01-3 representa un anticuerpo que comprende una región variable de la cadena pesada que corresponde con la SEQ ID NO: 53 (ADN)/SEQ ID NO: 51 (proteína) y una región variable de la cadena ligera que corresponde con la SEQ ID NO: 54 (ADN)/SEQ ID NO: 52 (proteína).

20 B01-5 representa un anticuerpo que comprende una región variable de la cadena pesada que corresponde con la SEQ ID NO: 63 (ADN)/SEQ ID NO: 61 (proteína) y una región variable de la cadena ligera que corresponde con la SEQ ID NO: 64 (ADN)/SEQ ID NO: 62 (proteína).

B01-7 representa un anticuerpo que comprende una región variable de la cadena pesada que corresponde con la SEQ ID NO: 73 (ADN)/SEQ ID NO: 71 (proteína) y una región variable de la cadena ligera que corresponde con la SEQ ID NO: 74 (ADN)/SEQ ID NO: 72 (proteína).

25 B01-10 representa un anticuerpo que comprende una región variable de la cadena pesada que corresponde con la SEQ ID NO: 83 (ADN)/SEQ ID NO: 81 (proteína) y una región variable de la cadena ligera que corresponde con la SEQ ID NO: 84 (ADN)/SEQ ID NO: 82 (proteína).

30 B01-12 representa un anticuerpo que comprende una región variable de la cadena pesada que corresponde con la SEQ ID NO: 93 (ADN)/SEQ ID NO: 91 (proteína) y una región variable de la cadena ligera que corresponde con la SEQ ID NO: 94 (ADN)/SEQ ID NO: 92 (proteína).

D02-4 representa un anticuerpo que comprende una región variable de la cadena pesada que corresponde con la SEQ ID NO: 103 (ADN)/SEQ ID NO: 101 (proteína) y una región variable de la cadena ligera que corresponde con la SEQ ID NO: 104 (ADN)/SEQ ID NO: 102 (proteína).

35 D02-6 representa un anticuerpo que comprende una región variable de la cadena pesada que corresponde con la SEQ ID NO: 113 (ADN)/SEQ ID NO: 111 (proteína) y una región variable de la cadena ligera que corresponde con la SEQ ID NO: 114 (ADN)/SEQ ID NO: 112 (proteína).

D02-7 representa un anticuerpo que comprende una región variable de la cadena pesada que corresponde con la SEQ ID NO: 123 (ADN)/SEQ ID NO: 121 (proteína) y una región variable de la cadena ligera que corresponde con la SEQ ID NO: 124 (ADN)/SEQ ID NO: 122 (proteína).

40 D02-11 representa un anticuerpo que comprende una región variable de la cadena pesada que corresponde con la SEQ ID NO: 133 (ADN)/SEQ ID NO: 131 (proteína) y una región variable de la cadena ligera que corresponde con la SEQ ID NO: 134 (ADN)/SEQ ID NO: 132 (proteína).

45 D02-13 representa un anticuerpo que comprende una región variable de la cadena pesada que corresponde con la SEQ ID NO: 143 (ADN)/SEQ ID NO: 141 (proteína) y una región variable de la cadena ligera que corresponde con la SEQ ID NO: 144 (ADN)/SEQ ID NO: 142 (proteína).

50 En otro aspecto, la divulgación proporciona anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno que tienen una región de unión a antígeno que se une de forma específica a y/o tiene una afinidad elevada por una o más regiones de C4.4a, cuya secuencia de aminoácidos se representa en la SEQ ID NO: 1. Se dice que un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno tiene una "afinidad elevada" por un antígeno si la medición de la afinidad es menor de 250 nM (afinidad monovalente del anticuerpo o fragmento de unión a antígeno). Preferentemente, un anticuerpo o región de unión a antígeno desvelado se puede unir a C4.4a humana con una afinidad de menos de 250 nM, preferentemente menos de 100 nM, más preferentemente menos de 25 nM e incluso más preferente con menos de 11 nM determinado como afinidad monovalente a C4.4a humana. Por ejemplo, la afinidad de un anticuerpo de la divulgación frente a C4.4a puede ser de aproximadamente 220,0 nM o 1 nM (afinidad monovalente del anticuerpo o fragmento de unión a

antígeno).

La tabla 1 proporciona un resumen de las constantes de disociación de anticuerpos representativos de la divulgación, determinadas mediante resonancia de plasmón superficial (Biacore) sobre C4.4a humana o murina inmovilizada de forma directa.

5 Tabla 1: Constantes de disociación monovalentes determinadas para IgG1 anti-C4.4a mediante resonancia de plasmón superficial

	C4.4a humana	C4.4a de ratón
Anticuerpo (IgG1)	K_D [M]	K_D [M]
M31-B01	$7,0 \times 10^{-8}$	$1,3 \times 10^{-7}$
M20-D02 S-A	$2,2 \times 10^{-7}$	$1,8 \times 10^{-7}$
B01-3	$6,0 \times 10^{-8}$	$1,2 \times 10^{-7}$
B01-5	4×10^{-9}	1×10^{-8}
B01-7	7×10^{-9}	9×10^{-9}
B01-10	4×10^{-9}	1×10^{-9}
B01-12	1×10^{-9}	2×10^{-9}
D02-4	$2,9 \times 10^{-8}$	$5,6 \times 10^{-8}$
D02-6	6×10^{-9}	$2,1 \times 10^{-8}$
D02-7	9×10^{-9}	$2,2 \times 10^{-8}$
D02-11	1×10^{-8}	$2,4 \times 10^{-8}$
D02-13	2×10^{-9}	$4,2 \times 10^{-8}$

10 El formato de IgG1 se usó para la determinación de la afinidad basada en células mediante separación celular activada por fluorescencia (FACS) combinada con análisis Scatchard. La Figura 3 f) indica la fuerza de unión de anticuerpos IgG representativos en células tumorales A549 transfectadas que expresan C4.4a y células tumorales que expresan C4.4a de forma endógena. La Tabla 8 proporciona un resumen de fuerza de la unión (CE_{50}) de anticuerpos IgG representativos en células CHO-S:mC4.4a murinas transfectadas y células tumorales NCI H292 que expresan C4.4a de forma endógena.

Tabla 8: Valores CE_{50} determinados para IgG1 anti-C4.4a mediante FACS

	C4.4a:CHO de ratón	NCI H292
Anticuerpo (IgG1)	CE_{50} [M]	CE_{50} [M]
M31-B01	$1,9 \times 10^{-9}$	3×10^{-10}
M20-D02 S-A	$1,6 \times 10^{-9}$	$1,3 \times 10^{-9}$
B01-3	$3,6 \times 10^{-10}$	6×10^{-11}
B01-5	$1,2 \times 10^{-9}$	5×10^{-11}
B01-7	$5,7 \times 10^{-10}$	6×10^{-11}
B01-10	$4,3 \times 10^{-10}$	1×10^{-10}
B01-12	$1,4 \times 10^{-9}$	Nd
D02-6	1×10^{-9}	2×10^{-11}
D02-7	$7,8 \times 10^{-10}$	3×10^{-11}
D02-11	$1,7 \times 10^{-9}$	1×10^{-11}
D02-13	2×10^{-9}	$1,2 \times 10^{-10}$
nd=no determinado		

15 Se dice que una IgG1 tiene una "afinidad elevada" por un antígeno si la medición de la afinidad mediante FACS es inferior a 100 nM (afinidad aparente de IgG). Preferentemente, un anticuerpo bivalente desvelado, o fragmento de unión a antígeno, puede unirse a C4.4a humana con una afinidad inferior a 100 nM, más preferentemente inferior a 50 nM, y todavía más preferentemente inferior a 10 nM. Otros preferentes son anticuerpos bivalentes que se unen a

20 C4.4a con una afinidad inferior a 5 nM, y más preferentemente inferior a 1 nM, determinada como la afinidad aparente de una IgG respecto a C4.4a humana. Por ejemplo, la afinidad aparente de un anticuerpo de la divulgación

frente a C4.4a puede ser de aproximadamente 4,3 nM o 0,03 nM en distintas líneas de células tumorales según se determina por análisis de FACS, como se representa en la figura 3f.

5 Un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno de la divulgación se internaliza “de forma eficaz” cuando su tiempo de seminternalización máxima ($t_{1/2}$) en células tumorales que expresan C4.4a es menor de 180 min o, más preferentemente, menor de 120 min, y todavía más preferentemente menor de 90 min. Otros preferentes son anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno con tiempos de seminternalización máxima ($t_{1/2}$) de 60 minutos o menores, según se determina por el protocolo descrito en el ejemplo 6, otros preferentes son inferiores a 50 minutos, o inferiores a 35 minutos. La Tabla 9 proporciona un resumen de los tiempos de internalización de anticuerpos representativos de la divulgación, según se determina mediante el protocolo descrito en el ejemplo 6. Los anticuerpos internalizables o fragmentos de unión a antígeno de la invención son adecuados como fracciones de direccionamiento de un conjugado anticuerpo-fármaco (CAF). Un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno es adecuado en un procedimiento *in vitro* o *in vivo* para entregar un compuesto, preferentemente un agente citotóxico, en una célula que expresa C4.4a

Tabla 9:

	internalización
Anticuerpo (IgG1)	$t_{1/2}$ [min]
M31-B01	49
M20-D02 S-A	60
B01-3	55
B01-7	33
B01-10	30
D02-6	39
D02-7	33
D02-11	22

15 En algunas realizaciones, se aísla el anticuerpo, fragmento de unión a antígeno del mismo o derivado del mismo, o ácido nucleico que lo codifica. Un componente biológico aislado (tal como una molécula de ácido nucleico o proteína, tal como un anticuerpo) es uno que se ha separado o purificado sustancialmente de otros componentes biológicos en la célula del organismo en el cual se produce el componente de forma natural, por ejemplo otros ADN y ARN cromosómicos y extracromosómicos, proteínas y orgánulos. Los ácidos nucleicos y proteínas que se han “aislado” incluyen ácidos nucleicos y proteínas purificados mediante procedimientos de purificación convencionales Sambrook y col., 1989 (Sambrook, J., Fritsch, E. F. y Maniatis, T. (1989) Molecular Cloning: A laboratory manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, USA) y Robert K. Scopes y col. 1994 Protein Purification, Principles and Practice, Springer Science and Business Media LLC. La expresión también abarca ácidos nucleicos y proteínas preparadas mediante expresión recombinante en una célula hospedadora, así como ácidos nucleicos sintetizados químicamente.

Generación de anticuerpos

30 Para aislar anticuerpos monoclonales humanos específicos de C4.4a de alta afinidad, se utilizó una biblioteca de presentación en fagos de anticuerpos N-CoDeR completamente humanos mediante una combinación de inmunoadsorciones de células enteras y de proteínas, y a través del desarrollo de herramientas específicas. Estas herramientas y procedimientos incluyen una línea celular recombinante que expresa C4.4a humana, una línea celular que expresa C4.4a murina, C4.4a recombinante humana y murina, y el desarrollo de procedimientos de inmunoadsorción y exploración capaces de identificar anticuerpos que se unen, de forma preferente, a C4.4a presentada en la superficie celular y que reaccionan de forma cruzada con C4.4a murina.

35 Mediante una combinación de tres enfoques no convencionales en la tecnología de presentación en fagos (TPF) se desarrollaron anticuerpos contra al marcador de superficie celular de cáncer C4.4a. En primer lugar se construyeron líneas celulares recombinantes que expresan la forma unida a la membrana de C4.4a humana y de ratón mediante transfección estable de células CHO-S y células tumorales A549, con un plásmido que codifica la forma anclada por GPI de longitud completa de la proteína humana o de ratón (SEQ ID NO: 3) y (SEQ ID NO: 4), respectivamente, para proporcionar las líneas celulares CHO-S:hC4.4a humana, la murina CHO-S:mC4.4a y la humana A549:hC4.4a, respectivamente. En segundo lugar, se realizaron selecciones de superficie celular con las últimas líneas celulares recombinantes y la línea celular de cáncer de mama MCF-7. Se incluyó preadsorción con células CHO-S o células A549 no transfectadas, para evitar la selección de fragmentos Fab que se unen a epítopos de las células parentales. Se realizaron selecciones adicionales con C4.4a humana, purificada, soluble, recombinante con C4.4a murina, purificada, soluble recombinante. En tercer lugar, se desarrollaron procedimientos de exploración que permitieron la exploración sucesiva de los resultados de los fagos obtenidos en la inmunoadsorción en células A549:hC4.4a

enteras así como en células CHO-S:hC4.4a. La combinación de estos procedimientos específicos permitió el aislamiento de los anticuerpos exclusivos "M31-B01", "M20-D02 S-A", "M60-G03" y "M36-H02".

Estos anticuerpos exclusivos se caracterizaron adicionalmente por su afinidad de unión en ELISA, mediante unión de BIAcore a C4.4a soluble, mediante su capacidad para reconocer distintos epítomos en C4.4a soluble y mediante su capacidad reaccionar de forma cruzada con C4.4a murina evaluada mediante BIAcore y FACS, y su capacidad para internalizarse en un ensayo basado en células. Los ensayos de internalización midieron de forma cuantitativa la internalización de anticuerpos anti-C4.4a marcados de forma con fluorescente de un modo resuelto en el tiempo.

Variantes peptídicas

Los anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno de la divulgación no se limitan a las secuencias peptídicas específicas proporcionadas en el presente documento. En su lugar, la divulgación también incorpora variantes de estos polipéptidos. Con referencia a la presente divulgación, y las tecnologías y referencias disponibles de forma convencional, el experto será capaz de preparar, analizar y utilizar variantes funcionales de los anticuerpos desvelados en el presente documento.

Una variante puede incluir, por ejemplo, un anticuerpo que tiene al menos una región determinante de complementariedad (CRD) (hipervariable) y/o un dominio/posición de armazón (FR) (variable) modificados, con respecto a una secuencia peptídica desvelada en el presente documento. Para ilustrar mejor este concepto, a continuación se presenta una breve descripción de la estructura del anticuerpo.

Un anticuerpo consta de dos cadenas peptídicas, conteniendo cada una uno (cadena ligera) o tres (cadena pesada) dominios constantes y una región variable (VL, VH), la última de ellas está, en cada caso, compuesta de cuatro regiones FR y tres CDR intercaladas. El sitio de unión al antígeno está formado por una o más CDR, aunque las regiones FR proporcionan el armazón estructural para las CDR y, por lo tanto, desempeñan un papel importante en la unión al antígeno. Modificando uno o más restos de aminoácidos en una región CDR o FR, el experto puede generar de forma rutinaria secuencias de anticuerpos mutadas o diversificadas que se pueden explorar frente al antígeno, para obtener, por ejemplo, propiedades nuevas o mejoradas.

Las tablas 3 (VL) y 4 (VH) definen las regiones CDR y FR para determinados anticuerpos de la invención y comparan aminoácidos entre sí y con las correspondientes secuencias consenso en una posición dada.

Tabla 3: Secuencias VL

Secuencias VL

M20-D02 S-A	(1)	QSVLTQPPSASGTPGQQRVTISCSGSSSNVGS-NPWNWYQQLPGTAPKLLIYRNNQRPSGV
M31-B01	(1)	QSVLTQPPSASGTPGQQRVTISCTGSSSNIGAGYVHHWYQQLPGTAPKLLIYDNNKRPSGV
B01-3	(1)	ESVLTQPPSVSGAPGQQRVTISCTGSSSNIGAGYVHHWYQQLPGTAPKLLIYDNNKRPSGV
B01-5	(1)	QSVLTQPPSVSGAPGQQRVTISCTGSSSNIGAGYVHHWYQQLPGTAPKLLIYDNNKRPSGV
B01-7	(1)	QSVLTQPPSASGTPGQQRVTISCTGSSSNIGAGYVHHWYQQLPGTAPKLLIYDNNKRPSGV
B01-10	(1)	QSVLTQPPSVSGAPGQQRVTISCTGSSSNIGAGYVHHWYQQLPGTAPKLLIYDNNKRPSGV
B01-12	(1)	QSVLTQPPSASGTPGQQRVTISCSGSSSNIGAGYVHHWYQQLPGTAPKLLIYDNNQRPSGV
D02-4	(1)	ESVLTQPPSASGTPGQQRVTISCSGSSSNIGS-NPWNWYQQLPGTAPKLLIYRNNQRPSGV
D02-6	(1)	QSVLTQPPSASGTPGQQRVTISCSGSSSNIGS-NPWNWYQQLPGTAPKLLIYRNNQRPSGV
D02-7	(1)	QSVLTQPPSASGTPGQQRVTISCSGSSSNIGS-NPWNWYQQLPGTAPKLLIYRNNQRPSGV
D02-11	(1)	QSVLTQPPSASGTPGQQRVTISCSGSSSNIGS-NPWNWYQQLPGTAPKLLIYRNNQRPSGV
D02-13	(1)	QSVLTQPPSASGTPGQQRVTISCSGSSSNIGS-NPWNWYQQLPGTAPKLLIYRNNQRPSGV
consenso	(1)	QSVLTQPPSASGTPGQQRVTISCSGSSSNIGS-NPWNWYQQLPGTAPKLLIYRNNQRPSGV
		----LCDR1----- -LCDR2-
M20-D02 S-A	(60)	PDRFSGSKSGTSASLAISGLRSEDEADYYCAAWDDRLLNGWVFGGGTKLTVLGQ
M31-B01	(61)	PDRFSGSKSGTSASLAISGLRSEDEADYYCAAWDDRLLNGWVFGGGTKLTVLGQ
B01-3	(61)	PDRFSGSKSGTSASLAISGLRSEDEADYYCAAWDDRLLNGWVFGGGTKLTVLGQ
B01-5	(61)	PDRFSGSKSGTSASLAISGLRSEDEADYYCAAYDSDLGSPVFGGGTKLTVLGQ
B01-7	(61)	PDRFSGSKSGTSASLAISGLRSEDEADYYCAAFDDRLLNGWVFGGGTKLTVLGQ
B01-10	(61)	PDRFSGSKSGTSASLAISGLRSEDEADYYCAAYDSDLGSPVFGGGTKLTVLGQ
B01-12	(61)	PDRFSGSKSGTSASLAISGLRSEDEADYYCAAFDDRLLSGPVFGGGTKLTVLGQ
D02-4	(60)	PDRFSGSKSGTSASLAISGLRSEDEADYYCAAWDDRLLNGWVFGGGTKLTVLGQ
D02-6	(60)	PDRFSGSKSGTSASLAISGLRSEDEADYYCAAWDDRLLSGWAFGGGTKLTVLGQ
D02-7	(60)	PDRFSGSKSGTSASLAISGLRSEDEADYYCAAWDDSLSGWAFGGGTKLTVLGQ
D02-11	(60)	PDRFSGSKSGTSASLAISGLRSEDEADYYCAAWDDRLLSGWVFGGGTKLTVLGQ
D02-13	(60)	PDRFSGSKSGTSASLAISGLRSEDEADYYCAAWDDSLSGWAFGGGTKLTVLGQ
consenso	(58)	PDRFSGSKSGTSASLAISGLRSEDEADYYXXXXXXXXXXXXXFGGGTKLTVLGQ
		----LCDR3----

Tabla: 4: Secuencias VH

Secuencias VH

M20-D02 S-A	(1)	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLS	CAASGFTFS	SDYQMTWIRQ	TPGKGLEWVSGVSWNGARTH
M31 B01	(1)	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLS	CAASGFTFS	NAWMSWVRQAPGKGLEWVSYISSSGSTIY	
B01-3	(1)	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLS	CAASGFTFS	NAWMSWVRQAPGKGLEWVSYISSSGSTIY	
B01-5	(1)	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLS	CAASGFTFS	NAWMSWVRQAPGKGLEWVSYISSSGSTIY	
B01-7	(1)	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLS	CAASGFTFS	NAWMSWVRQAPGKGLEWVSYISSSGSTIY	
B01-10	(1)	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLS	CAASGFTFS	SAWMSWVRQAPGKGLEWVSYISSSGSTIY	
B01-12	(1)	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLS	CAASGFTFS	SAWMSWVRQAPGKGLEWVSYISSSGSTIY	
D02-4	(1)	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLS	CAASGFTFS	SDYQMTWIRQ	TPGKGLEWVSGISWNGGSTH
D02-6	(1)	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLS	CAASGFTFS	SDYQMTWIRQ	TPGKGLEWVSGISWNGGSTH
D02-7	(1)	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLS	CAASGFTFS	SDYQMTWIRQ	TPGKGLEWVSGISWNGGSTH
D02-11	(1)	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLS	CAASGFTFS	SDYQMTWIRQ	TPGKGLEWVSGISWNGGSTH
D02-13	(1)	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLS	CAASGFTFS	SYQMTWIRQ	APGKGLEWVSGISWNGGSTH
consenso	(1)	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLS	CAASGFTXXXXXXV	QAPGKGLEWXXXXXXXXXX	
			--HCDR1-		-----HCDR2-
M20-D02 S-A	(60)	YADSVKGRFTISRDN	SKNTLYLQ	MNSLRAEDTAVYYCAKGDYLVY	SAYYFDSWGQGLTIVTSS
M31 B01	(60)	YADSVKGRFTISRDN	SKNTLYLQ	MNSLRAEDTAVYYCAREG	-----LWAFDYWGQGLTIVTSS
B01-3	(60)	YADSVKGRFTISRDN	SKNTLYLQ	MNSLRAEDTAVYYCAREG	-----LWAFDYWGQGLTIVTSS
B01-5	(60)	YADSVKGRFTISRDN	SKNTLYLQ	MNSLRAEDTAVYYCAREG	-----LWAFDYWGQGLTIVTSS
B01-7	(60)	YADSVKGRFTISRDN	SKNTLYLQ	MNSLRAEDTAVYYCAREG	-----LWAFDKWGQGLTIVTSS
B01-10	(60)	YADSVKGRFTISRDN	SKNTLYLQ	MNSLRAEDTAVYYCAREG	-----LWAFDYWGQGLTIVTSS
B01-12	(60)	YADSVKGRFTISRDN	SKNTLYLQ	MNSLRAEDTAVYYCAREG	-----LWAFDKWGQGLTIVTSS
D02-4	(60)	YADSVKGRFTISRDN	SKNTLYLQ	MNSLRAEDTAVYYCAKGDYLVY	SAYYFDSWGQGLTIVTSS
D02-6	(60)	YADSVKGRFTISRDN	SKNTLYLQ	MNSLRAEDTAVYYCAKGDYLVY	SSYYFKSWGQGLTIVTSS
D02-7	(60)	YADSVKGRFTISRDN	SKNTLYLQ	MNSLRAEDTAVYYCAKGDYLVY	KSYFFKSWGQGLTIVTSS
D02-11	(60)	YADSVKGRFTISRDN	SKNTLYLQ	MNSLRAEDTAVYYCAKGDYLVY	SSYYFKSWGQGLTIVTSS
D02-13	(60)	YADSVKGRFTISRDN	SKNTLYLQ	MNSLRAEDTAVYYCAKGDYLVY	KSYFFKSWGQGLTIVTSS
consenso	(60)	XXXXXXXXFTISRDN	SKNTLYLQ	MNSLRAEDTAVYYCXXXXXXXXXX	WGQGLTIVTSS
			-----		-----HCDR3-----

5 Una realización adicional preferente de la divulgación es un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo en el que las secuencias de CDR se seleccionan como se muestra en la tabla 7.

10 Una realización adicional preferente de la divulgación es un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno en el que las secuencias VH y VL se seleccionan como se muestra en la tabla 7. El experto en la materia puede utilizar los datos en las Tablas 3, 4 y 7 para diseñar variantes peptídicas. Es preferente que las variantes se construyan cambiando los aminoácidos dentro de una o más regiones de CDR; además, una variante podría tener una o más regiones marco conservadas modificadas. También se pueden hacer modificaciones en las regiones marco conservadas. Por ejemplo, podría modificarse un dominio de FR peptídico cuando exista una desviación en un resto en comparación con una secuencia de línea germinal.

15 Con referencia a una comparación de los anticuerpos nuevos con respecto a las correspondientes secuencias consenso, las cuales se enumeran en las Tablas 3 y 4, los restos candidatos que se pueden cambiar incluyen, por ejemplo, el resto 42 de la cadena pesada variable de M20-D02 S-A en comparación con VHIII del gen DP47. Como alternativa, el experto podría hacer el mismo análisis mediante la comparación de las secuencias de aminoácidos desveladas en el presente documento con secuencias conocidas de la misma clase de tales antibióticos, utilizando, por ejemplo, el procedimiento descrito por Knappik, A., y col. JMB 2000, 296:57-86.

20 Además, se pueden obtener variantes utilizando un anticuerpo como punto de partida para la optimización, diversificando de uno o más restos de aminoácido en el anticuerpo, preferentemente restos de aminoácido en una o más CDR, y explorando la colección resultante de variantes de anticuerpos para variantes con propiedades mejoradas. Es particularmente preferente la diversificación de uno o más restos de aminoácido en la CDR3 de VL y/o VH. La diversificación se puede realizar sintetizando de una colección de moléculas de ADN utilizando tecnología de mutagénesis de trinucleótidos (MTRI) (Virnekäs, B, y col., Nucl. Acids Res. 1994, 22: 5600.). Los anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno de los mismos incluyen moléculas con modificaciones/variaciones que incluyen, pero sin limitación, modificaciones que conducen a una semivida modificada (por ejemplo, modificación de la porción Fc o unión de moléculas adicionales tales como PEG) o a una actividad CCDA o CDC modificada.

Variantes conservativas de aminoácidos

30 Se pueden fabricar variantes polipeptídicas que conserven la estructura molecular global de una secuencia peptídica del anticuerpo descrita en el presente documento. Dadas las propiedades de los aminoácidos individuales, el experto reconocerá algunas sustituciones racionales. Se pueden hacer sustituciones de aminoácidos, es decir "sustituciones conservativas", por ejemplo a base de la similitud en la polaridad, la carga, la solubilidad, la hidrofobicidad, la hidrofiliidad y/o la naturaleza antipática de los restos implicados.

35 Por ejemplo, (a) los aminoácidos no polares (hidrófobos) incluyen alanina, leucina, isoleucina, valina, prolina, fenilalanina, triptófano y metionina; (b) los aminoácidos polares neutros incluyen glicina, serina, treonina, cisteína,

5 tirosina, asparagina y glutamina; (c) los aminoácidos cargados de forma positiva (básicos) incluyen arginina, lisina e histidina; y (d) los aminoácidos cargados de forma negativa (ácidos) incluyen ácido aspártico y ácido glutámico. Normalmente, las sustituciones se pueden realizar dentro de los grupos (a)-(d). Además, la glicina y la prolina pueden sustituirse una por otra basándose en su capacidad para alterar las α -hélices. De forma similar, determinados aminoácidos, tales como alanina, cisteína, leucina, metionina, ácido glutámico, glutamina, histidina y lisina, se encuentran más comúnmente en las α -hélices, mientras que valina, isoleucina, fenilalanina, tirosina, triptófano y treonina se encuentran más comúnmente en láminas β . Glicina, serina, ácido aspártico, asparagina y prolina comúnmente se encuentran en giros. Entre los grupos siguientes pueden hacerse algunas sustituciones preferentes: (i) S y T; (ii) P y G; y (iii) A, V, L e I. Dado el código genético conocido y las técnicas de ADN recombinante y sintético, el científico experto puede construir fácilmente los ADN que codifican las variantes de aminoácidos conservativas. En un ejemplo particular, la posición de aminoácido 3 en las SEQ ID NO: 33-36 se puede cambiar de una Q a una E.

10 Como se utiliza en el presente documento, "identidad de secuencia" entre dos secuencias polipeptídicas indica el porcentaje de aminoácidos que son idénticos entre las secuencias. "Homología de secuencia" indica el porcentaje de aminoácidos que son idénticos o que representan sustituciones conservativas de aminoácidos.

15 Moléculas de ADN de la invención

La presente invención también se refiere a las moléculas de ADN que codifican un anticuerpo, o fragmento de unión a antígeno del mismo, de la invención.

20 Las moléculas de ADN de la invención no se limitan a las secuencias desveladas en el presente documento, pero también incluyen variantes de las mismas. Las variantes de ADN dentro de la invención pueden describirse en referencia a sus propiedades físicas en la hibridación. El experto reconocerá que se puede utilizar ADN para identificar su complementario y, dado que el ADN es bicatenario, su equivalente u homólogo, utilizando técnicas de hibridación de ácidos nucleicos. También se reconocerá que la hibridación se puede producir con una complementariedad inferior al 100 %. No obstante, dada una apropiada elección de condiciones, se pueden utilizar las técnicas de hibridación para diferenciar entre secuencias de ADN a base de su relación estructural con una sonda particular. Para una guía en referencia a tales condiciones véase Sambrook y col., 1989 citado anteriormente y Ausubel y col., 1995 (Ausubel, F. M., Brent, R., Kingston, R. E., Moore, D. D., Sedman, J. G., Smith, J. A., & Struhl, K. eds. (1995). Current Protocols in Molecular Biology. Nueva York: John Wiley and Sons).

30 La similitud estructural entre dos secuencias polinucleotídicas se puede expresar como una función de la "rigurosidad" de las condiciones en las cuales las dos secuencias hibridarán entre sí. Como se utiliza en el presente documento, el término "rigurosidad" se refiere a la medida en la que las condiciones no favorecen la hibridación. Las condiciones rigurosas son fuertemente desfavorables para la hibridación y sólo las moléculas más relacionadas estructuralmente hibridarán entre sí en tales condiciones. Por el contrario, las condiciones no rigurosas favorecen la hibridación de moléculas que presentan un menor grado de relación estructural. Por lo tanto, la rigurosidad de la hibridación se correlaciona de forma directa con las relaciones estructurales de dos secuencias de ácido nucleico. Las siguientes relaciones son útiles en la correlación de la hibridación y la relación (en donde T_f es la temperatura de fusión de un ácido nucleico bicatenario):

- 35 a. $T_f = 69,3 + 0,41 (G+C)\%$
- 40 b. La T_f del ADN bicatenario disminuye en 1 °C con cada aumento del 1 % en el número de pares de bases desapareadas.
- c. $(T_f)_{\mu 2} - (T_f)_{\mu 1} = 18,5 \log_{10} \mu 2 / \mu 1$
en donde $\mu 1$ y $\mu 2$ son las fuerzas iónicas de dos soluciones.

45 La rigurosidad de la hibridación es una función de muchos factores, que incluyen la concentración de ADN global, la fuerza iónica, la temperatura, el tamaño de la sonda y la presencia de agentes que rompen los enlaces de hidrógeno. Los factores que estimulan la hibridación incluyen las concentraciones altas de ADN, las fuerzas iónicas altas, las temperaturas bajas, el mayor tamaño de la sonda y la ausencia de agentes que rompen los enlaces de hidrógeno. Normalmente, la hibridación se realiza en dos fases: la fase de "unión" y la fase de "lavado".

50 En primer lugar, en la fase de unión, la sonda se une a la diana en condiciones que favorecen la hibridación. Normalmente, en esta etapa la rigurosidad se controla modificando la temperatura. Para una alta rigurosidad, la temperatura normalmente está entre 65 °C y 70 °C, a menos que se utilicen sondas oligonucleotídicas cortas (< 20 nt). Una solución de hibridación representativa comprende SSC 6X, SDS al 0,5 %, solución de Denhardt 5X y 100 μ g de ADN vehículo no específico. Véase Ausubel y col., sección 2.9, suplemento 27 (1994). Por supuesto, se conocen muchas condiciones de tampón distintas, aunque equivalentes de forma funcional. Cuando el grado de relación es menor, se puede elegir una temperatura menor. Las temperaturas de unión de baja rigurosidad están entre aproximadamente 25 °C y 40 °C. La rigurosidad media está entre al menos aproximadamente 40 °C a menos de aproximadamente 65 °C. La rigurosidad alta es de, al menos, aproximadamente 65 °C.

En segundo lugar, la sonda en exceso se elimina mediante lavado. Es en esta fase en la habitualmente se aplican las condiciones más rigurosas. Por lo tanto, es esta etapa de "lavado" la que más importante para determinar la relación a través de hibridación. Normalmente, las soluciones de lavado contienen concentraciones menores de sales. Una solución de rigurosidad media ejemplar contiene SSC 2X y SDS al 0,1 %. Una solución de lavado de alta rigurosidad contiene el equivalente (en fuerza iónica) de menos de aproximadamente SSC 0,2X, con una solución rigurosa preferente que contiene aproximadamente SSC 0,1X. Las temperaturas asociadas con diversas rigurosidades son las mismas que las discutidas anteriormente para la "unión". Además, normalmente la solución de lavado se cambia varias veces durante el lavado. Por ejemplo, las condiciones típicas de lavado de alta rigurosidad comprenden lavar dos veces durante 30 minutos a 55 °C y tres veces durante 15 minutos a 60 °C.

Una realización de la divulgación es una secuencia de ácido nucleico aislado que codifica (i) el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno de la divulgación, las secuencias de CDR como se representan en la tabla 7 o (ii) las secuencias variables de la cadena ligera y pesada como se representan en la tabla 7, o (iii) que comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno de la divulgación, las secuencias de CDR que se representan en la tabla 7 o las secuencias variables de la cadena ligera y pesada que se representan en la tabla 7.

Variantes equivalentes de forma funcional

Puede describirse otra clase más de variantes de ADN dentro del ámbito de la divulgación con referencia al producto que codifican. Estos polinucleótidos equivalentes de forma funcional se caracterizan por el hecho de que codifican las mismas secuencias peptídicas que se encuentran en las SEQ ID NO: 5-36, 45-50, 55-60, 65-70, 75-80, 85-90, 95-100, 105-110, 115-120, 125-130, 135-140, debido a la degeneración del código genético.

Se ha reconocido que las variantes de las moléculas de ADN proporcionadas en el presente documento se pueden construir de varios modos distintos. Por ejemplo, se pueden construir como ADN completamente sintéticos. Los procedimientos para sintetizar de forma eficaz oligonucleótidos en el intervalo de 20 a aproximadamente 150 nucleótidos están ampliamente disponibles. Véase Ausubel y col., sección 2.11, suplemento 21 (1993). Los oligonucleótidos solapantes se pueden sintetizar y ensamblar de un modo comunicado por primera vez por Khorana y col., *J. Mol. Biol.* 72:209-217 (1971); véase también Ausubel y col., citado anteriormente, Sección 8.2. Preferentemente, los ADN sintéticos se diseñan con sitios de restricción convenientes modificados por ingeniería en los extremos 5' y 3' del gen, para facilitar la clonación en un vector apropiado.

Como se ha indicado, un procedimiento para generar variantes es comenzar con uno de los ADN desvelados en el presente documento y, después, realizar mutagénesis dirigida. Véase Ausubel y col., citado anteriormente, sección 8, suplemento 37 (1997). En un procedimiento típico, se clona un ADN diana en un vehículo de bacteriófago de ADN monocatenario. El ADN monocatenario se aísla e hibrida con un oligonucleótido que contiene la alteración (o alteraciones) nucleotídica(s) deseada(s). Se sintetiza la hebra complementaria y el fago bicatenario se introduce en un hospedador. Alguna de la progenie resultante contendrá el mutante deseado, lo que se puede confirmar utilizando secuenciación de ADN. Además, están disponibles diversos procedimientos que aumentan la probabilidad de que el fago progenie sea el mutante deseado. Estos procedimientos son bien conocidos para los expertos en la materia y hay disponibles de forma comercial kits para generar tales mutantes.

Construcciones y expresión de ADN recombinante

La divulgación proporciona construcciones de ADN recombinante que comprenden una o más de las secuencias nucleotídicas de la presente invención. Las construcciones recombinantes de la divulgación se utilizan en relación a un vector, tal como un plásmido, fagémido, fago o vector vírico, en el cual se inserta una molécula de ADN que codifica un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno de la invención.

Un anticuerpo, porción de unión a antígeno o derivado del mismo, proporcionado en el presente documento, se puede preparar mediante expresión recombinante de secuencias de ácido nucleico que codifican las cadenas ligera y pesada, o porciones de las mismas, en una célula hospedadora. Para expresar un anticuerpo, porción de unión a antígeno o derivado del mismo de forma recombinante, se puede transfectar una célula hospedadora con uno o más vectores de expresión recombinante que porten fragmentos de ADN que codifican las cadenas ligera y/o pesada, o porciones de las mismas, de forma tal que las cadenas ligera y pesada se expresen en la célula hospedadora. Para preparar y/u obtener ácidos nucleicos que codifican las cadenas pesada y ligera, para incorporar estos ácidos nucleicos en vectores de expresión recombinantes y para introducir los vectores en células hospedadoras, se utilizan metodologías convencionales de ADN recombinante tales como las descritas en Sambrook, Fritsch y Maniatis (eds.), *Molecular Cloning; A Laboratory Manual*, Segunda Edition, Cold Spring Harbor, N.Y., (1989), Ausubel, F. M. y col. (eds.) *Current Protocols in Molecular Biology*, Greene Publishing Associates, (1989) y en la patente de Estados Unidos nº 4.816.397 de Boss y col.

Además, las secuencias de ácido nucleico que codifican las regiones variables de las cadenas pesada y/o ligera se pueden convertir en, por ejemplo, secuencias de ácido nucleico que codifican cadenas de anticuerpo de longitud completa, fragmentos Fab o en scFv. El fragmento de ADN que codifica VL o VH se puede unir de forma operativa (de modo tal que las secuencias de aminoácidos codificadas por los dos fragmentos de ADN estén en marco) a otro

fragmento de ADN que codifica, por ejemplo, una región constante de anticuerpo o un enlazador flexible. Las secuencias de las regiones constantes de la cadena pesada y de la cadena ligera humanas se conocen en la técnica (véase, por ejemplo, Kabat, E. A., y col. (1991) *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5ª Edición, U.S. Dept. of Health and Human Services, Bethesda, MD, Publicación del NIH nº 91-3242) y los fragmentos de ADN que abarcan estas regiones se pueden obtener mediante amplificación por PCR convencional.

Para crear una secuencia de polinucleótidos que codifica un scFv, los ácidos nucleicos que codifican el VH y el VL se pueden unir de forma operativa a otro fragmento que codifica un enlazador flexible de forma que las secuencias de VH y VL se puedan expresar como una proteína monocatenaria contigua, con las regiones VL y VH unidas mediante el enlazador flexible (véase, por ejemplo, Bird y col. (1988) *Science* 242:423-426; Huston y col. (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85:5879-5883; McCafferty y col., *Nature* (1990) 348:552-554).

Para expresar los anticuerpos, porciones de unión a antígeno o derivados de los mismos, se pueden utilizar procedimientos convencionales de expresión de ADN recombinante (véase, por ejemplo, Goeddel; *Gene Expression Technology. Methods in Enzymology* 185, Academic Press, San Diego, Calif. (1990)). Por ejemplo, se puede insertar el ADN que codifica el polipéptido deseado en un vector de expresión que, después, se transfecta en una célula hospedadora adecuada. Las células hospedadoras adecuadas son células eucariotas y procariotas. Ejemplos de células hospedadoras procariotas son, por ejemplo, las bacterias, ejemplos de células hospedadoras eucariotas son células de levadura, de insecto o de mamífero. En algunas realizaciones, los ADN que codifican las cadenas pesada y ligera se insertan en vectores distintos. En otras realizaciones, el ADN que codifica las cadenas pesada y ligera se insertan en el mismo vector. Se entiende que el diseño del vector de expresión, que incluye la selección de secuencias reguladoras, está afectado por factores tales como la elección de la célula hospedadora, el nivel de expresión de la proteína deseado y si la expresión es constitutiva o inducible.

Expresión bacteriana

Se construyen vectores de expresión útiles para el uso bacteriano insertando una secuencia de ADN estructural que codifica una proteína deseada, junto con señales de iniciación y de terminación de la traducción adecuadas en fase de lectura operable con un promotor funcional. El vector comprenderá uno o más marcadores fenotípicos de selección y un origen de replicación para garantizar el mantenimiento del vector y, si es conveniente, para proporcionar la amplificación dentro del hospedador. Los hospedadores procariotas adecuados para la transformación incluyen *E. coli*, *Bacillus subtilis*, *Salmonella typhimurium* y diversas especies dentro de los géneros *Pseudomonas*, *Streptomyces* y *Staphylococcus*.

Los vectores bacterianos pueden estar basados, por ejemplo, en bacteriófagos, plásmidos o fagémidos. Estos vectores pueden contener un marcador de selección y un origen de replicación bacteriano derivados de plásmidos disponibles de forma comercial que normalmente contienen elementos del conocido vector de clonación pBR322 (ATCC 37017). Tras la transformación de una cepa hospedadora adecuada y el crecimiento de la cepa hospedadora hasta una densidad celular apropiada, el promotor seleccionado se desreprime/induce mediante medios apropiados (por ejemplo, cambio de temperatura o inducción química) y las células se cultivan durante un periodo adicional. Normalmente las células se recogen mediante centrifugación, se rompen por medios físicos o químicos, y el extracto bruto resultante se conserva para su posterior purificación.

En los sistemas bacterianos, se pueden seleccionar de forma ventajosa varios vectores de expresión dependiendo del uso pretendido de la proteína a expresar. Por ejemplo, cuando se ha de producir una gran cantidad de tal proteína para la generación de anticuerpos o para explorar bibliotecas de péptidos, pueden ser convenientes, por ejemplo, vectores que dirijan la expresión de niveles elevados de productos proteicos de fusión que se purifiquen fácilmente. Los anticuerpos de la presente invención o fragmentos de unión a antígeno de los mismos incluyen productos purificados de forma natural, productos de procedimientos químicos sintéticos y productos producidos mediante técnicas recombinantes a partir de un hospedador procariota, que incluyen, por ejemplo, *E. coli*, *Bacillus subtilis*, *Salmonella typhimurium* y diversas especies de los géneros *Pseudomonas*, *Streptomyces* y *Staphylococcus*, preferentemente de células de *E. coli*.

Expresión y purificación en mamíferos

Secuencias reguladoras preferentes para la expresión en células hospedadora de mamífero incluyen elementos víricos que dirigen niveles elevados de expresión de proteínas en células de mamífero, tales como promotores y/o potenciadores obtenidos de citomegalovirus (CMV) (tal como el promotor/potenciador de CMV), virus 40 de simio (SV40) (tal como el promotor/potenciador de SV40), adenovirus (por ejemplo, el promotor tardío principal del adenovirus (AdMPLP) y polioma. Para una descripción adicional de los elementos reguladores víricos y de las secuencias de los mismos, véase, por ejemplo, el documento U.S. 5.168.062 de Stinski, el documento U.S. 4.510.245 de Bell y col. y el documento U.S. 4.968.615 de Schaffner y col. Los vectores de expresión recombinantes también pueden incluir orígenes de replicación y marcadores de selección (véase, por ejemplo, los documentos U.S. 4.399.216, 4.634.665 y U.S. 5.179.017, de Axel y col.) Marcadores de selección adecuados incluyen genes que confieren resistencia a fármacos, tales como G418, higromicina o metotrexato, a una célula hospedadora en la que el vector se ha introducido. Por ejemplo, el gen de la dihidrofolato reductasa (DHFR) confiere resistencia a metotrexato y el gen neo confiere resistencia a G418.

La transfección del vector de expresión en una célula hospedadora se puede llevar a cabo utilizando técnicas convencionales, tales como electroporación, precipitación por fosfato cálcico, y transfección mediada por DEAE-dextrano, lipofección o policones.

5 Las células hospedadoras de mamífero adecuadas para expresar los anticuerpos, porciones de unión a antígeno o derivados de los mismos, proporcionados en el presente documento, incluyen células de ovario de hámster chino (células CHO) (que incluyen las células dhfr- CHO, descritas en Urlaub y Chasin, (1980) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77:4216-4220, utilizadas con un marcador de selección de DHFR, por ejemplo como se describe en R. J. Kaufman y P. A. Sharp (1982) Mol. Biol. 159:601-621), células de mieloma NSO, células COS y células SP2. En algunas realizaciones, el vector de expresión está diseñado de forma que la proteína expresada se secreta en el medio de cultivo en el que cultivan las células hospedadoras. La transfección/expresión transitoria de anticuerpos puede conseguirse, por ejemplo, siguiendo los protocolos de Durocher y col. (2002) Nucl. Acids Res. Vol 30 e9. La transfección/expresión estable de anticuerpos puede conseguirse, por ejemplo, siguiendo los protocolos del sistema UCOE (T. Benton y col.). (2002) Cytotechnology 38: 43-46).

15 Los anticuerpos, porciones de unión a antígeno o derivados de los mismos se pueden recuperar del medio de cultivo utilizando procedimientos de purificación de proteínas convencionales.

20 Los anticuerpos de la invención o un fragmento de unión a antígeno de los mismos se pueden recuperar y purificar a partir de cultivos de células recombinantes mediante procedimientos bien conocidos, que incluyen, pero sin limitación, precipitación con sulfato amónico o etanol, extracción ácida, cromatografía de proteína A, cromatografía de proteína G, cromatografía de intercambio aniónico o catiónico, cromatografía de fosfocelulosa, cromatografía de interacción hidrófoba, cromatografía de afinidad, cromatografía de hidroxapatita y cromatografía de lectina. También se puede emplear para purificación la cromatografía líquida de alto rendimiento ("HPLC"). Véase, por ejemplo, Colligan, Current Protocols in Immunology o Current Protocols in Protein Science, John Wiley & Sons, NY, N.Y., (1997-2001), por ejemplo los Capítulos 1, 4, 6, 8, 9, 10, cada uno incorporado en el presente documento por referencia en su totalidad.

25 Los anticuerpos de la divulgación o fragmentos de unión a antígeno de los mismos incluyen productos purificados de forma natural, productos de procedimientos químicos sintéticos y productos producidos mediante técnicas recombinantes a partir de un hospedador eucariota, incluyendo, por ejemplo, células de levadura, de plantas superiores, de insecto y de mamífero, preferentemente de células de mamífero. Dependiendo del hospedador empleado en un procedimiento de producción recombinante, el anticuerpo de la presente invención puede estar glucosilado o puede no estar glucosilado, prefiriéndose que esté glucosilado. Dichos procedimientos se describen en muchos manuales de laboratorio convencionales, tales como Sambrook, citado anteriormente, Secciones 17.37-17.42; Ausubel, citado anteriormente, Capítulos 10, 12, 13, 16, 18 y 20.

Procedimientos terapéuticos

35 Los procedimientos terapéuticos implican administrar a un sujeto que necesite tratamiento, una cantidad terapéuticamente eficaz de un anticuerpo, o fragmento de unión a antígeno del mismo, contemplado por la invención. En el presente documento, una cantidad "terapéuticamente eficaz" se define como la cantidad de un anticuerpo, o fragmento de unión a antígeno, que es suficiente cantidad para como para empobrecer las células positivas para C4.4a en un área tratada de un sujeto, bien como una dosis única o de acuerdo con un régimen de múltiples dosis, solo o en combinación con otros agentes, lo que conduce al alivio de una afección adversa, pero cuya cantidad es toxicológicamente tolerable. El sujeto puede ser un animal humano o no humano (por ejemplo, conejo, rata, ratón, perro, mono u otro primate de orden menor).

40 Un anticuerpo de la invención, o fragmento de unión a antígeno del mismo, podría coadministrarse con medicamentos conocidos y, en algunos casos, el propio anticuerpo podría estar modificado. Por ejemplo, un anticuerpo podría estar conjugado con un agente citotóxico o un radioisótopo para, de forma potencial, aumentar adicionalmente la eficacia.

45 Los anticuerpos de la presente invención se pueden administrar como único agente farmacéutico o en combinación con uno o más agentes terapéuticos adicionales, en donde la combinación no provoca efectos adversos no aceptables. Esta terapia de combinación incluye la administración de una única formulación de dosificación farmacéutica que contiene un anticuerpo de la invención y uno o más agentes terapéuticos adicionales, así como la administración de un anticuerpo de la invención y cada agente terapéutico adicional en su propia formulación de dosificación farmacéutica separada. Por ejemplo, un anticuerpo de la invención y un agente terapéutico se pueden administrar al paciente juntos en una composición de dosificación oral individual, tal como un comprimido o cápsula, o cada agente se puede administrar en formulaciones de dosificación separada.

50 Cuando se utilizan formulaciones de dosificación distintas, un anticuerpo de la invención y uno o más agentes terapéuticos pueden administrarse esencialmente al mismo tiempo (por ejemplo, de forma simultánea) o a momentos escalonados por separado (por ejemplo, de forma secuencial).

55 En particular, un anticuerpo de la presente invención se puede utilizar en combinación fija o separada con otros agentes antitumorales tales como agentes alquilantes, antimetabolitos, agentes antitumorales obtenidos de plantas,

agentes terapia de hormonal, inhibidores de la topoisomerasa, derivados de camptotecina, inhibidores de la quinasa, fármacos dirigidos, anticuerpos, interferones y/o modificadores de la respuesta biológica, compuestos antiangiogénicos y otros fármacos antitumorales. A este respecto, la siguiente es una relación no limitativa de ejemplos de agentes secundarios que se pueden utilizar en combinación con los anticuerpos de la presente invención:

- 5
- Los agentes alquilantes incluyen, pero sin limitación, N-óxido de mostaza nitrogenada, ciclofosfamida, ifosfamida, tiotepa, ranimustina, nimustina, temozolomida, altretamina, apaziquona, brostalicina, bendamustina, carmustina, estramustina, fotemustina, glufosfamida, mafosfamida, bendamustina y mitolactol; los compuestos alquilantes coordinados de platino incluyen, pero sin limitación, cisplatino, carboplatino, eptaplatino, lobaplatino, nedaplatino, oxaliplatino y satraplatino;
- 10
- Los anti-metabolitos incluyen, pero sin limitación, metotrexato, ribósido de 6-mercaptapurina, mercaptopurina, 5-fluorouracilo sólo o en combinación con leucovorina, tegafur, doxifluridina, carmofur, citarabina, octofosfato de citarabina, encitabina, gemcitabina, fludarabina, 5-azacitidina, capecitabina, cladribina, clofarabina, decitabina, eflornitina, etinilcitidina, arabinósido de citosina, hidroxurea, melfalán, nelarabina, nolatrexed, ocfosfite, premetrexed disódico, pentostatina, pelitrexol, raltitrexed, triapina, trimetrexato, vidarabina, vincristina y vinorelbina;
- 15
- Los agentes de terapia hormonal incluyen, pero sin limitación, exemestano, Lupron, anastrozol, doxercalciferol, fadrozol, formestano, inhibidores de la 11-beta hidroxisteroide deshidrogenasa 1, inhibidores de la 17-alfa hidroxilasa/17,20 liasa tales como acetato de abiraterona, inhibidores de la 5-alfa reductasa tales como finasterida y epristerida, antiestrógenos tales como tamoxifeno citrato y fulvestrant, Trelstar, toremifeno, raloxifeno, lasofoxifeno, letrozol, antiandrógenos tales como bicalutamida, flutamida, mifepristona, nilutamida, Casodex y antiprogesteronas y combinaciones de los mismos;
- 20
- Las sustancias antitumorales obtenidas de plantas incluyen, por ejemplo, las seleccionadas de inhibidores mitóticos, por ejemplo epotilonas tales como sagopilona, ixabepilona y epotilona B, vinblastina, vinflunina, docetaxel y paclitaxel;
- 25
- Los agentes que inhiben la topoisomerasa citotóxicos incluyen, pero sin limitación, aclarrubicina, doxorubicina, amonafida, belotecán, camptotecina, 10-hidroxycamptotecina, 9-aminocamptotecina, diflomotecán, irinotecán, topotecán, edotecarina, epimbicina, etopósido, exatecán, gimatecán, lurtotecán, mitoxantrona, pirambicina, pixantrona, rubitecán, sobuzoxano, taflupósido y combinaciones de los mismos;
- 30
- Los productos inmunológicos incluyen interferones tales como interferón alfa, interferón alfa-2a, interferón alfa-2b, interferón beta, interferón gamma-1a e interferón gamma-n1, y otros agentes potenciadores inmunitarios tales como L19-IL2 y otros derivados de IL2, filgrastim, lentinán, sizofilán, TheraCys, ubenimex, aldesleucina, alemtuzumab, BAM-002, dacarbazina, daclizumab, denileucina, gemtuzumab, ozogamicina, ibritumomab, imiquimod, lenograstim, lentinán, vacuna de melanoma (Corixa), molgramostim, sargramostim, tasonermin, teclucina, timalfasina, tositumomab, Vimlizin, epratuzumab, mitumomab, oregovomab, pemtumomab y Provenge;
- 35
- Los modificadores de la respuesta biológica son agentes que modifican los mecanismos de defensa de organismos vivos o las respuestas biológicas tales como la supervivencia, el crecimiento o la diferenciación de células de tejidos, para dirigirlas para que tengan actividad antitumoral; tales agentes incluyen, por ejemplo, krestin, lentinán, sizofirán, picibanilo, ProMune y ubenimex;
- 40
- Los compuestos antiangiogénicos incluyen, pero sin limitación, acitretina, aflibercept, angiostatina, aplidina, asentar, axitinib, bevacizumab, brivanib alaninat, cilengtide, combretastatina, endostatina, fenretinida, halofuginona, pazopanib, ranibizumab, rebimastat, recentina, regorafenib, removab, revlimid, sorafenib, esqualamina, sunitinib, telatinib, talidomida, ucraina, vatalanib y vitaxin;
- 45
- Los anticuerpos incluyen, pero sin limitación, trastuzumab, cetuximab, bevacizumab, rituximab, ticilimumab, ipilimumab, lumiliximab, catumaxomab, atacicept, oregovomab y alemtuzumab;
- Los inhibidores del VEGF, tales como, por ejemplo, sorafenib, regorafenib, bevacizumab, sunitinib, recentin, axitinib, aflibercept, telatinib, brivanib alaninato, vatalanib, pazopanib y ranibizumab;
- Inhibidores del EGFR (HER1) tales como, por ejemplo, cetuximab, panitumumab, vectibix, gefitinib, erlotinib y Zactima;
- 50
- Inhibidores de HER2 tales como, por ejemplo, lapatinib, tratuzumab y pertuzumab;
- Inhibidores de mTOR tales como, por ejemplo, temsirolimus, sirolimus/rapamicina y everolimus;
- Inhibidores de c-Met;
- Inhibidores de PI3K y AKT;
- 55
- Inhibidores de CDK tales como roscovitina y flavopiridol;
- Inhibidores de los puntos de control del ensamblaje del uso y agentes anti-mitóticos dirigidos tales como inhibidores de la PLK, inhibidores de Aurora (por ejemplo, Hesperadina), inhibidores de la quinasa del punto de control e inhibidores de KSP;
- Inhibidores de la HDAC tales como, por ejemplo, panobinostat, vorinostat, MS275, belinostat y LBH589;
- 60
- Inhibidores de HSP90 y HSP70;
- Inhibidores de proteasoma tales como bortezomib y carfilzomib;
- Inhibidores de la serina/treonina quinasa, que incluyen inhibidores de MECK e inhibidores de Raf, tales como sorafenib;
- Inhibidores de la farnesiltransferasa tales como, por ejemplo, tipifarnib;
- 65
- Inhibidores de la tirosina quinasa, que incluyen, por ejemplo, dasatinib, nilotibib, regorafenib, bosutinib, sorafenib,

- bevacizumab, sunitinib, cediranib, axitinib, aflibercept, telatinib, mesilato de imatinib, alaninato de brivanib, pazopanib, ranibizumab, vatalanib, cetuximab, panitumumab, vectibix, gefitinib, erlotinib, lapatinib, tratuzumab, pertuzumab e inhibidores de c-Kit;
- Agonistas del receptor de vitamina D;
- 5 Inhibidores de la proteína Bcl-2 tales como obatoclax, oblimersen de sodio y gossypol;
- Antagonistas del receptor cúmulo de diferenciación 20 tales como, por ejemplo, rituximab;
- Inhibidores de la ribonucleótido reductasa tales como, por ejemplo, gemcitabina;
- Agonistas del receptor 1 de ligando inductor de apoptosis de factor de necrosis tumoral tales como, por ejemplo, mapatumumab;
- 10 Antagonistas de receptor de 5-hidroxitriptamina tales como, por ejemplo, rEV598, xaliproden, clorhidrato de palonosetrón, granisetrón, Zindol y AB-1001;
- Inhibidores de integrinas que incluyen inhibidores de la integrina alfa5-beta1 tales como, por ejemplo, E7820, JSM 6425, volociximab y endostatina;
- Antagonistas del receptor de andrógenos que incluyen, por ejemplo, decanoato de nandrolona, fluoximesterona,
- 15 Android, Prost-aid, andromustina, bicalutamida, flutamida, apociproterona, apo-flutamida, acetato de clormadiona, Androcur, Tabi, acetato de ciproterona y nilutamida;
- Inhibidores de la aromatasas tales como, por ejemplo, anastrozol, letrozol, testolactona, exemestano, aminoglutetimida y formestano;
- Inhibidores de metaloproteinasas de matriz;
- 20 Otros agentes anticancerígenos que incluyen, por ejemplo, alitretinoína, ampligen, atrasentán, bexaroteno, bortezomib, bosentán, calcitriol, exisulind, fotemustina, ácido ibandrónico, miltefosina, mitoxantrona, l-asparaginasa, procarbazona, dacarbazina, hidroxycarbamida, pegaspargasa, pentostatina, tazaroteno, velcade, nitrato de galio, canfosfamida, darinaparsina y tretinoína.
- En una realización preferente, los anticuerpos de la presente invención se pueden utilizar en combinación con quimioterapia (es decir, agentes citotóxicos), anti-hormonas y/o terapias dirigidas tales como otros inhibidores de quinasa (por ejemplo, inhibidores del EGFR), inhibidores de mTOR e inhibidores de la angiogénesis.
- Los compuestos de la presente invención se pueden emplear también en el tratamiento del cáncer junto con radioterapia y/o intervención quirúrgica.
- Un anticuerpo de la invención, o fragmento de unión a antígeno del mismo, podría, en algunos casos, estar él mismo modificado. Por ejemplo, un anticuerpo podría estar conjugado con cualquiera, pero sin limitación, de los compuestos mencionados anteriormente o cualquier radioisótopo para aumentar adicionalmente de forma potencial la eficacia. Además, los compuestos de la invención pueden utilizarse como tales o en composiciones, en investigación y diagnóstico, o como patrones de referencia analítica, y similares, que se conocen bien en la técnica.
- 30 Los anticuerpos de la invención, o fragmentos de unión a antígeno de los mismos, se pueden utilizar como una herramienta terapéutica o diagnóstica en una diversidad de situaciones en donde C4.4a se expresa o se encuentra de forma indeseada, por ejemplo trastornos de la proliferación celular tales como el cáncer. Los trastornos y afecciones particularmente adecuados para el tratamiento con un anticuerpo de la invención son los tumores sólidos, tales como cáncer de mama, del tracto respiratorio, de cerebro, de órganos reproductores, del tracto digestivo, del tracto urinario, ocular, de hígado, de la piel, de cabeza y cuello, de tiroides, de paratiroides y sus metástasis a distancia. Los trastornos también incluyen linfomas, sarcomas y leucemias.
- 35 Los ejemplos de cáncer de mama incluyen, pero sin limitación, carcinoma ductal invasivo, carcinoma lobular invasivo, carcinoma ductal *in situ* y carcinoma lobular *in situ*.
- Los ejemplos de cánceres del tracto respiratorio incluyen, pero sin limitación, carcinoma de pulmón microcítico y amicrocítico, así como adenoma bronquial y blastoma pleuropulmonar.
- 45 Los ejemplos de cánceres de cerebro incluyen, pero sin limitación, glioma de tronco encefálico y glioma hipotalámico, astrocitoma cerebelar y cerebral, glioblastoma, meduloblastoma, ependimoma, así como a tumor neuroectodérmico y a tumor pineal.
- Los tumores de los órganos reproductores masculinos incluyen, pero sin limitación, cáncer de próstata y cáncer testicular. Los tumores de los órganos reproductores femeninos incluyen, pero sin limitación, cáncer de endometrio,
- 50 cáncer del cuello del útero, cáncer ovárico, cáncer vaginal y cáncer de la vulva, así como sarcoma del útero.
- Los tumores del tracto digestivo incluyen, pero sin limitación, cánceres anal, de colon, colorrectal, esofágico, de vesícula biliar, gástrico, pancreático, rectal, del intestino delgado y de las glándulas salivales.
- Los tumores del tracto urinario incluyen, pero sin limitación, cánceres de vejiga, de pene, de riñón, de pelvis renal, de uréter, uretral y renales papilares esporádicos.
- 55 Los cánceres oculares incluyen, pero sin limitación, melanoma intraocular y retinoblastoma.

Los ejemplos de cánceres de hígado incluyen, pero sin limitación, carcinoma hepatocelular (carcinomas de hepatocitos con y sin variante fibrolamelar), colangiocarcinoma (carcinoma del conducto biliar intrahepático) y colangiocarcinoma hepatocelular mixto.

5 Los cánceres de la piel incluyen, pero sin limitación, carcinoma de células escamosas, sarcoma de Kaposi, melanoma maligno, cáncer de piel de células de Merkel y cáncer de piel que no es melanoma.

Los cánceres de cabeza y cuello incluyen, pero sin limitación, cáncer laríngeo, cáncer hipolaríngeo, cáncer nasofaríngeo, cáncer orofaríngeo, cáncer de labio, cáncer de la cavidad oral y carcinoma de células escamosas.

Los linfomas incluyen, pero sin limitación, linfoma relacionado con SIDA, linfoma no Hodgkin, linfoma de linfocitos T cutáneo, linfoma de Burkitt, linfoma de Hodgkin y linfoma del sistema nervioso central.

10 Los sarcomas incluyen, pero sin limitación, sarcoma de tejido blando, osteosarcoma, histiocitoma fibroso maligno, linfosarcoma y rhabdomyosarcoma.

Las leucemias incluyen, pero sin limitación, leucemia mieloide aguda, leucemia linfoblástica aguda, leucemia linfocítica aguda, leucemia mielógena crónica y tricoleucemia.

15 Los trastornos mencionados anteriormente se han caracterizado bien en seres humanos, pero también existen con una etología similar en otros animales, que incluyen mamíferos, y se pueden tratar administrando las composiciones farmacéuticas de la presente invención.

20 Para tratar cualquiera de los trastornos anteriores, las composiciones farmacéuticas para su uso en conformidad con la presente invención se pueden formular de una manera convencional utilizando uno o más vehículos o excipientes fisiológicamente aceptables. Un anticuerpo de la invención, o fragmento de unión a antígeno del mismo, se puede administrar por cualquier medio adecuado, el cual puede variar dependiendo del tipo de trastorno a tratar. Las posibles vías de administración incluyen la parenteral (por ejemplo, intramuscular, intravenosa, intrarterial, intraperitoneal o subcutánea), la intrapulmonar y la intranasal, y, si se desea para el tratamiento inmunosupresor local, la administración intralesional. Además, un anticuerpo de la invención podría administrarse mediante infusión en pulsos con, por ejemplo, dosis decrecientes del anticuerpo. Preferentemente, la dosificación se proporciona mediante inyecciones, más preferentemente inyecciones intravenosas o subcutáneas, dependiendo en parte de si la administración es breve o crónica. La cantidad a administrar dependerá de una diversidad de factores, tales como los síntomas clínicos, el peso del individuo, si se administran otros fármacos. El experto en la técnica reconocerá que la vía de administración variará dependiendo del trastorno o afección a tratar.

30 La determinación de una cantidad terapéuticamente eficaz del nuevo polipéptido, de acuerdo con la presente invención, dependerá en gran medida de las características particulares del paciente, la vía de administración y la naturaleza del trastorno que se esté tratando. Guías directrices generales se pueden encontrar en, por ejemplo, las publicaciones de la Conferencia Internacional sobre Armonización y en Remington's pharmaceutical sciences, capítulos 27 y 28, pág. 484-528 (18ª ed., Alfonso R. Gennaro, Ed., Easton, Pa.: Mack Pub. Co., 1990). De forma más específica, la determinación de una cantidad terapéuticamente eficaz dependerá de factores tales como la toxicidad y la eficacia del medicamento. La toxicidad se puede determinar utilizando procedimientos bien conocidos en la técnica y encontrados en las referencias anteriores. La eficacia se puede determinar utilizando la misma directriz junto con los procedimientos descritos más adelante en los ejemplos.

Procedimientos diagnósticos

40 Los anticuerpos frente a C4.4a, o fragmentos de unión a antígeno de los mismos, se pueden utilizar para detectar la presencia de tumores que expresan C4.4a. La presencia de células que contienen C4.4a o que desprenden C4.4a dentro de diversas muestras biológicas, que incluyen suero y muestras de ensayo biopsia tisular, puede detectarse con anticuerpos frente a C4.4a. Además, los anticuerpos frente a C4.4a se pueden utilizar en diversas metodologías de formación de imágenes, tales como inmunocintigrafía con un anticuerpo conjugado con ⁹⁹Tc (u otro isótopo). Por ejemplo, para detectar carcinomas pancreáticos u ováricos se puede utilizar un protocolo de formación de imágenes similar al recientemente descrito utilizando un anticuerpo anti-PSMA conjugados con ¹¹¹In (Sodee y col., Clin. Nuc. Med. 21: 759-766, 1997). Otro procedimiento de detección que se puede utilizar es la tomografía de emisión de positrones conjugando los anticuerpos de la invención con un isótopo adecuado (véase Herzog y col., J. Nucl. Med. 34:2222-2226, 1993).

Composiciones farmacéuticas y administración

50 Una realización de la presente invención son composiciones farmacéuticas que comprenden anticuerpos frente a C4.4a, o fragmentos de unión a antígeno de los mismos, solos o en combinación con al menos otro agente, tal como un compuesto estabilizante, que puede administrarse en cualquier vehículo farmacéutico estéril biocompatible, que incluye, pero sin limitación, solución salina, solución salina tamponada, dextrosa y agua. Una realización adicional son las composiciones farmacéuticas que comprenden un anticuerpo de unión a C4.4a o fragmento de unión a antígeno del mismo, y otro compuesto farmacéuticamente activo que es adecuado para tratar enfermedades relacionadas con C4.4a, tales como el cáncer. Cualquiera de estas moléculas se puede administrar a un paciente en

sola o en combinación con otros agentes, fármacos u hormonas, en composiciones farmacéuticas en donde está mezclada con excipiente(s) o vehículos farmacéuticamente aceptables. En una realización de la presente invención, el vehículo farmacéuticamente aceptable es farmacéuticamente inerte.

5 La presente divulgación también se refiere a la administración de composiciones farmacéuticas. Dicha administración se lleva a cabo por vía oral o parenteral. Los procedimientos de entrega parenteral incluyen la administración tópica, intrarterial (de forma directa en el tumor), intramuscular, subcutánea, intramedular, intratecal, intraventricular, intravenosa, intraperitoneal o intranasal. Además de los principios activos, estas composiciones farmacéuticas pueden contener vehículos farmacéuticamente aceptables adecuados que comprenden excipientes y sustancias auxiliares que facilitan el procesamiento de los compuestos activos en preparaciones que pueden utilizarse farmacéuticamente. Los detalles adicionales sobre las técnicas de formulación y administración se pueden encontrar en la última edición de Remington's Pharmaceutical Sciences (Ed. Maack Publishing Co, Easton, Pa.).

15 Las composiciones farmacéuticas para la administración oral se pueden formular utilizando vehículos farmacéuticamente aceptables bien conocidos en la técnica, con dosificaciones adecuadas para la administración oral. Dichos vehículos permiten formular las composiciones farmacéuticas como comprimidos, píldoras, grageas, cápsulas, líquidos, geles, jarabes, suspensiones espesas, suspensiones y similares, para ingestión por el paciente.

20 Las preparaciones farmacéuticas para el uso oral se pueden obtener a través de la combinación de compuestos activos con excipientes sólidos, de forma opcional moliendo una mezcla resultante y procesando la mezcla de gránulos, tras añadir las sustancias auxiliares adecuadas, si se desea, para obtener núcleos de comprimidos o grageas. Los excipientes adecuados son rellenos de hidratos de carbono o de proteínas, tales como azúcares que incluyen lactosa, sacarosa, manitol o sorbitol; almidón de maíz, trigo, arroz, patata u otras plantas; celulosa tal como metilcelulosa, hidroxipropilmetilcelulosa o carboximetilcelulosa de sodio; y gomas, que incluyen goma arábiga y de tragacanto; y proteínas tales como gelatina y colágeno. Si se desea, se pueden añadir agentes disgregantes o solubilizantes, tales como polivinilpirrolidona reticulada, agar, ácido alginico o una sal de los mismos, tal como alginato de sodio.

25 Los núcleos de grageas se proporcionan con recubrimientos adecuados, tales como soluciones de azúcar concentradas que también pueden contener goma arábiga, talco, polivinilpirrolidona, gel de carbopol, polietilenglicol y/o dióxido de titanio, soluciones de laca y disolventes orgánicos adecuados o mezclas de disolventes. Se pueden añadir colorantes o pigmentos a los recubrimientos de comprimidos o grageas para la identificación del producto o para caracterizar la cantidad de compuesto activo, es decir, la dosificación.

30 Las preparaciones farmacéuticas que se pueden utilizar por vía oral incluyen cápsulas de ajuste por presión fabricadas de gelatina, así como cápsulas blandas selladas fabricadas de gelatina, y un revestimiento tal como glicerol o sorbitol. Las cápsulas de ajuste por presión pueden contener principios activos mezclados con un relleno o aglutinantes, tales como lactosa o almidones, lubricantes, tales como talco o estearato de magnesio, y, de forma opcional, estabilizantes. En cápsulas blandas, los compuestos activos pueden disolverse o suspenderse en líquidos adecuados, tales como aceites grasos, parafina líquida o polietilenglicol líquido con o sin estabilizantes.

35 Las formulaciones farmacéuticas para la administración parenteral incluyen soluciones acuosas de compuestos activos. Para la inyección, las composiciones farmacéuticas de la invención se pueden formular en soluciones acuosas, preferentemente en tampones fisiológicamente compatibles, tales como solución de Hank, solución de Ringer o solución salina tamponada de forma fisiológica. Las suspensiones para inyección acuosas pueden contener sustancias que aumentan la viscosidad de la suspensión, tales como carboximetilcelulosa de sodio, sorbitol o dextrano. De forma adicional, se pueden preparar suspensiones de los compuestos activos como suspensiones oleosas para la inyección adecuadas. Los disolventes o vehículos lipófilos adecuados incluyen aceites grasos tales como aceite de sésamo o ésteres de ácidos grasos sintéticos, tales como oleato de etilo o triglicéridos, o liposomas. De forma opcional, la suspensión también puede contener estabilizantes o agentes adecuados que aumenten la solubilidad de los compuestos para permitir la preparación de soluciones altamente concentradas.

40 Para la administración tópica o nasal, en la formulación se utilizan penetrantes apropiados para penetrar la barrera particular. En general tales penetrantes son conocidos en la técnica.

Kits

45 La invención adicionalmente se refiere a paquetes y kits farmacéuticos que comprenden uno o más recipientes rellenos con uno o más de los ingredientes de las composiciones de la invención mencionadas anteriormente. Asociados con tal(es) recipiente(es) puede haber una advertencia en la forma prescrita por un organismo gubernamental que regula la fabricación, uso o venta de productos farmacéuticos o biológicos, que refleje la aprobación del organismo para la fabricación, uso o venta del producto para administración a seres humanos.

55 En otra realización, los kits pueden contener secuencias de ADN que codifican los anticuerpos de la divulgación. Preferentemente, las secuencias de ADN que codifican estos anticuerpos se proporcionan en un plásmido adecuado para la transfección y expresión en una célula hospedadora. El plásmido puede contener un promotor (a menudo un promotor inducible) para regular la expresión del ADN en la célula hospedadora. El plásmido puede también contener sitios de restricción apropiados para facilitar la inserción de otras secuencias de ADN en el plásmido, para

producir diversos anticuerpos. Los plásmidos pueden también contener otros numerosos elementos para facilitar la clonación y la expresión de las proteínas codificadas. Dichos elementos son bien conocidos para el experto en la técnica e incluyen, por ejemplo, marcadores de selección, codones de iniciación, codones de terminación y similares.

Fabricación y almacenamiento.

5 Las composiciones farmacéuticas de la presente invención pueden fabricarse de un modo conocido en la técnica, por ejemplo, por medio de procedimientos convencionales mezclado, disolución, granulación, fabricación de grageas, levigación, emulsionado, encapsulación, atrapamiento o liofilización.

10 La composición farmacéutica puede proporcionarse como una sal y se puede formar con ácidos, que incluyen, pero sin limitación, clorhídrico, sulfúrico, acético, láctico, tartárico, málico, succínico etc. Las sales tienden a ser más solubles en disolventes acuosos u otros protónicos que son las correspondientes formas de base libre. En otros casos, la preparación preferente puede ser un polvo liofilizado en histidina 1 mM-50 mM, sacarosa al 0,1 %-2 %, manitol al 2 %-7 %, a un intervalo de pH de 4,5 a 5,5, que se combina con tampón antes del uso.

15 Después de que se han preparado las composiciones farmacéuticas que comprenden un compuesto de la invención formulado en un vehículo aceptable, pueden colocarse en un recipiente adecuado y etiquetarse para el tratamiento de una afección indicada. Para la administración de anticuerpos frente a C4.4a, o fragmento de unión a antígeno del mismo, tal etiquetado incluiría la cantidad, la frecuencia y el procedimiento de administración.

Dosis terapéuticamente eficaz

20 Las composiciones farmacéuticas adecuadas para su uso en la presente invención incluyen composiciones en las que los principios activos están contenidos en una cantidad eficaz para alcanzar el fin previsto, es decir, el tratamiento de una patología concreta que se caracteriza por la expresión de C4.4a. La determinación de una dosis eficaz está dentro de las habilidades de los expertos en la materia.

25 Para cualquier compuesto, la dosis terapéuticamente eficaz se puede estimar de forma inicial en ensayos de cultivos celulares, por ejemplo células neoplásicas, o en modelos animales, habitualmente ratones, conejos, perros, cerdos o monos. El modelo animal también se utiliza para alcanzar un intervalo de concentración deseado y una vía de administración. Después, tal información se puede utilizar para determinar las dosis útiles y las vías de administración en seres humanos.

30 Una dosis terapéuticamente eficaz se refiere a la cantidad de anticuerpo, o fragmento de unión a antígeno del mismo, que mejora los síntomas o la afección. La eficacia terapéutica y la toxicidad de tales compuestos se pueden determinar mediante procedimientos farmacéuticos convencionales en cultivos celulares o animales experimentales, por ejemplo la DE_{50} (la dosis terapéuticamente eficaz en el 50 % de la población) y la DL_{50} (la dosis letal para el 50 % de la población). La proporción de dosis entre los efectos terapéutico y tóxico es el índice terapéutico y puede expresarse como la proporción DE_{50}/DL_{50} . Son preferentes las composiciones farmacéuticas que presentan índices terapéuticos grandes. Los datos obtenidos de los ensayos de cultivos celulares y estudios animales se utilizan en la formulación de un intervalo de dosificación para uso humano. Las dosificaciones de tales compuestos se sitúan preferentemente dentro de un intervalo de concentraciones en circulación que incluye la DE_{50} , con poca o nula toxicidad. La dosificación varía dentro de este intervalo dependiendo de la forma de dosificación empleada, la sensibilidad del paciente y la vía de administración.

35 Cada médico elige la dosificación exacta según el paciente a tratar. La dosificación y la administración se ajustan para proporcionar niveles suficientes de la fracción activa o para mantener el efecto deseado. Los factores adicionales que se pueden tener en cuenta incluyen la gravedad de la patología, por ejemplo el tamaño y el emplazamiento del tumor; la edad, el peso y el sexo del paciente, la dieta, la hora y la frecuencia de la administración, la(s) combinación (o combinaciones) de fármacos, las reacciones de hipersensibilidad y la tolerancia/respuesta al tratamiento. Las composiciones farmacéuticas de acción prolongada podrían administrarse cada 3 a 4 días, cada semana o una vez cada dos semanas dependiendo de la semivida y la tasa de eliminación de la formulación particular.

40 Las cantidades de dosificación normales pueden variar de 0,1 a 100.000 microgramos, hasta una dosis total de aproximadamente 1 g, dependiendo de la vía de administración. En la bibliografía se proporcionan directrices en cuanto a las dosificaciones y procedimientos particulares de entrega. Véase la patente de Estados Unidos nº 4.657.760; 5.206.344 o 5.225.212. Los expertos en la materia emplearán distintas formulaciones para polinucleótidos que para proteínas o sus inhibidores. De forma similar, la entrega de polinucleótidos o polipéptidos será específica de células, afecciones, localizaciones, etc. particulares. Las actividades específicas preferentes para un anticuerpo radiomarcado pueden variar de 0,1 a 10 mCi/mg de proteína (Riva y col., Clin. Cancer Res. 5:3275-3280, 1999; Ulaner y col., 2008 Radiology 246(3):895-902)

45 La presente invención se describe adicionalmente mediante los ejemplos siguientes. Los ejemplos se proporcionan únicamente para ilustrar la invención por referencia a realizaciones específicas. Estos ejemplos, aunque ilustran determinados aspectos específicos de la invención, no representan las limitaciones o circunscriben el alcance de la invención desvelada.

5 Todos los ejemplos se llevaron a cabo utilizando técnicas convencionales, que son bien conocidas y habituales para los expertos en la materia, excepto cuando se describa lo otra cosa en detalle. Las técnicas de biología molecular habituales de los ejemplos siguientes se pueden llevar a cabo como se describe en los manuales convencionales de laboratorio, tales como Sambrook y col., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2ª Ed.; Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., 1989.

Ejemplos

Ejemplo 1: Generación de anticuerpos a partir de bibliotecas n-CoDeR

10 El aislamiento de anticuerpos humanos contra C4.4a se realizó mediante la tecnología de presentación en fagos empleando la biblioteca de anticuerpos n-CoDeR sin tratamiento previo de BioInvent International AB (Lund, Suecia; descrita en Söderling y col., *Nature Biotech.* 2000, 18:853-856) en un enfoque de selección celular. n-CoDeR es una biblioteca de Fab en la que se han diversificado las seis CDR. De forma inicial, las secuencias de las CDR se obtuvieron de donantes humanos sanos.

15 Brevemente, en un alícuota de la biblioteca de anticuerpos Fab se empobrecieron los ligantes de superficie no deseados mediante la preincubación con 10^7 células CHO-S parentales que no expresan C4.4a en PBS / FCS al 3 %/ NaN₃ al 0,01 % (tampón A) a 4°C mediante rotación vertical durante 15 min. Después de la eliminación de células mediante centrifugación, el sobrenadante se utilizó durante 2 ciclos adicionales de preincubación con células CHO-S. La posterior inmunoadsorción en las células diana (10^7 células CHO-S:hC4.4a) se efectuó mediante incubación con la preparación de fagos, durante 45 min a 4 °C en el tampón A, seguido por 10 lavados con tampón A (4 °C). Los fagos unidos se eluyeron tratando las células durante 5 min con rotación vertical con ácido cítrico 76 mM (4°C). La preparación que contenía los fagos eluidos se neutralizó mediante la adición de Tris/HCl 1M, a pH 7,5 y se realizaron 2 ciclos adicionales de inmunoadsorción celular. En cada ciclo, los fagos eluidos se propagaron y se determinaron los títulos de fagos como se ha descrito anteriormente (Cicortas Gunnarsson y col., *PEDS* 2004, 17(3) 213-221). Brevemente, los alícuotas de la solución de eluato se reservaron para experimentos de titulación y el resto se utilizó para transformar células *E. coli* HB101' en crecimiento exponencial para la preparación de nuevas reservas de fagos. Para cada ciclo de selección se titularon los fagos de inicio y los resultantes en *E. coli* HB101' en crecimiento exponencial y los clones se tomaron de los ciclos 2 y 3 para el análisis en ELISA de fagos.

Ensayo inmunoadsorbente ligado a enzimas (ELISA):

ELISA de fagos:

30 Los fagos seleccionados de distintos ciclos de selección se analizaron para determinar la especificidad utilizando ELISA para fagos. Brevemente, se realizó la expresión en fagos añadiendo 10 µl de un cultivo durante una noche (en medio LB complementado con ampicilina 100 µg/ml y tetraciclina 15 µg/ml) a 100 µl de medio reciente (medio LB complementado con ampicilina 100 µg/ml, tetraciclina 15 µg/ml y glucosa al 0,1 %) y agitando a 250 rpm y 37 °C en una PMT de 96 pocillos hasta que se alcanzó una DO600 de 0,5. Posteriormente, se añadió el fago auxiliar M13K07 (Invitrogen) y las muestras se incubaron durante otros 15 min a 37 °C sin agitación. Tras la adición de IPTG (c.f. de 35 0,25 mM), las células se incubaron durante 16 h a 30 °C agitando a 200 rpm.

40 Las placas PMT de 96 pocillos (Nunc-maxisorb) se recubrieron durante 16 h a 4 °C con 50 µl de C4.4a recombinante (proteína humana o de ratón 5 µg/ml). Al día siguiente, las placas se lavaron 3 veces con PBS/ Tween 20 al 0,05 % (tampón B), se trataron con reactivo de bloqueo (leche en polvo al 3 % en tampón B) y se lavaron 3 veces con tampón B. Después eso, se transfectaron alícuotas de 50 µl de las expresiones en fagos por pocillo y se incubaron durante 1 h a 20 °C. Después de lavar 3 veces con tampón B, se añadió anticuerpo anti M13 acoplado a HRP (GE Healthcare, 27-9421-01; 1:2500 diluido en tampón B) y se incubó durante 1 h a 20 °C. La reacción de color se desarrolló mediante la adición de 50 µl de TMB (Invitrogen) y se detuvo tras 5-15 min a 20 °C mediante la adición de 50 µl de solución de detención (Invitrogen). La reacción colorimétrica se registró a 450 nM en un lector Tecan.

Exploración de sFabs mediante ELISA:

45 Para la generación de Fab solubles (sFabs) se aisló ADN de fagémido de los ciclos de selección 2 y 3 y se digirió con las enzimas de restricción EagI y EcoRI, de acuerdo con las instrucciones del proveedor, con el fin de eliminar el producto del gen III. El fragmento resultante se volvió ligar y las construcciones se transformaron en células *E. coli* Top10 competentes utilizando procedimientos convencionales. Se tomaron un total de ~1500 clones, se transfirieron a placas de 96 pocillos que contenían medio LB (100 µg/ml, de glucosa al 0,1 %) y se agitaron a 250 rpm y 37 °C hasta alcanzar una DO600 de 0,5. Después de eso, se indujo la producción de sFab mediante la adición de IPTG (concentración final de 0,5 mM) y la incubación continuó durante 16 h a 30 °C mientras se agitaba a 200 rpm. A la mañana siguiente, se añadió a cada pocillo tampón BEL (ácido bórico 24,7 g/l; NaCl 18,7 g/l; EDTA 1,49 g/l, pH 8,0; lisozima 2,5 mg/ml (Roche)) y se analizaron en un ELISA 50 µl de los cultivos tratados para determinar la unión de los sFab a la diana, esencialmente como se ha descrito para fagos, a excepción de que la detección se realizó con anti-IgGh (específico de Fab) acoplado a HRP (Sigma; N° de producto A 0293)

FACS:

La unión celular de los sFab a las células diana se analizó en un FACSarray de BD. Brevemente, 50 μ l de la suspensión celular (2×10^6 células/ml) se mezclaron con 50 μ l de sobrenadante de *E. coli* durante 1 h a 4 °C y 300 rpm. Posteriormente se añadieron 100 μ l de tampón A, las células se centrifugaron y se lavaron otras 2 veces con tampón A. Para la detección de los Fabs, se añadió a las células fragmento F(ab')₂ específico anti F(ab')₂ de ser humano en cabra AffiniPure conjugado con R-ficoeritrina; Jackson Immuno Research; N° de producto 109-116-097, diluido a 1:100 en tampón A y se incubó durante 1 h a 4 °C. Después de 3 lavados con tampón A, el sedimento final se resuspendió en 150 μ l de tampón A y se registraron 5000 sucesos de FACS por muestra. El análisis de datos se realizó utilizando el programa informático del sistema FACSArray de BD.

10 Ejemplo 2: Agrupación de epítomos

Se realizaron experimentos de agrupación de epítomos utilizando análisis de resonancia de plasmón superficial en un instrumento Biacore T100 (GE Healthcare Biacore, Inc.), controlando la unión simultánea de parejas de anticuerpos anti-C4.4a y C4.4a. Todas las etapas siguientes se realizaron a 20 °C. Aproximadamente 2000 UR (una UR (unidad de resonancia) representa la unión de 1 pg de proteína por mm cuadrado) del primer anticuerpo se inmovilizaron de forma covalente en el chip sensor CM5 a través de acoplamiento con amina primaria. El chip se activó con una proporción 1:1 de N-etil-N-(3-dietilaminopropil) carbodiimida (EDC) 0,4 M y n-hidroxisuccinamida (NHC) 0,1 M a un caudal de 10 μ l/min durante 5-15 min. Después, los sitios de unión sobre la superficie no ocupados se bloquearon con un exceso de etanolamina 1 M a pH 8,5. Se capturó sobre la superficie C4.4a soluble (concentración de 400 nM en tampón HEPES-EP ((GE Healthcare Biacore, Inc.) a un caudal de 10 μ l/min durante 3 minutos) a través del anticuerpo inmovilizado. Por lo tanto, el epítomo del anticuerpo de captura está bloqueado para todas las moléculas de C4.4a unidas. Posteriormente, un segundo anticuerpo (a una concentración de 200 nM en tampón HEPES-EP a un caudal de 10 μ l/min durante 3 minutos) se pasó inmediatamente sobre la superficie para unirse al C4.4a capturado. Dos anticuerpos que reconocen el mismo epítomo, o epítomos solapantes, no se pueden unir a C4.4a, mientras que los anticuerpos con distintos epítomos son capaces de unirse. La superficie del anticuerpo se regeneró con MgCl₂ 3M (a un caudal de 10 μ l/min durante 30 segundos), para eliminar todas las proteínas unidas y, después, se repitió el proceso con otros anticuerpos.

Se analizaron los anticuerpos M31-B01 y M20-D02 S-A en formato de IgG1. Los anticuerpos no fueron capaces de unirse de forma simultánea a C4.4a y, por lo tanto, de competir por la unión (véase la Fig.1).

Ejemplo 3: Reactividad cruzada con C4.4a murina

30 En la Tabla 1 están los resultados de Biacore y los estudios que muestran la reactividad cruzada y las constantes de disociación (K_D) de los anticuerpos de la divulgación con C4.4a murina.

Las afinidades de unión de los anticuerpos anti C4.4 se determinaron mediante análisis de resonancia de plasmón superficial en un instrumento Biacore T100 (GE Healthcare Biacore, Inc.). Los anticuerpos se inmovilizaron sobre un chip sensor CM5 a través de un reactivo de captura indirecta, Fc anti- IgG de ser humano. Los reactivos del "Human Antibody Capture Kit" (BR-1008-39, GE Healthcare Biacore, Inc.) se utilizaron tal como lo describe el fabricante. Se inmovilizaron aproximadamente 5000 UR del anticuerpo monoclonal anti-IgG de ser humano (Fc) en ratón por célula. Los anticuerpos anti C4.4 se inyectaron a una concentración de 5 μ g/ml a 10 μ l/min durante 10 s para alcanzar un nivel de captura de aproximadamente 200 a 600 UR. Se inyectaron diversas concentraciones (400 nM, 200 nM, 100 nM, 50 nM, 25 nM, 12,5 nM, 6,25 nM, y 3,12 nM) en tampón HEPES-EP (GE Healthcare Biacore, Inc.) de C4.4a humana o murina sobre los anticuerpos anti C4.4a inmovilizados a un caudal de 60 μ l/min durante 3 minutos y se permitió la disociación durante 10 minutos. Se generaron sensogramas tras corrección de células de referencia en línea, seguida por la resta de la muestra de tampón. La constante de disociación en equilibrio (K_D) se calculó a base de la proporción de las constantes de asociación (k_a) y disociación (k_d), obtenida ajustando los sensogramas con un modelo de unión 1:1 de primer orden utilizando el programa informático Biacore Evaluation (versión 4.0).

45 Ejemplo 4: Unión a C4.4a humana y murina recombinantes

La Figura 2 representa curvas de unión de los anticuerpos anti-C4.4 M31-B01 y M20 D02 S-A sobre C4.4a humana (A) y C4.4.a murina (B) recombinantes, respectivamente. Brevemente, placas PMT de 96 pocillos se recubrieron durante 16 h a 4 °C con C4.4a humana o de ratón recombinante (placas de 100 ng/pocillo se lavaron 3 veces con PBS/Tween 20 al 0,05 % (=tampón B) tratadas con reactivo de bloqueo (PBS + BSA al 2 %) y se lavaron de nuevo 3 veces con tampón B. Después de eso, se añadieron los anticuerpos anti C4.4a de la divulgación en concentraciones de 0,39 ng a 400 ng/por pocillo y se incubaron durante una hora a 20 °C. Después de lavar 3 veces con tampón B, a cada pocillo se añadieron 20 ng de proteína A en 100 μ l de tampón B. La reacción de color se desarrolló mediante la adición de 50 μ l de 3,3',5,5'-tetrametilbenzidina (TMB) (Sigma). Los datos para la determinación de CE_{50} se registraron tras 18 min midiendo la extinción 360 nm en un lector de placas Tecan infinite. Los valores de CE_{50} para M31-B01 fueron de 0,24 y 0,29 nM para C4.4a humana y murina, respectivamente. Y para M20-D02 S-A, los valores de CE_{50} fueron de 0,3 y 0,38 nM para C4.4a humana y murina, respectivamente. Esto indica una elevada afinidad de unión de los anticuerpos anti C4.4a de la divulgación para C4.4a soluble humana y murina recombinante.

Ejemplo 5: Unión a distintas células tumorales

La Figura 3 representa las curvas de unión y los valores de CE_{50} de los anticuerpos M31-B01 y M20-D02 S-A en distintas células tumorales. Los análisis se realizaron mediante FACS utilizando la línea celular transfectada A549:hC4.4a y las líneas de células tumorales que expresan C4.4a de forma natural NCI H292, NCI H332, H1975/BCRP y BxPC3. La Figura 3 f) muestra que ambos anticuerpos de la divulgación se unen de forma específica y con afinidades elevadas a esta amplia variedad de células tumorales. Los valores de CE_{50} de anticuerpos de la divulgación adicionales en células mC4.4a : CHO y células NCI H292 se representan en la Tabla 8.

La titulación por FACS se realizó en una placa de microtitulación de 96 pocillos, en la que se mezclaron diluciones en serie del anticuerpo primario en un volumen de 50 μ l de tampón de FACS (SFT al 3 %, en PBS) con 50 μ l de una suspensión celular que consistía en 2x10⁵ células/ml que se habían desprendido con solución de disociación celular (1x) no enzimática (Sigma) y se resuspendieron en tampón de FACS. La incubación se realizó a 4 °C durante 1 h con agitación. Las células se centrifugaron, se lavaron con tampón de FACS y se resuspendieron en 100 μ l/pocillo de solución de cabra anti-IgG de ser humano conjugado con ficoeritrina (Dianova) en tampón de FACS. La incubación y el lavado se realizaron como anteriormente. El análisis de los anticuerpos unidos a las células se realizó a la longitud de onda de detección respectiva utilizando el dispositivo FACS Array. Los valores de CE_{50} se determinaron a partir de las medianas de fluorescencia de duplicados utilizando el programa informático Swift 8.0.

Ejemplo 6: Internalización

La internalización relativa de los anticuerpos antiC4.4a en las células C4.4a:A549 transfectadas se muestra en la Figura 4 y la Tabla 9. Los ensayos de internalización se realizaron con anticuerpos frente a C4.4a marcados con fluorescencia.

Como marcador fluorescente se eligió el colorante fluorescente sensible a pH CypHer 5E (GE Healthcare, PA15401), debido a que sólo se puede detectar una señal de fluorescencia a pH ácido, presente en los endosomas, mientras que a valores de pH neutros o básicos no se mide fluorescencia. Para el acoplamiento, los anticuerpos anti-C4.4a se incubaron durante 1 h a 20 °C con un exceso 2 molar del colorante en PBS/Carbonato Na a pH 8,3 (9:1). En promedio se alcanzó una carga de colorante acoplado a Lys de 1,6. Los efectos del acoplamiento sobre la afinidad se analizaron en ensayos de FACS y los cambios en los valores de CE_{50} se consideraron insignificantes. Se utilizaron 1x10⁴ células A549:hC4.4a para investigar la internalización específica de C4.4a tras la unión del anticuerpo. Las células se trataron con diversas concentraciones (34 nM – 6,6 nM) de anticuerpos marcados a 37 °C/CO₂ al 5 %. La internalización se midió de forma cinética durante hasta 24 h utilizando el analizador IN Cell Analyzer 1000. El análisis de la internalización se realizó de forma microscópica con un aumento de 40 x y mediante la determinación de la granularidad (recuento de gránulos/célula; excitación a 620 nm y emisión a 700 nm para CypHer5E). Los núcleos se visualizaron con tinción de ADN utilizando tinción permeable celular Hoechst 33342 (0,5 μ g/ml, incubación de 30 min, emisión a 353-365 nm, detección a 480 nm).

Se utilizaron como controles las correspondientes células de vector que no expresa C4.4a, así como células A549 de tipo silvestre (A549 ts). Se seleccionó como control de isotipo una IgG1 humana y se marcó en paralelo. Se llevaron a cabo tres experimentos independientes; los puntos de datos representan las determinaciones por triplicado. M31-B01 y M20-D02 S-A se internalizaron de forma eficaz. El tiempo de seminternalización máxima fue de 31 min para M31-B01 y de 49 min para M20-D02 S-A, respectivamente.

Ejemplo 7: Conversión de Fab a formato IgG

Para transferir regiones de VH y VL de Fab a formato IgG y/o cambiar el sistema de expresión de *E. coli* a un sistema de células de mamífero, las regiones de VH y VL se amplificaron utilizando cebadores de PCR. En los extremos 5' y 3' de los VH y VL se introdujeron, respectivamente, sitios flanqueantes de escisión para enzimas de restricción. Estos sitios de restricción se utilizaron para clonar los VH y VL en un vector de expresión que contiene una estructura IgG.

A 100 μ l de agua en un tubo de ensayo se añadieron células de *E. coli* y se incubaron a 95 °C durante 10 min y, después, se mantuvieron en hielo durante 5 min. Después de someter a agitación vorticial, los residuos bacterianos se sedimentaron mediante centrifugación. El sobrenadante se utilizó para la amplificación del ADN. Las reacciones de PCR se prepararon por separado para VH y VL utilizando parejas de dejadores específicos con sitios de restricción para BamHI y HpaI para VL, y sitios para BlnI y MfeI para VH, respectivamente. Las reacciones de PCR se realizaron con la polimerasa AccuPrime Pfx (Invitrogen n° 12344-024) de acuerdo con las instrucciones de los fabricantes. Se comprobó la calidad de los productos de PCR en un gel de agarosa al 1 %. Los vectores de expresión y los productos de PCR se digirieron durante 2 h a 37 °C con las respectivas endonucleasas de restricción para crear extremos compatibles, de acuerdo con las instrucciones de los proveedores. La reacción de digestión se detuvo mediante incubación a 70 °C durante 15 min. Los fragmentos resultantes se ligaron en un vector de expresión y las construcciones se transformaron en *E. coli* o en células de mamífero, utilizando procedimientos convencionales.

Ejemplo 8: Modelo de cáncer de xenoinjerto subcutáneo:

Los efectos antitumorales de los anticuerpos anti C4.4a se evaluarán utilizando modelos de xenoinjerto subcutáneo en ratones inmunodeficientes. Las células A431 se mantienen como cultivos adherentes en medio DMEM complementado con SFB al 10 %. Se inoculan ratones SCID de 6-7 semanas por vía subcutánea en el lado derecho con 1×10^7 células en 0,1 ml de medio. Se administrarán anticuerpos monoclonales i.p. 3x cada 3 días a una dosis de 5-60 mg/kg. Los ratones control se tratarán con PBS o con un anticuerpo monoclonal irrelevante. El tamaño del tumor se medirá cada 2 días con un calibre pie de rey. La eficacia antitumoral se evaluará comparando el tamaño del tumor en el tratamiento con anticuerpo anti C4.4a frente al tratamiento de control.

Ejemplo 9: Modelo de cáncer de xenoinjerto subcutáneo con conjugados de anticuerpo-fármaco:

Los anticuerpos anti C4.4a se pueden conjugar con pequeñas moléculas citotóxicas utilizando protocolos conocidos en la técnica (por ejemplo, Liu y col., Proc Natl. Acad. Sci. (1996), 93, 8618-8623). Las células A431 se mantienen como cultivos adherentes en medio DMEM complementado con SFB al 10 %. Se inoculan ratones SCID de 6-7 semanas por vía subcutánea en el lado derecho con 1×10^7 células en 0,1 ml de medio. Cuando los tamaños de los tumores alcancen los 50 mm³ se administrarán los conjugados de anticuerpo-fármaco i.p. 3x cada 3 días a una dosis de 1-60 mg/kg. Los ratones de control se tratarán con PBS, un anticuerpo monoclonal irrelevante o un fármaco no conjugado libre. El tamaño del tumor se medirá cada 2 días con un calibre pie de rey. La eficacia antitumoral se evaluará comparando el tamaño del tumor en el tratamiento con conjugado de anticuerpo anti C4.4a-fármaco frente al tratamiento de control.

Ejemplo 10: Clonación, expresión y cuantificación de los niveles de expresión del fragmento de anticuerpo Fab para la maduración de la afinidad.

Las cadenas pesada y ligera de los Fab de tipo silvestre de M31-B01 y M20-D02 S-A portadores de una etiqueta 3xHA y una etiqueta de hexa-histidina en el extremo C de la cadena pesada se subclonaron en el vector de expresión bacteriano pET28a (Novagen/Merck Chemicals Ltd., Nottingham, RU) y se transformaron en células Top10F' (Invitrogen GmbH, Karlsruhe, Alemania). Como alternativa se pueden utilizar otros vectores de expresión bacterianos (por ejemplo, el sistema del vector pQE, Qiagen GmbH, Hilden, Alemania) y cepas (por ejemplo, DH5 α , Invitrogen GmbH, Karlsruhe, Alemania). Se generaron variantes mediante mutagénesis convencional dirigida basada en oligonucleótidos y se confirmaron mediante secuenciación de ADN. En particular, se modificaron los restos de aminoácidos dentro de o alrededor de las regiones determinantes de complementariedad de la cadena pesada y/o la ligera.

Para la expresión, las variantes se transformaron en la cepa BL21starDE3 de *Escherichia coli* (Invitrogen, C6010-03), se inocularon en un cultivo de una noche en medio LB con kanamicina (30 μ g/ml) y se incubaron a 37 °C durante 18 horas. Los cultivos de expresión se generaron inoculando el cultivo a 1:20 en medio LB reciente con kanamicina (30 μ g/ml). Después de 6 horas a 37 °C, se añadió IPTG 1 mM para inducir la expresión de anticuerpos y los cultivos se incubaron durante 18 horas adicionales a 30 °C.

Para la cuantificación de los niveles de expresión se usó un abordaje de ELISA. Brevemente, se incubaron placas de PMT (Nunc maxisorp black, 460518) con un Acm etiquetado con epítipo HA (Covance, MMS-101P) diluido en tampón de recubrimiento (Candor Bioscience GmbH, 121125) a 4 °C durante 16 h, se lavaron con PBST (solución salina tamponada con fosfato que contiene: NaCl 137 mM, KCl 2,7 mM, Na₂HPO₄ 10 mM, KH₂PO₄ 2 mM, a pH 7,4, Tween 20 al 0,05 %), se bloquearon con Smart Block al 100 % (Candor Bioscience GmbH, 113500) durante 1 h a 20 °C y se lavaron de nuevo. Los cultivos se diluyeron en Smart Block al 10 % en PBST y se unieron a las placas PMT durante 1 h a 20 °C. Después de lavar con PBST, los anticuerpos capturados se incubaron con un anticuerpo anti-lambda acoplado a HRP (Sigma, A5175) y se detectaron mediante incubación de la placa con sustrato rojo amplex 10 μ M (Invitrogen, A12222) durante 30 minutos a 20 °C en oscuridad, seguido por la medición de la fluorescencia. Se comprobó que las señales de cuantificación determinadas estuvieran en el intervalo dinámico de una serie de calibración preparada con sobrenadante del cultivo de expresión de Fab parental concentrado (M31-B01 o M20-D02-S-A), lo que permite una cuantificación relativa de cada muestra individual de expresión de Fab.

Ejemplo 11: Determinación de la actividad y la reactividad cruzada entre especies de las variantes de fragmento de anticuerpo Fab generadas

Para determinar la actividad de las variantes Fab mutadas sobre C4.4a recombinante soluble humana o de ratón se utilizó un formato de ensayo de ELISA directo. Brevemente, las placas PMT (Nunc maxisorp black, 460518) se recubrieron con 2 μ g/ml de C4.4a humana o de ratón en tampón de recubrimiento (Candor Bioscience GmbH, 121125) y se incubaron durante 15 h a 4 °C. Después de lavar 3 veces con PBST, las placas se bloquearon con Smart Block al 100 % (Candor Bioscience GmbH, 113500) durante 1 h a 20 °C y se repitieron las etapas de lavado. Para la unión de los fragmentos de anticuerpo Fab, se añadieron a las placas 20 μ l de los sobrenadantes de cultivo durante 1 h a 20 °C, seguido de lavado. En algunos casos se aumentó la rigurosidad del lavado mediante una etapa adicional de incubación con Smart Block al 10 % en PBST durante 90 min, seguido por 3 lavados con PBST ("procedimiento B" en la Tabla 10b). Después se detectaron los Fab parentales y las variantes unidos mediante un anticuerpo específico para etiqueta de epítipo HA conjugado con HRP (Bethyl, A190-108P). Se añadieron a las

5 placas sustrato rojo amplex 10 µM (Invitrogen, A12222) y la señal de fluorescencia se detectó utilizando un lector de fluorescencia normal, por ejemplo Tecan Ultra. La cantidad de señales de afinidad normalizadas se calculó como las proporciones de las señales de afinidad y de cuantificación corregidas con el fondo en los respectivos ELISA: (señal de afinidad – afinidad de fondo) / (cantidad de señal-cantidad de fondo). Los valores resultantes correlacionan principalmente con la afinidad de una manera positiva, mientras que los valores no normalizados correlacionan de forma adicional con la concentración del Fab de unión en la muestra. Por lo tanto, la cantidad de las señales de afinidad normalizadas sirve como una orientación muy buena para la determinación de las variantes con afinidad mejorada.

Ejemplo 12: Sustituciones de aminoácidos únicas o múltiples

10 En las Tablas 10a y 10b se proporcionan varios ejemplos de sustituciones de aminoácido únicas generadas en las cadenas pesada y ligera de M20-D02 S-A. HC D101K, LC A90Q, LC V97A y LC V97G mostraron la mejora más fuerte con respecto a las señales de afinidad normalizadas en C4.4a humana, con una señal correspondiente en C4.4a de ratón de al menos 1/8 en comparación con la señal en C4.4a humana (Tabla 10a). Más allá de las dos sustituciones de CDR3, HC D31S y HC V51I mostraron la mejora más fuerte con respecto a las señales de afinidad normalizadas en C4.4a humana, con una señal correspondiente en C4.4a de ratón del 30 % en el caso de HC V51I (Tabla 10b).

Tabla 10a. Análisis de sustituciones de aminoácido únicas dentro de la CDR3 de las cadenas pesada y ligera de M20-D02 S-A. Se enumeran las señales de afinidad normalizadas en C4.4a humana y de ratón, el promedio y las respectivas desviaciones típicas de dos mediciones al menos por cuadruplicado.

20 Tabla 10a:

pos	en la SEQ ID NO:	pos	en la SEQ ID NO:	Nombre	humana		de ratón	
					promedio	desv. típ.	promedio	desv. típ.
9	14	105	34	HC S100aR	0,43	0,13	0,02	0,01
9	14	105	34	HC S100aK	0,45	0,21	0,06	0,01
10	14	106	34	HC A100bR	0,87	0,21	0,01	0,01
10	14	106	34	HC A100bS	0,34	0,17	0,02	0,00
14	14	110	34	HC D101E	0,31	0,24	0,05	0,00
14	14	110	34	HC D101K	1,65	0,48	0,21	0,09
14	14	110	34	HC D101R	0,61	0,18	0,03	0,01
3	26	91	30	LC A90Q	1,41	0,67	0,29	0,15
3	26	91	30	LC A90R	0,94	0,47	0,17	0,04
5	26	93	30	LC D92G	0,64	0,25	0,10	0,04
9	26	97	30	LC N95aW	0,11	0,06	0,00	0,01
12	26	100	30	LC V97A	1,32	0,21	0,52	0,11
12	26	100	30	LC V97G	1,21	0,31	0,30	0,13
			34 - VH 30 - VL	M20-D02 S-A	0,04	0,03	0,01	0,01

Tabla 10b. Análisis de sustituciones aminoácidos únicas más allá de la CDR3 de las cadenas pesada y ligera de M20-D02 S-A. Se enumeran las señales de afinidad normalizadas en C4.4a humana y murina, respectivamente; los números proporcionados son las medianas de una medición por cuadruplicado. La diferencia entre el procedimiento B y el A es una etapa de incubación adicional en tampón durante 90 min en el procedimiento B.

25 Tabla 10b:

pos	en la SEQ ID NO:	pos	en la SEQ ID NO:	nombre	proceso A		proceso B	
					humana	ratón	humana	ratón
3	6	31	34	HC D31S			0,84	0,04
4	10	51	34	HC V51I	0,52	0,16		
9	10	56	34	HC A55G	0,15	0,04		
10	10	57	34	HC R56S	0,21	0,06		
			34 - VH 30 - VL	M20-D02 S-A	0,15	0,04	0,06	0,00

En las Tablas 11a y 11b se proporcionan varios ejemplos de sustituciones de aminoácido únicas generadas en las cadenas pesada y ligera de B01. LC W91E, LC W91F, LC W91Y y LC G95bR mostraron la mejora más fuerte con respecto a las señales de afinidad normalizadas en C4.4a humana, con una señal correspondiente en C4.4a de ratón de al menos 1/8 en comparación con la señal en AC4.4a humana, las últimas tres del 40 % y más (Tabla 11a). Más allá de las CDR3, la sustitución de HC A32Y mostró la mejora más fuerte con respecto a las señales de afinidad normalizadas en AC4.4a humana (Tabla 11b).

Tabla 11a. Análisis de sustituciones aminoácido únicas dentro de la CDR3 de las cadenas pesada y ligera de M31-B01. Se enumeran las señales de afinidad normalizadas en AC4.4a humana y de ratón; el promedio y la respectiva desviación típica de dos mediciones que son el resultado de al menos cuadruplicados.

10 Tabla 11a:

pos	en la SEQ ID NO:	pos	en la SEQ ID NO:	nombre	humana		de ratón	
					promedio	desv. típ.	promedio	desv. típ.
10	13	106	33	HC Y102K	1,49	0,12	0,21	0,02
10	13	106	33	HC Y102W	1,65	0,15	0,13	0,03
4	25	93	29	LC W91E	3,17	0,44	0,40	0,02
4	25	93	29	LC W91F	4,30	0,78	2,53	0,39
4	25	93	29	LC W91Y	4,97	0,91	2,79	0,68
7	25	96	29	LC R94M	1,30	0,20	0,13	0,02
9	25	98	29	LC N95aK	1,11	0,01	0,12	0,04
10	25	99	29	LC G95bR	2,45	0,49	1,01	0,12
11	25	100	29	LC P96A	0,95	0,47	0,32	0,16
			33 - VH 29-VL	M31-B01	1,11	0,34	0,13	0,07

Tabla 11b. Análisis de sustituciones de aminoácido únicas más allá de la CDR3 de las cadenas pesada y ligera de B01. Se enumeran las señales de afinidad normalizadas en AC4.4a humana y de ratón; los números proporcionados son las medianas de una medición al menos por triplicado.

15 Tabla 11b:

pos	en la SEQ ID NO:	pos	en la SEQ ID NO:	nombre	humana	de ratón
3	5	31	33	HC N31S	1,53	0,32
4	5	32	33	HC A32Y	2,31	0,01
10	9	57	33	HC T56S	1,58	0,74
11	19	58	33	HT I57T	1,50	0,73
1	17	23	29	LC T24S	0,77	0,23
4	21	55	29	LC K53Q	1,12	0,35
			33 - VH 29 - VL	B01	1,23	0,16

En las Tablas 12a y 12b se proporcionan algunos ejemplos de sustituciones de aminoácido combinadas dentro de los anticuerpos anti-C4.4a M20-D02 S-A. Algunas sustituciones se analizaron como sustituciones de aminoácido únicas (Tablas 10a y 10b), adicionalmente se analizaron como parte de estas sustituciones combinadas. Aunque en las Tablas 12a y 12b no se proporcionan todas las combinaciones, se contempla que el anticuerpo anti-C4.4a puede comprender cualquier combinación de modificaciones proporcionadas en las Tablas 10a y 10b.

20

Tablas 12a y 12b. Ejemplo de sustituciones múltiples aminoácidos dentro de M20-D02 S-A.

pos	en la SEQ ID NO:	pos	en la SEQ ID NO:	nombre		D02-S-A	D02-04	D02-05	D02-og1	D02-08	D02-12	D02-11	D02-10	D02-09	D02-06	D02-07	D02-13
						D	D	S	D	D	D	D	D	D	D	S	
3	6	31	34	HC	31	D	D	S	D	D	D	D	D	D	D	D	S
No en CDR		40	34	HC	40	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	A
4	10	51	34	HC	51	V	I	I	V	I	I	I	I	I	I	I	I
9	10	56	34	HC	55	A	G	G	A	G	G	G	G	G	G	G	G
10	10	57	34	HC	56	R	S	S	R	S	S	S	S	S	S	S	S
9	14	105	34	HC	100 a	S	S	S	S	S	K	S	K	S	S	K	K
10	14	106	34	HC	100 b	A	A	A	S	S	S	S	S	S	S	S	S
14	14	110	34	HC	101	D	D	D	K	K	K	K	K	K	K	K	K
15	14	111	34	HC	102	S	S	S	S	Y	S	S	S	S	S	S	S

pos	en la SEQ ID NO:	pos	en la SEQ ID NO:	nombre		D02-S-A	D02-04	D02-05	D02-og1	D02-08	D02-12	D02-11	D02-10	D02-09	D02-06	D02-07	D02-13
						V	I	I	V	I	I	I	I	I	I	I	I
7	18	29	30	LC	30	V	I	I	V	I	I	I	I	I	I	I	I
7	26	95	30	LC	94	R	R	R	R	R	S	R	R	S	R	S	S
9	26	97	30	LC	95A	N	N	N	N	N	N	S	S	N	S	S	S
12	26	100	30	LC	97	V	G	G	G	A	G	G	G	G	A	A	A

5 En las Tablas 13a y 13b se proporcionan algunos ejemplos de sustituciones de aminoácidos combinadas dentro de los anticuerpos anti-C4.4a M31-B01. Algunas sustituciones se analizaron como sustituciones de aminoácido únicas (Tablas 11a y 11b), adicionalmente solo se analizaron como parte de estas sustituciones combinadas. Aunque en las Tablas 13a y 13b no se proporcionan todas las combinaciones, se contempla que el anticuerpo anti-C4.4a puede comprender cualquier combinación de modificaciones proporcionadas en las Tablas 11a y 11b.

Tablas 13a y 13b. Ejemplo de sustituciones múltiples de aminoácidos dentro de M31-B01.

pos	en la SEQ ID NO:	pos	en la SEQ ID NO:	nombre		B01	B01-03	B01-04	B01-02	B01-nn1	B01-08	B01-09	B01-nn2	B01-nn3	B01-07	B01-05	B01-10	B01-06	B01-nn4	B01-12	B01-nn5	B01-11
						N	N	N	S	N	N	S	N	N	N	N	N	S	S	S	S	S
3	5	31	33	HC	31	N	N	N	S	N	N	S	N	N	N <td>N</td> <td>S</td> <td>S</td> <td>S</td> <td>S</td> <td>S</td> <td>S</td>	N	S	S	S	S	S	S
10	9	57	33	HC	56	T	T	T	S	T	T	T	T	T	T	T	T	S	S	S	S	S
11	9	58	33	HC	57	I	I	I	T	I	I	I	I	I	I	I	T	T	T	T	T	T
10	13	106	33	HC	102	Y	Y	Y	Y	K	K	K	K	K	Y	Y	Y	G	W	K	N	K

pos	en la SEQ ID NO:	pos	en la SEQ ID NO:	nombre		B01	B01-03	B01-04	B01-02	B01-nn1	B01-08	B01-09	B01-nn2	B01-nn3	B01-07	B01-05	B01-10	B01-06	B01-nn4	B01-12	B01-nn5	B01-11
						A	V	V	A	A	A	A	V	V	V	V	V	V	A	A	A	A
No en CDR		10	29	LC	11	A	V	V	A	A	A	A	V	V	V	V	V	A	A	A	A	A
No en CDR		13	29	LC	14	T	A	A	T	T	T	T	A	A	A	A	A	T	T	T	T	T
1	17	23	29	LC	24	T	T	T	S	T	T	T	T	T	T	T	T	S	S	S	S	S
4	21	55	29	LC	53	K	K	K	Q	K	K	K	K	K	K	K	K	Q	Q	Q	Q	Q
4	25	93	29	LC	91	W	W	Y	W	Y	F	F	F	Y	F	Y	Y	Y	Y	F	Y	F
7	25	96	29	LC	94	R	R	R	R	S	R	R	S	S	S	S	S	S	S	R	S	S
9	25	98	29	LC	95A	N	N	N	N	K	N	N	N	S	N	S	S	N	S	S	N	N
10	25	99	29	LC	95B	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	R	G	G	G	G

En las Tablas 14a y 14b se proporcionan tramos de la secuencia de CDR con posibles sitios de desamidación, de forma específica Asn-Gly ("NG") y Asn-Ala ("NA") en M20-D02 S-A y M31-B01, así como las respectivas secuencias de algunas variantes correspondientes con múltiples sustituciones de aminoácidos.

5 En M20 D02-S-A hay dos posibles sitios de desamidación en las CDR, uno en la CDR-L3 y uno en la CDR-H2. En D02-11, -10, -06, -07 y -13, el sitio en la CDR-L3 se elimina mediante una sustitución N>S.

Tabla 14a:

pos	en SEQ ID NO:	pos	en SEQ ID NO:	nombre		D02-S-A	D02-04	D02-05	D02-06	D02-07	D02-08	D02-09	D02-10	D02-11	D02-12	D02-13	
						D02-S-A	D02-04	D02-05	D02-06	D02-07	D02-08	D02-09	D02-10	D02-11	D02-12	D02-13	
6	26	94	30	LC	93	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D
7	26	95	30	LC	94	R	R	R	R	R	S	R	R	S	R	S	S
8	26	96	30	LC	95	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L
9	26	97	30	LC	95A	N	N	N	N	N	N	S	S	N	S	S	S
10	26	98	30	LC	95B	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G
11	26	99	30	LC	96	W	W	W	W	W	W	W	W	W	W	W	W
12	26	100	30	LC	97	V	G	G	G	A	G	G	G	G	A	A	A
4	10	51	34	HC	51	V	I	I	V	I	I	I	I	I	I	I	I
5	10	52	34	HC	52	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
6	10	53	34	HC	52a	W	W	W	W	W	W	W	W	W	W	W	W
7	10	54	34	HC	53	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
8	10	55	34	HC	54	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G
9	10	56	34	HC	55	A	G	G	A	G	G	G	G	G	G	G	G
10	10	57	34	HC	56	R	S	S	R	S	S	S	S	S	S	S	S

10 En M31-B01 hay en las CDR dos posibles sitios de desamidación, uno en la CDR-L3 y uno en la CDR-H1. En B01-nn3, -05, -10, -nn4 y -12, el sitio en la CDR-L3 se elimina mediante una sustitución N>S, en B01-nn1 mediante una sustitución N>K y en B01-06 mediante una sustitución G>R. En B01-02, -09, -10, -06, -nn4, -12, -nn5 y -11, el sitio en la CDR-H1 se elimina mediante una sustitución N>S. B01-10, -06, -nn4 y -12 no muestran ninguno de estos posibles sitios de desamidación.

Tabla 14b:

pos	en SEQ ID NO:	pos	en SEQ ID NO:	nombre		B01	B01-03	B01-04	B01-02	B01-nn1	B01-08	B01-09	B01-nn2	B01-nn3	B01-07	B01-05	B01-10	B01-06	B01-nn4	B01-12	B01-nn5	B01-11	
						B01	B01-03	B01-04	B01-02	B01-nn1	B01-08	B01-09	B01-nn2	B01-nn3	B01-07	B01-05	B01-10	B01-06	B01-nn4	B01-12	B01-nn5	B01-11	
6	25	95	29	LC	93	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D
7	25	96	29	LC	94	R	R	R	R	S	R	R	S	S	S	S	S	S	S	R	S	S	S
8	25	97	29	LC	95	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L
9	25	98	29	LC	95A	N	N	N	N	K	N	N	N	S	N	S	S	N	S	S	N	N	N
10	25	99	29	LC	95B	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	R	G	G	G	G	G	G
11	25	100	29	LC	96	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P
12	25	101	29	LC	97	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V
1	5	29	33	HC	29	F	F	F	F	F	F	F	F	F	F	F	F	F	F	F	F	F	F
2	5	30	33	HC	30	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
3	5	31	33	HC	31	N	N	N	S	N	N	S	N	N	N	N	S	S	S	S	S	S	S
4	5	32	33	HC	32	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A
5	5	33	33	HC	33	W	W	W	W	W	W	W	W	W	W	W	W	W	W	W	W	W	W
6	5	34	33	HC	34	M	M	M	M	M	M	M	M	M	M	M	M	M	M	M	M	M	M

15 Los procedimientos descritos en los ejemplos 10-12 se utilizaron para generar anticuerpos madurados por afinidad mediante mutaciones únicas y combinaciones de mutaciones únicas de los mismos. Estos procedimientos son muy adecuados para la generación de anticuerpos que compiten obtenidos de un anticuerpo parental. Los anticuerpos de los ejemplos mencionados anteriormente se representan en la Tabla 7. Estos ejemplos proporcionan anticuerpos de unión a C4.4a adicionales, o fragmentos de unión al fragmento de antígeno, que comprenden secuencias de la CDR

5 H1 que son al menos el 77 % idénticas a la CDR H1 de M31 B01, secuencias de la CDR H2 que son al menos un
 90 % idénticas a la CDR H2 de M31 B01, secuencias de CDR H3 que son al menos el 90 % idénticas a la CDR H3
 de M31 B01, secuencias de la CDR L1 que son al menos el 92 % idénticas a la CDR L1 de M31 B01, secuencias de
 la CDR L2 que son al menos el 85 % idénticas a la CDR L2 de M31 B01 y secuencias de la CDR L3 que son al
 menos el 58 % idénticas a la CDR L3 de M31 B01 (dichas variantes de anticuerpo compiten por la unión con M31
 B01) y los anticuerpos o proteínas de unión a fragmentos de antígeno que comprenden secuencias de la CDR H1
 que son al menos el 88 % idénticas a la CDR H1 de M20 D02 S-A, secuencias de la CDR H2 que son al menos el
 85 % idénticas a la CDR H2 de M20 D02 S-A, secuencias de la CDR H3 que son al menos el 73 % idénticas a la
 10 CDR H3 de M20 D02 S-A, secuencias de la CDR L1 que son al menos el 92 % idénticas a la CDR L1 de M20 D02 S-
 A, secuencias de la CDR L2 que son al menos el 100 % idénticas a la CDR L2 de M20 D02 S-A y secuencias de la
 CDR L3 que son al menos el 58 % idénticas a la CDR L3 de M20 D02 S-A (dichas variantes de anticuerpo compiten
 por la unión con M20 D02 S-A).

Tabla 15a: Esta tabla resume las variaciones de aminoácidos de las CDR 1-3 de las cadenas pesada y ligera de M20 D02 S-A, como se describe en el procedimiento 12.

15 A continuación se representan los resultados anteriores en forma de una secuencia consenso de las respectivas
 secuencias de CDR obtenidas de M20 D02 S-A. La secuencia consenso para CDR H1 se representa en la Tabla
 15a (i) (SEQ ID NO: 297), para CDR H2 se representa en la Tabla 15a (ii) (SEQ ID NO: 298), para CDR H3 se
 representa en la Tabla 15a (iii) (SEQ ID NO: 299), para CDR L1 se representa en la Tabla 15a (iv) (SEQ ID NO: 300),
 para CDR L2 es idéntica a la SEQ ID NO: 22 (Tabla 15a (v)), para CDR L3 se representa en la Tabla 15a (v) (SEQ
 20 ID NO: 301), respectivamente.

Tabla 15a: Esta tabla resume las variaciones de aminoácidos de las CDR 1-3 de las cadenas pesada y ligera de M20 D02 S-A, como se describe en el ejemplo 12

(i) CDR H1 M20 D02 S-A (SEQ ID NO: 6)

posición	1	2	3	4	5	6	7	8	9
aminoácido	F	S	D	Y	Q	M	T	W	I
variante			S						
consenso	F	S	D o S	Y	Q	M	T	W	I

25 **(ii) CDR H2 M20 D02 S-A (SEQ ID NO: 10)**

posición	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
aminoácido	V	S	G	V	S	W	N	G	A	R	T	H	Y	A	D	S	V	k	G	R
variante				I					G	S										
consenso	V	S	G	V o I	S	W	N	G	A o G	R o S	T	H	Y	A	D	S	V	k	G	R

(iii) CDR H3 M20 D02 S-A (SEQ ID NO: 14)

posición	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
aminoácido	A	K	G	D	Y	L	V	Y	S	A	Y	Y	F	D	S
variante									K o R	S o R				K, E o R	Y
consenso	A	K	G	D	Y	L	V	Y	S, K o R	A, S o R	Y	Y	F	D, K, E o R	S o Y

(iv) CDR L1 M20 D02 S-A (SEQ ID NO: 18)

posición	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
aminoácido	S	G	S	S	S	N	V	G	S	N	P	V	N
variante							I						
consenso	S	G	S	S	S	N	V o I	G	S	N	P	V	N

30

(v) CDR L2 M20 D02 S-A (SEQ ID NO: 22)

posición	1	2	3	4	5	6	7
aminoácido	R	N	N	Q	R	P	S
variante							
consenso	R	N	N	Q	R	P	S

(vi) CDR L3 M20 D02 S-A (SEQ ID NO: 26)

posición	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
aminoácido	C	A	A	W	D	D	R	L	N	G	W	V
variante			Q o R		G		S		W o S			A o G
consenso	C	A	A, Q o R	W	D o G	D	R o S	L	N, W o S	G	W	V, A o G

5 A continuación se representan los resultados anteriores en forma de una secuencia consenso de las respectivas secuencias de CDR obtenidas de M31 B01. La secuencia consenso para CDR H1 se representa en la Tabla 15b (i) (SEQ ID NO: 302), para CDR H2 se representa en la Tabla 15b (ii) (SEQ ID NO: 303), para CDR H3 se representa en la Tabla 15b (iii) (SEQ ID NO: 304), para CDR L1 se representa en la Tabla 15b (iv) (SEQ ID NO: 305), para CDR L2 se representa en la Tabla 15b (v) (SEQ ID NO: 306), para CDR L3 se representa en la Tabla 15b (v) (SEQ ID NO: 307), respectivamente.

10 Tabla 15b: Esta tabla resume las variaciones de aminoácidos de las CDR 1-3 de las cadenas pesada y ligera de M31 B01, como se describen en el ejemplo 12.

(i) CDR H1 M31 B01 (SEQ ID N° :5)

posición	1	2	3	4	5	6	7	8	9
aminoácido	F	S	N	A	W	M	S	W	V
variante			S	Y					
consenso	F	S	N o S	A o Y	W	M	S	W	V

(ii) CDR H2 M31 B01 (SEQ ID N° :9)

posición	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
aminoácido	V	S	Y	I	S	S	S	G	S	T	I	Y	Y	A	D	S	V	K	G	R
variante										S	T									
consenso	V	S	Y	I	S	S	S	G	S	T o S	I o T	Y	Y	A	D	S	V	K	G	R

15 **(iii) CDR H3 M31 B01 (SEQ ID NO:13)**

posición	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
aminoácido	A	R	E	G	L	W	A	F	D	Y
variante										K, G, W o N
consenso	A	R	E	G	L	W	A	F	D	Y, K, G, W o N

(iv) CDR L1 M31 B01 (SEQ ID NO: 17)

posición	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
aminoácido	T	G	S	S	S	N	I	G	A	G	Y	V	V	H
variante	S													
consenso	T o S	G	S	S	S	N	I	G	A	G	Y	V	V	H

(v) CDR L2 M31 B01 (SEQ ID NO: 21)

posición	1	2	3	4	5	6	7
aminoácido	D	N	N	K	R	P	S
variante				Q			
consenso	D	N	N	K o Q	R	P	S

(vi) CDR L3 M31 B01 (SEQ ID NO: 25)

posición	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
aminoácido	C	A	A	W	D	D	R	L	N	G	P	V
variante				E, F o Y			S o M		K o S	R	A	
consenso	C	A	A	W, E, F o Y	D	D	R, S o M	L	N, K o S	G o R	P o A	V

5 Ejemplo 13: Determinación de la unión del anticuerpo a dominios individuales de C4.4a mediante transferencia de Western

Para caracterizar el dominio de unión del anticuerpo de M31-B01 y M20-D02 S-A, se generaron construcciones que consistían en los aminoácidos 1-85 del dominio S1 de C4.4a y 108-193 del dominio S2 de C4.4 de C4.4a humana SEQ ID NO: 1, respectivamente, como fusiones en el extremo C del Fc de IgG1 humana-etiqueta 6xHis, se clonaron en un vector de expresión en mamífero que contiene un promotor de CMV5 y se expresaron de forma transitoria en células HEK293 6E mediante procedimientos convencionales. Las proteínas S1 y S2 expresadas se purificaron después a partir de sobrenadantes celulares mediante cromatografía por quelatos metálicos utilizando una columna de 5 ml de NiNTA superflow (Qiagen) a 20 °C. Se ajustó el pH de las muestras a pH 8,0 con NaOH 1M y después se aplicaron a la columna equilibrada previamente con NaH₂PO₄ 50 mM + NaCl 300 mM a pH 8,0 a 1ml/min. La columna se lavó con 15 VC de tampón de equilibrio y las proteínas etiquetadas con His unidas se eluyeron con NaH₂PO₄ 50 mM + NaCl 300 mM + Imidazol 250 mM a pH 8,0. Las proteínas eluidas se purificaron adicionalmente en una Tricorn Superdex 75 10/300 GL (GE Healthcare) mediante cromatografía de exclusión por tamaño.

Para el análisis adicional de la longitud completa (C4.4a SEQ ID NO: 1), la fusión S1-Fc-Etiqueta6xHis purificada y Fc de S2-Etiqueta6xHis se aplicaron a distintas calles de un gel de gradiente 4 - 12 % Bis-Tris profundido NuPage (Invitrogen, N° NP0322Box) y se separaron mediante electroforesis, utilizando el tampón de corrida NuPage MES SDS (Invitrogen NP0002), de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

El gel de SDS se transfirió después a una membrana de transferencia de gel iblot (Invitrogen IB3010-02), utilizando un dispositivo iBlot (Invitrogen). La membrana se bloqueó en DPBS a pH 7,4 + leche en polvo al 4 % + Tween 20 al 0,1 % durante 16 h a 4 °C, seguido por tres etapas de lavado durante 5 min a 20 °C en DPBS a pH 7,4 + Tween 20 al 0,1 %. M31-B01 (5,76 mg/ml) o M20-D02 S-A (3,49 mg/ml) se aplicaron en diluciones de 1/5000 y 1/2000, respectivamente, y se incubaron durante 1,5 h a 20 °C, seguido por 2x lavados en DPBS a pH 7,4 + Tween 20 al 0,1 %. El segundo anticuerpo (anti IgG humana específico para Fab de cabra conjugado con fosfatasa alcalina; 109-055-097 Jackson ImmunoResearch) se incubó a una dilución de 1/1000 durante 1,5 h a 20 °C. Seguido por 3 etapas de lavado durante 5 min a 20 °C en DPBS a pH 7,4 + Tween 20 al 0,1 %. La tinción se realizó con BCIP/NBT de Sigma Fast / 1 comprimido en 10 ml de agua a 20 °C, hasta que las bandas se hicieron visibles. La reacción de tinción se detuvo lavando con agua.

Ambos anticuerpos M31-B01 y M20-D02 S-A se unen a C4.4a humana y de ratón de longitud completa. Además, se unen al dominio S1 de C4.4a pero no al dominio S2 de C4.4a, como se representa en la Fig. 6. La unión se puede detectar exclusivamente en muestras no reducidas por DTT, lo que es un fuerte indicador de la presencia de un epítipo dependiente de conformación que se estabiliza mediante uno o más puentes disulfuro.

Ejemplo 14: Ensayos de citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ensayos CCDA)

La actividad antitumoral de las IgG anti-C4.4a puede estar mediada por CCDA. Las células A549:hC4.4a que expresan C4.4a y las células parentales que no expresan C4.4a se incuban con 250 ng/ml, 1000 ng/ml o 2000 ng/ml de anticuerpo IgG1 anti-AC4.4a humana o de control (por ejemplo, anticuerpo anti-digoxina). A estas células se añaden CMSP humanas en las proporciones de efectoras-diana de 50:1, 25:1 y 5:1. Se realiza un ensayo de liberación de cromo 51 para determinar el nivel de lisis de la diana. Si la velocidad de la lisis en presencia del anticuerpo anti-C4.4a y de las CMSP es mayor que la velocidad de lisis (espontánea) en presencia de anticuerpo simulado o sin anticuerpo y PBMC, indica que la CCDA es eficaz.

Ejemplo 15: Inhibición de la proliferación dependiente de anticuerpos - Proliferación celular medida mediante el sistema xCELLigence

El sistema xCELLigence (análizador RTCA nº de cat. 05228972001, Roche) controla los acontecimientos celulares en tiempo real sin incorporar marcadores. El sistema mide la impedancia eléctrica a través de microelectrodos interdigitados integrados en el fondo de placas E de cultivo tisular. La medición de la impedancia proporciona información cuantitativa sobre el estado biológico de las células, incluyendo el número, la viabilidad y la morfología de las células. Para determinar la velocidad de la proliferación celular de las células A549:hC4.4a, estas se incubaron con un anticuerpo control de isotipo IgG1h de no unión o B01-3 100 nM (como IgG1h). En primer lugar, a cada pocillo de una placa E 96 se añadieron 50 µl de medio de cultivo celular (RPMI (Biochrom FG1640) + SFB al 10 % (Biochrom n.º S0145) + Puomicina 1 µg/ml (Sigma 8833)). La placa E 96 se introdujo en la estación RTCA MP (nº de cat. 05331625001, Roche) y se determinó la impedancia del fondo de cada pocillo. Las soluciones se retiraron de nuevo de la placa E 96 y se añadieron 50 µl de la suspensión celular a los pocillos (5000 células/pocillo de A549:hC4.4a en un medio de cultivo celular). Se volvieron a introducir las placas y se midieron durante 4 horas a 37 °C + CO₂ al 5 %. La placa E 96 se retiró de nuevo y se añadieron 100 µl de anticuerpos (B01-3 100 nM o IgG1h de control de no unión) en medio de cultivo celular. Todas las muestras se procesaron por triplicado. Después de la reintroducción de la placa E, la medición se realizó durante 92 horas a 37 °C + CO₂ al 5 %. Los resultados se analizaron con el paquete de programa informático integrado. Los resultados se representan en la Figura 6. El anticuerpo B01-3 claramente disminuye la proliferación celular en comparación con un anticuerpo de control de no unión. Esto muestra que los anticuerpos de la invención inhiben de forma eficaz la proliferación celular de las células que expresan C4.4a.

Tabla 7: Secuencias de anticuerpos

Anticuerpo	SEQ ID NO: HCDR1	SEQ ID NO: HCDR2	SEQ ID NO: HCDR3	SEQ ID NO LCDR1	SEQ ID NO: LCDR2	SEQ ID NO: LCDR3	SEQ ID NO: VH Proteína	SEQ ID NO: VL Proteína	SEQ ID NO: VH Nucleótido	SEQ ID NO: VL Nucleótido
M31-B01	5	9	13	17	21	25	33	29	41	37
M20-D02 S-A	6	10	14	18	22	26	34	30	42	38
M60-G03	7	11	15	19	23	27	35	31	43	39
M36-H02	8	12	16	20	24	28	36	32	44	40
B01-3	45	46	47	48	49	50	51	52	53	54
B01-5	55	56	57	58	59	60	61	62	63	64
B01-7	65	66	67	68	69	70	71	72	73	74
B01-10	75	76	77	78	79	80	81	82	83	84
B01-12	85	86	87	88	89	90	91	92	93	94
D02-4	95	96	97	98	99	100	101	102	103	104
D02-6	105	106	107	108	109	110	111	112	113	114
D02-7	115	116	117	118	119	120	121	122	123	124
D02-11	125	126	127	128	129	130	131	132	133	134
D02-13	135	136	137	138	139	140	141	142	143	144
B01-nn1	145	146	147	148	149	150	151	152	308	309
B01-nn2	153	154	155	156	157	158	159	160	310	311
B01-nn3	161	162	163	164	165	166	167	168	312	313
B01-nn4	169	170	171	172	173	174	175	176	314	315
B01-nn5	177	178	179	180	181	182	183	184	316	317
B01-2	185	186	187	188	189	190	191	192	318	319
B01-4	193	194	195	196	197	198	199	200	320	321
B01-6	201	202	203	204	205	206	207	208	322	323
B01-8	209	210	211	212	213	214	215	216	324	325
B01-9	217	218	219	220	221	222	223	224	326	327
B01-11	225	226	227	228	229	230	231	232	328	329
B01-12	233	234	235	236	237	238	239	240	330	331
D02-ogl	241	242	243	244	245	246	247	248	332	333
D02-5	249	250	251	252	253	254	255	256	334	335
D02-8	257	258	259	260	261	262	263	264	336	337
D02-9	265	266	267	268	269	270	271	272	338	339
D02-10	273	274	275	276	277	278	279	280	340	341
D02-11	281	282	283	284	285	286	287	288	342	343
D02-12	289	290	291	292	293	294	295	296	344	345

LISTADO DE SECUENCIAS

- <110> Bayer Schering Pharma AG
- 5 <120> Anticuerpos anti-C4.4a y usos de los mismos
- <130> BHC 09 1 039
- <160> 345
- 10 <170> PatentIn versión 3.5
- <210> 1
- <211> 278
- 15 <212> PRT
- <213> *Homo sapiens*
- <400> 1

ES 2 632 748 T3

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

ES 2 632 748 T3

Ser Asp Leu Arg Asn Lys Thr Tyr Phe Ser Pro Arg Ile Pro Pro Leu
 195 200 205

Val Arg Leu Pro Pro Pro Glu Pro Thr Thr Val Ala Ser Thr Thr Ser
 210 215 220

Val Thr Thr Ser Thr Ser Ala Pro Val Arg Pro Thr Ser Thr Thr Lys
 225 230 235 240

Pro Met Pro Ala Pro Thr Ser Gln Thr Pro Arg Gln Gly Val Glu His
 245 250 255

Glu Ala Ser Arg Asp Glu Glu Pro Arg Leu Thr Gly Gly Ala Ala Gly
 260 265 270

His Gln Asp Arg Ser Asn
 275

<210> 2
 <211> 293
 <212> PRT
 <213> *Mus musculus*
 <400> 2

5

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

His Arg Met Lys Thr Val Lys Cys Gly Pro Gly Val Asp Val Cys Thr
 20 25 30

Glu Ala Val Gly Ala Val Glu Thr Ile His Gly Gln Phe Ser Val Ala
 35 40 45

Val Arg Gly Cys Gly Ser Gly Ile Pro Gly Lys Asn Asp Arg Gly Leu
 50 55 60

Asp Leu His Gly Leu Leu Ala Phe Phe Gln Leu Gln Gln Cys Ser Glu
 65 70 75 80

Asp Arg Cys Asn Ala Lys Leu Asn Leu Thr Leu Arg Gly Leu Asn Pro
 85 90 95

Ala Gly Asn Glu Ser Ala Tyr Glu Pro Asn Gly Ala Glu Cys Tyr Ser
 100 105 110

Cys Val Gly Leu Ser Arg Glu Lys Cys Gln Gly Ser Met Pro Pro Val
 115 120 125

10

ES 2 632 748 T3

Val Asn Cys Tyr Asn Ala Ser Gly Arg Val Tyr Lys Gly Cys Phe Asp
 130 135 140

Gly Asn Val Thr Leu Thr Ala Ala Asn Val Thr Val Ser Leu Pro Val
 145 150 155 160

Arg Gly Cys Val Gln Asp Glu Thr Cys Thr Arg Asp Gly Val Thr Gly
 165 170 175

Pro Gly Phe Thr Leu Ser Gly Ser Cys Cys Gln Gly Pro Arg Cys Asn
 180 185 190

Ala Asp Leu Arg Asn Lys Thr Tyr Phe Ser Pro Arg Ile Pro Pro Leu
 195 200 205

Val Leu Leu Pro Pro Pro Thr Thr Ala Ala Pro Ser Thr Arg Ala Gln
 210 215 220

Asn Ser Ser Ser Thr Thr Ser Thr Ala Ala Pro Thr Thr Thr Thr Ser
 225 230 235 240

Ile Ile Lys Pro Thr Thr Ala Gln Ala Ser His Thr Ser Pro His Glu
 245 250 255

Met Asp Leu Glu Val Ile Gln Glu Glu Gly Ala Ser Leu Ser Gly Gly
 260 265 270

Ala Ala Gly His Gly Gly Thr Ala Gly His Gly Gly Ala Ala Gly His
 275 280 285

Gln Asp Arg Ser Asn
 290

<210> 3
 <211> 346
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 3

5

ES 2 632 748 T3

Val Gly Ala Val Glu Thr Ile His Gly Gln Phe Ser Leu Ala Val Arg
 65 70 75 80
 Gly Cys Gly Ser Gly Leu Pro Gly Lys Asn Asp Arg Gly Leu Asp Leu
 85 90 95
 His Gly Leu Leu Ala Phe Ile Gln Leu Gln Gln Cys Ala Gln Asp Arg
 100 105 110
 Cys Asn Ala Lys Leu Asn Leu Thr Ser Arg Ala Leu Asp Pro Ala Gly
 115 120 125
 Asn Glu Ser Ala Tyr Pro Pro Asn Gly Val Glu Cys Tyr Ser Cys Val
 130 135 140
 Gly Leu Ser Arg Glu Ala Cys Gln Gly Thr Ser Pro Pro Val Val Ser
 145 150 155 160
 Cys Tyr Asn Ala Ser Asp His Val Tyr Lys Gly Cys Phe Asp Gly Asn
 165 170 175
 Val Thr Leu Thr Ala Ala Asn Val Thr Val Ser Leu Pro Val Arg Gly
 180 185 190
 Cys Val Gln Asp Glu Phe Cys Thr Arg Asp Gly Val Thr Gly Pro Gly
 195 200 205
 Phe Thr Leu Ser Gly Ser Cys Cys Gln Gly Ser Arg Cys Asn Ser Asp
 210 215 220
 Leu Arg Asn Lys Thr Tyr Phe Ser Pro Arg Ile Pro Pro Leu Val Arg
 225 230 235 240
 Leu Pro Pro Pro Glu Pro Thr Thr Val Ala Ser Thr Thr Ser Val Thr
 245 250 255
 Thr Ser Thr Ser Ala Pro Val Arg Pro Thr Ser Thr Thr Lys Pro Met
 260 265 270
 Pro Ala Pro Thr Ser Gln Thr Pro Arg Gln Gly Val Glu His Glu Ala
 275 280 285
 Ser Arg Asp Glu Glu Pro Arg Leu Thr Gly Gly Ala Ala Gly His Gln
 290 295 300
 Asp Arg Ser Asn Ser Gly Gln Tyr Pro Ala Lys Gly Gly Pro Gln Gln
 305 310 315 320

ES 2 632 748 T3

Pro His Asn Lys Gly Cys Val Ala Pro Thr Ala Gly Leu Ala Ala Leu
325 330 335

Leu Leu Ala Val Ala Ala Gly Val Leu Leu
340 345

5 <210> 4
<211> 363
<212> PRT
<213> *Mus musculus*

<400> 4

ES 2 632 748 T3

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

Gly Trp Leu Leu Leu Leu Pro Leu Leu Leu Cys Glu Gly Ala Gln Ala
20 25 30

Leu Glu Cys Tyr Ser Cys Val Gln Lys Ala Asp Asp Gly Cys Ser Pro
35 40 45

His Arg Met Lys Thr Val Lys Cys Gly Pro Gly Val Asp Val Cys Thr
50 55 60

Glu Ala Val Gly Ala Val Glu Thr Ile His Gly Gln Phe Ser Val Ala
65 70 75 80

Val Arg Gly Cys Gly Ser Gly Ile Pro Gly Lys Asn Asp Arg Gly Leu
85 90 95

Asp Leu His Gly Leu Leu Ala Phe Phe Gln Leu Gln Gln Cys Ser Glu
100 105 110

Asp Arg Cys Asn Ala Lys Leu Asn Leu Thr Leu Arg Gly Leu Asn Pro
115 120 125

Ala Gly Asn Glu Ser Ala Tyr Glu Pro Asn Gly Ala Glu Cys Tyr Ser
130 135 140

Cys Val Gly Leu Ser Arg Glu Lys Cys Gln Gly Ser Met Pro Pro Val
145 150 155 160

Val Asn Cys Tyr Asn Ala Ser Gly Arg Val Tyr Lys Gly Cys Phe Asp
165 170 175

Gly Asn Val Thr Leu Thr Ala Ala Asn Val Thr Val Ser Leu Pro Val
180 185 190

Arg Gly Cys Val Gln Asp Glu Thr Cys Thr Arg Asp Gly Val Thr Gly

ES 2 632 748 T3

	195		200		205												
	Pro	Gly	Phe	Thr	Leu	Ser	Gly	Ser	Cys	Cys	Gln	Gly	Pro	Arg	Cys	Asn	
	210						215					220					
	Ala	Asp	Leu	Arg	Asn	Lys	Thr	Tyr	Phe	Ser	Pro	Arg	Ile	Pro	Pro	Leu	
	225					230					235					240	
	Val	Leu	Leu	Pro	Pro	Pro	Thr	Thr	Ala	Ala	Pro	Ser	Thr	Arg	Ala	Gln	
					245					250					255		
	Asn	Ser	Ser	Ser	Thr	Thr	Ser	Thr	Ala	Ala	Pro	Thr	Thr	Thr	Thr	Ser	
				260					265					270			
	Ile	Ile	Lys	Pro	Thr	Thr	Ala	Gln	Ala	Ser	His	Thr	Ser	Pro	His	Glu	
			275					280					285				
	Met	Asp	Leu	Glu	Val	Ile	Gln	Glu	Glu	Gly	Ala	Ser	Leu	Ser	Gly	Gly	
	290						295					300					
	Ala	Ala	Gly	His	Gly	Gly	Thr	Ala	Gly	His	Gly	Gly	Ala	Ala	Gly	His	
	305					310					315					320	
	Gln	Asp	Arg	Ser	Asn	Met	Glu	Lys	Tyr	Pro	Gly	Lys	Gly	Gly	Ala	Gln	
					325					330					335		
	Ile	Pro	Ala	Lys	Gly	Gly	Ser	Gly	Thr	Leu	Gly	Ser	Trp	Leu	Ser	Ala	
				340					345					350			
	Val	Leu	Leu	Thr	Val	Val	Ala	Gly	Ala	Met	Leu						
			355					360									

5 <210> 5
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

10 <220>
 <223> Ligante de C4.4a
 <400> 5

Phe Ser Asn Ala Trp Met Ser Trp Val
 1 5

15 <210> 6
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

20 <220>
 <223> Ligante de C4.4a

ES 2 632 748 T3

<400> 6

5 Phe Ser Asp Tyr Gln Met Thr Trp Ile
1 5

<210> 7
<211> 9
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

10 <220>
<223> Ligante de C4.4a

15 <400> 7

Phe Gly His Tyr Tyr Met Phe Trp Ile
1 5

20 <210> 8
<211> 8
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

25 <220>
<223> Ligante de C4.4a

<400> 8

Phe Ser Ser Asn Tyr Met Ser Trp
1 5

30 <210> 9
<211> 20
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

35 <220>
<223> Ligante de C4.4a

<400> 9

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

40 Val Lys Gly Arg
20

45 <210> 10
<211> 20
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Ligante de C4.4a

50 <400> 10

ES 2 632 748 T3

Val Ser Gly Val Ser Trp Asn Gly Ala Arg Thr His Tyr Ala Asp Ser
1 5 10 15

Val Lys Gly Arg
20

5 <210> 11
<211> 20
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

10 <220>
<223> Ligante de C4.4a
<400> 11

Val Ser Ala Ile Ser Gly Ser Gly Tyr Ser Thr His Tyr Ala Asp Ser
1 5 10 15

Val Lys Gly Arg
20

15 <210> 12
<211> 20
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

20 <220>
<223> Ligante de C4.4a
<400> 12

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

Val Lys Gly Arg
20

25 <210> 13
<211> 10
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

30 <220>
<223> Ligante de C4.4a

35 <400> 13

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

40 <210> 14
<211> 15
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

45 <220>
<223> Ligante de C4.4a
<400> 14

ES 2 632 748 T3

Ala Lys Gly Asp Tyr Leu Val Tyr Ser Ala Tyr Tyr Phe Asp Ser
 1 5 10 15

5 <210> 15
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

10 <220>
 <223> Ligante de C4.4a
 <400> 15

Ala Arg Leu Pro Tyr Gly Ser Gln Ser Gly Val Asp Tyr
 1 5 10

15 <210> 16
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

20 <220>
 <223> Ligante de C4.4a
 <400> 16

Ala Arg Glu Ser Gly Gly Ser Gly Pro Asn Tyr Tyr Tyr Gly Met Asp
 1 5 10 15

25 Val
 <210> 17
 <211> 14
 <212> PRT
 30 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Ligante de C4.4a
 35 <400> 17

Thr Gly Ser Ser Ser Asn Ile Gly Ala Gly Tyr Val Val His
 1 5 10

40 <210> 18
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

45 <220>
 <223> Ligante de C4.4a
 <400> 18

Ser Gly Ser Ser Ser Asn Val Gly Ser Asn Pro Val Asn
 1 5 10

50 <210> 19
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

ES 2 632 748 T3

<220>
<223> Ligante de C4.4a

<400> 19
5
Thr Gly Ser Ser Ser Asn Ile Gly Ala Gly Tyr Val Val His
1 5 10

<210> 20
<211> 14
10 <212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Ligante de C4.4a
15 <400> 20

Thr Gly Ser Ser Ser Asn Ile Gly Ala Gly Tyr Val Val His
1 5 10

20 <210> 21
<211> 7
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

25 <220>
<223> Ligante de C4.4a

<400> 21

Asp Asn Asn Lys Arg Pro Ser
1 5
30

<210> 22
<211> 7
35 <212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Ligante de C4.4a

<400> 22
40

Arg Asn Asn Gln Arg Pro Ser
1 5
45

<210> 23
<211> 7
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Ligante de C4.4a
50

<400> 23

Ser Asn Asn Gln Arg Pro Ser
1 5
55

<210> 24
<211> 7
<212> PRT

ES 2 632 748 T3

<213> Secuencia Artificial
<220>
<223> Ligante de C4.4a
5
<400> 24

Ser Asn Asn Gln Arg Pro Ser
1 5

10 <210> 25
<211> 12
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

15 <220>
<223> Ligante de C4.4a
<400> 25

Cys Ala Ala Trp Asp Asp Arg Leu Asn Gly Pro Val
1 5 10

20 <210> 26
<211> 12
<212> PRT
25 <213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Ligante de C4.4a

30 <400> 26

Cys Ala Ala Trp Asp Asp Arg Leu Asn Gly Trp Val
1 5 10

35 <210> 27
<211> 10
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
40 <223> Ligante de C4.4a
<400> 27

Cys Gln Ser Tyr Asp Ser Ser His Val Leu
1 5 10

45 <210> 28
<211> 12
<212> PRT
50 <213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Ligante de C4.4a

<400> 28

55 <210> 29

Cys Gln Ser Tyr Asp Arg Ser Leu Arg Gly Trp Val
1 5 10

<210> 29

ES 2 632 748 T3

<211> 113
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

5 <220>
 <223> Ligante de C4.4a

<400> 29

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

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

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

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

Ser Gly Ser Lys Ser Gly Thr Ser Ala Ser Leu Ala Ile Ser Gly Leu
 65 70 75 80

Arg Ser Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ala Ala Trp Asp Asp Arg
 85 90 95

Leu Asn Gly Pro Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly
 100 105 110

10 Gln

<210> 30
 <211> 112
 <212> PRT
 15 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Ligante de C4.4a

20 <400> 30

ES 2 632 748 T3

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

Arg Val Thr Ile Ser Cys Ser Gly Ser Ser Ser Asn Val Gly Ser Asn
 20 25 30

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

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

Gly Ser Lys Ser Gly Thr Ser Ala Ser Leu Ala Ile Ser Gly Leu Arg
 65 70 75 80

Ser Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ala Ala Trp Asp Asp Arg Leu
 85 90 95

Asn Gly Trp Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly Gln
 100 105 110

<210> 31
 <211> 111
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Ligante de C4.4a

<400> 31

5

10

ES 2 632 748 T3

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

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

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

Leu Ile Tyr Ser Asn Asn Gln Arg Pro Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe
 50 55 60

Ser Gly Ser Lys Ser Gly Thr Ser Ala Ser Leu Ala Ile Ser Gly Leu
 65 70 75 80

Arg Ser Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Ser Tyr Asp Ser Ser
 85 90 95

His Val Leu Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly Gln
 100 105 110

<210> 32
 <211> 113
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

5

<220>
 <223> Ligante de C4.4a

10

<400> 32

ES 2 632 748 T3

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

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

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

Leu Ile Tyr Ser Asn Asn Gln Arg Pro Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe
 50 55 60

Ser Gly Ser Lys Ser Gly Thr Ser Ala Ser Leu Ala Ile Ser Gly Leu
 65 70 75 80

Arg Ser Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Ser Tyr Asp Arg Ser
 85 90 95

Leu Arg Gly Trp Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly
 100 105 110

Gln

<210> 33
 <211> 117
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Ligante de C4.4a

<400> 33

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 Ala
 20 25 30

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

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

ES 2 632 748 T3

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

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

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

Val Thr Val Thr Ser
115

- <210> 34
- <211> 122
- <212> PRT
- <213> Secuencia Artificial
- <220>
- <223> Ligante de C4.4a
- <400> 34

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 Asp Tyr
20 25 30

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

Ser Gly Val Ser Trp Asn Gly Ala Arg Thr His 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 Gly Asp Tyr Leu Val Tyr Ser Ala Tyr Tyr Phe Asp Ser Trp
100 105 110

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

- <210> 35
- <211> 120
- <212> PRT
- <213> Secuencia Artificial
- <220>

ES 2 632 748 T3

<223> Ligante de C4.4a

<400> 35

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 Gly His Tyr
20 25 30

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

Ser Ala Ile Ser Gly Ser Gly Tyr Ser Thr His 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 Leu Pro Tyr Gly Ser Gln Ser Gly Val Asp Tyr Trp Gly Gln
100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Thr Ser
115 120

5

<210> 36

<211> 124

<212> PRT

10 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Ligante de C4.4a

15

<400> 36

ES 2 632 748 T3

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 Asn
 20 25 30

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

Ser Ala Ile Ser Ser Ser Gly Ser Ser 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 Arg Glu Ser Gly Gly Ser Gly Pro Asn Tyr Tyr Tyr Gly Met Asp
 100 105 110

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

<210> 37
 <211> 339
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

5

<220>
 <223> Ligante de C4.4a

10

<400> 37

cagtctgtgc tgactcagcc accctcagcg tctgggaccc ctgggcagag ggtcaccatc 60
 tctctgactg ggagcagctc caacattggg gcgggttatg ttgtacattg gtatcagcag 120
 ctcccaggaa cggcccccaa actcctcacc tatgacaata ataagcgacc ctccagggctc 180
 cctgaccgat tctctggctc caagtctggc acctcagcct ccctggccat cagtgggctc 240
 cgggtccgagg atgaggctga ttattactgt gcagcatggg atgacaggct gaatggtccg 300
 gtgttcggcg gaggaaccaa gttaaccgct ctaggtcag 339

<210> 38
 <211> 336
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

15

<220>
 <223> Ligante de C4.4a

20

<400> 38

ES 2 632 748 T3

cagtctgtgc tgactcagcc accctcagcg tctgggaccc cgggcagag ggtcaccatc 60
 tcttgttctg gaagcagctc caacgtcggg agtaatcctg taaactggta tcagcagctc 120
 ccaggaacgg cccccaaact cctcatctat aggaataatc agcggccctc aggggtccct 180
 gaccgattct ctggctccaa gtctggcacc tcagcctccc tggccatcag tgggctccgg 240
 tccgaggatg aggctgatta ttactgtgca gcatgggatg acaggtgaa tggttgggtg 300
 ttcggcggag gaaccaagct gacggtccta ggtcag 336

5 <210> 39
 <211> 333
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

10 <220>
 <223> Ligante de C4.4a

<400> 39

cagtctgtgc tgactcagcc accctcagcg tctgggaccc cgggcagag ggtcaccatc 60
 tcttgcactg ggagcagctc caacattggg gggggttatg ttgtacattg gtatcagcag 120
 ctcccaggaa cggcccccaa actcctcatc tatagtaata atcagcggcc ctcaggagtc 180
 cctgaccgat tctctggctc caagtctggc acctcagcct cctggccat cagtgggctc 240
 cggctccgagg atgaggctga ttattactgc cagtctatg acagcagcca tgttttattc 300
 ggcggaggaa ccaagctgac ggtcctaggt cag 333

15 <210> 40
 <211> 339
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

20 <220>
 <223> Ligante de C4.4a

<400> 40

cagtctgtgc tgactcagcc accctcagcg tctgggaccc cgggcagag ggtcaccatc 60
 tcttgcactg ggagcagctc caacattggg gggggttatg ttgtacattg gtatcagcag 120
 ctcccaggaa cggcccccaa actcctcatc tatagtaata atcagcggcc ctcaggggtc 180
 cctgaccgat tctctggctc caagtctggc acctcagcct cctggccat cagtgggctc 240
 cggctccgagg atgaggctga ttattactgc cagtctatg acagaagcct gcgtgggtgg 300
 gtgttcggcg gaggaaccaa gctgacggtc ctaggtcag 339

30 <210> 41
 <211> 351
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Ligante de C4.4a

35 <400> 41

ES 2 632 748 T3

gaggtgcagc tgttggagtc tgggggaggc ttggtacagc ctggggggtc cctgagactc 60
 tcctgtgcag cctctggatt caccttcagt aacgcctgga tgagctgggt ccgccaggct 120
 ccaggggaagg ggctggagtg ggtttcatac attagtagta gtggtagtac catatactac 180
 gcagactctg tgaagggccg attcaccatc tccagagaca attccaagaa cacgctgtat 240
 ctgcaaatga acagcctgag agccgaggac actgccgtgt attactgtgc gagagaaggg 300
 ttatgggcct ttgactactg gggccagggt accctgggtca ccgtgactag t 351

5 <210> 42
 <211> 366
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

10 <220>
 <223> Ligante de C4.4a

<400> 42

gaggtgcagc tgttggagtc tgggggaggc ttggtacagc ctggggggtc cctgagactc 60
 tcctgtgcag cctctggatt caccttcagt gactatcaga tgacctggat ccgccagact 120
 ccaggggaagg ggctggagtg ggtatcgggt gttagttgga atggcgctag gacgcactat 180
 gcagactctg tgaagggccg attcaccatc tccagagaca attccaagaa cacgctgtat 240
 ctacaaatga acagcctgag agccgaggac actgccgtgt attactgtgc gaagggcgac 300
 tacctggttt actccgcata ctactttgac tcctggggcc aggggtaccct ggtcacogtg 360
 actagt 366

15 <210> 43
 <211> 360
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

20 <220>
 <223> Ligante de C4.4a

<400> 43

gaggtgcagc tgttggagtc tgggggaggc ttggtacagc ctggggggtc cctgagactc 60
 tcctgtgcag cctctggatt caccttcagg cactactata tgttctggat ccgtcaggct 120
 ccaggggaagg ggctggagtg ggtctcagct attagtggta gtggttatag cacacactac 180
 gcagactccg tgaagggccg gttcaccatc tccagagaca attccaagaa cacgctgtat 240
 ctgcaaatga acagcctgag agccgaggac actgccgtgt attactgtgc gagactgcc 300
 tatggttcgc agagtggcgt tgactactgg ggccagggta ccctgggtcac cgtgactagt 360

30 <210> 44
 <211> 372
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Ligante de C4.4a

ES 2 632 748 T3

<400> 44

```

gaggtgcagc tgttgagtc tgggggaggc ttggtacagc ctgggggggc cctgagactc      60
tcctgtgcag cctctggatt caccttcagt agcaactaca tgagctgggt ccgccaggct      120
ccaggggaagg ggctggagtg ggtctcagct attagtagta gtggtagtag cacatactac      180
gcagactccg tgaagggccg gttcaccatc tccagagaca attccaagaa cacgctgtat      240
ctgcaaatga acagcctgag agccgaggac actgccgtgt attactgtgc gagagaatct      300
ggtgggagcg gaccgaacta ctactacggt atggacgtct ggggccaagg taccctggtc      360
accgtgacta gt                                                                372

```

5 <210> 45
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

10 <220>
 <223> Ligante de C4.4a
 <400> 45

15 Phe Ser Asn Ala Trp Met Ser Trp Val
 1 5

<210> 46
 <211> 20
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Ligante de C4.4a

25 <400> 46

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

Val Lys Gly Arg
 20

30 <210> 47
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

35 <220>
 <223> Ligante de C4.4a

<400> 47

40 Ala Arg Glu Gly Leu Trp Ala Phe Asp Tyr
 1 5 10

<210> 48
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

ES 2 632 748 T3

<220>
<223> Ligante de C4.4a

5 <400> 48

Thr Gly Ser Ser Ser Asn Ile Gly Ala Gly Tyr Val Val His
1 5 10

<210> 49
<211> 7
10 <212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
15 <223> Ligante de C4.4a

<400> 49

Asp Asn Asn Lys Arg Pro Ser
1 5

20 <210> 50
<211> 12
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

25 <220>
<223> Ligante de C4.4a

<400> 50

Cys Ala Ala Trp Asp Asp Arg Leu Asn Gly Pro Val
1 5 10

30 <210> 51
<211> 117
<212> PRT
35 <213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Ligante de C4.4a

40 <400> 51

ES 2 632 748 T3

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 Ala
 20 25 30
 Trp Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ser Tyr Ile Ser Ser Ser Gly Ser Thr Ile 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 Gly Leu Trp Ala Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu
 100 105 110
 Val Thr Val Ser Ser
 115

<210> 52
 <211> 113
 5 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Ligante de C4.4a
 10 <400> 52

ES 2 632 748 T3

```

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

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

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

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

Ser Gly Ser Lys Ser Gly Thr Ser Ala Ser Leu Ala Ile Ser Gly Leu
65          70          75          80

Arg Ser Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ala Ala Trp Asp Asp Arg
          85          90          95

Leu Asn Gly Pro Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly
          100          105          110

```

Gln

5 <210> 53
 <211> 351
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

10 <220>
 <223> Ligante de C4.4a

<400> 53

```

gaggtgcagc tgctggaag cggcggagga ctggtgcagc ctggaggcag cctgagactg      60
tcttgcgccg ccagcggctt caccttcagc aacgcctgga tgagctgggt cgcacaggct      120
cctggcaagg gcctggaatg ggtgtcctac atcagcagca gcggcagcac catctactac      180
gccgacagcg tgaagggccg gttcaccatc agccgggaca acagcaagaa caccctgtac      240
ctgcagatga acagcctgcg ggccgaggac accgccgtgt actactgcbc cagagaaggc      300
ctgtgggcct tcgactactg gggccagggc accctgggtca ccgtgtctag c              351

```

15 <210> 54
 <211> 339
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

20 <220>
 <223> Ligante de C4.4a

<400> 54

ES 2 632 748 T3

```

gagagcgtgc tgaccagcc tcctagcgtg tccggcgctc ctggccagag agtgaccatc      60
agctgcaccg gcagcagcag caacatcggg gccggctacg tggcgcactg gtatcagcag      120
ctgcccggca cgcgcccaaa gctgctgacg tacgacaaca acaagcggcc tagcggcgtg      180
cccgacagat tcagcggcag caagagcggc accagcgcca gcctggccat cagcggcctg      240
agaagcgagg acgaggccga ctactactgc gcgcctggg acgacagact gaacggcct      300
gtgtcggcg gaggcaccaa gctgaccgtg ctgggacag      339

```

5 <210> 55
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

10 <220>
 <223> Ligante de C4.4a
 <400> 55

Phe Ser Asn Ala Trp Met Ser Trp Val
 1 5

15 <210> 56
 <211> 20
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

20 <220>
 <223> Ligante de C4.4a
 <400> 56

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

25 Val Lys Gly Arg
 20

30 <210> 57
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

35 <220>
 <223> Ligante de C4.4a
 <400> 57

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

40 <210> 58
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

45 <220>
 <223> Ligante de C4.4a
 <400> 58

ES 2 632 748 T3

Thr Gly Ser Ser Ser Asn Ile Gly Ala Gly Tyr Val Val His
 1 5 10

5 <210> 59
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

10 <220>
 <223> Ligante de C4.4a
 <400> 59

Asp Asn Asn Lys Arg Pro Ser
 1 5

15 <210> 60
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

20 <220>
 <223> Ligante de C4.4a
 <400> 60

Cys Ala Ala Tyr Asp Asp Ser Leu Ser Gly Pro Val
 1 5 10

25 <210> 61
 <211> 117
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

30 <220>
 <223> Ligante de C4.4a
 35 <400> 61

ES 2 632 748 T3

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 Ala
 20 25 30

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

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

Val Thr Val Ser Ser
 115

5 <210> 62
 <211> 113
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

10 <220>
 <223> Ligante de C4.4a

<400> 62

ES 2 632 748 T3

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

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

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

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

Ser Gly Ser Lys Ser Gly Thr Ser Ala Ser Leu Ala Ile Ser Gly Leu
 65 70 75 80

Arg Ser Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ala Ala Tyr Asp Asp Ser
 85 90 95

Leu Ser Gly Pro Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly
 100 105 110

Gln

5 <210> 63
 <211> 351
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

10 <220>
 <223> Ligante de C4.4a

<400> 63

gagggtgcagc tgctggaatc cggcgggaggc ctggtgcagc ctggcgggatc totgagactg 60
 tcctgcgccg ccagcggcct taccttctcc aacgcctgga tgtcctgggt ccgacaggcc 120
 cctggcaagg gactggaatg ggtgtcctac atctcctcct ccggtccac catctactac 180
 gccgactccg tgaagggccg gttcaccatc tcccgggaca actccaagaa caccctgtac 240
 ctgcagatga actccctgcg ggccgaggac accgccgtgt actactgcgc ccgagagggc 300
 ctgtgggcct tcgattattg gggccagggc accctgggtca ccgtcagctc a 351

15 <210> 64
 <211> 339
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

20 <220>
 <223> Ligante de C4.4a

<400> 64

ES 2 632 748 T3

cagtccgtgc tgaccagcc ccttctgtg tctggcgccc ctggccagag agtgaccatc 60
 tcttgaccg gctcctccag caacatcggc gctggctacg tggcgcactg gtatcagcag 120
 ctgcccggca cggccccaa gctgctgac tacgacaaca acaageggcc ctccggcgtg 180
 cccgacagat tctccggctc caagtccggc acctccgcct cctggccat ctccggcctg 240
 agatctgagg acgaggccga ctactactgc gccgcctacg acgactccct gtccggccct 300
 gtgttcggcg gaggcacaaa gttaaccgtg ctgggccag 339

5 <210> 65
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

10 <220>
 <223> Ligante de C4.4a
 <400> 65

Phe Ser Asn Ala Trp Met Ser Trp Val
 1 5

15 <210> 66
 <211> 20
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

20 <220>
 <223> Ligante de C4.4a
 <400> 66

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

25 Val Lys Gly Arg
 20

30 <210> 67
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

35 <220>
 <223> Ligante de C4.4a
 <400> 67

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

40 <210> 68
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

45 <220>
 <223> Ligante de C4.4a
 <400> 68

ES 2 632 748 T3

Thr Gly Ser Ser Ser Asn Ile Gly Ala Gly Tyr Val Val His
1 5 10

5 <210> 69
<211> 7
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

10 <220>
<223> Ligante de C4.4a
<400> 69

Asp Asn Asn Lys Arg Pro Ser
1 5

15 <210> 70
<211> 12
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

20 <220>
<223> Ligante de C4.4a
<400> 70

25 Cys Ala Ala Phe Asp Asp Ser Leu Asn Gly Pro Val
1 5 10

30 <210> 71
<211> 117
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

35 <220>
<223> Ligante de C4.4a
<400> 71

ES 2 632 748 T3

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 Ala
 20 25 30
 Trp Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ser Tyr Ile Ser Ser Ser Gly Ser Thr Ile 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 Gly Leu Trp Ala Phe Asp Lys Trp Gly Gln Gly Thr Leu
 100 105 110
 Val Thr Val Ser Ser
 115

<210> 72
 <211> 113
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Ligante de C4.4a
 <400> 72

5
 10

Gln Ser Val Leu Thr Gln Pro Pro Ser Ala Ser Gly Thr Pro Gly Gln
 1 5 10 15
 Arg Val Thr Ile Ser Cys Thr Gly Ser Ser Ser Asn Ile Gly Ala Gly
 20 25 30
 Tyr Val Val His Trp Tyr Gln Gln Leu Pro Gly Thr Ala Pro Lys Leu
 35 40 45
 Leu Ile Tyr Asp Asn Asn Lys Arg Pro Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe
 50 55 60

ES 2 632 748 T3

Ser Gly Ser Lys Ser Gly Thr Ser Ala Ser Leu Ala Ile Ser Gly Leu
65 70 75 80

Arg Ser Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ala Ala Phe Asp Asp Arg
85 90 95

Leu Asn Gly Pro Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly
100 105 110

Gln

5 <210> 73
<211> 351
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

10 <220>
<223> Ligante de C4.4a

<400> 73

gaggtgcagc tgctggaatc cggcggaggc ctggtgcagc ctggcggatc tctgagactg 60
tcttgccgac cctccggctt taccttctcc aacgcctgga tgtcctgggt ccgacaggct 120
cctggcaagg gcctggaatg ggtgtcctac atctctcct ccggctccac catctactac 180
gccgactccg tgaagggcog gttcaccatc tcccgggaca actccaagaa caccctgtac 240
ctgcagatga actccctgcg ggccgaggac accgccgtgt actactgcbc ccgagagggc 300
ctgtgggcct tcgataagtg gggccagggc accctggtca ccgtcagctc a 351

15 <210> 74
<211> 339
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

20 <220>
<223> Ligante de C4.4a

<400> 74

cagtccgtgc tgaccagcc tcttccgcc tctggcacc ctggccagag agtgaccatc 60
tcttgaccgc gctcctccag caacatcggc gctggctacg tggcgactg gtatcagcag 120
ctgcccggca ccgccccaa gctgctgatc tacgacaaca acaagcggcc ctccggcgtg 180
cccgacagat tctccggctc caagtccggc acctccgect ccctggccat ctccggcctg 240
agatctgagg acgaggcoga ctactactgc gccgccttcg acgaccggct gaacggccct 300
gtgttcggcg gaggcacaaa gttaccctg ctgggccag 339

30 <210> 75
<211> 9
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>

ES 2 632 748 T3

<223> Ligante de C4.4a

<400> 75

5 Phe Ser Ser Ala Trp Met Ser Trp Val
1 5

<210> 76

<211> 20

<212> PRT

10 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Ligante de C4.4a

15 <400> 76

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

Val Lys Gly Arg
20

<210> 77

20 <211> 10

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

25 <223> Ligante de C4.4a

<400> 77

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

30

<210> 78

<211> 14

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

35

<220>

<223> Ligante de C4.4a

<400> 78

40

Thr Gly Ser Ser Ser Asn Ile Gly Ala Gly Tyr Val Val His
1 5 10

<210> 79

<211> 7

45 <212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Ligante de C4.4a

50

<400> 79

Asp Asn Asn Lys Arg Pro Ser
1 5

ES 2 632 748 T3

<210> 80
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 5
 <220>
 <223> Ligante de C4.4a
 <400> 80
 10
 Cys Ala Ala Tyr Asp Asp Ser Leu Ser Gly Pro Val
 1 5 10
 <210> 81
 <211> 117
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 15
 <220>
 <223> Ligante de C4.4a
 20
 <400> 81
 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 Ala
 20 25 30
 Trp Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ser Tyr Ile Ser Ser Ser Gly Ser Thr Ile 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
 Ala Arg Glu Gly Leu Trp Ala Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu
 100 105 110
 Val Thr Val Ser Ser
 115
 25
 <210> 82
 <211> 113
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 30
 <220>
 <223> Ligante de C4.4a
 <400> 82

ES 2 632 748 T3

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

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

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

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

Ser Gly Ser Lys Ser Gly Thr Ser Ala Ser Leu Ala Ile Ser Gly Leu
 65 70 75 80

Arg Ser Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ala Ala Tyr Asp Asp Ser
 85 90 95

Leu Ser Gly Pro Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly
 100 105 110

Gln

5 <210> 83
 <211> 351
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

10 <220>
 <223> Ligante de C4.4a

<400> 83

gaggtgcagc tgctggaatc cggcggaggc ctggtgcagc ctggcggatc tctgagactg 60
 tctctgcgccg ccagcggcctt taccttctcc agcgcctgga tgcctctgggt ccgacaggcc 120
 cctggcaagg gactggaatg ggtgtcctac atctctcct ccggtccac catctactac 180
 gccgactccg tgaagggccg gttcaccatc tcccgggaca actccaagaa caccctgtac 240
 ctgcagatga actccctgcg ggccgaggac accgcoctgt actactgcgc ccgagagggc 300
 ctgtgggcct tcgattattg gggccagggc accctggtca ccgtcagctc a 351

15 <210> 84
 <211> 339
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

20 <220>
 <223> Ligante de C4.4a

25 <400> 84

ES 2 632 748 T3

```

cagtccgtgc tgaccagcc cccttctgtg tctggcgccc ctggccagag agtgaccatc      60
tcttgcaccg gctcctccag caacatcggc gctggctacg tggcgcactg gtatcagcag      120
ctgcccggca cggcccccaa gctgctgata tacgacaaca acaagcggcc ctccggcgtg      180
cccgacagat tctccggctc caagtccggc acctccgcct ccctggccat ctccggcctg      240
agatctgagg acgaggccga ctactactgc gccgcctacg acgactccct gtccggccct      300
gtgttcggcg gaggcacaaa gttaaccgtg ctgggccag                                339

```

5 <210> 85
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

10 <220>
 <223> Ligante de C4.4a
 <400> 85

Phe Ser Ser Ala Trp Met Ser Trp Val
 1 5

15 <210> 86
 <211> 20
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

20 <220>
 <223> Ligante de C4.4a
 <400> 86

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

25 Val Lys Gly Arg
 20

30 <210> 87
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

35 <220>
 <223> Ligante de C4.4a
 <400> 87

Ala Arg Glu Gly Leu Trp Ala Phe Asp Lys
 1 5 10

40 <210> 88
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

45 <220>
 <223> Ligante de C4.4a
 <400> 88

ES 2 632 748 T3

Ser Gly Ser Ser Ser Asn Ile Gly Ala Gly Tyr Val Val His
1 5 10

5 <210> 89
<211> 7
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

10 <220>
<223> Ligante de C4.4a
<400> 89

Asp Asn Asn Gln Arg Pro Ser
1 5

15 <210> 90
<211> 12
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

20 <220>
<223> Ligante de C4.4a
<400> 90

Cys Ala Ala Phe Asp Asp Arg Leu Ser Gly Pro Val
1 5 10

25 <210> 91
<211> 117
<212> PRT
30 <213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Ligante de C4.4a
35 <400> 91

ES 2 632 748 T3

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

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

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

Leu Ile Tyr Asp Asn Asn Gln Arg Pro Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe
 50 55 60

Ser Gly Ser Lys Ser Gly Thr Ser Ala Ser Leu Ala Ile Ser Gly Leu
 65 70 75 80

Arg Ser Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ala Ala Phe Asp Asp Arg
 85 90 95

Leu Ser Gly Pro Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly
 100 105 110

Gln

5 <210> 93
 <211> 351
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

10 <220>
 <223> Ligante de C4.4a

<400> 93

gaggtgcagc tgctgaaag cggcggaggc ctggtgcagc ctggcggaag cctgagactg 60
 agctgtgccg ccageggctt caccttcagc agcgcctgga tgagctgggt ccgacaggcc 120
 cctggcaagg gcctggaatg ggtgtcctac atcagcagca gcggcagcag cacctactac 180
 gccgacagcg tgaagggcog gttcaccatc agccgggaca acagcaagaa caccctgtac 240
 ctgcagatga acagcctgcg ggccgaggac accgccgtgt actactgcbc cagagaaggc 300
 ctgtgggcct tcgataagtg gggccagggc accctgggtca ccgtcagctc a 351

15 <210> 94
 <211> 339
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

20 <220>
 <223> Ligante de C4.4a

<400> 94

ES 2 632 748 T3

```

cagagcgtgc tgaccagcc tcctagcgcc tctggcacc ctggccagag agtgaccatc      60
agctgcagcg gcagcagcag caacatcgga gccggctacg tggcgcactg gtatcagcag      120
ctgcccggca ccgcccccaa gctgctgatc taagacaaca accagcggcc cagcggcgtg      180
cccgacagat ttccggcag caagagcggc accagcgcca gcctggccat cagcggcctg      240
agaagcgagg acgaggccga ctactactgc gccgccttcg acgacagact gagcggccct      300
gtgttcggcg gaggcacaaa gttaaccgtg ctgggccag      339

```

5 <210> 95
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

10 <220>
 <223> Ligante de C4.4a
 <400> 95

Phe Ser Asp Tyr Gln Met Thr Trp Ile
 1 5

15 <210> 96
 <211> 20
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

20 <220>
 <223> Ligante de C4.4a
 <400> 96

Val Ser Gly Val Ser Trp Asn Gly Ala Arg Thr His Tyr Ala Asp Ser
 1 5 10 15

25 Val Lys Gly Arg
 20

30 <210> 97
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

35 <220>
 <223> Ligante de C4.4a
 <400> 97

Ala Lys Gly Asp Tyr Leu Val Tyr Ser Ala Tyr Tyr Phe Asp Ser
 1 5 10 15

40 <210> 98
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

45 <220>
 <223> Ligante de C4.4a
 <400> 98

ES 2 632 748 T3

Ser Gly Ser Ser Ser Asn Val Gly Ser Asn Pro Val Asn
1 5 10

5 <210> 99
<211> 7
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

10 <220>
<223> Ligante de C4.4a
<400> 99

Arg Asn Asn Gln Arg Pro Ser
1 5

15 <210> 100
<211> 12
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

20 <220>
<223> Ligante de C4.4a
<400> 100

Cys Ala Ala Trp Asp Asp Arg Leu Asn Gly Trp Val
1 5 10

25 <210> 101
<211> 122
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

30 <220>
<223> Ligante de C4.4a
35 <400> 101

ES 2 632 748 T3

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 Asp Tyr
 20 25 30

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

Ser Gly Ile Ser Trp Asn Gly Gly Ser Thr His 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 Gly Asp Tyr Leu Val Tyr Ser Ala Tyr Tyr Phe Asp Ser Trp
 100 105 110

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

<210> 102
 <211> 112
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Ligante de C4.4a

<400> 102

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

Arg Val Thr Ile Ser Cys Ser Gly Ser Ser Ser Asn Ile Gly Ser Asn
 20 25 30

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

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

Gly Ser Lys Ser Gly Thr Ser Ala Ser Leu Ala Ile Ser Gly Leu Arg
 65 70 75 80

ES 2 632 748 T3

Ser Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ala Ala Trp Asp Asp Arg Leu
85 90 95

Asn Gly Trp Gly Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly Gln
100 105 110

5 <210> 103
<211> 366
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

10 <220>
<223> Ligante de C4.4a

<400> 103

gaggtgcagc tgctggaag cggcggagga ctggtgcagc ctggaggcag cctgagactg 60
tcttgcgccg ccagcggctt caccttcagc gactaccaga tgacctggat ccgacagacc 120
cctggcaagg gcctggaatg ggtgtccggc atcagctgga acggaggcag caccactac 180
gccgacagcg tgaagggccg gttcaccatc agccgggaca acagcaagaa caccctgtac 240
ctgcagatga acagcctgcg ggccgaggac accgccgtgt actactgcbc caagggcgac 300
tacctggtgt acagcgccta ctacttcgac agctggggcc agggcaccct ggtcaccgtg 360
tctagc 366

15 <210> 104
<211> 336
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

20 <220>
<223> Ligante de C4.4a

<400> 104

gagagcgtgc tgaccagcc tctagcggc tctggcacc ctggccagag agtgaccatc 60
agctgctctg gcagcagcag caacatcgga agcaaccccg tgaactgta tcagcagctg 120
cccggcaccg cccccaagct gctgatctac cggaacaacc agcggcctag cggcgtgccc 180
gacagattca gcggcagcaa gagcggcacc agcggcagcc tggccatcag cggcctgaga 240
agcgaggacg aggcgacta ctactgcbc gccctgggacg acagactgaa cggctggggc 300
ttcggcgggag gcaccaagct gaccgtgctg ggacag 336

25 <210> 105
<211> 9
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

30 <221>
<223> Ligante de C4.4a

35 <400> 105

ES 2 632 748 T3

Phe Ser Asp Tyr Gln Met Thr Trp Ile
1 5

5 <210> 106
<211> 20
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

10 <220>
<223> Ligante de C4.4a
<400> 106

Val Ser Gly Ile Ser Trp Asn Gly Gly Ser Thr His Tyr Ala Asp Ser
1 5 10 15

Val Lys Gly Arg
20

15 <210> 107
<211> 15
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

20 <220>
<223> Ligante de C4.4a
<400> 107

25 Ala Lys Gly Asp Tyr Leu Val Tyr Ser Ser Tyr Tyr Phe Lys Ser
1 5 10 15

30 <210> 108
<211> 13
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

35 <220>
<223> Ligante de C4.4a
<400> 108

Ser Gly Ser Ser Ser Asn Ile Gly Ser Asn Pro Val Asn
1 5 10

40 <210> 109
<211> 7
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

45 <220>
<223> Ligante de C4.4a
<400> 109

Arg Asn Asn Gln Arg Pro Ser
1 5

50 <210> 110
<211> 12
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

55

ES 2 632 748 T3

<220>
<223> Ligante de C4.4a

<400> 110

5

Cys Ala Ala Trp Asp Asp Arg Leu Ser Gly Trp Ala
1 5 10

<210> 111
<211> 122
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

10

<220>
<223> Ligante de C4.4a

15

<400> 111

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 Asp Tyr
20 25 30

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

Ser Gly Ile Ser Trp Asn Gly Gly Ser Thr His 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 Gly Asp Tyr Leu Val Tyr Ser Ser Tyr Tyr Phe Lys Ser Trp
100 105 110

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

20 <210> 112
<211> 112
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

25 <220>
<223> Ligante de C4.4a

<400> 112

ES 2 632 748 T3

cagtcctgtgc tgaccagcc tccttcogcc tctggcacc ctggccagag agtgaccatc 60
 tctgtctcgc gctcctctc caacatcgcc tccaaccccg tgaactggta tcagcagctg 120
 cccggcaccg cccccaagct gctgatctac cggaacaacc agcggccctc cggcgtgcc 180
 gacagattct ccggtccaa gtccggcacc tccgcctccc tggccatctc cggcctgaga 240
 tctgaggacg aggccgacta ctactgcgcc gcctgggacg accggctgtc tggtgggct 300
 tttggcggcg gaacaaagt aaccgtgctg ggccag 336

5 <210> 115
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

10 <220>
 <223> Ligante de C4.4a
 <400> 115

Phe Ser Asp Tyr Gln Met Thr Trp Ile
 1 5

15 <210> 116
 <211> 20
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

20 <220>
 <223> Ligante de C4.4a
 <400> 116

Val Ser Gly Ile Ser Trp Asn Gly Gly Ser Thr His Tyr Ala Asp Ser
 1 5 10 15

25 Val Lys Gly Arg
 20

30 <210> 117
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

35 <220>
 <223> Ligante de C4.4a
 <400> 117

Ala Lys Gly Asp Tyr Leu Val Tyr Lys Ser Tyr Tyr Phe Lys Ser
 1 5 10 15

40 <210> 118
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

45 <220>
 <223> Ligante de C4.4a

ES 2 632 748 T3

<400> 118

Ser Gly Ser Ser Ser Asn Ile Gly Ser Asn Pro Val Asn
1 5 10

5 <210> 119
<211> 7
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

10 <220>
<223> Ligante de C4.4a

<400> 119

Arg Asn Asn Gln Arg Pro Ser
1 5

15 <210> 120
<211> 12
<212> PRT
20 <213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Ligante de C4.4a

25 <400> 120

Cys Ala Ala Trp Asp Asp Ser Leu Ser Gly Trp Ala
1 5 10

30 <210> 121
<211> 122
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

35 <220>
<223> Ligante de C4.4a

<400> 121

ES 2 632 748 T3

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 Asp Tyr
 20 25 30
 Gln Met Thr Trp Ile Arg Gln Thr Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ser Gly Ile Ser Trp Asn Gly Gly Ser Thr His 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 Gly Asp Tyr Leu Val Tyr Lys Ser Tyr Tyr Phe Lys Ser Trp
 100 105 110
 Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120

5 <210> 122
 <211> 112
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 10 <220>
 <223> Ligante de C4.4a
 <400> 122

ES 2 632 748 T3

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

Arg Val Thr Ile Ser Cys Ser Gly Ser Ser Ser Asn Ile Gly Ser Asn
 20 25 30

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

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

Gly Ser Lys Ser Gly Thr Ser Ala Ser Leu Ala Ile Ser Gly Leu Arg
 65 70 75 80

Ser Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ala Ala Trp Asp Asp Ser Leu
 85 90 95

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

<210> 123
 <211> 366
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

5

<220>
 <223> Ligante de C4.4a

10

<400> 123

gaggtgcagc tgctggaatc cggcggaggc ctggtgcagc ctggcggatc tctgagactg 60
 tcctgcgccg cctccggctt caccttctcc gactaccaga tgacctggat cagacagacc 120
 cccggcaagg gcctggaatg ggtgtccggc atctcctgga acggcggctc caccactac 180
 gccgactctg tgaagggccg gttcaccatc tcccgggaca actccaagaa caccctgtac 240
 ctgcagatga actccctgcg ggccgaggac accgccgtgt actactgcbc caagggcgac 300
 tacctggtgt acaagtccta ctacttcaag tcttggggcc agggcaccct gggtcaccctc 360
 agctca 366

<210> 124
 <211> 336
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

15

<220>
 <223> Ligante de C4.4a

20

<400> 124

ES 2 632 748 T3

```

cagtcctgtgc tgaccagcc tccttcggcc tctggcacc ctggccagag agtgaccatc      60
tcctgctccg gctcctctc caacatcggc tccaaccccg tgaactggta tcagcagctg      120
cccggcaccg cccccaagct gctgatctac cggaacaacc agcggccctc cggcgtgccc      180
gacagattct cgggctccaa gtccggcacc tcgcctccc tggccatctc cggcctgaga      240
tctgaggacg aggcgacta ctactgggcc gcttgggacg actccctgtc tggctgggct      300
tttggcggcg gaacaaagt aaccgtgctg ggccag                                336

```

5 <210> 125
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

10 <220>
 <223> Ligante de C4.4a
 <400> 125

Phe Ser Asp Tyr Gln Met Thr Trp Ile
 1 5

15 <210> 126
 <211> 20
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

20 <220>
 <223> Ligante de C4.4a
 <400> 126

Val Ser Gly Ile Ser Trp Asn Gly Gly Ser Thr His Tyr Ala Asp Ser
 1 5 10 15

25 Val Lys Gly Arg
 20

30 <210> 127
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

35 <220>
 <223> Ligante de C4.4a
 <400> 127

Ala Lys Gly Asp Tyr Leu Val Tyr Ser Ser Tyr Tyr Phe Lys Ser
 1 5 10 15

40 <210> 128
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

45 <220>
 <223> Ligante de C4.4a
 <400> 128

ES 2 632 748 T3

Ser Gly Ser Ser Ser Asn Ile Gly Ser Asn Pro Val Asn
 1 5 10

5 <210> 129
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

10 <220>
 <223> Ligante de C4.4a
 <400> 129

Arg Asn Asn Gln Arg Pro Ser
 1 5

15 <210> 130
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

20 <220>
 <223> Ligante de C4.4a
 <400> 130

Cys Ala Ala Trp Asp Asp Arg Leu Ser Gly Trp Gly
 1 5 10

25 <210> 131
 <211> 122
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

30 <220>
 <223> Ligante de C4.4a
 35 <400> 131

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

ES 2 632 748 T3

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

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

Ser Gly Ile Ser Trp Asn Gly Gly Ser Thr His 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 Gly Asp Tyr Leu Val Tyr Ser Ser Tyr Tyr Phe Lys Ser Trp
 100 105 110

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

<210> 132
 <211> 112
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

5

<220>
 <223> Ligante de C4.4a

10

<400> 132

ES 2 632 748 T3

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

5 <210> 133
 <211> 366
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

10 <220>
 <223> Ligante de C4.4a
 <400> 133

gaggtgcagc tgctggaatc cggcggaggc ctggtgcagc ctggcggatc tctgagactg 60
 tcctgcgccg cctccggctt caccttctcc gactaccaga tgacctggat cagacagacc 120
 cccggcaagg gcctggaatg ggtgtccggc atctctgga acggcggctc caccactac 180
 gccgactctg tgaagggccg gttcaccatc tcccgggaca actccaagaa caccctgtac 240
 ctgcagatga actcctgcg ggccgaggac accgccgtgt actactgcgc caagggcgac 300
 tacctggtgt actcctccta ctacttcaag tcctggggcc agggcaccct ggtcaccgtc 360
 agctca 366

15 <210> 134
 <211> 336
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

20 <220>
 <223> Ligante de C4.4a
 <400> 134

ES 2 632 748 T3

```

cagtccgtgc tgaccagcc tccttccgcc tctggcacc ctggccagag agtgaccatc      60
tcctgctccg gctcctcctc caacatcggc tccaaccccg tgaactggta tcagcagctg    120
cccggcaccg cccccaagct gctgatctac cggaacaacc agcggccctc cggcgtgccc    180
gacagattct ccggtccaa gtccggcacc tccgcctccc tggccatctc cggcctgaga    240
tctgaggacg aggccgacta ctactgcgcc gcctgggacg accggetgtc tggctgggga    300
tttggcggcg gaacaaagtt aaccgtgctg ggccag                                336

```

5 <210> 135
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

10 <220>
 <223> Ligante de C4.4a
 <400> 135

Phe Ser Ser Tyr Gln Met Thr Trp Ile
 1 5

15 <210> 136
 <211> 20
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

20 <220>
 <223> Ligante de C4.4a
 <400> 136

Val Ser Gly Ile Ser Trp Asn Gly Gly Ser Thr His Tyr Ala Asp Ser
 1 5 10 15

25 **Val Lys Gly Arg**
 20

30 <210> 137
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

35 <220>
 <223> Ligante de C4.4a
 <400> 137

Ala Lys Gly Asp Tyr Leu Val Tyr Lys Ser Tyr Tyr Phe Lys Ser
 1 5 10 15

40 <210> 138
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

45 <220>
 <223> Ligante de C4.4a
 <400> 138

ES 2 632 748 T3

Ser Gly Ser Ser Ser Asn Ile Gly Ser Asn Pro Val Asn
 1 5 10

5 <210> 139
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

10 <220>
 <223> Ligante de C4.4a
 <400> 139

Arg Asn Asn Gln Arg Pro Ser
 1 5

15 <210> 140
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

20 <220>
 <223> Ligante de C4.4a
 <400> 140

Cys Ala Ala Trp Asp Asp Ser Leu Ser Gly Trp Ala
 1 5 10

25 <210> 141
 <211> 122
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

30 <220>
 <223> Ligante de C4.4a

35 <400> 141

ES 2 632 748 T3

```

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

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

Ser Gly Ile Ser Trp Asn Gly Gly Ser Thr His 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 Gly Asp Tyr Leu Val Tyr Lys Ser Tyr Tyr Phe Lys Ser Trp
          100          105          110

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

```

5
<210> 142
<211> 112
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

10
<220>
<223> Ligante de C4.4a
<400> 142

```

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

Arg Val Thr Ile Ser Cys Ser Gly Ser Ser Ser Asn Ile Gly Ser Asn
          20           25           30

```

ES 2 632 748 T3

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

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

Gly Ser Lys Ser Gly Thr Ser Ala Ser Leu Ala Ile Ser Gly Leu Arg
 65 70 75 80

Ser Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ala Ala Trp Asp Asp Ser Leu
 85 90 95

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

<210> 143
 <211> 366
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Ligante de C4.4a

<400> 143

gaggtgcagc tgctggaaag cggcggaggc ctggtgcagc ctggcgggaag cctgagactg 60
 agctgtgccg ccagcggcctt caccttcagc agctaccaga tgacctggat cagacaggcc 120
 cctggcaagg gcctggaatg ggtgtccggc atcagctgga acggcggcag caccactac 180
 gccgacagcg tgaagggccg gttcaccatc agccgggaca acagcaagaa caccctgtac 240
 ctgcagatga acagcctgcg ggccgaggac accgccgtgt actactgcbc caagggcgac 300
 tacctggtgt acaagagcta ctacttcaag agctggggcc agggcacact ggtcacccgc 360
 agctca 366

<210> 144
 <211> 336
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Ligante de C4.4a

<400> 144

cagagcgtgc tgaccagcc tcctagcgc tctggcacc ctggccagag agtgaccatc 60
 agctgcagcg gcagcagcag caacatcggc agcaaccccg tgaactggta tcagcagctg 120
 cccggcaccg ccccaagct gctgatctac cggaacaacc agcggcccag cggcgtgccc 180
 gacagatttt ccggcagcaa gagcggcacc agcggccagcc tggccatcag cggcctgaga 240
 agcgaggacg aggccgacta ctactgcbc gcctgggacg atagcctgag cggctgggcc 300
 tttggcggcg gaacaaagtt aaccgtgctg ggccag 336

ES 2 632 748 T3

<400> 149

Asp Asn Asn Lys Arg Pro Ser
1 5

5 <210> 150
<211> 12
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

10 <220>
<223> Ligante de C4.4a

<400> 150

Cys Ala Ala Tyr Asp Asp Ser Leu Lys Gly Pro Val
1 5 10

15 <210> 151
<211> 117
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

20 <220>
<223> Ligante de C4.4a

25 <400> 151

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 Ala
20 25 30

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

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

Val Thr Val Thr Ser
115

30 <210> 152
<211> 113
<212> PRT

ES 2 632 748 T3

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Ligante de C4.4a

5

<400> 152

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

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

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

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

Ser Gly Ser Lys Ser Gly Thr Ser Ala Ser Leu Ala Ile Ser Gly Leu
65 70 75 80

Arg Ser Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ala Ala Tyr Asp Asp Ser
85 90 95

Leu Lys Gly Pro Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly
100 105 110

Gln

10

<210> 153

<211> 9

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

15

<220>

<223> Ligante de C4.4a

<400> 153

Phe Ser Asn Ala Trp Met Ser Trp Val
1 5

20

<210> 154

<211> 20

<212> PRT

25

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Ligante de C4.4a

30

<400> 154

ES 2 632 748 T3

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

Val Lys Gly Arg
 20

5 <210> 155
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

10 <220>
 <223> Ligante de C4.4a
 <400> 155

Ala Arg Glu Gly Leu Trp Ala Phe Asp Lys
 1 5 10

15 <210> 156
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

20 <220>
 <223> Ligante de C4.4a
 <400> 156

Thr Gly Ser Ser Ser Asn Ile Gly Ala Gly Tyr Val Val His
 1 5 10

25 <210> 157
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

30 <220>
 <223> Ligante de C4.4a
 <400> 157

Asp Asn Asn Lys Arg Pro Ser
 1 5

35 <210> 158
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

40 <220>
 <223> Ligante de C4.4a
 <400> 158

Cys Ala Ala Phe Asp Asp Ser Leu Asn Gly Pro Val
 1 5 10

45 <210> 159
 <211> 117
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

ES 2 632 748 T3

<220>

<223> Ligante de C4.4a

<400> 159

5

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 Ala
20 25 30

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

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

Val Thr Val Thr Ser
115

<210> 160

<211> 113

10

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Ligante de C4.4a

15

<400> 160

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

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

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

ES 2 632 748 T3

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

Ser Gly Ser Lys Ser Gly Thr Ser Ala Ser Leu Ala Ile Ser Gly Leu
 65 70 75 80

Arg Ser Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ala Ala Phe Asp Asp Ser
 85 90 95

Leu Asn Gly Pro Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly
 100 105 110

Gln

5 <210> 161
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

10 <220>
 <223> Ligante de C4.4a
 <400> 161

Phe Ser Asn Ala Trp Met Ser Trp Val
 1 5

15 <210> 162
 <211> 20
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

20 <220>
 <223> Ligante de C4.4a
 <400> 162

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

25 Val Lys Gly Arg
 20

30 <210> 163
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

35 <220>
 <223> Ligante de C4.4a
 <400> 163

Ala Arg Glu Gly Leu Trp Ala Phe Asp Lys
 1 5 10

ES 2 632 748 T3

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 Ala
 20 25 30

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

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

Val Thr Val Thr Ser
 115

- <210> 168
- <211> 113
- <212> PRT
- <213> Secuencia Artificial

- <220>
- <223> Ligante de C4.4a

- <400> 168

ES 2 632 748 T3

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

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

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

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

Ser Gly Ser Lys Ser Gly Thr Ser Ala Ser Leu Ala Ile Ser Gly Leu
 65 70 75 80

Arg Ser Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ala Ala Phe Asp Asp Ser
 85 90 95

Leu Asn Gly Pro Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly
 100 105 110

Gln

5 <210> 169
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

10 <220>
 <223> Ligante de C4.4a
 <400> 169

Phe Ser Ser Ala Trp Met Ser Trp Val
 1 5

15 <210> 170
 <211> 20
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

20 <220>
 <223> Ligante de C4.4a
 <400> 170

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

25 Val Lys Gly Arg
 20

<210> 171
 <211> 10
 <212> PRT

ES 2 632 748 T3

<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Ligante de C4.4a

5 <400> 171

Ala Arg Glu Gly Leu Trp Ala Phe Asp Trp
1 5 10

10 <210> 172
<211> 14
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

15 <220>
<223> Ligante de C4.4a

<400> 172

Ser Gly Ser Ser Ser Asn Ile Gly Ala Gly Tyr Val Val His
1 5 10

20 <210> 173
<211> 7
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

25 <220>
<223> Ligante de C4.4a

30 <400> 173

Asp Asn Asn Gln Arg Pro Ser
1 5

35 <210> 174
<211> 12
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

40 <220>
<223> Ligante de C4.4a

<400> 174

Cys Ala Ala Tyr Asp Asp Ser Leu Ser Gly Pro Val
1 5 10

45 <210> 175
<211> 117
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

50 <220>
<223> Ligante de C4.4a

55 <400> 175

ES 2 632 748 T3

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 Ala
 20 25 30

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

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

Val Thr Val Thr Ser
 115

- <210> 176
- <211> 113
- <212> PRT
- <213> Secuencia Artificial

- <220>
- <223> Ligante de C4.4a

- <400> 176

ES 2 632 748 T3

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

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

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

Leu Ile Tyr Asp Asn Asn Gln Arg Pro Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe
 50 55 60

Ser Gly Ser Lys Ser Gly Thr Ser Ala Ser Leu Ala Ile Ser Gly Leu
 65 70 75 80

Arg Ser Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ala Ala Tyr Asp Asp Ser
 85 90 95

Leu Ser Gly Pro Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly
 100 105 110

Gln

5 <210> 177
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

10 <220>
 <223> Ligante de C4.4a
 <400> 177

Phe Ser Ser Ala Trp Met Ser Trp Val
 1 5

15 <210> 178
 <211> 20
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

20 <220>
 <223> Ligante de C4.4a
 <400> 178

25 Val Ser Tyr Ile Ser Ser Ser Gly Ser Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser
 1 5 10 15

Val Lys Gly Arg
 20

<210> 179

ES 2 632 748 T3

<211> 10
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

5

<220>
 <223> Ligante de C4.4a

 <400> 179

10

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

<210> 180
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

15

<220>
 <223> Ligante de C4.4a

20

<400> 180

25

Ser	Gly	Ser	Ser	Ser	Asn	Ile	Gly	Ala	Gly	Tyr	Val	Val	His
1				5					10				

<210> 181
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

30

<220>
 <223> Ligante de C4.4a

 <400> 181

35

Asp	Asn	Asn	Gln	Arg	Pro	Ser
1				5		

<210> 182
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

40

<220>
 <223> Ligante de C4.4a

 <400> 182

45

Cys	Ala	Ala	Tyr	Asp	Asp	Ser	Leu	Asn	Gly	Pro	Val
1				5					10		

<210> 183
 <211> 117
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

50

<220>
 <223> Ligante de C4.4a

55

<400> 183

ES 2 632 748 T3

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 Ala
 20 25 30
 Trp Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ser Tyr Ile Ser Ser Ser Gly Ser Thr Ile 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 Gly Leu Trp Ala Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu
 100 105 110
 Val Thr Val Thr Ser
 115

<210> 184
 <211> 113
 5 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Ligante de C4.4a
 10 <400> 184

ES 2 632 748 T3

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

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

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

Leu Ile Tyr Asp Asn Asn Gln Arg Pro Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe
 50 55 60

Ser Gly Ser Lys Ser Gly Thr Ser Ala Ser Leu Ala Ile Ser Gly Leu
 65 70 75 80

Arg Ser Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ala Ala Tyr Asp Asp Ser
 85 90 95

Leu Asn Gly Pro Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly
 100 105 110

Gln

5 <210> 185
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

10 <220>
 <223> Ligante de C4.4a
 <400> 185

Phe Ser Ser Ala Trp Met Ser Trp Val
 1 5

15 <210> 186
 <211> 20
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

20 <220>
 <223> Ligante de C4.4a
 <400> 186

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

25 Val Lys Gly Arg
 20

<210> 187
 <211> 10

ES 2 632 748 T3

<212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

5 <220>
 <223> Ligante de C4.4a

<400> 187

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

<210> 188
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

15 <220>
 <223> Ligante de C4.4a

<400> 188

20 Ser Gly Ser Ser Ser Asn Ile Gly Ala Gly Tyr Val Val His
 1 5 10

<210> 189
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

25 <220>
 <223> Ligante de C4.4a

<400> 189

30 Asp Asn Asn Gln Arg Pro Ser
 1 5

35 <210> 190
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

40 <220>
 <223> Ligante de C4.4a

<400> 190

45 Cys Ala Ala Trp Asp Asp Arg Leu Asn Gly Pro Val
 1 5 10

<210> 191
 <211> 117
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

50 <220>
 <223> Ligante de C4.4a

<400> 191

55

ES 2 632 748 T3

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 Ala
 20 25 30

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

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

Val Thr Val Ser Ser
 115

5 <210> 192
 <211> 113
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

10 <220>
 <223> Ligante de C4.4a

<400> 192

ES 2 632 748 T3

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

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

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

Leu Ile Tyr Asp Asn Asn Gln Arg Pro Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe
 50 55 60

Ser Gly Ser Lys Ser Gly Thr Ser Ala Ser Leu Ala Ile Ser Gly Leu
 65 70 75 80

Arg Ser Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ala Ala Trp Asp Asp Arg
 85 90 95

Leu Asn Gly Pro Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly
 100 105 110

Gln

5 <210> 193
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

10 <220>
 <223> Ligante de C4.4a
 <400> 193

Phe Thr Phe Ser Asn Ala Trp Met Ser Trp Val
 1 5 10

15 <210> 194
 <211> 20
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

20 <220>
 <223> Ligante de C4.4a
 <400> 194

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

25 Val Lys Gly Arg
 20

<210> 195
 <211> 10

ES 2 632 748 T3

<212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 5 <223> Ligante de C4.4a

 <400> 195

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

 10 <210> 196
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 15
 <220>
 <223> Ligante de C4.4a

 <400> 196
 20

Thr	Gly	Ser	Ser	Ser	Asn	Ile	Gly	Ala	Gly	Tyr	Val	Val	His
1				5					10				

 <210> 197
 <211> 7
 25 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> Ligante de C4.4a
 30
 <400> 197

Asp	Asn	Asn	Lys	Arg	Pro	Ser
	1					5

 35 <210> 198
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 40
 <220>
 <223> Ligante de C4.4a

 <400> 198

Cys	Ala	Ala	Tyr	Asp	Asp	Arg	Leu	Asn	Gly	Pro	Val
1				5					10		

 45 <210> 199
 <211> 117
 <212> PRT
 50 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> Ligante de C4.4a

 <400> 199
 55

ES 2 632 748 T3

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 Ala
 20 25 30
 Trp Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ser Tyr Ile Ser Ser Ser Gly Ser Thr Ile 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 Gly Leu Trp Ala Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu
 100 105 110
 Val Thr Val Ser Ser
 115

<210> 200
 <211> 113
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 5
 <220>
 <223> Ligante de C4.4a
 10
 <400> 200

ES 2 632 748 T3

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

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

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

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

Ser Gly Ser Lys Ser Gly Thr Ser Ala Ser Leu Ala Ile Ser Gly Leu
 65 70 75 80

Arg Ser Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ala Ala Tyr Asp Asp Arg
 85 90 95

Leu Asn Gly Pro Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly
 100 105 110

Gln

5 <210> 201
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

10 <220>
 <223> Ligante de C4.4a
 <400> 201

Phe Thr Phe Ser Ser Ala Trp Met Ser Trp Val
 1 5 10

15 <210> 202
 <211> 20
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

20 <220>
 <223> Ligante de C4.4a
 <400> 202

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

25 Val Lys Gly Arg

20

ES 2 632 748 T3

<210> 203
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 5
 <220>
 <223> Ligante de C4.4a
 <400> 203
 10
 Ala Arg Glu Gly Leu Trp Ala Phe Asp Gly
 1 5 10
 <210> 204
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 15
 <220>
 <223> Ligante de C4.4a
 20
 <400> 204
 Ser Gly Ser Ser Ser Asn Ile Gly Ala Gly Tyr Val Val His
 1 5 10
 25
 <210> 205
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 30
 <220>
 <223> Ligante de C4.4a
 <400> 205
 Asp Asn Asn Gln Arg Pro Ser
 1 5
 35
 <210> 206
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 40
 <220>
 <223> Ligante de C4.4a
 45
 <400> 206
 Cys Ala Ala Tyr Asp Asp Ser Leu Asn Arg Pro Val
 1 5 10
 50
 <210> 207
 <211> 117
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 55
 <220>
 <223> Ligante de C4.4a
 <400> 207

ES 2 632 748 T3

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 Ala
 20 25 30

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

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

Val Thr Val Ser Ser
 115

<210> 208
 <211> 113
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

5

<220>
 <223> Ligante de C4.4a

10

<400> 208

ES 2 632 748 T3

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

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

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

Leu Ile Tyr Asp Asn Asn Gln Arg Pro Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe
 50 55 60

Ser Gly Ser Lys Ser Gly Thr Ser Ala Ser Leu Ala Ile Ser Gly Leu
 65 70 75 80

Arg Ser Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ala Ala Tyr Asp Asp Ser
 85 90 95

Leu Asn Arg Pro Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly
 100 105 110

Gln

5 <210> 209
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

10 <220>
 <223> Ligante de C4.4a
 <400> 209

Phe Thr Phe Ser Asn Ala Trp Met Ser Trp Val
 1 5 10

15 <210> 210
 <211> 20
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

20 <220>
 <223> Ligante de C4.4a
 <400> 210

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

25 Val Lys Gly Arg
 20

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

ES 2 632 748 T3

<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Ligante de C4.4a

5 <400> 211

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

10 <210> 212
<211> 14
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

15 <220>
<223> Ligante de C4.4a

<400> 212

Thr Gly Ser Ser Ser Asn Ile Gly Ala Gly Tyr Val Val His
1 5 10

20 <210> 213
<211> 7
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

25 <220>
<223> Ligante de C4.4a

30 <400> 213

Asp Asn Asn Lys Arg Pro Ser
1 5

35 <210> 214
<211> 12
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

40 <220>
<223> Ligante de C4.4a

<400> 214

Cys Ala Ala Phe Asp Asp Ser Leu Asn Gly Pro Val
1 5 10

45 <210> 215
<211> 117
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

50 <220>
<223> Ligante de C4.4a

55 <400> 215

ES 2 632 748 T3

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 Ala
 20 25 30
 Trp Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ser Tyr Ile Ser Ser Ser Gly Ser Thr Ile 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 Gly Leu Trp Ala Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu
 100 105 110
 Val Thr Val Ser Ser
 115

<210> 216
 <211> 113
 5 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 10 <223> Ligante de C4.4a
 <400> 216

ES 2 632 748 T3

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

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

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

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

Ser Gly Ser Lys Ser Gly Thr Ser Ala Ser Leu Ala Ile Ser Gly Leu
 65 70 75 80

Arg Ser Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ala Ala Phe Asp Asp Ser
 85 90 95

Leu Asn Gly Pro Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly
 100 105 110

Gln

5 <210> 217
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

10 <220>
 <223> Ligante de C4.4a
 <400> 217

Phe Ser Ser Ala Trp Met Ser Trp Val
 1 5

15 <210> 218
 <211> 20
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

20 <220>
 <223> Ligante de C4.4a
 <400> 218

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

25 Val Lys Gly Arg
 20

<210> 219
 <211> 10

ES 2 632 748 T3

<212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

5 <220>
 <223> Ligante de C4.4a

<400> 219

Ala Arg Glu Gly Leu Trp Ala Phe Asp Lys
 1 5 10

10 <210> 220
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

15 <220>
 <223> Ligante de C4.4a

<400> 220

20 **Thr Gly Ser Ser Ser Asn Ile Gly Ala Gly Tyr Val Val His**
 1 5 10

<210> 221
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

25 <220>
 <223> Ligante de C4.4a

30 <400> 221

Asp Asn Asn Lys Arg Pro Ser
 1 5

35 <210> 222
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

40 <220>
 <223> Ligante de C4.4a

<400> 222

Cys Ala Ala Phe Asp Asp Ser Leu Asn Gly Pro Val
 1 5 10

45 <210> 223
 <211> 117
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

50 <220>
 <223> Ligante de C4.4a

55 <400> 223

ES 2 632 748 T3

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

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

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

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

Ser Gly Ser Lys Ser Gly Thr Ser Ala Ser Leu Ala Ile Ser Gly Leu
 65 70 75 80

Arg Ser Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ala Ala Phe Asp Asp Ser
 85 90 95

Leu Asn Gly Pro Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly
 100 105 110

Gln

5 <210> 225
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

10 <220>
 <223> Ligante de C4.4a
 <400> 225

Phe Thr Phe Ser Ser Ala Trp Met Ser Trp Val
 1 5 10

15 <210> 226
 <211> 20
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

20 <220>
 <223> Ligante de C4.4a
 <400> 226

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

25 Val Lys Gly Arg
 20

<210> 227
 <211> 10

ES 2 632 748 T3

<212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

5 <220>
 <223> Ligante de C4.4a

<400> 227

Ala Arg Glu Gly Leu Trp Ala Phe Asp Lys
 1 5 10

10 <210> 228
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

15 <220>
 <223> Ligante de C4.4a

<400> 228

20 Ser Gly Ser Ser Ser Asn Ile Gly Ala Gly Tyr Val Val His
 1 5 10

<210> 229
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

25 <220>
 <223> Ligante de C4.4a

30 <400> 229

Asp Asn Asn Gln Arg Pro Ser
 1 5

35 <210> 230
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

40 <220>
 <223> Ligante de C4.4a

<400> 230

Cys Ala Ala Phe Asp Asp Ser Leu Asn Gly Pro Val
 1 5 10

45 <210> 231
 <211> 117
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

50 <220>
 <223> Ligante de C4.4a

55 <400> 231

ES 2 632 748 T3

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 Ala
 20 25 30
 Trp Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ser Tyr Ile Ser Ser Ser Gly Ser Ser 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 Arg Glu Gly Leu Trp Ala Phe Asp Lys Trp Gly Gln Gly Thr Leu
 100 105 110
 Val Thr Val Ser Ser
 115

- <210> 232
- <211> 113
- <212> PRT
- <213> Secuencia Artificial
- <220>
- <223> Ligante de C4.4a
- <400> 232

ES 2 632 748 T3

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

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

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

Leu Ile Tyr Asp Asn Asn Gln Arg Pro Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe
 50 55 60

Ser Gly Ser Lys Ser Gly Thr Ser Ala Ser Leu Ala Ile Ser Gly Leu
 65 70 75 80

Arg Ser Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ala Ala Phe Asp Asp Ser
 85 90 95

Leu Asn Gly Pro Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly
 100 105 110

Gln

5 <210> 233
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

10 <220>
 <223> Ligante de C4.4a
 <400> 233

Phe Thr Phe Ser Ser Ala Trp Met Ser Trp Val
 1 5 10

15 <210> 234
 <211> 20
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

20 <220>
 <223> Ligante de C4.4a
 <400> 234

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

25 Val Lys Gly Arg
 20

<210> 235
 <211> 10
 <212> PRT

ES 2 632 748 T3

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 Ala
 20 25 30
 Trp Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ser Tyr Ile Ser Ser Ser Gly Ser Ser 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 Arg Glu Gly Leu Trp Ala Phe Asp Lys Trp Gly Gln Gly Thr Leu
 100 105 110
 Val Thr Val Ser Ser
 115

- <210> 240
- <211> 113
- <212> PRT
- <213> Secuencia Artificial
- <220>
- <223> Ligante de C4.4a
- <400> 240

ES 2 632 748 T3

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

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

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

Leu Ile Tyr Asp Asn Asn Gln Arg Pro Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe
 50 55 60

Ser Gly Ser Lys Ser Gly Thr Ser Ala Ser Leu Ala Ile Ser Gly Leu
 65 70 75 80

Arg Ser Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ala Ala Phe Asp Asp Arg
 85 90 95

Leu Ser Gly Pro Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly
 100 105 110

Gln

5 <210> 241
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

10 <220>
 <223> Ligante de C4.4a
 <400> 241

Phe Ser Asp Tyr Gln Met Thr Trp Ile
 1 5

15 <210> 242
 <211> 20
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

20 <220>
 <223> Ligante de C4.4a
 <400> 242

Val Ser Gly Val Ser Trp Asn Gly Ala Arg Thr His Tyr Ala Asp Ser
 1 5 10 15

25 Val Lys Gly Arg
 20

<210> 243
 <211> 15
 <212> PRT

ES 2 632 748 T3

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Ligante de C4.4a

5 <400> 243

Ala Lys Gly Asp Tyr Leu Val Tyr Ser Ser Tyr Tyr Phe Lys Ser
 1 5 10 15

10 <210> 244
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

15 <220>
 <223> Ligante de C4.4a

<400> 244

Ser Gly Ser Ser Ser Asn Val Gly Ser Asn Pro Val Asn
 1 5 10

20 <210> 245
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

25 <220>
 <223> Ligante de C4.4a

30 <400> 245

Arg Asn Asn Gln Arg Pro Ser
 1 5

35 <210> 246
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

40 <220>
 <223> Ligante de C4.4a

<400> 246

Cys Ala Ala Trp Asp Asp Arg Leu Asn Gly Trp Thr Gly
 1 5 10

45 <210> 247
 <211> 122
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

50 <220>
 <223> Ligante de C4.4a

<400> 247

55

ES 2 632 748 T3

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 Asp Tyr
 20 25 30

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

Ser Gly Val Ser Trp Asn Gly Ala Arg Thr His 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 Gly Asp Tyr Leu Val Tyr Ser Ser Tyr Tyr Phe Lys Ser Trp
 100 105 110

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

5 <210> 248
 <211> 112
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

10 <220>
 <223> Ligante de C4.4a

<400> 248

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

ES 2 632 748 T3

Arg Val Thr Ile Ser Cys Ser Gly Ser Ser Ser Asn Val Gly Ser Asn
 20 25 30

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

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

Gly Ser Lys Ser Gly Thr Ser Ala Ser Leu Ala Ile Ser Gly Leu Arg
 65 70 75 80

Ser Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ala Ala Trp Asp Asp Arg Leu
 85 90 95

Asn Gly Trp Gly Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly Gln
 100 105 110

5 <210> 249
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

10 <220>
 <223> Ligante de C4.4a
 <400> 249

Phe Thr Phe Ser Ser Tyr Gln Met Thr Trp Ile
 1 5 10

15 <210> 250
 <211> 20
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

20 <220>
 <223> Ligante de C4.4a
 <400> 250

Val Ser Gly Ile Ser Trp Asn Gly Gly Ser Thr His Tyr Ala Asp Ser
 1 5 10 15

25 Val Lys Gly Arg
 20

30 <210> 251
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

35 <220>
 <223> Ligante de C4.4a
 <400> 251

ES 2 632 748 T3

Ala Lys Gly Asp Tyr Leu Val Tyr Ser Ala Tyr Tyr Phe Asp Ser
 1 5 10 15

5 <210> 252
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

10 <220>
 <223> Ligante de C4.4a
 <400> 252

Ser Gly Ser Ser Ser Asn Ile Gly Ser Asn Pro Val Asn
 1 5 10

15 <210> 253
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

20 <220>
 <223> Ligante de C4.4a
 <400> 253

Arg Asn Asn Gln Arg Pro Ser
 1 5

25 <210> 254
 <211> 12
 <212> PRT
 30 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Ligante de C4.4a
 35 <400> 254

Cys Ala Ala Trp Asp Asp Arg Leu Asn Gly Trp Gly
 1 5 10

40 <210> 255
 <211> 122
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

45 <220>
 <223> Ligante de C4.4a
 <400> 255

ES 2 632 748 T3

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

Arg Val Thr Ile Ser Cys Ser Gly Ser Ser Ser Asn Ile Gly Ser Asn
 20 25 30

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

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

Gly Ser Lys Ser Gly Thr Ser Ala Ser Leu Ala Ile Ser Gly Leu Arg
 65 70 75 80

Ser Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ala Ala Trp Asp Asp Arg Leu
 85 90 95

Asn Gly Trp Gly Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly Gln
 100 105 110

5 <210> 257
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

10 <220>
 <223> Ligante de C4.4a
 <400> 257

Phe Thr Phe Ser Asp Tyr Gln Met Thr Trp Ile
 1 5 10

15 <210> 258
 <211> 20
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

20 <220>
 <223> Ligante de C4.4a
 <400> 258

Val Ser Gly Ile Ser Trp Asn Gly Gly Ser Thr His Tyr Ala Asp Ser
 1 5 10 15

25 Val Lys Gly Arg
 20

30 <210> 259
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

ES 2 632 748 T3

<220>
 <223> Ligante de C4.4a

5 <400> 259

Ala Lys Gly Asp Tyr Leu Val Tyr Ser Ser Tyr Tyr Phe Lys Tyr
 1 5 10 15

<210> 260
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

10

<220>
 <223> Ligante de C4.4a

15 <400> 260

Ser Gly Ser Ser Ser Asn Ile Gly Ser Asn Pro Val Asn
 1 5 10

20 <210> 261
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

25 <220>
 <223> Ligante de C4.4a

<400> 261

30 Arg Asn Asn Gln Arg Pro Ser
 1 5

<210> 262
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

35 <220>
 <223> Ligante de C4.4a

40 <400> 262

Cys Ala Ala Trp Asp Asp Arg Leu Asn Gly Trp Ala
 1 5 10

45 <210> 263
 <211> 122
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

50 <220>
 <223> Ligante de C4.4a

<400> 263

ES 2 632 748 T3

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

Arg Val Thr Ile Ser Cys Ser Gly Ser Ser Ser Asn Ile Gly Ser Asn
 20 25 30

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

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

Gly Ser Lys Ser Gly Thr Ser Ala Ser Leu Ala Ile Ser Gly Leu Arg
 65 70 75 80

Ser Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ala Ala Trp Asp Asp Arg Leu
 85 90 95

Asn Gly Trp Ala Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly Gln
 100 105 110

5 <210> 265
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

10 <220>
 <223> Ligante de C4.4a
 <400> 265

Phe Thr Phe Ser Asp Tyr Gln Met Thr Trp Ile
 1 5 10

15 <210> 266
 <211> 20
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

20 <220>
 <223> Ligante de C4.4a
 <400> 266

Val Ser Gly Ile Ser Trp Asn Gly Gly Ser Thr His Tyr Ala Asp Ser
 1 5 10 15

25 Val Lys Gly Arg
 20

30 <210> 267
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

ES 2 632 748 T3

<220>
 <223> Ligante de C4.4a

5 <400> 267

Ala Lys Gly Asp Tyr Leu Val Tyr Ser Ser Tyr Tyr Phe Lys Ser
 1 5 10 15

10 <210> 268
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

15 <220>
 <223> Ligante de C4.4a

<400> 268

Ser Gly Ser Ser Ser Asn Ile Gly Ser Asn Pro Val Asn
 1 5 10

20 <210> 269
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

25 <220>
 <223> Ligante de C4.4a

<400> 269

30 style="padding-left: 100px;">**Arg Asn Asn Gln Arg Pro Ser**
 1 5

35 <210> 270
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

40 <220>
 <223> Ligante de C4.4a

<400> 270

Cys Ala Ala Trp Asp Asp Ser Leu Asn Gly Trp Gly
 1 5 10

45 <210> 271
 <211> 122
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

50 <220>
 <223> Ligante de C4.4a

<400> 271

ES 2 632 748 T3

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 Asp Tyr
 20 25 30
 Gln Met Thr Trp Ile Arg Gln Thr Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ser Gly Ile Ser Trp Asn Gly Gly Ser Thr His 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 Gly Asp Tyr Leu Val Tyr Ser Ser Tyr Tyr Phe Lys Ser Trp
 100 105 110
 Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120

5 <210> 272
 <211> 112
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 10 <220>
 <223> Ligante de C4.4a
 <400> 272

ES 2 632 748 T3

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

Arg Val Thr Ile Ser Cys Ser Gly Ser Ser Ser Asn Ile Gly Ser Asn
 20 25 30

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

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

Gly Ser Lys Ser Gly Thr Ser Ala Ser Leu Ala Ile Ser Gly Leu Arg
 65 70 75 80

Ser Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ala Ala Trp Asp Asp Ser Leu
 85 90 95

Asn Gly Trp Gly Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly Gln
 100 105 110

5 <210> 273
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

10 <220>
 <223> Ligante de C4.4a
 <400> 273

Phe Thr Phe Ser Asp Tyr Gln Met Thr Trp Ile
 1 5 10

15 <210> 274
 <211> 20
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

20 <220>
 <223> Ligante de C4.4a
 <400> 274

Val Ser Gly Ile Ser Trp Asn Gly Gly Ser Thr His Tyr Ala Asp Ser
 1 5 10 15

25 Val Lys Gly Arg
 20

30 <210> 275
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

<220>

ES 2 632 748 T3

<223> Ligante de C4.4a

<400> 275

5 Ala Lys Gly Asp Tyr Leu Val Tyr Lys Ser Tyr Tyr Phe Lys Ser
1 5 10 15

<210> 276

<211> 13

<212> PRT

10 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Ligante de C4.4a

15 <400> 276

Ser Gly Ser Ser Ser Asn Ile Gly Ser Asn Pro Val Asn

1

5

10

<210> 277

20 <211> 7

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

25 <223> Ligante de C4.4a

<400> 277

Arg Asn Asn Gln Arg Pro Ser

1

5

30

<210> 278

<211> 12

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

35

<220>

<223> Ligante de C4.4a

<400> 278

40

Cys Ala Ala Trp Asp Asp Arg Leu Ser Gly Trp Gly

1

5

10

<210> 279

<211> 122

45 <212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Ligante de C4.4a

50

<400> 279

ES 2 632 748 T3

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

Arg Val Thr Ile Ser Cys Ser Gly Ser Ser Ser Asn Ile Gly Ser Asn
 20 25 30

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

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

Gly Ser Lys Ser Gly Thr Ser Ala Ser Leu Ala Ile Ser Gly Leu Arg
 65 70 75 80

Ser Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ala Ala Trp Asp Asp Arg Leu
 85 90 95

Ser Gly Trp Gly Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly Gln
 100 105 110

5 <210> 281
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

10 <220>
 <223> Ligante de C4.4a
 <400> 281

Phe Thr Phe Ser Asp Tyr Gln Met Thr Trp Ile
 1 5 10

15 <210> 282
 <211> 20
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

20 <220>
 <223> Ligante de C4.4a
 <400> 282

Val Ser Gly Ile Ser Trp Asn Gly Gly Ser Thr His Tyr Ala Asp Ser
 1 5 10 15

25 Val Lys Gly Arg
 20

30 <210> 283
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

ES 2 632 748 T3

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 Asp Tyr
 20 25 30
 Gln Met Thr Trp Ile Arg Gln Thr Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ser Gly Ile Ser Trp Asn Gly Gly Ser Thr His 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 Gly Asp Tyr Leu Val Tyr Ser Ser Tyr Tyr Phe Lys Ser Trp
 100 105 110
 Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 288
 <211> 112
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Ligante de C4.4a

<400> 288

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

ES 2 632 748 T3

35

40

45

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

Gly Ser Lys Ser Gly Thr Ser Ala Ser Leu Ala Ile Ser Gly Leu Arg
65 70 75 80

Ser Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ala Ala Trp Asp Asp Arg Leu
85 90 95

Ser Gly Trp Gly Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly Gln
100 105 110

<210> 289
<211> 11
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

5

<220>
<223> Ligante de C4.4a

10

<400> 289

Phe Thr Phe Ser Asp Tyr Gln Met Thr Trp Ile
1 5 10

15

<210> 290
<211> 20
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

20

<220>
<223> Ligante de C4.4a

<400> 290

Val Ser Gly Ile Ser Trp Asn Gly Gly Ser Thr His Tyr Ala Asp Ser
1 5 10 15

25

Val Lys Gly Arg
20

<210> 291
<211> 15
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

30

<220>
<223> Ligante de C4.4a

35

<400> 291

Ala Lys Gly Asp Tyr Leu Val Tyr Lys Ser Tyr Tyr Phe Lys Ser
1 5 10 15

ES 2 632 748 T3

5 <210> 292
<211> 13
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

10 <220>
<223> Ligante de C4.4a

<400> 292
Ser Gly Ser Ser Ser Asn Ile Gly Ser Asn Pro Val Asn
1 5 10

15 <210> 293
<211> 7
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

20 <220>
<223> Ligante de C4.4a

<400> 293
Arg Asn Asn Gln Arg Pro Ser
1 5

25 <210> 294
<211> 12
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

30 <220>
<223> Ligante de C4.4a

<400> 294
Cys Ala Ala Trp Asp Asp Ser Leu Asn Gly Trp Gly
1 5 10

35 <210> 295
<211> 122
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

40 <220>
<223> Ligante de C4.4a

45 <400> 295

ES 2 632 748 T3

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 Asp Tyr
 20 25 30
 Gln Met Thr Trp Ile Arg Gln Thr Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ser Gly Ile Ser Trp Asn Gly Gly Ser Thr His 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 Gly Asp Tyr Leu Val Tyr Lys Ser Tyr Tyr Phe Lys Ser Trp
 100 105 110
 Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120

5 <210> 296
 <211> 112
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> Ligante de C4.4a
 10 <400> 296

ES 2 632 748 T3

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

Arg Val Thr Ile Ser Cys Ser Gly Ser Ser Ser Asn Ile Gly Ser Asn
 20 25 30

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

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

Gly Ser Lys Ser Gly Thr Ser Ala Ser Leu Ala Ile Ser Gly Leu Arg
 65 70 75 80

Ser Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ala Ala Trp Asp Asp Ser Leu
 85 90 95

Asn Gly Trp Gly Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly Gln
 100 105 110

5 <210> 297
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

10 <220>
 <223> Secuencia consenso para M20 D02 S-A obtenida de CDR H1

<220>
 <221> VARIANTE
 <222> (3)..(3)
 <223> X = D o S

15 <400> 297

Phe Ser Xaa Tyr Gln Met Thr Trp Ile
 1 5

20 <210> 298
 <211> 20
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

25 <220>
 <223> Secuencia consenso para M20 D02 S-A obtenida de CDRH2

<220>
 <221> VARIANTE
 <222> (4)..(4)
 <223> X = V o I

35 <211>
 <221> VARIANTE
 <222> (9)..(9)
 <223> X = A o G

<211>

ES 2 632 748 T3

<221> VARIANTE
 <222> (10)..(10)
 <223> X = R o S

5 <400> 298

Val Ser Gly Xaa Ser Trp Asn Gly Xaa Xaa Thr His Tyr Ala Asp Ser
 1 5 10 15

Val Lys Gly Arg
 20

10 <210> 299
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

15 <220>
 <223> consenso para M20 D02 S-A obtenida de CDRH3

<220>
 <221> VARIANTE
 <222> (9)..(9)
 20 <223> X = S, K, o R

<220>
 <221> VARIANTE
 <222> (10)..(10)
 25 <223> X = A, S o R

<220>
 <221> VARIANTE
 <222> (14)..(14)
 30 <223> X = D, K, E o R

<220>
 <221> VARIANTE
 <222> (15)..(15)
 35 <223> X = S o Y

<400> 299

Ala Lys Gly Asp Tyr Leu Val Tyr Xaa Xaa Tyr Tyr Phe Xaa Xaa
 1 5 10 15

40 <210> 300
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

45 <220>
 <223> Secuencia consenso obtenida de CDRL1 de M20 D02 S-A

<220>
 <221> VARIANTE
 <222> (7)..(7)
 50 <223> X = V o I

55 <400> 300

Ser Gly Ser Ser Ser Asn Xaa Gly Ser Asn Pro Val Asn
 1 5 10

ES 2 632 748 T3

<210> 301
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 5
 <220>
 <223> Secuencia consenso obtenida de CDR L3 obtenida de M20 D02 S-A
 10
 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> (3)..(3)
 <223> X = A, Q o R
 15
 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> (5)..(5)
 <223> X = D o G
 20
 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> (7)..(7)
 <223> X = R o S
 25
 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> (9)..(9)
 <223> X = N, W o S
 30
 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> (12)..(12)
 <223> X = V, A o G
 35
 <400> 301
 Cys Ala Xaa Trp Xaa Asp Xaa Leu Xaa Gly Trp Xaa
 1 5 10
 40
 <210> 302
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 45
 <220>
 <223> Secuencia consenso obtenida de CDR H1 de M31 B01
 50
 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> (3)..(3)
 <223> X = N o S
 55
 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> (4)..(4)
 <223> X = A o Y
 <400> 302
 Phe Ser Xaa Xaa Trp Met Ser Trp Val
 1 5
 60
 <210> 303
 <211> 20
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

ES 2 632 748 T3

<220>
 <223> Secuencia consenso obtenida de CDR H2 de M31 B01

5 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> (10)..(10)
 <223> X = T o S

10 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> (11)..(11)
 <223> X = I o T

15 <400> 303

Val Ser Tyr Ile Ser Ser Ser Gly Ser Xaa Xaa Tyr Tyr Ala Asp Ser
 1 5 10 15

Val Lys Gly Arg
 20

20 <210> 304
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

25 <220>
 <223> Secuencia consenso obtenida de CDR H3 M31 B01

30 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> (10)..(10)
 <223> X = Y, K, G, W o N

Ala Arg Glu Gly Leu Trp Ala Phe Asp Xaa
 1 5 10

35 <210> 305
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

40 <220>
 <223> Secuencia consenso obtenida de M31 B01 de CDR L1

45 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> (1)..(1)
 <223> X = T o S

50 <400> 305

Xaa Gly Ser Ser Ser Asn Ile Gly Ala Gly Tyr Val Val His
 1 5 10

55 <210> 306
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Secuencia consenso obtenida de CDR L2 de M31 B01

ES 2 632 748 T3

<220>
 <221> VARIANTE
 <222> (4)..(4)
 <223> X = K o Q
 5
 <400> 306

Asp Asn Asn Xaa Arg Pro Ser
1 5

10 <210> 307
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

15 <220>
 <223> Secuencia consenso obtenida de CDR L3 de M31 B01

20 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> (4)..(4)
 <223> X = W, E, F o Y

25 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> (7)..(7)
 <223> X = R, S o M

30 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> (9)..(9)
 <223> X = N, K o S

35 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> (10)..(10)
 <223> X = G o R

40 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> (11)..(11)
 <223> X = P o A
 <400> 307

Cys Ala Ala Xaa Asp Asp Xaa Leu Xaa Xaa Xaa Val
1 5 10

45 <210> 308
 <211> 351
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Ligante de C4.4a

55 <400> 308

ES 2 632 748 T3

gaggtgcagc tgctggagag cggggggggg ctggtgcagc cgggggggag cctgcgcctg 60
 agctgcgcgg cgagcgggtt tacctttagc aacgcgtgga tgagctgggt gcgccaggcg 120
 ccggggaaaag ggctggagtg ggtgagctat attagcagca gcgggagcac catttattat 180
 gcggatagcg tgaagggcg ctttaccatt agccgcgata acagcaaaaa caccctgtat 240
 ctgcagatga acagcctgcg cgcggaggat accgcggtgt attattgcgc gcgcgagggg 300
 ctgtgggcgt ttgataaatg ggggcagggg accctggtga ccgtgaccag c 351

5 <210> 309
 <211> 339
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

10 <220>
 <223> Ligante de C4.4a

<400> 309

cagagcgtgc tgaccagcc gccgagcgcg agcgggacc cggggcagcg cgtgaccatt 60
 agctgcaccg ggagcagcag caacattggg gcggggtatg tgggtcattg gtatcagcag 120
 ctgccgggga ccgcgccgaa actgctgatt tatgataaca acaaacgcc gagcgggggtg 180
 ccggatcgct ttagcgggag caaaagcggg accagcgcga gcctggcgat tagcgggctg 240
 cgcagcaggg atgaggcgga ttattattgc gcggcgtatg atgatagcct gaaagggccg 300
 gtgtttgggg gggggaccaa actgaccgtg ctggggcag 339

15 <210> 310
 <211> 351
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

20 <220>
 <223> Ligante de C4.4a

<400> 310

gaggtgcagc tgctggagag cggggggggg ctggtgcagc cgggggggag cctgcgcctg 60
 agctgcgcgg cgagcgggtt tacctttagc aacgcgtgga tgagctgggt gcgccaggcg 120
 ccggggaaaag ggctggagtg ggtgagctat attagcagca gcgggagcac catttattat 180
 gcggatagcg tgaagggcg ctttaccatt agccgcgata acagcaaaaa caccctgtat 240
 ctgcagatga acagcctgcg cgcggaggat accgcggtgt attattgcgc gcgcgagggg 300
 ctgtgggcgt ttgataaatg ggggcagggg accctggtga ccgtgaccag c 351

25 <210> 311
 <211> 339
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

30 <220>
 <223> Ligante de C4.4a

35 <400> 311

ES 2 632 748 T3

cagagcgtgc tgaccagcc gccgagcgtg agcggggcgc cggggcagcg cgtgaccatt 60
 agctgcaccg ggagcagcag caacattggg gcggggtatg tggcgcattg gtatcagcag 120
 ctgccgggga ccgcgccgaa actgctgatt tatgataaca acaaaccgcc gagcgggggtg 180
 ccggatcgct ttagcgggag caaaagcggg accagcgcga gcctggcgat tagcgggctg 240
 cgcagcgagg atgagggcga ttattattgc gcggcgtttg atgatagcct gaacggggccg 300
 gtgtttgggg gggggaccaa actgaccgtg ctggggcag 339

5 <210> 312
 <211> 351
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

10 <220>
 <223> Ligante de C4.4a
 <400> 312

gaggtgcagc tgctggagag cggggggggg ctggtgcagc cgggggggag cctgcccctg 60
 agctgcccgg cgagcggggt tacctttagc aacgcgtgga tgagctgggt gcgccaggcg 120
 ccggggaaag ggctggagtg ggtgagctat attagcagca gcgggagcac catttattat 180
 gcggatagcg tgaagggcg ctttaccatt agccgcgata acagcaaaa caccctgtat 240
 ctgcagatga acagcctgcg cgcggaggat accgcggtgt attattgcgc gcgcgagggg 300
 ctgtgggcgt ttgataaatg ggggcagggg accctggtga ccgtgaccag c 351

15 <210> 313
 <211> 339
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

20 <220>
 <223> Ligante de C4.4a
 <400> 313

cagagcgtgc tgaccagcc gccgagcgtg agcggggcgc cggggcagcg cgtgaccatt 60
 agctgcaccg ggagcagcag caacattggg gcggggtatg tggcgcattg gtatcagcag 120
 ctgccgggga ccgcgccgaa actgctgatt tatgataaca acaaaccgcc gagcgggggtg 180
 ccggatcgct ttagcgggag caaaagcggg accagcgcga gcctggcgat tagcgggctg 240
 cgcagcgagg atgagggcga ttattattgc gcggcgtttg atgatagcct gaacggggccg 300
 gtgtttgggg gggggaccaa actgaccgtg ctggggcag 339

30 <210> 314
 <211> 351
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

35 <220>
 <223> Ligante de C4.4a
 <400> 314

ES 2 632 748 T3

gaggtgcagc tgctggagag cggggggggg ctggtgcagc cgggggggag cctgcgcctg 60
 agctgcgcgg cgagcgggtt tacctttagc agcgcgtgga tgagctgggt gcgccaggcg 120
 ccggggaaag ggctggagtg ggtgagctat attagcagca gcgggagcag cacctattat 180
 gcggatagcg tgaagggcg ctttaccatt agccgcgata acagcaaaaa caccctgtat 240
 ctgcagatga acagcctgcg cgcggaggat accgcggtgt attattgcgc gcgcgagggg 300
 ctgtggcgt ttgattggtg ggggcagggg accctggtga ccgtgaccag c 351

5 <210> 315
 <211> 339
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

10 <220>
 <223> Ligante de C4.4a

<400> 315
 cagagcgtgc tgaccagcc gccgagcgcg agcgggaccc cggggcagcg cgtgaccatt 60
 agctgcagcg ggagcagcag caacattggg gcggggtatg tggcgcattg gtatcagcag 120
 ctgccgggga ccgcgccgaa actgctgatt tatgataaca accagcgcgc gagcgggggtg 180
 ccggatcgc ttagcgggag caaaagcggg accagcgcga gcctggcgat tagcgggctg 240
 cgcagcagag atgagcggga ttattattgc gcggcgtatg atgatagcct gagcggggccg 300
 gtgtttgggg gggggaccaa actgaccgtg ctggggcag 339

15 <210> 316
 <211> 351
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

20 <220>
 <223> Ligante de C4.4a

25 <400> 316
 gaggtgcagc tgctggagag cggggggggg ctggtgcagc cgggggggag cctgcgcctg 60
 agctgcgcgg cgagcgggtt tacctttagc aacgcgtgga tgagctgggt gcgccaggcg 120
 ccggggaaag ggctggagtg ggtgagctat attagcagca gcgggagcac catttattat 180
 gcggatagcg tgaagggcg ctttaccatt agccgcgata acagcaaaaa caccctgtat 240
 ctgcagatga acagcctgcg cgcggaggat accgcggtgt attattgcgc gcgcgagggg 300
 ctgtggcgt ttgattattg ggggcagggg accctggtga ccgtgaccag c 351

30 <210> 317
 <211> 339
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

35 <220>
 <223> Ligante de C4.4a

ES 2 632 748 T3

<400> 317

```

cagagcgtgc tgaccagcc gccgagcgcg agcgggaccc cggggcagcg cgtgaccatt      60
agctgcagcg ggagcagcag caacattggg gcggggtatg tggcgcattg gtatcagcag      120
ctgccgggga ccgcgccgaa actgctgatt tatgataaca accagcgcgc gagcgggggtg      180
ccggatcgct ttagcgggag caaaagcggg accagcgcga gcctggcgat tagcgggctg      240
cgcagcaggg atgaggcgga ttattattgc gcggcgtatg atgatagcct gaacggggccg      300
gtgtttgggg gggggaccaa actgaccgtg ctggggcag      339

```

5 <210> 318
 <211> 351
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

10 <220>
 <223> Ligante de C4.4a

<400> 318

```

gaggtgcagc tgctggagag cggggggggg ctggtgcagc cgggggggag cctgcgcctg      60
agctgcgcgg cgagcggggt taccttagc agcgcgtgga tgagctgggt gcgccaggcg      120
ccgggaaaag ggctggagt ggtgagctat attagcagca gcgggagcag cacctattat      180
gcggatagcg taaaagggcg ctttaccatt agccgcgata acagcaaaa caccctgtat      240
ctgcagatga acagcctgcg cgcggaggat accgcgggtg attattgcgc gcgcgagggg      300
ctgtgggcgt ttgattattg ggggcagggg accctggtga ccgtgagcag c      351

```

15 <210> 319
 <211> 339
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Ligante de C4.4a

25 <400> 319

```

gagagcgtgc tgaccagcc gccgagcgcg agcgggaccc cggggcagcg cgtgaccatt      60
agctgcagcg ggagcagcag caacattggg gcggggtatg tggcgcattg gtatcagcag      120
ctgccgggga ccgcgccgaa actgctgatt tatgataaca accagcgcgc gagcgggggtg      180
ccggatcgct ttagcgggag caaaagcggg accagcgcga gcctggcgat tagcgggctg      240
cgcagcaggg atgaggcgga ttattattgc gcggcgtggg atgatagcct gaacggggccg      300
gtgtttgggg gggggaccaa actgaccgtg ctggggcag      339

```

30 <210> 320
 <211> 351
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

35 <220>
 <223> Ligante de C4.4a

ES 2 632 748 T3

<400> 320

```

gaggtgcagc tgctggagag cggggggggg ctggtgcagc cgggggggag cctgcccctg      60
agctgcgcgg cgagcgggtt tacctttagc aacgcgtgga tgagctgggt gcgccaggcg      120
ccggggaaaag ggctggagtg ggtgagctat attagcagca gcgggagcac catttattat      180
gcggatagcg tgaagggcg ctttaccatt agccgcgata acagcaaaaa caccctgtat      240
ctgcagatga acagcctgcg cgcggaggat accgcggtgt attattgcgc gcgcgagggg      300
ctgtgggcgt ttgattattg ggggcagggg accctggtga ccgtgagcag c              351

```

5 <210> 321
 <211> 339
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

10 <220>
 <223> Ligante de C4.4a

<400> 321

```

gagagcgtgc tgaccagcc gccgagcgtg agcggggcgc cggggcagcg cgtgaccatt      60
agctgcaccg ggagcagcag caacattggg gcggggtatg tggcgcattg gtatcagcag      120
ctgccgggga ccgcgccgaa actgctgatt tatgataaca acaaaccgcc gagcggggtg      180
ccggatcgct ttagcgggag caaaagcggg accagcgcga gcctggcgat tagcgggctg      240
cgcagcagag atgagggcga ttattattgc gcggcgtatg atgatcgct gaacgggccc      300
gtgtttgggg gggggaccaa actgaccgtg ctggggcag              339

```

15 <210> 322
 <211> 351
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Ligante de C4.4a

25 <400> 322

```

gaggtgcagc tgctggagag cggggggggg ctggtgcagc cgggggggag cctgcccctg      60
agctgcgcgg cgagcgggtt tacctttagc agcgcgtgga tgagctgggt gcgccaggcg      120
ccggggaaaag ggctggagtg ggtgagctat attagcagca gcgggagcag cacctattat      180
gcggatagcg tgaagggcg ctttaccatt agccgcgata acagcaaaaa caccctgtat      240
ctgcagatga acagcctgcg cgcggaggat accgcggtgt attattgcgc gcgcgagggg      300
ctgtgggcgt ttgatgggtg ggggcagggg accctggtga ccgtgagcag c              351

```

30 <210> 323
 <211> 339
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

35 <220>
 <223> Ligante de C4.4a

ES 2 632 748 T3

<400> 323

```

cagagcgtgc tgaccagcc gccgagcgcg agcgggaccc cggggcagcg cgtgaccatt      60
agctgcagcg ggagcagcag caacattggg gcggggtatg tggcgcattg gtatcagcag      120
ctgccgggga ccgcgccgaa actgctgatt tatgataaca accagcgcgc gagcggggtg      180
ccgatcgct ttagcgggag caaaagcggg accagcgcga gcctggcgat tagcgggctg      240
cgcagcgagg atgaggcgga ttattattgc gcggcgtatg atgatagcct gaaccgcccg      300
gtgtttgggg gggggaccaa actgaccgtg ctggggcag      339
    
```

5 <210> 324
 <211> 351
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

10 <220>
 <223> Ligante de C4.4a

<400> 324

```

gaggtgcagc tgctggagag cggggggggg ctggtgcagc cgggggggag cctgcgcctg      60
agctgcgcgg cgagcgggtt taccttagc aacgcgtgga tgagctgggt gcgccaggcg      120
ccggggaaag ggctggagtg ggtgagctat attagcagca gcgggagcac catttattat      180
gcgatagcg taaagggcg cttaccatt agccgcgata acagcaaaaa caccctgtat      240
ctgcagatga acagcctgcg cgcggaggat accgcggtgt attattgcgc gcgcgagggg      300
ctgtgggcgt ttgattattg ggggcagggg accctggtga ccgtgagcag c      351
    
```

15 <210> 325
 <211> 339
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Ligante de C4.4a

25 <400> 325

```

cagagcgtgc tgaccagcc gccgagcgtg agcggggcgc cggggcagcg cgtgaccatt      60
agctgcaccg ggagcagcag caacattggg gcggggtatg tggcgcattg gtatcagcag      120
ctgccgggga ccgcgccgaa actgctgatt tatgataaca acaaacgcc gagcggggtg      180
ccgatcgct ttagcgggag caaaagcggg accagcgcga gcctggcgat tagcgggctg      240
cgcagcgagg atgaggcgga ttattattgc gcggcgtttg atgatagcct gaaccggccg      300
gtgtttgggg gggggaccaa actgaccgtg ctggggcag      339
    
```

30 <210> 326
 <211> 351
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

35 <220>
 <223> Ligante de C4.4a

ES 2 632 748 T3

<400> 326

```

gaggtgcagc tgctggagag cggggggggg ctggtgcagc cgggggggag cctgcgcctg      60
agctgcgcgg cgagcgggtt tacctttagc agcgcgtgga tgagctgggt gcgccaggcg      120
ccggggaaaag ggctggagtg ggtgagctat attagcagca gcgggagcag cacctattat      180
gcggatagcg tgaagggcg ctttaccatt agccgcgata acagcaaaaa caccctgtat      240
ctgcagatga acagcctgcg cgcggaggat accgcggtgt attattgcgc gcgcgagggg      300
ctgtgggcgt ttgataaatg ggggcagggg accctggtga ccgtgaccag c              351
    
```

5 <210> 327
 <211> 339
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

10 <220>
 <223> Ligante de C4.4a

<400> 327

```

cagagcgtgc tgaccagcc gccgagcgcg agcgggaccc cggggcagcg cgtgaccatt      60
agctgcaccg ggagcagcag caacattggg gcgggggatg tggtgcattg gtatcagcag      120
ctgccgggga ccgcgcgaa actgctgatt tatgataaca acaaacgccg gagcgggggtg      180
ccggatcgct ttagcgggag caaaagcggg accagcgcga gcctggcgat tagcgggctg      240
cgcagcgagg atgagggcga ttattattgc gcggcgtttg atgatagcct gaacggggccg      300
gtgtttgggg gggggaccaa actgaccgtg ctggggcag              339
    
```

15 <210> 328
 <211> 351
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Ligante de C4.4a

25 <400> 328

```

gaggtgcagc tgctggagag cggggggggg ctggtgcagc cgggggggag cctgcgcctg      60
agctgcgcgg cgagcgggtt tacctttagc agcgcgtgga tgagctgggt gcgccaggcg      120
ccggggaaaag ggctggagtg ggtgagctat attagcagca gcgggagcag cacctattat      180
gcggatagcg tgaagggcg ctttaccatt agccgcgata acagcaaaaa caccctgtat      240
ctgcagatga acagcctgcg cgcggaggat accgcggtgt attattgcgc gcgcgagggg      300
ctgtgggcgt ttgataaatg ggggcagggg accctggtga ccgtgagcag c              351
    
```

30 <210> 329
 <211> 339
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

35 <220>
 <223> C4.4a

ES 2 632 748 T3

<400> 329

```

cagagcgtgc tgaccagcc gccgagcgcg agcgggaccc cggggcagcg cgtgaccatt      60
agctgcagcg ggagcagcag caacattggg gcggggtatg tggcgcattg gtatcagcag      120
ctgccgggga ccgcgccgaa actgctgatt tatgataaca accagcgcgc gagcggggtg      180
ccggatcgct ttagcgggag caaaagcggg accagcgcga gcctggcgat tagcgggctg      240
cgcagcagag atgagggcga ttattattgc gcggcgtttg atgatagcct gaacgggccc      300
gtgtttgggg gggggaccaa actgaccgtg ctggggcag      339
    
```

5 <210> 330
 <211> 351
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

10 <220>
 <223> Ligante de C4.4a

<400> 330

```

gaggtgcagc tgctggagag cggggggggg ctggtgcagc cgggggggag cctgcgcctg      60
agctgcgcgg cgagcggggt taccttagc agcgcgtgga tgagctgggt gcgccagcgg      120
ccgggaaag ggctggagtg ggtgagctat attagcagca gcgggagcag cacctattat      180
gcggatagcg taaagggcgc ctttaccatt agccgcgata acagcaaaa caccctgtat      240
ctgcagatga acagcctgcg cgcggaggat accgcgggtg attattgcgc gcgcgagggg      300
ctgtgggctg ttgataaatg ggggcagggg accctgggtg ccgtgagcag c      351
    
```

15 <210> 331
 <211> 339
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Ligante de C4.4a

25 <400> 331

```

cagagcgtgc tgaccagcc gccgagcgcg agcgggaccc cggggcagcg cgtgaccatt      60
agctgcagcg ggagcagcag caacattggg gcggggtatg tggcgcattg gtatcagcag      120
ctgccgggga ccgcgccgaa actgctgatt tatgataaca accagcgcgc gagcggggtg      180
ccggatcgct ttagcgggag caaaagcggg accagcgcga gcctggcgat tagcgggctg      240
cgcagcagag atgagggcga ttattattgc gcggcgtttg atgatagcct gagcgggccc      300
gtgtttgggg gggggaccaa actgaccgtg ctggggcag      339
    
```

30 <210> 332
 <211> 366
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

35 <220>
 <223> Ligante de C4.4a

ES 2 632 748 T3

<400> 332

```

gaggtgcagc tgctggagag cggggggggg ctggtgcagc cgggggggag cctgcgcctg      60
agctgcgcgg cgagcgggtt tacctttagc gattatcaga tgacctggat tcgccagacc      120
ccggggaaag ggctggagtg ggtgagcggg gtgagctgga acggggcgcg caccattat      180
gcggatagcg tgaaagggcg ctttaccatt agccgcgata acagcaaaaa caccctgtat      240
ctgcagatga acagcctgcg cgcggaggat accgcggtgt attattgcgc gaaaggggat      300
tatctggtgt atagcagcta ttatthtaaa agctgggggc aggggaccct ggtgaccgtg      360
accagc

```

5 <210> 333
 <211> 336
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

10 <220>
 <223> Ligante de C4.4a

<400> 333

```

cagagcgtgc tgaccagcc gccgagcgcg agcgggaccc cggggcagcg cgtgaccatt      60
agctgcagcg ggagcagcag caacgtgggg agcaaccgag tgaactggtg tcagcagctg      120
ccggggaccg cgcgaaaact gctgatttat cgcaacaacc agcggccgag cggggtgccc      180
gatcgcttta gcgggagcaa aagcgggacc agcgcgagcc tggcgattag cgggctgcgc      240
agcaggatg aggcggatta ttattgcgcg gcgtgggatg atgcctgaa cgggtggggg      300
tttggggggg ggaccaaaact gaccgtgctg gggcag

```

15 <210> 334
 <211> 363
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Ligante de C4.4a

25 <400> 334

```

gagcagctgc tggagagcgg gggggggctg gtgcagccgg gggggagcct gcgcctgagc      60
tgcgcggcga gcgggtttac ctttagcagc tatcagatga cctggattcg ccagaccccg      120
gggaaagggc tggagtgggt gagcgggatt agctggaacg gggggagcac ccattatgcg      180
gatagcgtga aagggcgctt taccattagc cgcgataaca gcaaaaacac cctgtatctg      240
cagatgaaca gcctgcgcgc ggaggatacc gcggtgtatt attgcgcgaa aggggattat      300
ctggtgtata gcgcgtatta ttttgatagc tgggggcagg ggaccctggt gaccgtgagc      360
agc

```

30 <210> 335
 <211> 333
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

<220>

ES 2 632 748 T3

<223> Ligante de C4.4a

<400> 335

```

caggtgctga cccagccgcc gagcgcgagc gggaccccgg ggcagcgcgt gaccattagc      60
tgcagcggga gcagcagcaa cattgggagc aaccocgtga actggtatca gcagctgccg      120
gggaccgcgc cgaaactgct gatttatcgc aacaaccagc gcccgagcgg ggtgcccgat      180
cgcttttagcg ggagcaaaaag cgggaccagc gcgagcctgg cgattagcgg gctgcgcagc      240

gaggatgagg cggattatta ttgcgcggcg tgggatgatc gcctgaacgg gtggggggtt      300
5      ggggggggga ccaaactgac cgtgctgggg cag      333

```

<210> 336

<211> 366

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

10

<220>

<223> Ligante de C4.4a

15

<400> 336

```

gaggtgcagc tgctggagag cggggggggg ctggtgcagc cgggggggag cctgcgcctg      60
agctgcgcgg cgagcggggt tacctttagc gattatcaga tgacctggat tgcacagacc      120
ccggggaaag ggctggagtg ggtgagcggg attagctgga acggggggag caccattat      180
gcggatagcg tgaaggggcg ctttaccatt agcgcgata acagcaaaa caccctgtat      240
ctgcagatga acagcctgcg cgcggaggat accgcgggtg attattgccc gaaaggggat      300
tatctggtgt atagcagcta ttattttaa tattgggggc aggggaccct ggtgaccgtg      360
agcagc      366

```

<210> 337

<211> 336

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

20

<220>

<223> Ligante de C4.4a

25

<400> 337

```

cagagcgtgc tgaccagcc gccgagcgcg agcgggacc cggggcagcg cgtgaccatt      60
agctgcagcg ggagcagcag caacattggg agcaaccocg tgaactggta tcagcagctg      120
ccggggaccg cgccgaaact gctgatttat cgcaacaacc agcgcocgag cggggtgccg      180
gatcgcttta gcgggagcaa aagcgggacc agcgcgagcc tggcgattag cgggctgcgc      240
agcagggatg aggcggatta ttattgcgcg gcgtgggatg atcgccgaa cgggtggggc      300
tttggggggg ggaccaaact gaccgtgctg gggcag      336

```

30

<210> 338

<211> 366

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

ES 2 632 748 T3

	<220>		
	<223> Ligante de C4.4a		
5	<400> 338		
	gaggtgcagc tgctggagag cggggggggg ctggtgcagc cgggggggag cctgcgcctg	60	
	agctgcgcgg cgagcgggtt tacctttagc gattatcaga tgacctggat tcgccagacc	120	
	ccggggaaag ggctggagtg ggtgagcggg attagctgga acggggggag caccattat	180	
	gcggatagcg tgaaagggcg ctttaccatt agccgcgata acagcaaaaa caccctgtat	240	
	ctgcagatga acagcctgcg cgcggaggat accgcggtgt attattgcgc gaaaggggat	300	
	tatctggtgt atagcagcta ttattttaa agctgggggc aggggaccct ggtgaccctg	360	
	agcagc	366	
10	<210> 339		
	<211> 336		
	<212> ADN		
	<213> Secuencia Artificial		
15	<220>		
	<223> Ligante de C4.4a		
	<400> 339		
	cagagcgtgc tgacctagcc gccgagcgcg agcgggaccc cggggcagcg cgtgaccatt	60	
	agctgcagcg ggagcagcag caacattggg agcaaccocgg tgaactggta tcagcagctg	120	
	ccggggaccg cgccgaaact gctgatttat cgcaacaacc agcgcocgag cggggtgccg	180	
	gatcgcttta gcgggagcaa aagcgggacc agcgcgagcc tggcgattag cgggctgcgc	240	
	agcgaggatg aggcggatta ttattgcgcg gcgtgggatg atagcctgaa cgggtggggg	300	
20	tttggggggg ggaccaaact gaccgtgctg gggcag	336	
	<210> 340		
	<211> 366		
	<212> ADN		
25	<213> Secuencia Artificial		
	<220>		
	<223> Ligante de C4.4a		
30	<400> 340		
	gaggtgcagc tgctggagag cggggggggg ctggtgcagc cgggggggag cctgcgcctg	60	
	agctgcgcgg cgagcgggtt tacctttagc gattatcaga tgacctggat tcgccagacc	120	
	ccggggaaag ggctggagtg ggtgagcggg attagctgga acggggggag caccattat	180	
	gcggatagcg tgaaagggcg ctttaccatt agccgcgata acagcaaaaa caccctgtat	240	
	ctgcagatga acagcctgcg cgcggaggat accgcggtgt attattgcgc gaaaggggat	300	
	tatctggtgt ataaaagcta ttattttaa agctgggggc aggggaccct ggtgaccctg	360	
	agcagc	366	

ES 2 632 748 T3

5 <210> 341
 <211> 336
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Ligante de C4.4a

10 <400> 341

cagagcgtgc tgacccagcc gccgagcgcg agcgggaccc cggggcagcg cgtgaccatt	60
agctgcagcg ggagcagcag caacattggg agcaaccocg tgaactggta tcagcagctg	120
ccggggaccg cggcgaact gctgatttat cgcaacaacc agcgcccagc cggggtgccg	180
gatcgcttta gggggagcaa aagcgggacc agcgcgagcc tggcgattag cgggctgcgc	240
agcagggatg aggcggatta ttattgcgcg gcgtgggatg atcgccctgag cgggtggggg	300
tttggggggg ggaccaaact gaccgtgctg gggcag	336

15 <210> 342
 <211> 366
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Ligante de C4.4a

20 <400> 342

gaggtgcagc tgctggagag cggggggggg ctggtgcagc cgggggggag cctgcgcctg	60
agctgcgcgg cgagcgggtt tacctttagc gattatcaga tgacctgat tcgccagacc	120
ccggggaaag ggctggagtg ggtgagcggg attagctgga acggggggag caccattat	180
gcgtagtagc tgaagggcg ctttaccatt agccgcgata acagcaaaa caccctgtat	240
ctgcagatga acagcctgcg cgcggaggat accgcggtgt attattgcgc gaaaggggat	300
tatctggtgt atagcagcta ttattttaa agctgggggc aggggaccct ggtgaccgtg	360
agcagc	366

25 <210> 343
 <211> 336
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

30 <220>
 <223> Ligante de C4.4a

<400> 343

ES 2 632 748 T3

cagagcgtgc tgaccagcc gccgagcgc agcgggaccc cggggcagcg cgtgaccatt 60
 agctgcagcg ggagcagcag caacattggg agcaaccgg tgaactggta tcagcagctg 120
 ccggggaccg cgccgaaact gctgatttat cgcaacaacc agcggccgag cggggtgccg 180
 gatcgcttta gggggagcaa aagcgggacc agcgcgagcc tggcgattag cgggctgccc 240
 agcgaggatg aggcggatta ttattgcgcg gcgtgggatg atcgctgag cgggtggggg 300
 tttggggggg ggaccaaact gaccgtgctg gggcag 336

5 <210> 344
 <211> 366
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

10 <220>
 <223> Ligante de C4.4a
 <400> 344

gaggtgcagc tgctggagag cggggggggg ctggtgcagc cgggggggag cctgcgcctg 60
 agctgcgcgg cgagcgggtt tacottttagc gattatcaga tgacctggat tcgccagacc 120
 ccggggaaag ggctggagtg ggtgagcggg attagctgga acggggggag caccattat 180
 gcggatagcg tgaagggcg ctttaccatt agccgcgata acagcaaaaa caccctgtat 240
 ctgcagatga acagcctgcg cgcggaggat accgcggtgt attattgcgc gaaaggggat 300
 tatctggtgt ataaaagcta ttattttaa agctgggggc aggggaccct ggtgaccgtg 360
 agcagc 366

15 <210> 345
 <211> 336
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

20 <220>
 <223> Ligante de C4.4a
 <400> 345

cagagcgtgc tgaccagcc gccgagcgc agcgggaccc cggggcagcg cgtgaccatt 60
 agctgcagcg ggagcagcag caacattggg agcaaccgg tgaactggta tcagcagctg 120
 ccggggaccg cgccgaaact gctgatttat cgcaacaacc agcggccgag cggggtgccg 180
 gatcgcttta gggggagcaa aagcgggacc agcgcgagcc tggcgattag cgggctgccc 240
 agcgaggatg aggcggatta ttattgcgcg gcgtgggatg atagcctgaa cgggtggggg 300
 tttggggggg ggaccaaact gaccgtgctg gggcag 336

25

REIVINDICACIONES

1. Un anticuerpo aislado o fragmento de unión a antígeno del mismo que se une de forma específica a los aminoácidos 1 - 85 de la SEQ ID NO:1, en el que dicho anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo se internaliza después de la unión a células que expresan C4.4a, y en el que dicho anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo comprende las secuencias variables de CDR de la cadena pesada:
- 5 H-CDR1 que comprende la SEQ ID NO:45, H-CDR2 que comprende la SEQ ID NO:46 y H-CDR3 que comprende la SEQ ID NO:47, y en el que dicho anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo comprende las secuencias variables de CDR de la cadena ligera:
- 10 L-CDR1 que comprende la SEQ ID NO:48, L-CDR2 que comprende la SEQ ID NO:49, y L-CDR3 que comprende la SEQ ID NO:50.
2. El anticuerpo o fragmento de unión al antígeno de acuerdo con la reivindicación 1 que comprende una secuencia variable de la cadena pesada como se presenta en la SEQ ID NO:33 y una secuencia variable de la cadena ligera como se presenta en la SEQ ID NO:29,
- 15 o una secuencia variable de la cadena pesada como se presenta en la SEQ ID NO:51 y una secuencia variable de la cadena ligera como se presenta en la SEQ ID NO:52.
3. El anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, el cual es un anticuerpo IgG.
4. El fragmento de unión a antígeno de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, el cual es un scFv, Fab, fragmento Fab' o un fragmento F(ab')₂.
- 20 5. El anticuerpo o fragmento de unión a antígeno de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, el cual es un anticuerpo monoclonal o fragmento de unión a antígeno.
6. El anticuerpo o fragmento de unión a antígeno de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, el cual es un anticuerpo humano, humanizado o quimérico, o fragmento de unión a antígeno.
- 25 7. Un conjugado de anticuerpo-fármaco, que comprende un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo de acuerdo con las reivindicaciones 1 a 6.
8. Una secuencia de ácido nucleico aislada que codifica el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno de acuerdo con las reivindicaciones 1 a 6.
9. Un vector que comprende una secuencia de ácido nucleico de acuerdo con la reivindicación 8.
- 30 10. Una célula aislada que expresa un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 - 6 y/o que comprende un ácido nucleico de acuerdo con la reivindicación 8 o un vector de acuerdo con la reivindicación 9.
11. Una célula aislada de acuerdo con la reivindicación 10, en la que dicha célula es una célula procariota o una eucariota.
- 35 12. Un procedimiento de producción de un anticuerpo o fragmento de unión de antígeno de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 - 6, que comprende el cultivo de una célula de acuerdo con la reivindicación 11 y la purificación del anticuerpo o fragmento de unión al antígeno.
13. Un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno de acuerdo con las reivindicaciones 1 - 6 o un conjugado de anticuerpo-fármaco de acuerdo con la reivindicación 7 para su uso como un medicamento.
- 40 14. Un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno de acuerdo con las reivindicaciones 1 - 6 para su uso como un agente diagnóstico.
15. Un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno de acuerdo con las reivindicaciones 1 - 6 o un conjugado de anticuerpo-fármaco de acuerdo con la reivindicación 7 para su uso como un medicamento para el tratamiento del cáncer.
- 45 16. Una composición farmacéutica que comprende un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno de acuerdo con las reivindicaciones 1 - 6 o un conjugado de anticuerpo-fármaco de acuerdo con la reivindicación 7.
17. Una combinación de una composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 16 y uno o más compuestos terapéuticamente activos.

Figura 1

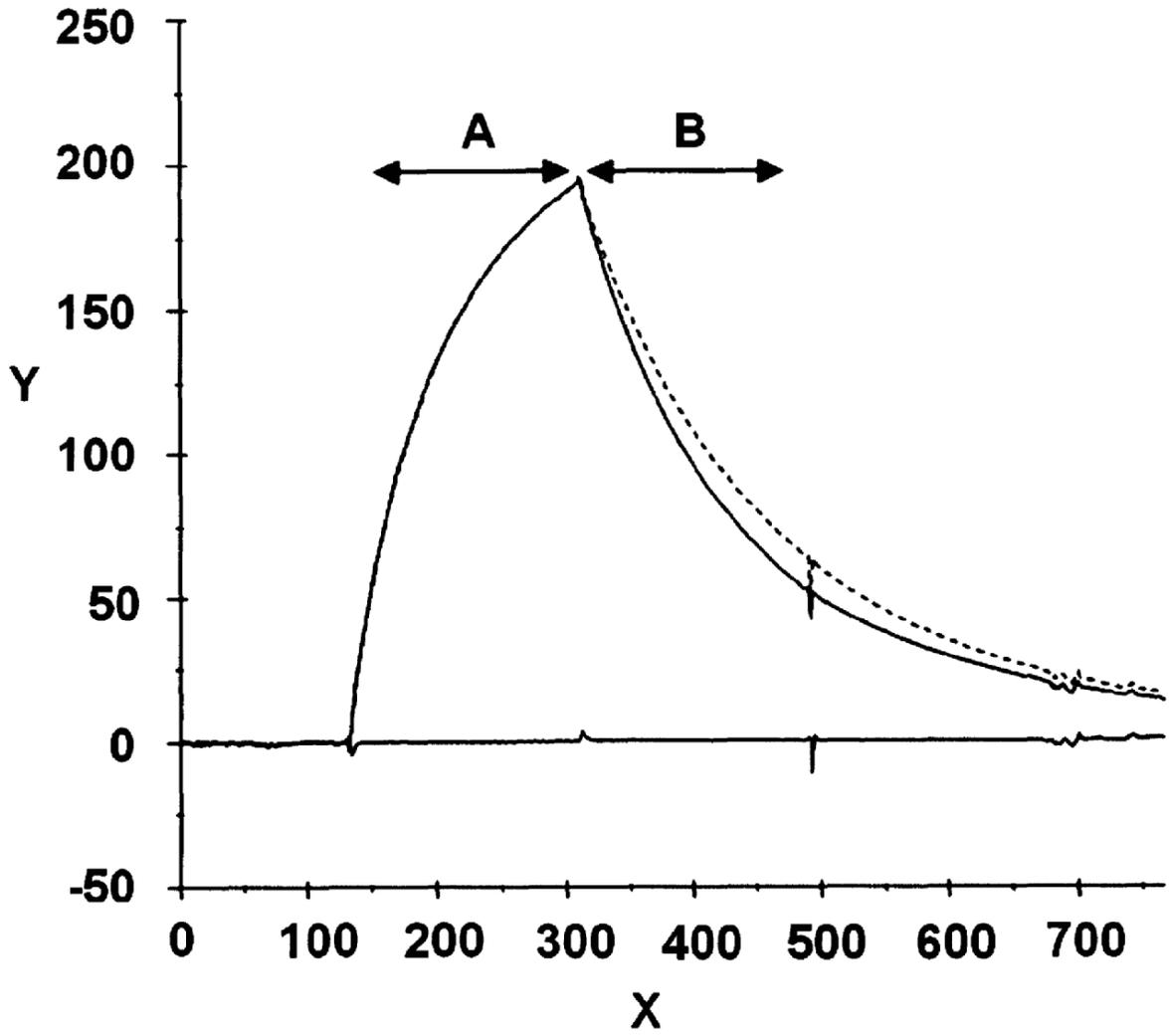


Figura 2

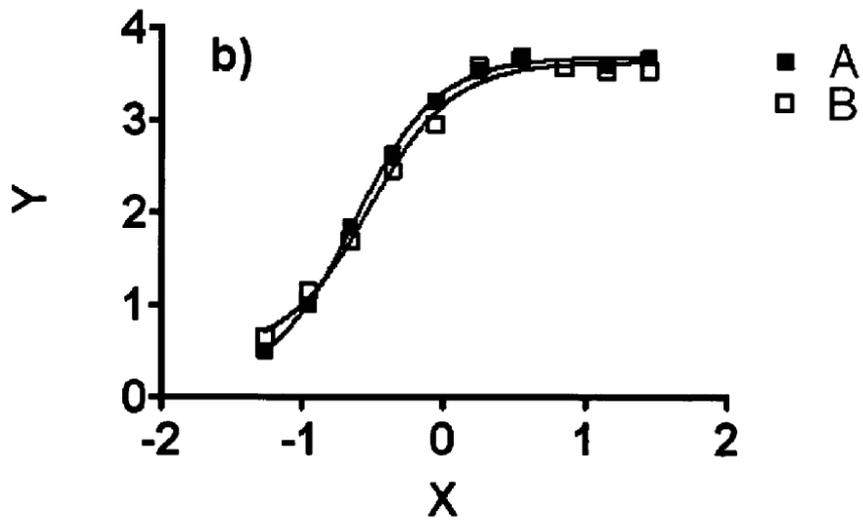
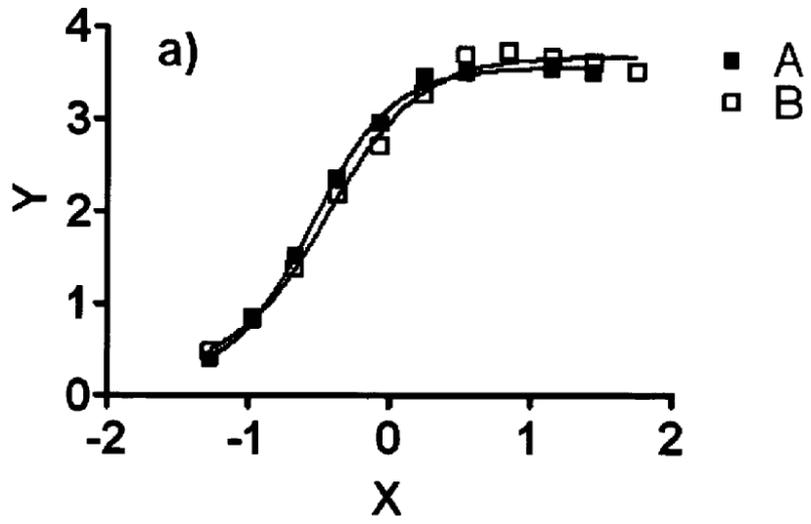


Figura 3

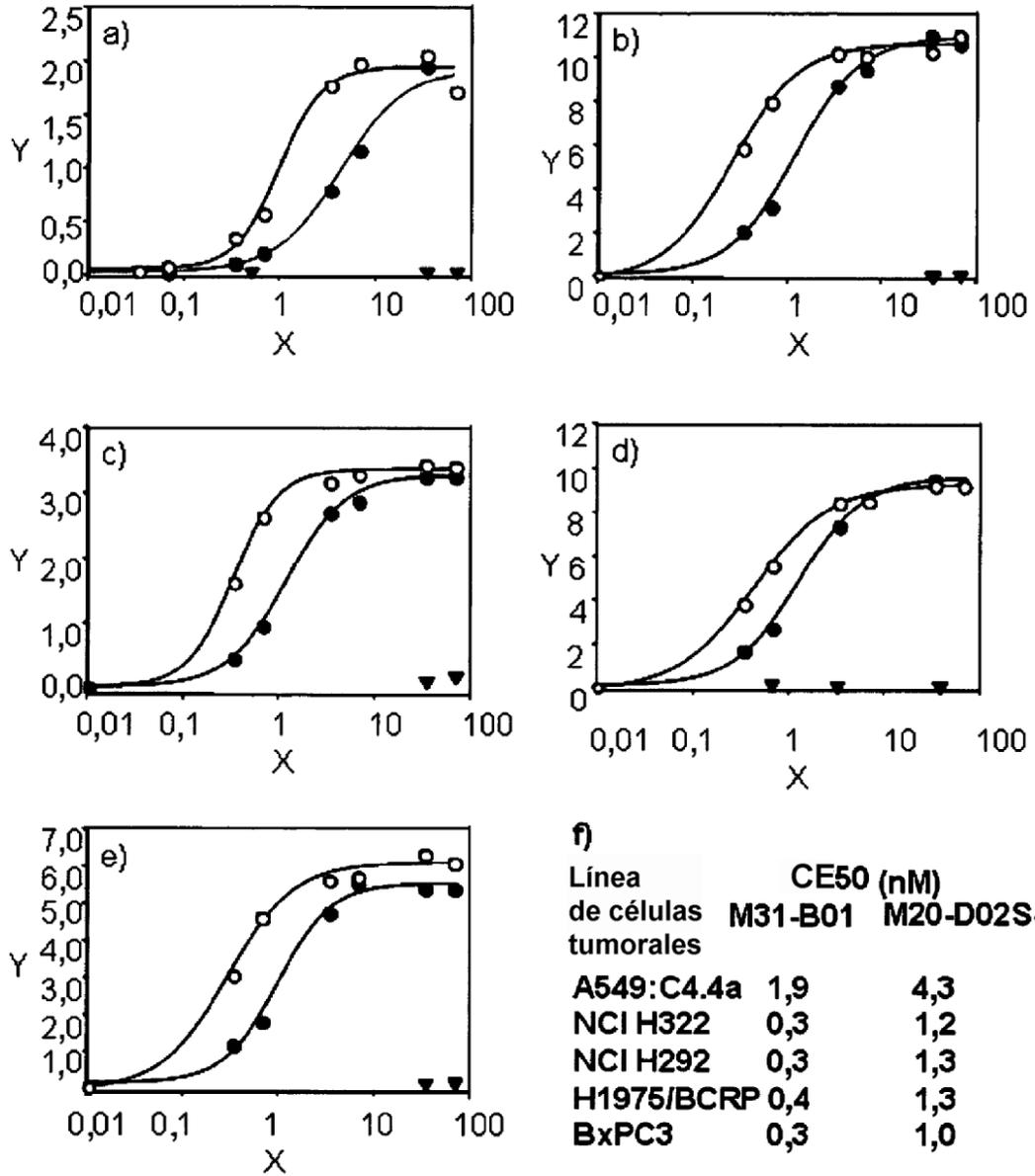


Figura 4

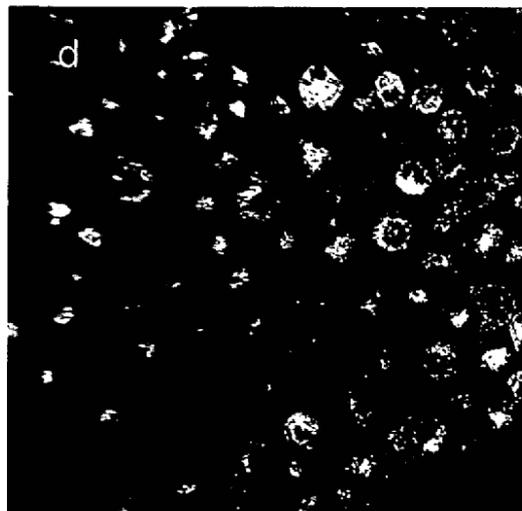
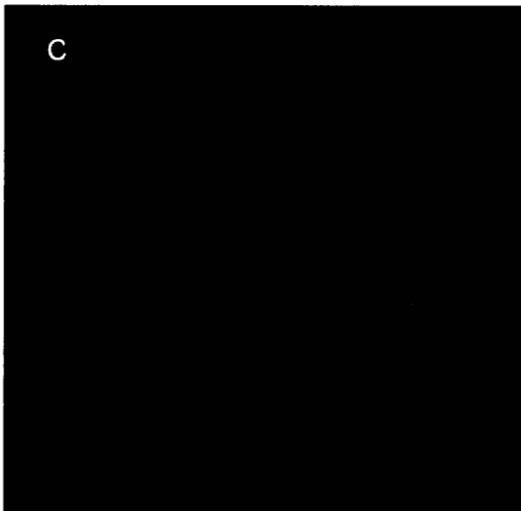
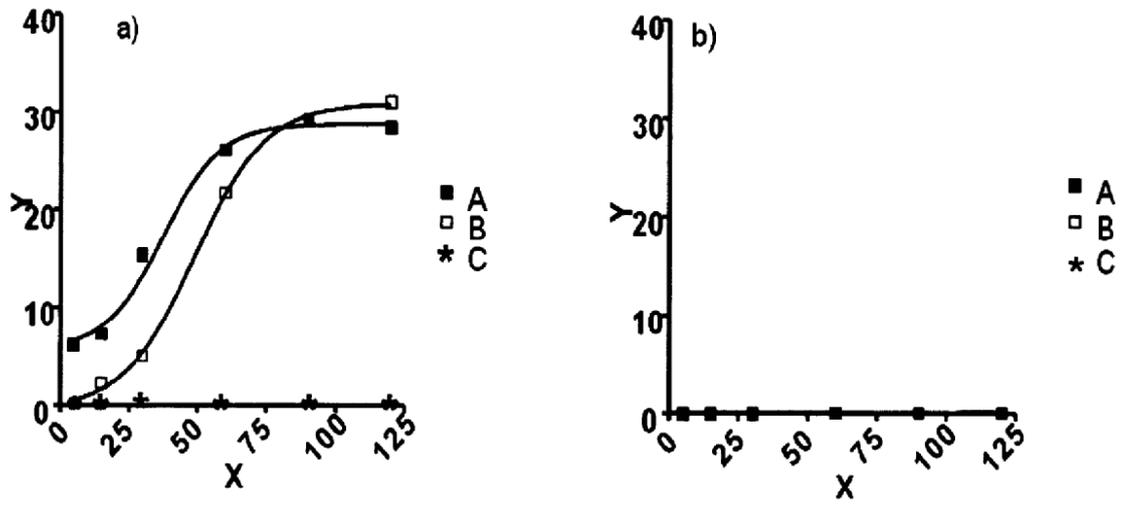


Figura 5

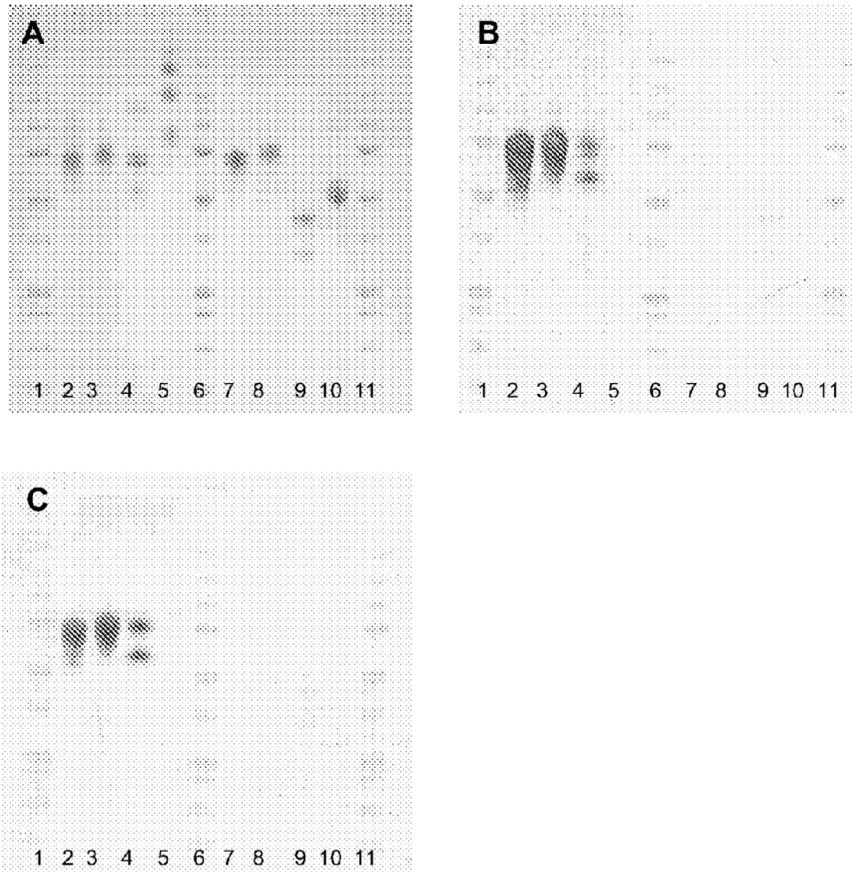


Figura 6:

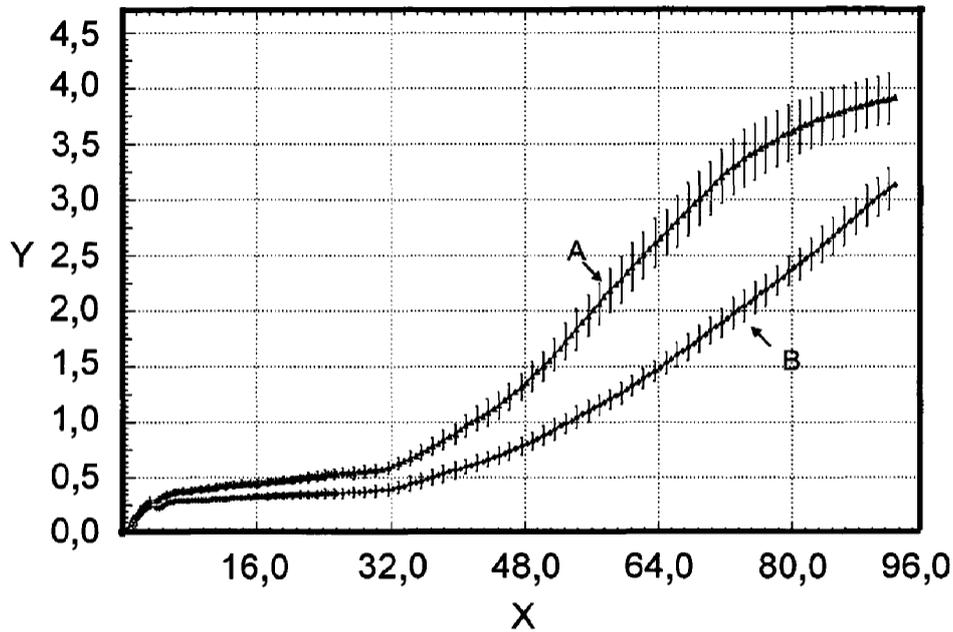


Figura 7:

SEQ ID NO:1 (polipéptido):

lecyscvqkaddgcspnkmtvkcapgvdvcteavgavetihgqfslavrgcsglpgkndrgldlhgll
afiqqqcaqdrncaklnltsraldpagnesayppngvecyscvglreacqgtsppvscynasdhvyk
gcfdgntvltaanvtvslpvrvcvqdefctrdgvtpggftlsgccqgsrncsdlrnktyfspripplvr
lpppepttvasttsvtsttsapvrptsttkmpaptsqtprqgveheasrdeeprltggaaghqdrsn

SEQ ID NO:2 (polipéptido):

lecyscvqkaddgcsphrmktvkcgpgvdvcteavgavetihgqfsvavrgcsggipgkndrgldlhgll
afflqqcsedrncaklnltrlglnpagnesayepngaecyscvglrekcqgsmpvncynasgrvyk
gcfdgntvltaanvtvslpvrvcvqdetctrdgvtpggftlsgccqgsprncadlrnktyfspripplvl
lpppttaapstragnsssttstaapttttsiikpptaashtsphemdleviqeegaslsggaaghggt
ghggaaghqdrsn

SEQ ID NO:3 (polipéptido):

mdparkagaqamiwtagwlllllrggaqalecyscvqkaddgcspnkmtvkcapgvdvcteavgavet
ihgqfslavrgcsglpgkndrgldlhgllafiqqqcaqdrncaklnltsraldpagnesayppngvec
yscvglreacqgtsppvscynasdhvykgcfdgntvltaanvtvslpvrvcvqdefctrdgvtpggft
lsgccqgsrncsdlrnktyfspripplvrlpppepttvasttsvtsttsapvrptsttkmpaptsqtpr
qgveheasrdeeprltggaaghqdrsnsgqypakggpqqphnkvcvaptaglaalllavaagvll

SEQ ID NO:4 (polipéptido):

mdaarrgdtqpvmttgwllllplllcegaqalecyscvqkaddgcsphrmktvkcgpgvdvcteavgav
etihgqfsvavrgcsggipgkndrgldlhgllafflqqcsedrncaklnltrlglnpagnesayepnga
ecyscvglrekcqgsmpvncynasgrvykgcfdgntvltaanvtvslpvrvcvqdetctrdgvtpgg
ftlsgccqgsprncadlrnktyfspripplvlpppttaapstragnsssttstaapttttsiikppta
ashtsphemdleviqeegaslsggaaghggttaghggaaghqdrsnmekypgkgaqipakggsctlgswl
savlltvvagaml

SEQ ID NO:5 (polipéptido):

ES 2 632 748 T3

FSNAWMSWV

SEQ ID NO:6 (polipéptido):
FSDYQMTWI

SEQ ID NO:7 (polipéptido):
FGHYMFWI

SEQ ID NO:8 (polipéptido):
FSSNYMSW

SEQ ID NO:9 (polipéptido):
VSYISSSGSTIYYADSVKGR

SEQ ID NO:10 (polipéptido):
VSGVSWNGARTHYADSVKGR

SEQ ID NO:11 (polipéptido):
VSAISGSGYSTHYADSVKGR

SEQ ID NO:12 (polipéptido):
VSAISSGSSSTYYADSVKGR

SEQ ID NO:13 (polipéptido):
AREGLWAFDY

SEQ ID NO:14 (polipéptido):
AKGDYLVYSAYYFDS

SEQ ID NO:15 (polipéptido):
ARLPYGSQSGVDY

SEQ ID NO:16 (polipéptido):
ARESGSGPNYYYGMDV

SEQ ID NO:17 (polipéptido):
TGSSSNIGAGYVVH

SEQ ID NO:18 (polipéptido):
SGSSSNVGSNPVN

SEQ ID NO:19 (polipéptido):
TGSSSNIGAGYVVH

SEQ ID NO:20 (polipéptido):
TGSSSNIGAGYVVH

SEQ ID NO:21 (polipéptido):
DNNKRPS

SEQ ID NO:22 (polipéptido):
RNNQRPS

SEQ ID NO:23 (polipéptido):
SNNQRPS

SEQ ID NO:24 (polipéptido):
SNNQRPS

SEQ ID NO:25 (polipéptido):
CAAWDDRLNGPV

SEQ ID NO:26 (polipéptido):

ES 2 632 748 T3

CAAWDDRLNGWV

SEQ ID NO:27 (polipéptido):
CQSYDSSHVL

SEQ ID NO:28 (polipéptido):
CQSYDRSLRGWV

SEQ ID NO:29 (polipéptido):
QSVltqppsasgtppgqrvtisctgsssnigagyvvhwyqqlpgtapklliydnknrpsgvpdrfsgs
ksgtsaslaisglrsedeaddycaawddrlngpvmfgggtklvtlvgg

SEQ ID NO:30 (polipéptido):
QSVLTQPPSASGTPGQRVTISCTGSSSNVGSNPNVWYQQLPGTAPKLLIYRNNQRPSGVPDRFSGSK
SGTSASLAISGLRSEADYYCAAWDDRLNGWVFGGGTCLTVLGG

SEQ ID NO:31 (polipéptido):
qsvltqppsasgtppgqrvtisctgsssnigagyvvhwyqqlpgtapklliydnknrpsgvpdrfsgs
ksgtsaslaisglrsedeaddyqcsydrslrgwvmfgggtklvtlvgg

SEQ ID NO:32 (polipéptido):
qsvltqppsasgtppgqrvtisctgsssnigagyvvhwyqqlpgtapklliydnknrpsgvpdrfsgs
ksgtsaslaisglrsedeaddyqcsydrslrgwvmfgggtklvtlvgg

SEQ ID NO:33 (polipéptido):
evqllesggglvqpggsrlscaasgftfnsawmswvrqapkgglewvsyisssgstiyyadvsvkgr
ftisrdnskntlylqmnsraedtavyycaareglwafdywgqgtlvtvts

SEQ ID NO:34 (polipéptido):
evqllesggglvqpggsrlscaasgftfndyqmtwirqtpgkglewvsyisssgstiyyadvsvkgr
ftisrdnskntlylqmnsraedtavyycaareglwafdywgqgtlvtvts

SEQ ID NO:35 (polipéptido):
evqllesggglvqpggsrlscaasgftfghyymfwirqapkgglewvsaisgsgysthyadvsvkgr
ftisrdnskntlylqmnsraedtavyycaareglwafdywgqgtlvtvts

SEQ ID NO:36 (polipéptido):
evqllesggglvqpggsrlscaasgftfssnyswvrqapkgglewvsaisssgsstyyadvsvkgr
ftisrdnskntlylqmnsraedtavyycaareglwafdywgqgtlvtvts

SEQ ID NO:37 (ADN):
cagtctgtgctgactcagccaacctcagcgtctgggacccccgggcagaggggcaccatctcctgca
ctgggagcagctccaacatggggcggttatgttgatcattgggtatcagcagctcccaggaacggccc
ccccaaactcctcatctataggaataatcagcggccctcaggggtccctgaccgattctctggctcc
aagtctggcacctcagcctccctggccatcagtgggctccgggtccgaggatgaggctgattattact
gtgcagcatgggatgacagcctgaatgggtccgggttcggcgagggaaccaagctgaacggctcctagg
tcag

SEQ ID NO:38 (ADN):
cagtctgtgctgactcagccaacctcagcgtctgggacccccgggcagaggggcaccatctcctggt
ctggaagcagctccaacatggggcggttatgttgatcattgggtatcagcagctcccaggaacggccc
caaactcctcatctataggaataatcagcggccctcaggggtccctgaccgattctctggctccaag
tctggcacctcagcctccctggccatcagtgggctccgggtccgaggatgaggctgattattactgtg
cagcatgggatgacagcctgaatgggtgggtgttcggcgagggaaccaagctgaacggctcctaggtc
g

SEQ ID NO:39 (ADN):
cagtctgtgctgactcagccaacctcagcgtctgggacccccgggcagaggggcaccatctcctgca
ctgggagcagctccaacatggggcggttatgttgatcattgggtatcagcagctcccaggaacggccc
ccccaaactcctcatctataggaataatcagcggccctcaggggtccctgaccgattctctggctcc
aagtctggcacctcagcctccctggccatcagtgggctccgggtccgaggatgaggctgattattact
gccagtcctatgacagcagccatggtttattcggcgagggaaccaagctgaacggctcctaggtcag

ES 2 632 748 T3

SEQ ID NO:40 (ADN):

cagctctgtgctgactcagccaccctcagcgtctgggacccccgggcagagggtcaccatctcctgca
ctgggagcagctccaacattggggcgggttatgtgtacattgggtatcagcagctcccaggaacggc
ccccaaactcctcatctatagtaataatcagcggccctcaggggtccctgacogattctctggctcc
aagctctggcacctcagcctccctggccatcagtggtccggctccgaggatgaggctgattattact
gccagtcctatgacagaagcctgcgtggttgggtgttcggcggaggaaccaagctgacggctcctagg
tcag

SEQ ID NO:41 (ADN):

GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGAGACTCTCCTGTG
CAGCCTCTGGATTACCTTCAGTAACGCCCTGGATGAGCTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCT
GGAGTGGGTTTCATACATAGTAGTAGTGGTAGTACCATATACTACGCAGACTCTGTGAAGGGCCGA
TTCACCATCTCCAGAGACAAATCCAAGAACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAGAGCCGAGG
ACACTGCCGTGTATTACTGTGCGAGAGAAGGGTTATGGCCTTTGACTACTGGGGCCAGGGTACCCT
GGTCACCGTGACTAGT

SEQ ID NO:42 (ADN):

gaggtgcagctgttggagctctgggggagggcttgggtacagcctggggggctccctgagactctcctgtg
cagcctctggattcaccttcagtgactatcagatgacctggatccgccagactccaggaaggggct
ggagtggtatcgggtgttagttggaatggcGCTaggacgcactatgcagactctgtgaagggccga
ttcaccatctccagagacaattccaagaacacgctgtatctcaaatgaacagcctgagagccgagg
acactgccgtgtattactgtgcaagggcgactacctggtttactccgcatactactttgactcctg
gggccagggtaacctggtcacctgactagt

SEQ ID NO:43 (ADN):

gaggtgcagctgttggagctctgggggagggcttgggtacagcctggggggctccctgagactctcctgtg
cagcctctggattcaccttcoggtcactactatattgttctggatccgctcaggtccaggaaggggct
ggagtggtctcagctattagtggttagtggttatagcacacactacgcagactccgtgaagggccgg
ttcaccatctccagagacaattccaagaacacgctgtatctgcaaatgaacagcctgagagccgagg
acactgccgtgtattactgtgcaagggcgactacctggtttactccgcatactactttgactcctg
gggtacctggtcacctgactagt

SEQ ID NO:44 (ADN):

gaggtgcagctgttggagctctgggggagggcttgggtacagcctggggggctccctgagactctcctgtg
cagcctctggattcaccttcagtagcaactacatgagctgggtccgccaggtccaggaaggggct
ggagtggtctcagctattagtagtagtggttagtagcacatactacgcagactccgtgaagggccgg
ttcaccatctccagagacaattccaagaacacgctgtatctgcaaatgaacagcctgagagccgagg
acactgccgtgtattactgtgcaagggcgactacctggtttactccgcatactactttgactcctg
cgtctggggccaaggtacctggtcacctgactagt

SEQ ID NO:45 (polipéptido):

FSNAWMSWV

SEQ ID NO:46 (polipéptido):

VSYISSSGSTIYYADSVKGR

SEQ ID NO:47 (polipéptido):

AREGLWAFDY

SEQ ID NO:48 (polipéptido):

TGSSSNIGAGYVVH

SEQ ID NO:49 (polipéptido):

DNNKRFS

SEQ ID NO:50 (polipéptido):

CAAWDDRLNGPV

SEQ ID NO:51 (polipéptido):

EVQLLSEGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSNAWMSWVRQAPGKLEWVSYISSSGSTIYYADSVKGR
FTISRDNKNTLYLQMNLSRAEDTAVYYCAREGLWAFDYWGQGLVTVSS

SEQ ID NO:52 (polipéptido):

ES 2 632 748 T3

ESVLTQPPSVSGAPGQRVTISCTGSSSNIGAGYVVHWYQQLPGTAPKLLIYDNNKRPSGVPDRFSGS
KSGTSASLAISGLRSEDEADYYCAAWDDRLNGPVFGGGKTLTVLGG

SEQ ID NO:53 (ADN):

gaggtgcagctgctggaaagcggcggaggactggtgcagcctggaggcagcctgagactgtcttggc
ccgccagcggcttcacctcagcaacgcctggatgagctgggtccgacaggtcctggcaagggcct
ggaatgggtgtcctacatcagcagcagcggcagcaccatctactacgccgacagcgtgaagggccgg
ttcaccatcagccgggacaacagcaagaacacctgtacctgcagatgaacagcctgcccggcgg
acaccgcctgtactactgcgccagagaaggcctgtggccttcgactactggggccagggcaccct
ggtcaccgtgtctagc

SEQ ID NO:54 (ADN):

gagagcgtgctgacccagcctcctagcgtgtccggcgtcctggccagagagtgaccatcagctgca
ccggcagcagcagcaacatcggagccggctacgtggtgcaactggtatcagcagctgcccggcaccgc
ccccaaagctgtgatctacgacaacaacaagcggcctagcggcgtgcccagacagattcagcggcagc
aagagcggcaccagcggccagcctggccatcagcggcctgagaagcggaggaagggccgactactact
gcgccctgggacgacagactgaacggcctgtgttcggcggaggcaccacagctgaccgtgctggg
acag

SEQ ID NO:55 (polipéptido):

FSSNAWMSW

SEQ ID NO:56 (polipéptido):

VSYISSSGSTIYYADSVKGR

SEQ ID NO:57 (polipéptido):

AREGLWAFDY

SEQ ID NO:58 (polipéptido):

TGSSSNIGAGYVVH

SEQ ID NO:59 (polipéptido):

DNNKRPS

SEQ ID NO:60 (polipéptido):

CAAYDDSLSGPV

SEQ ID NO:61 (polipéptido):

EVQLLESGLLVQPGGSLRLSCAASGFTFSNAWMSWVRQAPGKLEWVSYISSSGSTIYYADSVKGR
FTISRDNKNTLYLQMNLSRAEDTAVYYCAREGLWAFDYWGQGLTVTVSS

SEQ ID NO:62 (polipéptido):

QSVLTQPPSVSGAPGQRVTISCTGSSSNIGAGYVVHWYQQLPGTAPKLLIYDNNKRPSGVPDRFSGS
KSGTSASLAISGLRSEDEADYYCAAYDDSLSGPVFGGGKTLTVLGG

SEQ ID NO:63 (ADN):

gaggtgcagctgctggaaatccggcggaggcctggtgcagcctggcggatctctgagactgtcctggc
ccgccagcggctttacctctccaacgcctggatgtcctgggtccgacaggtccctggcaagggact
ggaatgggtgtcctacatctcctcctccggctccaccatctactacgccgactccgtgaagggccgg
ttcaccatctccgggacaactccaagaacacctgtacctgcagatgaactccctgcccggcggagg
acaccgcctgtactactgcgccagagaggcctgtggccttcgattattggggccagggcaccct
ggtcaccgtcagctca

SEQ ID NO:64 (ADN):

cagtcctgctgacccagcccccttctgtgtctggcggcctggccagagagtgaccatctcttga
ccggctcctccagcaacatcggcgtggctacgtggtgcaactggtatcagcagctgcccggcaccgc
ccccaaagctgtgatctacgacaacaacaagcggcctccggcgtgcccagacagattctccggctcc
aagtcggcaccctccgcctcctggccatctccggcctgagatctgaggacgaggccgactactact
gcgccctacgacgactcctgtccggcctgtgttcggcggaggcacaagtaaccgtgctggg
ccag

SEQ ID NO:65 (polipéptido):

FSSNAWMSW

ES 2 632 748 T3

SEQ ID NO:66 (polipéptido):
VSYISSSGSTIYYADSVKGR

SEQ ID NO:67 (polipéptido):
AREGLWAFDY

SEQ ID NO:68 (polipéptido):
TGSSSNIGAGYVVH

SEQ ID NO:69 (polipéptido):
DNNKRPS

SEQ ID NO:70 (polipéptido):
CAAFDDSLNGPV

SEQ ID NO:71 (polipéptido):
EVQLLES GGGLVQ PGGSLRLS CAASGFTFSNAWMSWVRQAPGKLEWVSYISSSGSTIYYADSVKGR
FTISRDN SKNTLYLQMN SLRAEDTAVYYCAREGLWAFDKWGQGLVTVSS

SEQ ID NO:72 (polipéptido):
QSVLTQPPSASGTPGQRVTISCTGSSSNIGAGYVVHWYQQLPGTAPKLLIYDNNKRPSGVPDFRFSGS
KSGTSASLAISGLRSEDEADYYCAAFDDRLNGPVEFGGKTKLTVLQG

SEQ ID NO:73 (ADN):
gaggtgcagctgctggaatccggcggaggcctgggtgcagcctggcggatctctgagactgtcctgcg
ccgctcggctttacctctccaacgcctggatgtcctgggtccgacagcctcctggcaaggccct
ggaatgggtgtctacatctcctcctccggctccaccatctactacgcgcactccgtgaaggccgg
ttaccatctccgggacaactccaagaacaccctgtacctgcagatgaactccctgcccggcggagg
acaccgcgctgtactactgcgccgagaggccctgtgggccttcgataaagtggggccaggccacct
ggtcaccgtcagctca

SEQ ID NO:74 (ADN):
cagtcctgtgtgaccagcctcctccgctctggcaccctggccagagagtgaccatctcctgca
ccgctcctccagcaacatcggcgtggtacgtggtgactggtatcagcagctgcccggcaccgc
ccccagctgctgatctacgacaacaagaaggccctccggcgtgcccagacagattctccggctcc
aagtcggcaccctccgctcctggccatctccggcctgagatctgaggacgaggccgactactact
gcgcgccttcgacgaccggctgaacggcctgtgttcggcggaggccacaaagttaaccgtgctggg
ccag

SEQ ID NO:75 (polipéptido):
FSSAWMSWV

SEQ ID NO:76 (polipéptido):
VSYISSSGSTIYYADSVKGR

SEQ ID NO:77 (polipéptido):
AREGLWAFDY

SEQ ID NO:78 (polipéptido):
TGSSSNIGAGYVVH

SEQ ID NO:79 (polipéptido):
DNNKRPS

SEQ ID NO:80 (polipéptido):
CAAYDDSLSGPV

SEQ ID NO:81 (polipéptido):
EVQLLES GGGLVQ PGGSLRLS CAASGFTFSNAWMSWVRQAPGKLEWVSYISSSGSTIYYADSVKGR
FTISRDN SKNTLYLQMN SLRAEDTAVYYCAREGLWAFDYWGQGLVTVSS

SEQ ID NO:82 (polipéptido):

ES 2 632 748 T3

QSVLTQPPSVSGAPGQRVTISCTGSSSNIGAGYVVHWYQQLPGTAPKLLIYDNNKRPSGVPDRFSGS
KSGTSASLAISGLRSEDEADYYCAAYDDSLSGPVPFGGGTKLTVLGQ

SEQ ID NO:83 (ADN):

gaggtgcagctgctggaatccggcggaggcctgggtgcagcctggcggatctctgagactgtcctgcg
ccgccagcggctttaccttctccagcgcctggatgtcctgggtccgacaggccctggcaaggact
ggaatgggtgtcctacatctcctcctccggctccaccatctactacgccgactccgtgaaggccgg
ttaccatctcccggaactccagaacaccctgtacctgcagatgaactccctgcccggccgagg
acaccgctgtactactgcccagaggcctgtggccttcgattattggggccaggccacct
ggtcaccgtcagctca

SEQ ID NO:84 (ADN):

cagtcctgctgaccagccccctctgtgtctggcgcctggccagagagtaccatctcttga
ccggctcctccagcaacatcggcgtggctacgtgggtgcaactggatcagcagctgcccggaaccgc
ccccagctgctgatctacgacaacaacagcggccctccggcgtgccgacagattctccggctcc
aagtcggcaccctccgctccctggccatctccggcctgagatctgaggacgaggccgactactact
gcccgcctacgacgactccctgtccggcctgtgttcggcggaggcacaagttaaccgtgctggg
ccag

SEQ ID NO:85 (polipéptido):

FSSAWMSWV

SEQ ID NO:86 (polipéptido):

VSYISSSGSSTYYADSVKGR

SEQ ID NO:87 (polipéptido):

AREGLWAFDK

SEQ ID NO:88 (polipéptido):

SGSSSNIGAGYVVH

SEQ ID NO:89 (polipéptido):

DNNQRPS

SEQ ID NO:90 (polipéptido):

CAAFDDRLSGPV

SEQ ID NO:91 (polipéptido):

EVQLLESGLVQPGGLRLSCAAAGFTFSSAWMSWVRQAPGKLEWVSYISSSGSSTYYADSVKGR
FTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAREGLWAFDKWGQGLTVTVSS

SEQ ID NO:92 (polipéptido):

QSVLTQPPSASGTPGQRVTISCSGSSSNIGAGYVVHWYQQLPGTAPKLLIYDNNQRPSGVPDRFSGS
KSGTSASLAISGLRSEDEADYYCAAFDDRLSGPVPFGGGTKLTVLGQ

SEQ ID NO:93 (ADN):

gaggtgcagctgctggaagcggcggaggcctgggtgcagcctggcgggaagcctgagactgagctgtg
ccgccagcggcttaccctcagcagcgcctggatgagctgggtccgacaggccctggcaaggcct
ggaatgggtgtcctacatcagcagcagcggcagcagcactactacgccgacagcgtgaaggccgg
ttaccatcagccgggacaacagcaagaacaccctgtacctgcagatgaacagcctgcccggccgagg
acaccgctgtactactgcccagagaaggcctgtggccttcgataaagtggggcccaggccacct
ggtcaccgtcagctca

SEQ ID NO:94 (ADN):

cagagcgtgctgaccagcctcctagcgcctctggcaccctggccagagagtaccatcagctgca
gcggcagcagcagcaacatcggagccggctacgtgggtgcaactggatcagcagctgcccggaaccgc
ccccagctgctgatctacgacaacaaccagcggccagcggcgtgccgacagatttccggcagc
aagagcggcaccagcgcagcctggccatcagcggcctgagaagcagaggacgaggccgactactact
gcccgccttcgacgacagactgagcggcctgtgttcggcggaggcacaagttaaccgtgctggg
ccag

SEQ ID NO:95 (polipéptido):

FSDYQMTWI

ES 2 632 748 T3

SEQ ID NO:96 (polipéptido):
VSGVSWNGARTHYADSVKGR

SEQ ID NO:97 (polipéptido):
AKGDYLVYSAYYFDS

SEQ ID NO:98 (polipéptido):
SGSSSNVGSNPVN

SEQ ID NO:99 (polipéptido):
RNNQRPS

SEQ ID NO:100 (polipéptido):
CAAWDDRLNGWV

SEQ ID NO:101 (polipéptido):
EVQLLESGGGLVQPGGSLRLS CAASGFTFS DYQMTWIRQTFGKGLEWVSGISWNGGSTHYADSVKGR
FTISRDNKNTLYLQMNLSRAEDTAVYYCAKGDYLVYSAYYFDSWGQGLVTVSS

SEQ ID NO:102 (polipéptido):
ESVLTQPPSASGTPGQRVTISCSGSSSNIGSNPNWYQQLFGTAPKLLIYRNNQRPSGVPDRFSGSK
SGTSASLAISGLRSEDEADYYCAAWDDRLNGWGFGGGTKLTVLGQ

SEQ ID NO:103 (ADN):
gaggtgcagctgctggaaagcggcgaggactggtgcagcctggaggcagcctgagactgtcttgccg
cggccagcggcttcaccttcagcgactaccagatgacctggatccgacagaccctggcaagggcct
ggaatgggtgtccggcatcagctggaacggaggcagcaccactacgccgacagcgtgaagggccgg
ttcaccatcagccgggacaacagcaagaacaccctgtacctgcagatgaacagcctgcccggccgagg
acaccgccgtgtactactgcccgaagggcgactacctggtgtacagcgcctactacttcgacagctg
gggcccagggcaccctggtcaccgtgtctagc

SEQ ID NO:104 (ADN):
gagagcgtgctgaccagcctcctagcgcctctggcaccctggccagagagtgaccatcagctgct
ctggcagcagcagcaacatcggaagcaaccocgtgaaactggatcagcagctgcccggcaccgcccc
caagctgctgatctaccggaacaaccagcggcctagcggcgtgcccagacagattcagcggcagcaag
agcggcaccagcgcagcctggccatcagcggcctgagaagcagagcagggccgactactactgcg
ccgctgggacgacagactgaaacggctggggcttcggcggaggcaccagctgaccgtgctgggaca
g

SEQ ID NO:105 (polipéptido):
FSDYQMTWI

SEQ ID NO:106 (polipéptido):
VSGISWNGGSTHYADSVKGR

SEQ ID NO:107 (polipéptido):
AKGDYLVYSYFYS

SEQ ID NO:108 (polipéptido):
SGSSSNIGSNPN

SEQ ID NO:109 (polipéptido):
RNNQRPS

SEQ ID NO:110 (polipéptido):
CAAWDDRLSGWA

SEQ ID NO:111 (polipéptido):
EVQLLESGGGLVQPGGSLRLS CAASGFTFS DYQMTWIRQTFGKGLEWVSGISWNGGSTHYADSVKGR
FTISRDNKNTLYLQMNLSRAEDTAVYYCAKGDYLVYSYFYSWGQGLVTVSS

SEQ ID NO:112 (polipéptido):

ES 2 632 748 T3

QSVLTQPPSASGTPGQRVTISCSGSSSNIGSNPWNWYQQLPGTAPKLLIYRNNQRPSGVDPDRFSGSK
SGTSASLAISGLRSEDEADYYCAAWDDRLSGWAFGGGKLTVLGQ

SEQ ID NO:113 (ADN):

gaggtgcagctgctggaatccggcggaggcctggtgcagcctggcggatctctgagactgtcctgog
ccgctccggcttcaccttctccgactaccagatgacctggatcagacagacccccggcaaggcct
ggaatgggtgtccggcatctcctggaacggcggctccaccactacgccgactctgtgaaggccgg
ttcaccatctccgggacaactccaagaacaccctgtacctgcagatgaactccctgcgggccgagg
acaccgocgtgtactactgcgccaaggcgactacctggtgtactcctcctactactcaagtctg
ggccaggccacctggtcaccgtcagctca

SEQ ID NO:114 (ADN):

cagtcogtgcagaccagcctccttcogcctctggcaccctggccagagagtgaccatctcctgct
ccggctcctcctccaacatcggtccaaccccgtaactggtatcagcagctgcccggcaccgccc
caagctgctgatctaccggaacaaccagggcctccggcgtgccgacagattctccggctccaag
tccggcacctccgctcctggccatctccggcctgagatctgaggacgagggccgactactactgog
ccgctgggacgaccggtgtctggtgggcttttggcggcgggaacaaagtaacctgctgggcca
g

SEQ ID NO:115 (polipéptido):

FSDYQMTWI

SEQ ID NO:116 (polipéptido):

VSGISWNGGSTHYADSVKGR

SEQ ID NO:117 (polipéptido):

AKGDYLVYKSYFYS

SEQ ID NO:118 (polipéptido):

SGSSSNIGSNPWN

SEQ ID NO:119 (polipéptido):

RNNQRPS

SEQ ID NO:120 (polipéptido):

CAAWDDSLSGWA

SEQ ID NO:121 (polipéptido):

EVQLLESGLLVQPGGSLRLSCAASGTFSDYQMTWIRQTPGKLEWVSGISWNGGSTHYADSVKGR
FTISRDNKNTLYLQMNLSLRAEDTAVYYCAKGDYLVYKSYFYSWVGGTTLVTVSS

SEQ ID NO:122 (polipéptido):

QSVLTQPPSASGTPGQRVTISCSGSSSNIGSNPWNWYQQLPGTAPKLLIYRNNQRPSGVDPDRFSGSK
SGTSASLAISGLRSEDEADYYCAAWDDSLSGWAFGGGKLTVLGQ

SEQ ID NO:123 (ADN):

gaggtgcagctgctggaatccggcggaggcctggtgcagcctggcggatctctgagactgtcctgog
ccgctccggcttcaccttctccgactaccagatgacctggatcagacagacccccggcaaggcct
ggaatgggtgtccggcatctcctggaacggcggctccaccactacgccgactctgtgaaggccgg
ttcaccatctccgggacaactccaagaacaccctgtacctgcagatgaactccctgcgggccgagg
acaccgocgtgtactactgcgccaaggcgactacctggtgtacaagtctcctactactcaagtctg
ggccaggccacctggtcaccgtcagctca

SEQ ID NO:124 (ADN):

cagtcogtgcagaccagcctccttcogcctctggcaccctggccagagagtgaccatctcctgct
ccggctcctcctccaacatcggtccaaccccgtaactggtatcagcagctgcccggcaccgccc
caagctgctgatctaccggaacaaccagggcctccggcgtgccgacagattctccggctccaag
tccggcacctccgctcctggccatctccggcctgagatctgaggacgagggccgactactactgog
ccgctgggacgactcctgtctggtgggcttttggcggcgggaacaaagtaacctgctgggcca
g

SEQ ID NO:125 (polipéptido):

FSDYQMTWI

ES 2 632 748 T3

SEQ ID NO:126 (polipéptido):
VSGISWNGGSTHYADSVKGR

SEQ ID NO:127 (polipéptido):
AKGDYLVYSSYYFKS

SEQ ID NO:128 (polipéptido):
SGSSSNIGSNPVN

SEQ ID NO:129 (polipéptido):
RNNQRPS

SEQ ID NO:130 (polipéptido):
CAAWDDRLSGWG

SEQ ID NO:131 (polipéptido):
EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDYQMTWIRQTPGKGLEWVSGISWNGGSTHYADSVKGR
FTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKGDYLVYSSYYFKSWGQGLTVTVSS

SEQ ID NO:132 (polipéptido):
QSVLTQPPSASGTPGQRVTISCSGSSSNIGSNPVNHWYQQLPGTAPKLLIYRNNQRPSGVPDRFSGSK
SGTSASLAISGLRSEDEADYYCAAWDDRLSGWGFGGGKTLTVLGQ

SEQ ID NO:133 (ADN):
gaggtgcagctgctggaatccggcggaggcctgggtgcagcctggcggatctctgagactgtcctgcg
ccgctccggcttcacctctccgactaccagatgacctggatcagacagacccccggcaaggcct
ggaatgggtgtccggcatctcctggaacggcggctccaccactacgccgactctgtgaagggccgg
ttaccatctccgggacaactccaagaacaccctgtacctgcagatgaactccctgccccggcggg
acaccgcgctgtactactgcgccaagggcgactacctgggtgtaactcctactacttcaagtccctg
ggccagggcaccctggtcaccgtcagctca

SEQ ID NO:134 (ADN):
cagtcgctgctgaccagcctccttcggcctctggcaccctggccagagagtgaccatctcctgct
ccgctcctcctccaacatcggctccaaccccgtaactggatcagcagctgcccggaaccgcccc
caagctgctgactaccggaacaaccagcggcctccggcgtgccgacagattctccggctccaag
tcggcacctccgctccctggccatctccggcctgagatctgaggacgagggccgactactactgcg
ccgctgggacgaccggctgtctggctgggatttgggggcggaaacaaagttaaccgtgctgggcca
g

SEQ ID NO:135 (polipéptido):
FSSYQMTWI

SEQ ID NO:136 (polipéptido):
VSGISWNGGSTHYADSVKGR

SEQ ID NO:137 (polipéptido):
AKGDYLVYKSYFKS

SEQ ID NO:138 (polipéptido):
SGSSSNIGSNPVN

SEQ ID NO:139 (polipéptido):
RNNQRPS

SEQ ID NO:140 (polipéptido):
CAAWDDSLSGWA

SEQ ID NO:141 (polipéptido):
EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYQMTWIRQAPGKGLEWVSGISWNGGSTHYADSVKGR
FTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKGDYLVYKSYFKSWGQGLTVTVSS

SEQ ID NO:142 (polipéptido):

ES 2 632 748 T3

QSVLTQPPSASGTPGQRVTISCSGSSSNIGSNPWNWYQQLPGTAPKLLIYRNNQRPSGVPDRFSGSK
SGTSASLAISGLRSEDEADYYCAAWDDSLSGWAFGGGTKLTVLGQ

SEQ ID NO:143 (ADN):

gaggtgcagctgctgaaagcggcggaggcctggtgcagcctggcggaaagcctgagactgagctgtg
ccgccagcggcttcaccttcagcagctaccagatgacctggatcagacagggcccctggcaagggcct
ggaatgggtgtccggcatcagctggaacggcggcagcaccactacgccgacagcgtgaagggccgg
ttcaccatcagccgggacaacagcaagaacaccctgtacctgcagatgaacagcctgcgggcccagg
acaccgccgtgtactactgcgccaagggcgactacctggtgtacaagagctactacttcaagagctg
ggccagggcacactggtcacctcagctca

SEQ ID NO:144 (ADN):

cagagcgtgctgacctcctcctagcgcctctggcaccctggccagagagtaccatcagctgca
gcggcagcagcagcaacatcggcagcaaccccgatgaactggtatcagcagctgcccgccaccgccc
caagctgctgatctaccggaacaaccagcggcccagcggcgtgcccgacagatcttccggcagcaag
agcggcaccagcgcagcctggccatcagcggcctgagaagcaggacgaggccgactactactgcg
ccgctgggacgatagcctgagcggctgggcctttggcggcggaaacaaagttaaccgtgctgggcca
g