

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 672 267**

51 Int. Cl.:

C07K 16/36 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **12.03.2012 PCT/US2012/028770**

87 Fecha y número de publicación internacional: **20.09.2012 WO12125559**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **12.03.2012 E 12757251 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **25.04.2018 EP 2686350**

54 Título: **Anticuerpo del factor tisular humano y usos del mismo**

30 Prioridad:

15.03.2011 US 201161452674 P

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

13.06.2018

73 Titular/es:

**JANSSEN BIOTECH, INC. (100.0%)
800/850 Ridgeview Drive
Horsham, PA 19044, US**

72 Inventor/es:

**ALMAGRO, JUAN, CARLOS;
ANDERSON, GLENN, MARK;
CHI, ELLEN;
MARTINEZ, CHRISTIAN;
RAGHUNATHAN, GOPALAN;
SWANSON, RONALD;
TEPLYAKOV, ALEXEY;
TSE, KAM-FAI;
WU, SHENG-JIUM y
ZHOU, HONG, MIMI**

74 Agente/Representante:

IZQUIERDO BLANCO, María Alicia

ES 2 672 267 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).

Anticuerpo del factor tisular humano y usos del mismo

Descripción

5 Campo de la invención

La invención se refiere a anticuerpos adaptados humanos que se unen al factor tisular humano, un antígeno presente en tejidos vasculares extra que incluyen células tumorales, dichos anticuerpos no inhiben la coagulación sanguínea mediada por factores tisulares. La invención también se refiere a métodos para usar el anticuerpo para tratar afecciones como el cáncer que están asociadas con la presencia y las funciones receptoras del factor tisular humano.

Discusión del Campo

15 El factor tisular (TF), también conocido como factor de coagulación III (F3), tromboplastina tisular, o CD142 es una glicoproteína transmembrana que tiene un dominio extracelular de 219 aminoácidos que comprende dos dominios de fibronectina tipo III y un dominio intracelular corto con un residuo de serina capaz de ser fosforilado. El TF es el receptor celular para FVII/FVIIa.

20 El TF muestra una distribución específica del tejido con niveles elevados en el cerebro, el pulmón y la placenta normales y niveles bajos en el bazo, el timo, el músculo esquelético y el hígado en la forma de un receptor celular. También se encuentra en micropartículas derivadas de células y como una forma soluble alternativamente empalmada. Además de la expresión en tejido normal, se ha informado que el TF se sobreexpresa en la mayoría de los tipos de tumores principales y en muchas líneas celulares derivadas de tumores (Ruf W J Thromb Haemost. 5:1584-1587, 2007; Milsom et al., Arterioscler Thromb Vasc Biol. 29: 2005-2014, 2009).

30 La coagulación de proteínas séricas en respuesta a una lesión es una respuesta fisiológica importante a la lesión. La exposición de la sangre a proteínas incluyendo colágeno (vía intrínseca) y factor tisular (vía extrínseca) inicia cambios en las plaquetas sanguíneas y el fibrinógeno de la proteína plasmática, un factor de coagulación. Después del daño a un vaso sanguíneo, el factor VII (FVII) deja la circulación y entra en contacto con el factor tisular (TF) expresado en células portadoras del factor tisular (fibroblastos estromales y leucocitos), formando un complejo TF-FVIIa activado. El TF-FVIIa activa el factor IX (FIX) y el factor X (FX). El FVII puede activarse alostéricamente por TF y activarse por trombina, FXIa, plasmina, FXII y FXa. El TF-FVIIa forma un complejo ternario con FXa.

35 La expresión del factor tisular (TF) por células no vasculares desempeña un papel esencial en la hemostasia activando la coagulación sanguínea. El TF también se asocia con procesos distintos de la hemostasia y relacionados directamente con funciones en la superficie de las células en las que se expresa. El ensamblaje dependiente de TF de proteasas de coagulación en células vasculares y no vasculares activa los receptores activados por proteasa (PAR) que son receptores acoplados a proteína G. Por tanto, el complejo TF:VIIa es capaz de inducir la señalización celular, a través de PARs, principalmente PAR2 (Camerer et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 97:5255-5260, 2000; Riewald & Ruf, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 98:7742-7747, 2001; Ruf et al, J Thromb Haemost 1: 1495-4503, 2003; Chen et al., Thromb Haemost 86: 334-45, 2001) contribuyendo a la tumorigénesis, angiogénesis, progresión tumoral y metástasis.

40 El complejo ternario TF/FVIIa/FXa está formado directamente por el complejo TF:VIIa que actúa sobre FX o indirectamente después de la escisión de TF:VIIa de FIX a FIXa que puede escindir FX a FXa. La formación del complejo TF/FVIIa/FXa puede dar como resultado la señalización o activar otros receptores como PAR1-4. La formación del complejo TF/FVIIa/FXa lleva a la inducción de interleuquina-8 (IL-8), que puede estimular la migración de células tumorales (Hjortor et al., Blood 103:3029-3037, 2004). Tanto PAR1 como PAR2 están implicados en la metástasis tumoral (Shi et al., Mol Cancer Res. 2:395-402, 2004), sin embargo, los complejos binarios y ternarios activados, TF-VIIa y TF-VIIa-FXa, son activadores de PAR2 que también llevan a la señalización celular (Rao & Pendurthi, Arterioscler. Thromb.Vasc. Biol. 25:47-56, 2005)). Por lo tanto, era de interés determinar si el papel oncogénico del factor tisular podría separarse del papel procoagulante, que también se ha sospechado durante mucho tiempo que estaba implicado en la migración tumoral, la extravasación y los mecanismos metastásicos.

60 Los anticuerpos monoclonales como los descritos por Morrissey (1988, Thromb Res 52(3):247-261; US5223427) y Magdolen (1996 Biol Chem 379: 157-165) para el factor tisular se han usado para explorar aspectos funcionales e inmunológicos de los sitios de unión de ligandos. Los anticuerpos monoclonales capaces de unirse al factor tisular pueden usarse para bloquear eventos trombóticos interfiriendo con la capacidad del TF para formar o mantener el complejo TF-VIIa o bloqueando la capacidad del complejo para activar FX. También se conocen anticuerpos que se unen al factor tisular y no bloquean la coagulación. El factor VIIa inició el bloqueo de la señalización de TF pero no se han descrito anticuerpos que bloqueen la coagulación como el anticuerpo 10H10 (Ahamed et al., 2006 Proc Natl Acad Sci USA 103 (38):13932-13937) y tales anticuerpos han proporcionado la oportunidad de estudiar el papel y la utilidad de un agente con dicha actividad en el tratamiento de tumores sólidos

(Versteeg, et al 2008 Blood 111(1): 190-199). Ruf et al, en la solicitud publicada WO2007056352A3 divulga métodos y composiciones para inhibir la señalización del factor tisular sin interferir con la hemostasis en un paciente.

5 Como la progresión del cáncer es un proceso multifacético, sería deseable un candidato terapéutico que sea un anticuerpo de unión a TF capaz de bloquear funciones oncogénicas, metastásicas, angiogénicas y anti-apoptóticas en células tumorales sin interferir con la hemostasia en un paciente.

SUMARIO DE LA INVENCIÓN

10 La invención proporciona un anticuerpo aislado que se une al factor tisular humano en donde el anticuerpo comprende una región variable de la cadena pesada de la SEQ ID NO: 139 y una región variable de la cadena ligera de la SEQ ID NO: 23.

15 La invención también proporciona una composición farmacéutica útil para tratar a un sujeto que comprende un anticuerpo de la invención en una preparación farmacéuticamente aceptable.

La invención también proporciona un kit que comprende un anticuerpo de la invención en una forma estable e instrucciones de uso.

20 La invención también proporciona un ácido nucleico aislado que codifica los dominios de unión de anticuerpos de un anticuerpo de la invención.

La invención también proporciona un vector que comprende por lo menos un polinucleótido de la invención.

25 La invención también proporciona una célula huésped que comprende un vector de la invención.

También se divulga en la presente un anticuerpo específico para el factor tisular anti-humano adaptado humano para su uso como un agente terapéutico humano que retiene el epítipo de unión del anticuerpo murino 10H10, dicho anticuerpo no compite con el factor tisular para la unión a FVIIa y por lo tanto no bloquea sustancialmente el procoagulante, actividad amidolítica del complejo TF-VIIa pero que bloquea la señalización mediada por TF-VIIa y efectos oncogénicos cadena abajo como la liberación de citoquinas IL-8.

30 El anticuerpo adaptado humano divulgado escrito en la presente está construido de marcos de dominio variable de IgG humana en combinación con residuos variantes de CDR como se determina por referencia a la secuencia de las secuencias de CDR del anticuerpo murino 10H10 y representadas como las SEQ ID NO: 6-11 y 27. Se proporcionan marcos humanos FR1 y FR2 y FR3, combinadas con las CDR y variantes de CDR, con FR4, que permiten el ensamblaje de dominios de unión a anticuerpos con la inmunoespecificidad del anticuerpo murino 10H10. Las seis secuencias de CDR representadas por las SEQ ID NO: 6-11 o como el grupo representado por las SEQ ID NO: 6, 8-11 y 27 pueden combinarse con FRs de la línea germinal humana, definidas como las posiciones no CDR de un dominio variable de IgG humana, seleccionado de tal manera que se retenga la afinidad de unión de 10H10 para TF humano. Las FR de las región variable de HC humana pueden derivarse de un miembro de la familia génica 1, 3 ó 5 IGHV como se representa por la base de datos IMGT. Las FR de la región variable LC humana pueden derivarse de un miembro de la familia génica 2 ó 4 IGKV humana. En un caso, el anticuerpo Fv (región variable HC emparejada con una región variable LC) comprende un dominio variable HC seleccionado de las SEQ ID NO: 12-21 y un dominio variable LC seleccionado de las SEQ ID NO: 22-26.

35 Las FR humanas que forman un anticuerpo Fv (región variable HC emparejada con una región variable LC) comprenden FR de IGHV5 e IGKV2. Un anticuerpo divulgado en la presente comprende un dominio variable HC que tiene la H-CDR3 de la SEQ ID NO: 8; una H-CDR1 que tiene una secuencia seleccionada de las SEQ ID NO: 6 y 62-83; una H-CDR2 que tiene una secuencia seleccionada de las SEQ ID NO: 7, 27 y 84-107; y una región HC de FR4, opcionalmente, seleccionada de IGVJ4 (SEQ ID NO: 60) o una variante de la misma. Los anticuerpos divulgados en la presente comprenden además aquellos que tienen un dominio variable de LC que tiene una L-CDR1 que tiene una secuencia seleccionada de las SEQ ID NO: 9, 108-116; una L-CDR2 que tiene una secuencia seleccionada de las SEQ ID NO: 10 y 117-120; y una L-CDR3 que tiene una secuencia seleccionada de las SEQ ID NO: 11 y 121-128; y una región LC de FR4, opcionalmente, seleccionada de IGKJ2 (SEQ ID NO: 61) o una variante de la misma. Las secuencias marco humanas se derivan de IGHV5_a e IGKV2D40_O1. El dominio variable creado comprende las secuencias de las SEQ ID NO: 139 y 23. También se divulgan secuencias marco humanas derivadas de IGHV5_a en las que el dominio variable creado comprende una secuencia seleccionada de las SEQ ID NO: 19, 129-138, 140-155. En otro caso, las secuencias marco humanas se derivan de IGKV2D40_O1 y el dominio variable creado comprende una secuencia seleccionada de las SEQ ID NO: 156-163.

40 Los anticuerpos divulgados en la presente pueden representarse en una forma como anticuerpos que tienen un dominio de unión derivado de marcos de IGHV5_a, definidos como posiciones no CDR, una H-CDR3 que tiene la secuencia SGYYGNSGFAY (SEQ ID NO: 8), en donde las secuencias en la posición de H-CDR-1 viene dada por la fórmula:

H-CDR1 GYTFX₁X₂X₃WIE (I) (SEQ ID NO: 83)

en la que X1 se selecciona de A, D, G, I, L, N, P, R, S, T, V, e Y; X2 se selecciona de A, P, S y T, y X3 se selecciona de F, H e Y; o la secuencia puede ser GFTFITYWIA (SEQ ID NO: 81); y la secuencia en la posición de H-CDR2 viene dada por la fórmula:

H-CDR2 DIX₁PGX₂GX₃TX₄ (II) (SEQ ID NO: 107)

en la que X1 se selecciona de I y L, X2 se selecciona de S y T, X3 se selecciona de A, F, H y w; y X4 se selecciona de D, H, I, L y N; excepto en H189 donde H-CDR2 es DILPASSSTN (SEQ ID NO: 105).

Los anticuerpos divulgados en la presente se representan como anticuerpos que tienen un dominio de unión derivado de marcos IGKV2D40_O1, definidos como posiciones no CDR, y en donde las secuencias en la L-CDR-1 y/o LCDR-2 y L-CDR3 tienen las secuencias dadas por las fórmulas:

L-CDR1 KSSQSLLX₁X₂X₃X₄QX₅NYLT (III) (SEQ ID NO: 116)

en la que X1 se selecciona de F, P, S, T, W e Y; X2 se selecciona de F, S, T, R y V; X3 se selecciona de A, G, P, S, W, Y y V; X4 se selecciona de G, N y T; X5 se selecciona de K, R y S;

L-CDR2 X₁ASTRX₂S (IV) (SEQ ID NO: 120)

en la que X1 se selecciona de H y W; X2 se selecciona de D, E y S;

L-CDR3 QNDX₁X₂X₃PX₄T (V) (SEQ ID NO: 128)

en la que X1 se selecciona de D, F y L; X2 se selecciona de S, T e Y; X3 se selecciona de W e Y; X4 se selecciona de L y M.

Por tanto, los residuos de CDR de cadena pesada y cadena ligera del anticuerpo están sustancialmente modificados de las CDR murinas de 10H10. Por ejemplo, de acuerdo con la descripción enunciada anteriormente, la cadena pesada del anticuerpo puede ser solo un 70% (3/10 residuos alterados en la CDR1), y un 60% (4/10 residuos alterados en la CDR2) similares a las CDR murinas de 10H10 (la CDR 3 no se cambia). Los residuos de CDR de la cadena ligera son solo un 71% (5/17 cambiados), (71%) (2/7 cambiados), o 55% (4/9 cambiados) similares a las CDR murinas de 10H10.

También se divulgan en la presente anticuerpos adaptados humanos que compiten por la unión al factor tisular humano y, por tanto se unen sustancialmente al mismo epítipo en TF-ECD humano que el anticuerpo 10H10 murino. También se divulgan en la presente métodos para usar dichos anticuerpos para tratar a un sujeto humano que padece una afección en la que la expresión de TF y la bioactividad local resultante de la expresión de TF están relacionadas directa o indirectamente con la afección a ser tratada.

También se divulgan en la presente métodos para preparar los anticuerpos así como preparaciones farmacéuticamente aceptables de los anticuerpos, un recipiente que comprende la preparación, y un kit que comprende el recipiente en el que un anticuerpo divulgado en la presente está disponible para los métodos de uso para tratar un sujeto humano.

DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

La **Figura 1** muestra el epítipo revelado por análisis de difracción de rayos X de un co-cristal de Fab 10H10 o con una variante adaptada humana (Fab M1593) y residuos de TF-ECD humanos 5-208, donde se muestran los dos residuos de contacto que se cambiaron en H-CDR1 (T31P) y HCDR-2 (S57F) de M1593.

La **Figura 2** es un alineamiento de los residuos de aminoácidos de humano (SEQ ID NO: 1, 1-219), cyno (SEQ ID NO: 2, 1-220), y TF-ECD de ratón (SEQ ID NO: 3, 1-221) que muestra las posiciones de los residuos contactados por el anticuerpo murino TF8-5G9 (Huang et al., 1998 J Mol Biol 275:873-94) y 10H10 y aquellos residuos que se sabe que están en contacto con los factores de coagulación FVIII/VIIIa y FX.

La **Figura 3** muestra la proyección tridimensional de TF-ECD humano con las áreas indicadas contactadas por los paratopos de 5G9 y 10H10 así como los factores de coagulación FVII y FX, donde solo los residuos L104 y T197 son contactados por tanto 10H10 como FX.

La **Figura 4** muestra un alineamiento de las secuencias de aminoácidos de los dominios variables de la cadena pesada (alineamiento superior) y la cadena ligera (alineamiento inferior) del anticuerpo murino 10H10 (SEQ ID NO: 4 y 5, respectivamente), las secuencias adaptadas al marco humano del anticuerpo M59 (SEQ

ID NO: 19 y 23, respectivamente) y, dos secuencias del dominio variable maduras por afinidad seleccionadas H116 (SEQ ID NO: 133) y H171 (SEQ ID NO: 139).

5 La **Figura 5** muestra el porcentaje relativo de inhibición por los 27 mAbs madurados por afinidad para la liberación de IL-8 inducida por FVIIa a 0,24 µg/ml por células de cáncer de mama MDB-MB-231 en comparación con el control de isotipo B37.

10 La **Figura 6** muestra un gráfico del volumen tumoral durante los días posteriores a la implantación de células tumorales MDA-MB231 en ratones inmunocomprometidos donde el grupo dosificado con M1593 redujo el crecimiento de un tumor establecido.

15 La **Figura 7** muestra un gráfico del volumen tumoral durante los días posteriores a la implantación de células tumorales escamosas humanas A431 en ratones inmunocomprometidos en los que el grupo dosificado con M1593 redujo el crecimiento de un tumor establecido.

20 La **Figura 8** muestra un gráfico del porcentaje de lisis de células objetivo (células MDA-MB231) por PBMC humano frente a concentraciones de MAb para la IgG1 humana del dominio variable murino (M1), IgG4 humana del dominio variable murino con sustitución de alanina en las posiciones 234 y 235, M1593 como la IgG1 de tipo salvaje producida en CHO no modificadas, como M1593-LF producida en una línea de CHO seleccionada para producir glicano con bajo contenido de fucosa, y M1593-DE con sustituciones en la posición Kabat en S239D e I332E.

DESCRIPCIÓN DEL LISTADO DE SECUENCIAS

SEQ ID NO:	Descripción	Características u Origen
1	Cadena Madura de Factor Tisular Humano	ECD = 1-219
2	ECD de Factor Tisular de Mono Cynomolgous	ECD solo 1-220
3	Factor de tejido Mus musculus (P20352)	ECD = 1-221
4	Región variable de la cadena pesada (HC) de 10H10	
5	Región variable de cadena ligera (LC) de 10H10	
6	H-CDR1 de 10H10	
7	H-CDR2 de 10H10	
8	H-CDR3 de 10H10	
9	L-CDR1 de 10H10	
10	L-CDR2 de 10H10	
11	L-CDR3 de 10H10	
12	H15	IGHV5-in
13	H16	IGHV1-46
14	H17	IGHV1-3
15	H18	IGHV3-74
16	H19	IGHV1-69
17	H20	IGHV1-18
18	H21	IGHV1-f
19	H22	s1_IGHV5-a
20	H23	s1_IGHV1-69
21	H24	s1_IGHV1-f

ES 2 672 267 T3

(continuación)

<u>SEQ ID NO:</u>	<u>Descripción</u>	<u>Características u Origen</u>	
5	22	L2	IGKV4-1_B3
	23	L3	IGKV2D40_O1
	24	L4	IGKV2D-28_A3
10	25	L5	IGKV2D-29_A2
	26	L7	IGKV2-24_A23
	27	H-CDR2 de H22, H23 y H24	Murino, Kabat -7
15	28	FR1 de H15 y H22	IGHV5-in
	29	FR1 de H16, H17 y H20	IGHV1-46, IGHV1-3, IGHV1-18
20	30	FR1 de H18	IGHV3-74
	31	FR1 de H19 y H23	IGHV1-69
	32	FR1 de H21 y H24	
25	33	FR2 de H15 y H22	IGHV5-in
	34	FR2 de H16, H19, H20 y H23_s1_IGHV1-69	FR2 de IGHV1-46, IGHV1-18 y s1_IGHV1-69
	35	FR2 de H17	IGHV1-3
30	36	FR2 de H18	IGHV3-74
	37	FR2 de H21 y H24	IGHV1-f
35	38	FR3 de H15	IGHV5-in
	39	FR3 de H16	IGHV1-46
	40	FR3 de H17	IGHV1-3
40	41	FR3 de H18	IGHV3-74
	42	FR3 de H19	IGHV1-69
	43	FR3 de H20	IGHV1-18
45	44	FR3 de H21	IGHV1-f
	45	FR3 de H22	s1_IGHV5-a
	46	FR3 de H23	s1_IGHV1-69_
50	47	FR3 de H24	s1_IGHV1-f
	48	FR1 de L2	IGKV4-1_B3
55	49	FR1 de L3	IGKV2D40_O1
	50	FR1 de L4	IGKV2D-28_A3
	51	FR1 de L5	IGKV2D-29_A2
60	52	FR1 de L7	IGKV2-24_A23
	53	FR2 de L2	IGKV4-1_B3
65	54	FR2 de L3 y L4	IGKV2D-28_A3

ES 2 672 267 T3

(continuación)

<u>SEQ ID NO:</u>	<u>Descripción</u>	<u>Características u Origen</u>	
5	55	FR2 de L5	IGKV2D-29_A2
	56	FR2 de L7	IGKV2-24_A23
	57	FR3 de L2	IGKV4-1_B3
10	58	FR3 de L3, L4 y L5	IGKV2D40_O1, IGKV2D-28_A3, IGKV2D-29_A2
	59	FR3 de L7	IGKV2-24_A23
15	60	FR4 HC	IGHJ4
	61	FR4 LC	IGKJ2
	62	H-CDR1 de H106 en M1602	
20	63	H-CDR1 de H116 en M1587	
	64	H-CDR1 de H117 en M1590	
	65	H-CDR1 de H122 en M1591	
25	66	H-CDR1 de H133 en M1612	
	67	H-CDR1 de H134 en M1597	
	68	H-CDR1 de H136 en M1613 y H185 de M1596	
30	69	H-CDR1 de H136 en M1613	
	70	H-CDR1 de H139 en M1585	
35	71	H-CDR1 de H158 en M1594	
	72	H-CDR1 de H160 en M1595	M1595
	73	H-CDR1 de H164 en M1586	
40	74	H-CDR1 de H165 en M1592	
	75	H-CDR1 de H168 en M1605	
	76	H-CDR1 de H171 en M1593	
45	77	H-CDR1 de H173 en M1584	
	78	H-CDR1 de H179 en M1588	
	79	H-CDR1 de H181 en M1606	
50	80	H-CDR1 de H187 en M1589	
	81	H-CDR1 de H189 en M1607	
55	82	H-CDR1 de H177, H130, H105 y H128	
	83	Variantes H-CDR1	
	84	H-CDR2 de H106 en M1602	
60	85	H-CDR2 de H115 en M1610	
	86	H-CDR2 de H116 en M1587	

65

ES 2 672 267 T3

(continuación)

<u>SEQ ID NO:</u>	<u>Descripción</u>	<u>Características u Origen</u>	
5	87	H-CDR2 de H117 en M1590	
	88	H-CDR2 de H128 en M1611	
	89	H-CDR2 de H130 en M1599	
10	90	H-CDR2 de H134 en M1597	
	91	H-CDR2 de H136 en M1613	
	92	H-CDR2 de H137 en M1598	
15	93	H-CDR2 de H138 en M1604	
	94	H-CDR2 de H160 en M1595	
	95	H-CDR2 de H164 en M1586	
20	96	H-CDR2 de H165 en M1592	
	97	H-CDR2 de H168 en M1605	
	98	H-CDR2 de H171 en M1593	
25	99	H-CDR2 de H173 en M1584	
	100	H-CDR2 de H177 en M1583	
30	101	H-CDR2 de H179 en M1588	
	102	H-CDR2 de H181 en M1606	
	103	H-CDR2 de H185 en M1596	
35	104	H-CDR2 de H187 en M1589	
	105	H-CDR2 de H189 en M1607	
	106	H-CDR2 de H207 en M1608	
40	107	Variantes H-CDR2	
	108	L-CDR1 de L138 en ambos M1646 y M1638	
45	109	L-CDR1 de L162 en ambos M1651 y M1643	
	110	L-CDR1 de L225 en ambos M1652 y M1644	
	111	L-CDR1 de L283 en ambos M1653 y M1645	
50	112	L-CDR1 de L320 en ambos M1647 y M1639	
	113	L-CDR1 de L327 en ambos M1648 y M1640	
	114	L-CDR1 de L335 en ambos M1649 y M1641	
55	115	L-CDR1 de L369 en ambos M1650 y M1642	
	116	Variantes de L-CDR1	
60	117	L-CDR2 de L138 en ambos M1646 y M1638	
	118	L-CDR2 de L320 en ambos M1647 y M1639	
65	119	L-CDR2 de L335 en ambos M1649 y M1641	

ES 2 672 267 T3

(continuación)

<u>SEQ ID NO:</u>	<u>Descripción</u>	<u>Características u Origen</u>
5	120	Variantes L-CDR2
	121	L-CDR3 de L162 en ambos M1651 y M1643
	122	L-CDR3 de L225 en ambos M1652 y M1644
10	123	L-CDR3 de L283 en ambos M1653 y M1645
	124	L-CDR3 de L320 en ambos M1647 y M1639
	125	L-CDR3 de L327 en M1648 y M1640
15	126	L-CDR3 de L335 en ambos M1649 y M1641
	127	L-CDR3 de L369 en M1650 y M1642
20	128	Variantes L-CDR3
	129	H177
	130	H173
25	131	H139
	132	H164
	133	H116
30	134	H179
	135	H187
	136	H117
35	137	H122
	138	H165
40	139	H171
	140	H158
	141	H160
45	142	H185
	143	H134
	144	H137
50	145	H130
	146	H105
55	147	H106
	148	H138
	149	H168
60	150	H181
	151	H189
65	152	H207

(continuación)

<u>SEQ ID NO:</u>	<u>Descripción</u>	<u>Características u Origen</u>
5	153	H115
	154	H128
	155	H133
10	156	H136
	157	L138
	158	L320
15	159	L327
	160	L335
	161	L369
20	162	L162
	163	L225
25	164	L283
	165	Cadena ligera de longitud completa de M1593
	166	Cadena pesada de longitud completa de M1593
30	167	Cadena pesada de longitud completa de M1593-DE

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION**35 Abreviaturas**

TF = Factor tisular, huTF = Factor Tisular Humano, muTF = Factor Tisular Murino, cynoTF = Factor Tisular de Cynomolgus, TF-FVIIa = Complejo Factor Tisular-Factor VIIa, TF/FVIIa = Complejo Factor Tisular-Factor VIIa, HC = Cadena pesada, LC = cadena ligera, región-v = región variable, VH = región variable de cadena pesada, VL = región variable de cadena ligera, CCD = Dispositivo acoplado a carga, CDR = Región determinante de la complementariedad, CHES = ácido 2-(N-ciclohexilamino)-etanosulfónico, EDTA = ácido etilendiaminotetraacético, ECD = dominio extracelular, HEPES = ácido N-(2-hidroxietil) -piperazina-N'-2-etanosulfónico, HEK = células de riñón embrionarias humanas, MES = ácido 2-(N-morfolino)etanosulfónico, PAR = Receptor activado de proteasa, PBMC = células mononucleares de sangre periférica, PBS = Solución salina tamponada con fosfato, PDB = Banco de Datos de Proteínas, PEG = polietilenglicol, SDS PAGE = electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato de sodio, SEC = Cromatografía de exclusión por tamaño, MAb = Anticuerpo monoclonal, FR = Marco en anticuerpo, HFA = Adaptación de marco humano.

50 Definiciones y Explicación de la Terminología

Como se usa en la presente, un "anticuerpo" incluye anticuerpos completos y cualquier fragmento de unión al antígeno o una cadena individual de los mismos. Por tanto, el anticuerpo incluye cualquier molécula que contiene proteínas o péptidos que comprende por lo menos una porción de una molécula de inmunoglobulina, como, pero no limitado a, por lo menos una región determinante de la complementariedad (CDR) de una cadena pesada o ligera o una porción de unión a ligando de la misma, una región variable de cadena pesada o ligera, una región constante de cadena pesada o ligera, una región marco (FR), o cualquier porción de las mismas, o por lo menos una porción de una proteína de unión, que puede incorporarse en un anticuerpo del presente invención. El término "anticuerpo" se pretende que incluya además anticuerpos, fragmentos de digestión, porciones especificadas y variantes de los mismos, incluyendo miméticos de anticuerpos o que comprenden porciones de anticuerpos que imitan la estructura y/o función de un anticuerpo o un fragmento o porción especificada del mismo, que incluyen anticuerpos de cadena sencilla y de dominio único y fragmentos de los mismos. Los fragmentos funcionales incluyen fragmentos de unión al antígeno a un objetivo preseleccionado. Ejemplos de fragmentos de unión abarcados dentro del término "porción de unión a antígeno" de un anticuerpo incluyen (i) un fragmento Fab, un fragmento monovalente que consiste de los dominios VL, VH, CL y CH; (ii) un fragmento F(ab')₂, un fragmento bivalente que comprende dos fragmentos Fab ligados por un puente disulfuro en la región bisagra; (iii) un fragmento Fd que consiste de los dominios VH y CH; (iv)

un fragmento Fv que consiste de los dominios VL y VH de un solo brazo de un anticuerpo, (v) un fragmento dAb (Ward et al., (1989) Nature 341:544-546), que consiste en un dominio VH; y (vi) una región determinante de la complementariedad (CDR) aislada. Además, aunque los dos dominios del fragmento Fv, VL y VH, están codificados por genes separados, se pueden unir, usando métodos recombinantes, mediante un conector sintético que les permita formarse como una cadena de proteínas individual en la que las regiones VL y VH se emparejan para formar moléculas monovalentes (conocidas como Fv de cadena sencilla (scFv); ver, por ejemplo, Bird et al. (1988) Science 242:423-426, y Huston et al. (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:5879-5883). Tales anticuerpos de cadena sencilla también se pretende que estén incluidos dentro del término "porción de unión a antígeno" de un anticuerpo. Estos fragmentos de anticuerpos se obtienen usando técnicas convencionales conocidas por los expertos en la técnica, y los fragmentos se examinan por su utilidad de la misma manera que los anticuerpos intactos. Por el contrario, las bibliotecas de constructos de scFv se pueden usar para examinar la capacidad de unión a antígeno y luego, usando técnicas convencionales, empalmar con otro ADN que codifica secuencias de genes de la línea germinal humana. Un ejemplo de tal biblioteca es la "HuCAL: Human Combinatorial Antibody Library" (Knappik, A. et al. J Mol Biol (2000) 296(1):57-86).

El término "CDR" se refiere a la región determinante de la complementariedad o a los residuos de aminoácidos de la región hipervariable de un anticuerpo que participa en o es responsable de la unión al antígeno. La región hipervariable o CDR del subtipo de IgG humana del anticuerpo comprende residuos de aminoácidos de los residuos 24-34 (L-CDR1), 50-56 (L-CDR2) y 89-97 (L-CDR3) en el dominio variable de la cadena ligera y 31-35 (H-CDR1), 50-65 (H-CDR2) y 95-102 (H-CDR3) en el dominio variable de la cadena pesada como se describe por Kabat et al. (1991 Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5ª Edición, Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md.) y/o aquellos residuos de un giro hipervariable (es decir, residuos 26-32 (L1), 50-52 (L2) y 91-96 (L3) en el dominio variable de la cadena ligera y 26-32 (H1), 52-56 (H2), y 95-101 (H3) en el dominio variable de la cadena pesada como se describe por (Chothia y Lesk, 1987 J. Mol. Biol. 196: 901-917). Chothia y Lesk se refieren a giros hipervariables estructuralmente conservados como "estructuras canónicas". Los residuos marco o FR1-4 son aquellos residuos del dominio variable distintos de y que delimitan las regiones hipervariables. El sistema de numeración de Chothia y Lesk tiene en cuenta las diferencias en el número de residuos en un giro mostrando la expansión en residuos especificados indicados con anotaciones de letras pequeñas, por ejemplo, 30a, 30b, 30c, etc. Más recientemente, se ha desarrollado y adoptado ampliamente un sistema de numeración universal, internacional ImMunoGeneTics information system® (IMGT) (LaFranc, et al. 2005. Nucl Acids Res. 33:D593-D597).

En la presente, se hace referencia a las CDR en términos tanto de secuencia de aminoácidos como de la localización dentro de la cadena ligera o pesada mediante numeración secuencial. Como la "localización" de las CDR dentro de la estructura del dominio variable de inmunoglobulina se conserva entre especies y está presente en estructuras llamadas giros, mediante el uso de sistemas de numeración que alinean secuencias de dominios variables de acuerdo con características estructurales, CDR y residuos de marco y se identifican fácilmente. Esta información se usa en el injerto y la sustitución de residuos de CDR de inmunoglobulinas de una especie en un marco aceptor de, típicamente, un anticuerpo humano.

Los términos "Fc", "proteína que contiene Fc" o "molécula que contiene Fc" como se usan en la presente se refieren a una proteína monomérica, dimerica o heterodimérica que tiene por lo menos un dominio de inmunoglobulina CH2 y CH3. Los dominios CH2 y CH3 pueden formar por lo menos una parte de la región dimerica de la proteína/molécula (por ejemplo, anticuerpo).

El término "epítipo" significa un determinante de proteínas capaz de unirse específicamente a un anticuerpo. Los epítipos consisten habitualmente de agrupaciones superficiales químicamente activas de moléculas como aminoácidos o cadenas laterales de azúcar y habitualmente tienen características estructurales tridimensionales específicas, así como características de carga específicas. Los epítipos conformacionales y no conformacionales se distinguen porque se pierde la unión al primero pero no al último en presencia de solventes desnaturizantes.

Como se usa en la presente, K_D se refiere a la constante de disociación, específicamente, la K_D del anticuerpo para un antígeno predeterminado, y es una medida de la afinidad del anticuerpo por un objetivo específico. Los anticuerpos de alta afinidad tienen una K_D de 10^{-8} M o menos, más preferiblemente 10^{-9} M o menos e incluso más preferiblemente 10^{-10} M o menos, para un antígeno predeterminado. El recíproco de K_D es K_A , la constante de asociación. El término " k_{dis} " o " k_2 ", o " k_d " como se usa en la presente, se pretende que se refiera a la velocidad de disociación de una interacción anticuerpo-antígeno particular. La " K_D " es la proporción de la velocidad de disociación (k_2), también denominada la "disociación (k_{off})" para la velocidad de asociación (k_1) o "asociación (k_{on})". Por lo tanto, K_D es igual a k_2/k_1 o k_{off}/k_{on} y se expresa como una concentración molar (M). Se deduce que cuanto menor es la K_D , más fuerte es la unión. Por tanto, una K_D de 10^{-6} M (o 1 microM) indica unión débil en comparación con 10^{-9} M (o 1nM).

Los términos "anticuerpo monoclonal" o "composición de anticuerpo monoclonal" tal como se usan en la presente se refieren a una preparación de moléculas de anticuerpos de composición molecular única. Una

composición de anticuerpo monoclonal muestra una única especificidad de unión y afinidad para un epítipo particular. El término también incluye "anticuerpo recombinante" y "anticuerpo monoclonal recombinante" ya que todos los anticuerpos se preparan, expresan, crean o aíslan por medios recombinantes, como (a) anticuerpos aislados de un animal o un hibridoma preparado por la fusión de células animales secretoras de anticuerpos y un compañero de fusión, (b) anticuerpos aislados de una célula huésped transformada para expresar el anticuerpo, por ejemplo, de un transfectoma, (c) anticuerpos aislados de una biblioteca de anticuerpos humanos o de otras especies recombinante, combinatoria, y (d) anticuerpos preparados, expresados, creados o aislados por cualquier otro medio que impliquen el corte y empalme de las secuencias del gen de inmunoglobulina a otras secuencias de ADN. Un "anticuerpo aislado", como se usa en la presente, se pretende que se refiera a un anticuerpo que está sustancialmente libre de otros anticuerpos que tienen especificidades antigénicas diferentes. Un anticuerpo aislado que se une específicamente a un epítipo, isoforma o variante de TF humano puede, sin embargo, tener reactividad cruzada con otros antígenos relacionados, por ejemplo, de otras especies (por ejemplo, homólogos de especies de TF). Además, un anticuerpo aislado puede estar sustancialmente libre de otro material celular y/o productos químicos. En una realización de la invención, una combinación de anticuerpos monoclonales "aislados" que tienen especificidades diferentes se combinan en una composición bien definida.

Como se usa en la presente, "unión específica", "unión inmuno-específica" y "se une inmuno-específicamente" se refiere a la unión del anticuerpo a un antígeno predeterminado. Típicamente, el anticuerpo se une con una constante de disociación (K_D) de 10^{-7} M o menos, y se une al antígeno predeterminado con una K_D que es por lo menos dos veces menor que su K_D para la unión a un antígeno no específico (por ejemplo, BSA, caseína, o cualquier otro polipéptido especificado) distinto del antígeno predeterminado. Las frases "un anticuerpo que reconoce un antígeno" y "un anticuerpo específico para un antígeno" se usan de manera intercambiable en la presente con el término "un anticuerpo que se une específicamente a un antígeno". Como se usa en la presente, unión "altamente específica" significa que la K_D del anticuerpo para el epítipo objetivo específico es por lo menos 10 veces menor que la K_D para la unión de ese anticuerpo a otros ligandos.

Como se usa en la presente, "isotipo" se refiere a la clase de anticuerpo (por ejemplo, IgM o IgG) que está codificada por genes de la región constante de la cadena pesada. Algunas clases de anticuerpos abarcan además subclases que también están codificadas por las regiones constantes de la cadena pesada y decoradas además por oligosacáridos en residuos específicos dentro de los dominios de la región constante (por ejemplo, IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4) que imparten además funciones biológicas al anticuerpo. Por ejemplo, en los isotipos de anticuerpos humanos IgG1, IgG3 y, en menor medida, IgG2 muestran funciones efectoras como lo hacen los anticuerpos murinos IgG2a.

Por funciones "efectoras" o "efectoras positivas" se entiende que el anticuerpo comprende dominios distintos de los dominios de unión específicos del antígeno capaces de interactuar con receptores u otros componentes sanguíneos como el complemento, que llevan, por ejemplo, al reclutamiento de macrófagos y eventos que llevan a la destrucción de las células unidas por los dominios de unión al antígeno del anticuerpo. Los anticuerpos tienen varias funciones efectoras mediadas por la unión de moléculas efectoras. Por ejemplo, la unión del componente C1 del complemento a anticuerpos activa el sistema del complemento. La activación del complemento es importante en la opsonización y lisis de los patógenos celulares. La activación del complemento estimula la respuesta inflamatoria y también puede estar implicada en la hipersensibilidad autoinmune. Además, los anticuerpos se unen a las células a través de la región Fc, con un sitio del receptor de Fc en la región Fc del anticuerpo que se une a un receptor de Fc (FcR) en una célula. Hay varios receptores de Fc que son específicos para diferentes clases de anticuerpo, incluyendo IgG (receptores gamma), IgE (receptores eta), IgA (receptores alfa), e IgM (receptores mu). La unión del anticuerpo a los receptores de Fc en las superficies celulares desencadena una serie de respuestas biológicas importantes y diversas incluyendo la engullición y la destrucción de partículas recubiertas con anticuerpos, la depuración de complejos inmunes, la lisis de células objetivo recubiertas con anticuerpos por células asesinas (denominada citotoxicidad mediada por células dependientes de anticuerpos, o ADCC), liberación de mediadores inflamatorios, transferencia placentaria y control de la producción de inmunoglobulinas.

Los términos "proteína del factor tisular", "factor tisular" y "TF" se usan para referirse a un polipéptido que tiene una secuencia de aminoácidos correspondiente a un factor tisular humano de origen natural o a un factor tisular recombinante como se describe a continuación. El TF de origen natural incluye especies humanas así como otras especies animales como el factor tisular de conejo, rata, porcino, primate no humano, equino, murino y ovino (ver, por ejemplo Hartzell et al., (1989) Mol. Cell. Biol., 9:2567-2573; Andrews et al., (1991) Gene, 98:265-269; y Takayenik et al., (1991) Biochem. Biophys. Res. Comm., 181:1145-1150). La secuencia de aminoácidos del factor tisular humano viene dada por el registro UniProt P13726 (SEQ ID NO: 1), mono cynomolgous (SEQ ID NO: 2) y murino por UniProt P20352 (SEQ ID NO: 3). La secuencia de aminoácidos de otras proteínas del factor tisular de mamífero es generalmente conocida o puede obtenerse mediante técnicas convencionales.

Los anticuerpos de la invención son útiles para su administración a un sujeto humano o para contactar con tejido humano cuando se desea bloquear las funciones del FT humano expresado en una célula, tejido u órgano resultante de la señalización de FT y en donde también se desea no alterar sustancialmente las funciones

procoagulantes de TF que resultan de la formación de un complejo TF:FVIIa. Tales usos pueden encontrarse en el tratamiento de tumores, en particular, tumores sólidos primarios o secundarios de mama, próstata, pulmón, páncreas y ovario.

5 La invención también abarca ácidos nucleicos que codifican las secuencias de anticuerpos de la invención que pueden combinarse con aquellas secuencias que se sabe en la técnica que son útiles en la construcción y fabricación a través de medios recombinantes o transferencia de la información para la expresión de anticuerpos en un medio donde es deseable que se formen, como en cultivo, *in situ* e *in vivo*. Los medios para el funcionamiento de tales ácidos nucleicos con la intención de producir un anticuerpo de la invención son bien conocidos por los expertos en la técnica.

La invención proporciona además preparaciones tales como preparaciones farmacéuticamente aceptables o estables para la administración y almacenamiento de un anticuerpo de la invención en forma aislada.

15 1. Composición del anticuerpo

Propiedades

20 La presente invención se basa en el descubrimiento inesperado de que un anticuerpo murino que no bloquea la coagulación que se une al TF humano, conocido como 10H10 (Edgington, et al. US 5.223.427) es capaz de anular la señalización de TF en ciertas células (Ahmed, et al., 2006, citado anteriormente, WO2007/056352A2). Por lo tanto, un anticuerpo divulgado en la presente es uno que retiene el epítipo de unión del anticuerpo murino 10H10, cuyo anticuerpo no compite con el factor tisular para la unión de FVIIa y no bloquea sustancialmente la actividad procoagulante, amidolítica del complejo TF-VIIa y que no bloquea la señalización mediada por TF-VIIa y los efectos oncogénicos corriente abajo como la liberación de IL-8 de citoquinas. El anticuerpo está adaptado a genes de IgG de la línea germinal humana como se representa en la base de datos IMGT y retiene la unión a TF humano a la vez que no interfiere con la capacidad del TF para iniciar la coagulación en presencia de calcio en plasma humano.

30 Un anticuerpo que retiene el epítipo de unión del anticuerpo murino 10H10 puede evaluarse generalmente evaluando la capacidad del anticuerpo de unirse a TF y de competir con 10H10 por la unión a TF humano mientras que al mismo tiempo, cuando está presente en una muestra que comprende TF en presencia de plasma humano, no prolongará sustancialmente el tiempo requerido para la coagulación de plasma iniciada por TF en comparación con una muestra similar de plasma humano en ausencia del anticuerpo. En otro sentido, el epítipo del anticuerpo puede mapearse físicamente usando técnicas conocidas en la técnica, que incluyen, pero no están limitadas a, mutagénesis por deleción, mutagénesis por sustitución, proteólisis limitada de TF unida por el anticuerpo seguido por identificación del fragmento del péptido, y métodos de co-cristalización y difracción de rayos X para mapear la proximidad de estructuras atómicas de las estructuras primarias del TF y los dominios de unión al anticuerpo definiendo de este modo una asociación tridimensional entre el anticuerpo y el TF humano (Fig. 1).

40 El epítipo, por tanto, puede definirse como no superpuesto con el sitio de unión de FVIIa (Fig. 2 y 3). Más específicamente, el epítipo unido por el anticuerpo puede contactar con uno o más residuos en el dominio N de TF (residuos 1-104 de la cadena madura como se representa por la SEQ ID NO: 1) no contactados por FVII, como los residuos 65-70, y no contactar con los residuos K165 y K166 en el dominio C, que son importantes para la unión al sustrato (Kirchofer et al., 2000 Thromb Haemostat 84: 1072-81) a la vez que no interfiere con la capacidad de TF para iniciar la coagulación en presencia de calcio en plasma humano.

50 En una realización, la asociación (k_a en 1/M-s) del anticuerpo es mayor de 1×10^{-5} . En otra realización, la disociación (k_d en 1/s) del anticuerpo para TF es menor que $1,0 \times 10^{-5}$ y la K_D resultante es inferior a 1×10^{-9} M (menos de 1 nM). En una realización particular, el anticuerpo es un anticuerpo adaptado al gen de la línea germinal humana con una K_D inferior a $0,5 \times 10^{-9}$ M. El anticuerpo tiene dominios de unión de los emparejamientos de cadena pesada y ligera de M1593 como se muestra en la Tabla 11. También se divulgan anticuerpos que tienen dominios de unión de los emparejamientos de la cadena pesada y ligera como se muestra en la Tabla 11 como M1639, M1645, M1647, M1652, M1641, M1644, M1587, M1604, , M1606, M1584, M1611, M1596, M1601, M1588, M1594, M1607, M1612, M1595, M1599, M1589, M1592, M1583, y M1610.

La composición del anticuerpo puede caracterizarse además como comprendiendo una secuencia de residuos de aminoácidos en el dominio de unión seleccionado de una o más de las secuencias de aminoácidos dadas por las SEQ ID NO: 6-166.

Variantes de anticuerpos con funciones de Fc Alteradas

65 A medida que el uso de anticuerpos monoclonales terapéuticos producidos por métodos recombinantes se expande, se están explorando las características y propiedades de estas composiciones complejas. Aunque las características inmunes específicas y dirigidas a antígenos residen generalmente en los dominios y subdominios

variables, como los extremos de giros de las regiones hipervariables también conocidas como CDR, el complejo interactúa con otros receptores y componentes séricos proporcionados por las estructuras formadas por los dominios constantes, como la porción Fc de una IgG.

5 Los anticuerpos y otras proteínas que contienen Fc pueden compararse para la funcionalidad mediante varios ensayos in vitro bien conocidos. En particular, es interesante la afinidad para los miembros de la familia FcyRI, FcyRII y FcyRIII de los receptores de Fcy. Estas mediciones podrían hacerse usando formas solubles recombinantes de los receptores o formas asociadas a células de los receptores. Adicionalmente, la afinidad para FcRn, el receptor responsable de la vida media circulante prolongada de las IgG, puede medirse, por ejemplo, mediante BIAcore usando FcRn soluble recombinante. Los ensayos funcionales basados en células, como los ensayos ADCC y los ensayos CDC, proporcionan comprensión sobre las consecuencias funcionales probables de las estructuras variantes particulares. En una realización, el ensayo ADCC está configurado para que las células NK sean la célula efectora primaria, reflejando de este modo los efectos funcionales en el receptor de FcyRIIIA. También pueden usarse ensayos de fagocitosis para comparar las funciones efectoras inmunes de diferentes variantes, así como ensayos que miden las respuestas celulares, como la liberación de superóxido o mediadores inflamatorios. También pueden usarse modelos in vivo, como, por ejemplo, en el caso de usar variantes de anticuerpos anti-CD3 para medir la activación de células T en ratones, una actividad que depende de dominios Fc que acoplan con ligandos específicos, como receptores de Fcy.

20 **2. Generación de Anticuerpos Bloqueadores de la Señal del Factor Tisular**

Un anticuerpo que tiene las características y la actividad biológica de un anticuerpo descrito en esta solicitud puede incluir o derivarse de cualquier mamífero, como, pero no limitado a, un humano, un ratón, un conejo, una rata, un roedor, un primate, una cabra, o cualquier combinación de los mismos e incluye anticuerpos de humanos, primates, roedores, mamíferos, quiméricos, adaptados a humanos o a primates, inmunoglobulinas, productos de escisión y otras porciones especificadas y variantes de los mismos aisladas. Los anticuerpos monoclonales pueden prepararse por cualquier método conocido en la técnica como la técnica de hibridoma (Kohler y Milstein, 1975, Nature, 256:495-497.) y métodos relacionados usando compañeros de fusión inmortalizados fusionados a células B. Los anticuerpos para su uso en la invención pueden generarse también usando métodos de anticuerpos de linfocitos individuales clonando y expresando ADNc de regiones variables de inmunoglobulina generados a partir de linfocitos individuales seleccionados para la producción de anticuerpos específicos mediante, por ejemplo los métodos descritos por Babcook, J. et al., 1996. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93(15):7843-78481 ; la WO92/02551; la WO2004/051268 y la Solicitud de Patente Internacional número WO2004/106377.

35 Los anticuerpos, incluyendo los dominios o subdominios de unión al objetivo, los dominios constantes, y los dominios de unión no al objetivo funcionales como el dominio Fc, como se describen en la presente, pueden derivarse de varias maneras bien conocidas en la técnica. En un aspecto, las secuencias de dominios de anticuerpos de origen natural se obtienen convenientemente de documentos o bases de datos publicados o en línea, como la V-base (proporcionada por el MRC Centre for Protein Engineering), el National Center for Biologics Information (NCBI Ig blast), o la base de datos ImMunoGeneTics (IMGT) proporcionada por el International Immunogenetics Information System®.

Anticuerpos humanos

45 La invención proporciona además inmunoglobulinas (o anticuerpos) humanos que se unen a TF humano. Estos anticuerpos también pueden caracterizarse como diseñados o adaptados. Las inmunoglobulinas tienen región(es) variable(s) sustancialmente de una inmunoglobulina de la línea germinal humana e incluyen variaciones dirigidas en residuos que se sabe participan en el reconocimiento de antígeno, por ejemplo, las CDR de Kabat o los giros hipervariables como se definen estructuralmente. Las región(es) constante(s), si están presentes, también son sustancialmente de una inmunoglobulina humana. Los anticuerpos humanos muestran una K_D para TF de por lo menos aproximadamente 10^{-6} M (1 microM), aproximadamente 10^{-7} M (100 nM), 10^{-9} M (1 nM), o menos. Para afectar un cambio en la afinidad, por ejemplo, mejorar la afinidad o reducir la K_D , del anticuerpo humano para TF, pueden realizarse sustituciones o en los residuos de CDR o en otros residuos.

55 La fuente para la producción de anticuerpo humano que se une a TF es preferiblemente las secuencias proporcionadas en la presente como las regiones variables que comprenden una secuencia seleccionada de las SEQ ID NO: 129-163, una FR seleccionada de las SEQ ID NO: 28-61, y CDR, donde las CDR se seleccionan de una o más de las SEQ ID NO: 6-11, 27, 62-128 identificadas como capaces de unirse a TF humano y reaccionar de forma cruzada con TF de mono cynomolgous usando un repertorio de Fab derivado de humano expuesto en partículas de fago filamentoso.

65 La sustitución de cualquiera de las CDR no humanas en cualquier FR de dominio variable humano puede no permitir la misma orientación espacial proporcionada por la conformación a la FR variable original de la que se originaron las CDR. Las regiones marco variables de cadena pesada y ligera a emparejar en el MAb final pueden derivarse de la misma o de diferentes secuencias de anticuerpos humanos. Las secuencias de anticuerpos humanos

pueden ser las secuencias de anticuerpos humanos de origen natural, derivarse de secuencias de inmunoglobulina de la línea germinal humana, o pueden ser secuencias de consenso de varias secuencias de anticuerpos y/o línea germinal humanas.

5 Las secuencias de anticuerpos humanos adecuadas se identifican mediante comparaciones informáticas de las secuencias de aminoácidos de las regiones variables de ratón con las secuencias de anticuerpos humanos conocidos. La comparación se realiza por separado para cadenas pesadas y ligeras, pero los principios son similares para cada una.

10 Con respecto al método empírico, se ha encontrado que es particularmente conveniente crear una biblioteca de secuencias variantes que puedan examinarse para determinar la actividad deseada, la afinidad de unión o la especificidad. Un formato para la creación de dicha biblioteca de variantes es un vector de presentación de fagos. Alternativamente, las variantes pueden generarse usando otros métodos para el abigarramiento de una secuencia de ácidos nucleicos que codifica los residuos objetivo dentro del dominio variable.

15 Otro método para determinar si se requieren sustituciones adicionales, y la selección de residuos de aminoácidos para la sustitución, puede lograrse usando modelos informáticos. El hardware y el software informáticos para producir imágenes tridimensionales de moléculas de inmunoglobulina están ampliamente disponibles. En general, los modelos moleculares se producen partiendo de estructuras resueltas para cadenas de inmunoglobulinas o dominios de las mismas. Las cadenas a ser modeladas se comparan para la similitud de la secuencia de aminoácidos con cadenas o dominios de estructuras tridimensionales resueltas, y las cadenas o dominios que muestran la mayor similitud de secuencia se seleccionan como puntos de partida para la construcción del modelo molecular. Las estructuras de partida resueltas se modifican para permitir diferencias entre los aminoácidos reales en las cadenas de inmunoglobulinas o dominios que se están modelando, y los de la estructura de partida. Las estructuras modificadas se ensamblan luego en una inmunoglobulina compuesta. Finalmente, el modelo se refina por minimización de energía y verificando que todos los átomos estén dentro de las distancias apropiadas entre sí y que las longitudes y ángulos de los enlaces estén dentro de los límites químicamente aceptables.

20 Debido a la degeneración del código, una variedad de secuencias de ácidos nucleicos codificará cada secuencia de aminoácidos de inmunoglobulina. Las secuencias de ácidos nucleicos deseadas pueden producirse mediante síntesis de ADN en fase sólida *de novo* o mediante mutagénesis por PCR de una variante preparada anteriormente del polinucleótido deseado.

25 Los segmentos variables de anticuerpos humanos producidos como se describe en la presente están ligados típicamente a por lo menos una porción de una región constante de inmunoglobulina humana. El anticuerpo contendrá regiones constantes tanto de cadena ligera como de cadena pesada. La región constante de cadena pesada incluye habitualmente dominios CH1, bisagra, CH2, CH3 y, algunas veces, CH4.

30 Los anticuerpos humanos pueden comprender cualquier tipo de dominio constante de cualquier clase de anticuerpo, incluyendo IgM, IgG, IgD, IgA e IgE, y cualquier subclase (isotipo), incluyendo IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4. Cuando se desea que el anticuerpo humanizado exhiba actividad citotóxica, el dominio constante es habitualmente un dominio constante de fijación del complemento y la clase es típicamente IgG₁. Cuando dicha actividad citotóxica no es deseable, el dominio constante puede ser de la clase IgG₂. El anticuerpo humanizado puede comprender secuencias de más de una clase o isotipo.

35 Los ácidos nucleicos que codifican regiones variables de cadena ligera y pesada humanizadas, opcionalmente ligadas a regiones constantes, se insertan en vectores de expresión. Las cadenas ligera y pesada se pueden clonar en los mismos o diferentes vectores de expresión. Los segmentos de ADN que codifican las cadenas de inmunoglobulina están ligados operativamente a secuencias de control en el vector(es) de expresión que aseguran la expresión de los polipéptidos de inmunoglobulina. Dichas secuencias de control incluyen una secuencia señal, un promotor, un potenciador y una secuencia de terminación de la transcripción (ver Queen et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86, 10029 (1989); WO 90/07861 ; Co et al., J. Immunol. 148, 1149 (1992)).

40 Los anticuerpos o Fc o componentes y dominios de los mismos también pueden obtenerse seleccionando de bibliotecas de tales dominios o componentes, por ejemplo, una biblioteca de fagos. Se puede crear una biblioteca de fagos insertando una biblioteca de oligonucleótidos aleatorios o una biblioteca de polinucleótidos que contienen secuencias de interés, como las de células B de un animal o humano inmunizado (Hoogenboom, et al., 2000, Immunol. Today 21(8) 371-8). Las bibliotecas de fagos de anticuerpos contienen parejas de regiones variables de cadena pesada (H) y ligera (L) en un fago que permite la expresión de fragmentos Fv de cadena sencilla o fragmentos Fab (Hoogenboom, et al., 2000 *supra.*) La diversidad de una biblioteca de fagémidos puede manipularse para aumentar y/o alterar las inmunoespecificidades de los anticuerpos monoclonales de la biblioteca para producir y posteriormente identificar anticuerpos monoclonales humanos deseables adicionales. Por ejemplo, los genes que codifican las moléculas de inmunoglobulina de la cadena pesada (H) y la cadena ligera (L) pueden mezclarse aleatoriamente (cambiar el orden) para crear nuevas parejas de HL en una molécula de inmunoglobulina ensamblada. Adicionalmente, los genes que codifican cualquiera o ambas de la cadena H y L pueden mutagenizarse

en una región determinante de la complementariedad (CDR) de la región variable del polipéptido de inmunoglobulina, y posteriormente examinarse para capacidades de afinidad y neutralización deseables. Las bibliotecas de anticuerpos también pueden crearse sintéticamente seleccionando una o más secuencias de FR humanas e introduciendo colecciones de casetes de CDR de repertorios de anticuerpos humanos o a través de variación diseñada (Kretzschmar y von Ruden 2000, *Current Opinion in Biotechnology*, 13: 598-602). Las posiciones de diversidad no están limitadas a CDR, sino que también pueden incluir los segmentos de FR de las regiones variables o pueden incluir otros que no sean regiones variables de anticuerpos, como péptidos.

Otras bibliotecas de componentes de unión a objetivos o no de unión a objetivos que pueden incluir otras regiones variables de anticuerpos son presentación de ribosomas, presentación de levaduras y presentaciones bacterianas. La presentación de ribosomas es un método de traducción de ARNm en sus proteínas afines mientras se mantiene la proteína unida al ARN. La secuencia que codifica el ácido nucleico se recupera mediante RT-PCR (Mattheakis, L.C. et al., 1994. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91, 9022). La presentación de levaduras se basa en la construcción de proteínas de fusión del receptor de adhesión a levadura alfa-aglutinina asociado a la membrana, aga1 y aga2, una parte del sistema de tipo de apareamiento (Broder, et al., 1997. *Nature Biotechnology*, 15:553-7). La presentación bacteriana se basa en la fusión del objetivo con proteínas bacterianas exportadas que se asocian con la membrana celular o la pared celular (Chen y Georgiou 2002. *Biotechnol Bioeng*, 79:496-503).

La invención también proporciona ácidos nucleicos que codifican las composiciones de la invención como polinucleótidos aislados o como porciones de vectores de expresión que incluyen vectores compatibles con la expresión del fago procariota, eucariota o filamentosa, secreción y/o presentación de las composiciones o mutágenos dirigidos de los mismos.

3. Métodos para Producir el Anticuerpo de la Invención

Una vez que se ha identificado una molécula de anticuerpo de la invención de acuerdo con las características estructurales y funcionales descritas en la presente, las secuencias de ácidos nucleicos que codifican las porciones deseadas de, o las cadenas de anticuerpos completas, pueden clonarse, copiarse o sintetizarse químicamente y pueden aislarse y usarse para expresar el anticuerpo por métodos rutinarios. El anticuerpo de la invención puede purificarse mediante cualquier método conocido en la técnica para la purificación de una molécula de inmunoglobulina, por ejemplo, mediante cromatografía (por ejemplo, cromatografía en columna de intercambio iónico, afinidad y tamaño), centrifugación, solubilidad diferencial, o por cualquier otro técnica estándar para la purificación de proteínas. Adicionalmente, los anticuerpos de la presente invención o fragmentos de los mismos pueden fusionarse a secuencias polipeptídicas heterólogas descritas en la presente o conocidas de otro modo en la técnica, para facilitar la purificación.

Selección de Células Huésped o Diseño de Células Huésped

Como se describe en la presente, la célula huésped elegida para la expresión de la proteína o anticuerpo monoclonal que contiene Fc recombinante es un contribuyente importante a la composición final, incluyendo, sin limitación, la variación en la composición de las fracciones de oligosacáridos que decoran la proteína en el dominio CH2 de inmunoglobulina. Por tanto, un aspecto de la invención implica la selección de células huésped apropiadas para su uso y/o desarrollo de una célula de producción que expresa la proteína terapéutica deseada.

Además, la célula huésped puede ser de origen mamífero o puede seleccionarse de células COS-1, COS-7, HEK293, BHK21, CHO, BSC-1, Hep G2, 653, SP2/0, 293, HeLa, de mieloma, de linfoma, de levadura, de insecto o de planta, o cualquier célula derivada, inmortalizada o transformada de las mismas.

Alternativamente, la célula huésped puede seleccionarse de una especie u organismo incapaz de glicosilar polipéptidos, por ejemplo, una célula u organismo procariota, como y de la *E. coli spp*, *Klebsiella spp.*, o *Pseudomonas spp* naturales o diseñadas.

4. Métodos de Uso de un Anticuerpo Anti-TF

Las composiciones (anticuerpo, variantes de anticuerpo o fragmentos) generadas por cualquiera de los métodos descritos anteriormente se pueden usar para diagnosticar, tratar, detectar, o modular una enfermedad humana o patologías específicas en células, tejidos, órganos, fluidos o, en general, un huésped. Como se enseña en la presente, la modificación de la porción Fc de un anticuerpo, proteína de fusión Fc o fragmento Fc para proporcionar un intervalo de funciones efectoras más específicamente adecuado después de la unión al objetivo pero en donde el anticuerpo retiene las propiedades de dirección originales generará variantes del anticuerpo para aplicaciones específicas e indicaciones terapéuticas.

Las enfermedades o patologías que pueden ser susceptibles de tratamiento usando una composición proporcionada por la invención incluyen, pero no están limitadas a: cáncer; incluyendo tumores sólidos primarios y metástasis; carcinomas, adenocarcinomas, melanomas, tumores líquidos como linfomas, leucemias y mielomas y

masas invasivas formadas a medida que progresa el cáncer; cánceres de tejidos blandos; sarcomas, osteosarcoma, timoma, linfosarcoma, fibrosarcoma, leiomiomas, lipomas, glioblastoma, astrosarcoma, cáncer de próstata, mama, ovario, estómago, páncreas, laringe, esófago, testículos, hígado, parótida, tracto biliar, colon, recto, cuello uterino, útero, endometrio, tiroides, pulmón, riñón o vejiga.

5 En la medida en que el anticuerpo de la invención reduzca el medio pro-oncogénico en un tejido bloqueando la capacidad del TF para participar en la liberación corriente abajo de citoquinas como la citoquina inflamatoria, IL-8, el anticuerpo de la invención puede usarse profilácticamente o junto con otros tratamientos dirigidos a suprimir la proliferación tumoral y la angiogénesis. La mayoría de los cánceres relacionados con la edad se derivan de las células epiteliales de los tejidos renovables. Un elemento importante de los tejidos epiteliales es el estroma, la capa sub-epitelial compuesta de matriz extracelular y varios tipos de células que incluyen fibroblastos, macrófagos y células endoteliales. En tumores cancerosos el estroma es crítico para el crecimiento y la progresión tumoral y el TF puede expresarse en células estromales así como también en células epiteliales cancerosas. Por lo tanto, la presencia de los factores corriente abajo que resultan de la señalización TF:VIIa en el estroma pueden crear una ambiente de tejido pro-oncogénico que sinergiza con las mutaciones oncogénicas para impulsar la formación de tejido neoplásico.

20 De manera similar, cuando el TF se expresa en tejido adiposo, puede modificar la función del tejido en condiciones como la obesidad, el síndrome metabólico y la diabetes. El anticuerpo de la invención puede ser útil para tratar estas afecciones bloqueando la señalización TF:VIIa. Algunos de los factores producidos corriente abajo de la señalización TF:FVIIa, incluyendo IL-8 e IL-6, son mediadores potentes de la inflamación. Los usos adicionales del anticuerpo de la invención incluyen por lo tanto el tratamiento de afecciones inflamatorias como, pero no limitados a, artritis reumatoide, enfermedad inflamatoria del intestino y asma.

25 Como el anticuerpo de la invención inhibe la señalización TF:VIIa y reduce los efectos corriente abajo que promueven la angiogénesis, los anticuerpos de la invención pueden ser útiles en el tratamiento de otras enfermedades, trastornos y/o afecciones, además de cánceres, que implican angiogénesis. Estas enfermedades, trastornos, y/o afecciones incluyen, pero no están limitadas a: tumores benignos, por ejemplo hemangiomas, neuromas acústicos, neurofibromas, tracomias y granulomas piógenos; placas arterioscleróticas; enfermedades angiogénicas oculares, por ejemplo, retinopatía diabética, retinopatía del prematuro, degeneración macular, rechazo a injerto corneal, glaucoma neovascular, fibroplasia retrolental, rubeosis, retinoblastoma, uveítis y Pterygia (crecimiento anormal de vasos sanguíneos) del ojo; artritis reumatoide; psoriasis; retraso en la curación de heridas; endometriosis; vasculogénesis; granulaciones; cicatrices hipertróficas (queloides); fracturas sin unión; esclerodermia; tracoma; adherencias vasculares; angiogénesis miocárdica; colaterales coronarios; colaterales cerebrales; malformaciones arteriovenosas; angiogénesis de la extremidad isquémica; Síndrome de Osler-Webber; neovascularización de placas; telangiectasia; articulaciones hemofílicas; angiofibroma; displasia fibromuscular; granulación de heridas; enfermedad de Crohn; y aterosclerosis.

40 En la medida en que el anticuerpo de la invención inhibe la señalización de TF:VIIa, el anticuerpo puede usarse para tratar y/o diagnosticar enfermedades, trastornos y/o afecciones hiperproliferativas, incluyendo pero no limitadas a, neoplasmas. El anticuerpo puede inhibir la proliferación del trastorno a través de interacciones directas o indirectas. Los ejemplos de enfermedades, trastornos y/o afecciones hiperproliferativas que pueden tratarse y/o diagnosticarse mediante los anticuerpos de la invención incluyen enfermedades, trastornos y/o afecciones hiperproliferativas que incluyen, pero no están limitadas a, hipergammaglobulinemia, enfermedades linfoproliferativas, trastornos como la enfermedad de Castleman, y/o afecciones, paraproteinemias, púrpura, sarcoidosis, síndrome de Sezary, macroglobulinemia de Waldenström, enfermedad de Gaucher, histiocitosis, y cualquier otra enfermedad hiperproliferativa en un órgano, tejido o compartimento corporal de fluido.

50 Las maneras adicionales en las que los anticuerpos de la presente invención pueden usarse terapéuticamente incluyen, pero no están limitadas a, citotoxicidad dirigida del anticuerpo, por ejemplo, como mediada por complemento (CDC) o por células efectoras (ADCC), o por citotoxicidad indirecta del anticuerpo, por ejemplo, como inmunoconjugados.

55 Aunque la invención se ha descrito en términos generales, las realizaciones de la invención se divulgarán adicionalmente en los siguientes ejemplos que no deben interpretarse como limitativos del alcance de las reivindicaciones. En las descripciones experimentales, se usaron ciertos reactivos y procedimientos para producir proteínas o un anticuerpo o un fragmento específico. Los métodos analíticos rutinariamente usados para caracterizar el anticuerpo se describen a continuación.

60 **Materiales y Métodos**

Estándares de Proteínas y Anticuerpos

65 El dominio extracelular recombinante (ECD) del FT humano se construyó de dos formas: por ensayos de unión directa basados en ELISA y Biacore, el aminoácido 1-219 de la cadena madura de TF (SEQ ID NO: 1) se

expresó en un sistema mamífero con un péptido His6-etiquetado C-terminal; por estudios de co-cristalografía, el aminoácido 5-213 de la SEQ ID NO: 1 se expresó con un péptido His6-etiquetado C-terminal en un sistema bacteriano. Se biotiniló^{TF1-219} humano usando química de ésteres de NHS dirigida a residuos amina en la proteína. Para ensayos de coagulación, se usó Innovin® (Dade Behring Inc. N° de catálogo B4212), un factor tisular humano recombinante liofilizado combinado con fosfolípidos, calcio, tampones y estabilizadores para uso diagnóstico.

El TF-ECD de mono Cynomolgous (cyno) (SEQ ID NO: 2) se clonó usando PCR de ADNc aislado de tejido de testículos de cynomolgous obtenido del BioChain Institute (Hayward, CA).

Se usaron varios anticuerpos como anticuerpos de referencia: i) 10H10 clonado del hibridoma original TF9.10H10-3.2.2 (US 7223427) ii) una quimera de ratón-humano 10H10, que comprende la SEQ ID NO: 4 y la SEQ ID NO: 5 con regiones constantes IgG1/Kappa humanas, designadas M1 iii) M59, un anticuerpo adaptado de FR humano que comprende las seis CDR de 10H10 y sirve como el anticuerpo original para la maduración por afinidad, que comprende la SEQ ID NO: 19 y la SEQ ID NO: 23 con IgG1 humana y la región constante Kappa humana; iv) anticuerpo del factor tisular anti-humano murino TF8-5G9 (US 7223427); v) uno humanizado del anticuerpo 5G9, conocido como CNTO 860, como un IgG1/Kappa humano (US7605235); y vi) un anticuerpo de control de isotipo (IgG1/kappa humano) que se une a un antígeno irrelevante (VRS) denominado B37.

Expresión y Purificación de Anticuerpos

Se usaron procedimientos rutinarios para expresar y purificar los anticuerpos divulgados. Para el examen primario, el ADN que codifica estas moléculas se expresó transitoriamente en placas de 96 pocillos en células HEK 293E y se evaluó la actividad (unión) de los sobrenadantes 96 horas después de la transfección. Se identificaron los aciertos y se eligieron para la expresión y purificación a escala piloto. La expresión a escala piloto se hizo transitoriamente en células HEK 293F o CHO-S a un volumen de 750 ml. Los sobrenadantes recogidos se purificaron mediante cromatografía de proteína A y las proteínas purificadas se evaluaron por su afinidad y actividad funcional. Adicionalmente, las proteínas purificadas se sometieron a caracterización biofísica por SDS-PAGE, SE-HPLC y cromatografía de interacción cruzada (CIC). Los puntos isoeléctricos teóricos (pI) se calcularon también para cada variante. De las caracterizaciones de escala piloto, se transfectó un conjunto de candidatas principales finales en biorreactores WAVE y se purificaron mediante cromatografía de Proteína A.

Producción de Fab y ELISA de Fab monoclonal

Los stocks de glicerol de las rondas de adsorción de fagos se miniprepararon y el gen pIX se escindió mediante digestión con NheI/SpeI. Después de la religación, el ADN se transformó en células TG-1 y se cultivó en placas LB/Agar durante la noche. Al día siguiente, se recogieron las colonias, se cultivaron durante la noche, y los cultivos se usaron para (i) PCR de colonias y secuenciación de las regiones V, y (ii) inducción de la producción de Fab. Para la producción de Fab, el cultivo nocturno se diluyó 10-100 veces en medio nuevo y se cultivó durante 5-6 horas a 37° C. La producción de Fab se indujo mediante la adición de medio fresco que contenía IPTG y los cultivos se cultivaron durante la noche a 30 grados C. Al día siguiente, los cultivos se centrifugaron y los sobrenadantes, que contenían las proteínas Fab solubles, se usaron para ELISA de Fab.

Para el ELISA de Fab, los Fab se capturaron en placas mediante un anticuerpo policlonal anti-Fd(CH1). Después del lavado y el bloqueo apropiados, se añadió hTF biotinilado a una concentración de 0,2 nM. Esta concentración permite la clasificación de las variantes de Fab, definidas como el porcentaje de unión de la original, en la que el Fab original, presente como control en todas las placas, se define como 100% de unión. El hTF biotinilado se detectó mediante estreptavidina conjugada con HRP y lectura de quimioluminiscencia en un lector de placas.

ELISA basado en Mab de Unión a TF-ECDA

Se usó una solución ELISA de unión a TF de fase directa usando detección quimioluminiscente para clasificar los aglutinantes superiores de la biblioteca de adaptación de marco humano. Se recubrieron placas maxisorp negras de 96 pocillos con 100 µl de IgG de cabra antihumana 4µg/ml diluida en tampón carbonato-bicarbonato, pH 9,4 a 4° C durante la noche y luego se lavaron tres veces con tampón de lavado (PBS con solución de 0,05% de Tween-20) y se bloqueó con 300 µl de solución de 1% de BSA/PBS 10mM durante 1 hora seguido de un lavado como antes. Las muestras o estándares se diluyeron a 50 ng/ml Tampón de Ensayo (1% de BSA en PBS + 05% de Tween) y se añadieron 100 µl a la placa de ensayo a temperatura ambiente durante 1 hora con agitación. Las placas se lavaron tres veces y se añadieron 100 µl por pocillo de TF-ECD humano o de cynomologus con etiqueta His a 100 ng/ml diluido en tampón de ensayo y se incubó durante 2 horas a temperatura ambiente. Después del lavado, se añadieron 100 µl por pocillo de penta-his conjugado con peroxidasa de Qiagen a una dilución 1:2000 en tampón de ensayo y se incubó durante 1 hora a temperatura ambiente con agitación. El sustrato BM ChemiLum (BM Chemilum, POD, Roche) se hizo recientemente a una dilución 1:100 en tampón y se añadieron 100 µl a las placas después de un lavado final. Después de 10 minutos, las placas se leen en el programa Perkin Elmer Envision

Reader, BM ChemiLum.

Unión de Células Completas MDA-MB-231 de mAb de Factor Anti-Tisular por FACS

5 Este ensayo se usa para detectar la unión directa del anticuerpo al FT humano endógeno expresado en células de cáncer de mama. Preparar titulaciones de cuatro puntos de los mAb de prueba en tampón FACS (1% de FBS en PBS) por duplicado. Iniciar una titulación a 1.000 ng/ml con diluciones 1:4. M1, la molécula original, se usa como control positivo, mientras que B37, mAb anti-RSV, se usa como control negativo/de isotipo. Las células no teñidas y el anticuerpo secundario, anticuerpo de Fc IgG anti-humano de cabra Cy-5 conjugado en tampón FACS 10 1:200, se usa como controles y se prepara inmediatamente antes del uso.

Usando técnicas de cultivo de tejidos estándar, enjuagar las células MDA-MB-231 adherentes en un matraz de cultivo con una vez con PBS (sin Ca⁺ 2/Mg⁺2). Elevar las células con Versene y contar las células y sembrar 15 200,000 células por pocillo en una placa con fondo en V de poliestireno. Protocolo de análisis FACS: Unión de Factor Tisular. Sedimentar las células en una centrifuga Allegra X-15R a 450xg durante 3 minutos a 4° C, resuspender en tampón FACS (2% de FBS en PBS) y colocar en placas 200.000 células por pocillo en 200 ul. Sedimentar las células a 450xg durante 3 minutos a 4° C. Desechar los sobrenadantes y añadir 100 µL/pocillo de mAbs de prueba o control a pocillos designados e incubar en hielo o a 4° C durante 1 hora (+/- 10 minutos). Sedimentar las células a 450xg durante 3 minutos a 4° C. Desechar los sobrenadantes y lavar las células una vez en tampón FACS. Resuspender las células en tampón FACS a 200 ul/pocillo y sedimentar las células a 450xg durante 3 minutos a 4° C. Desechar los sobrenadantes y añadir 100 ul/pocillo de anticuerpo secundario a los pozos designados (triterato) e incubar en hielo durante 1 hora (+/- 10 minutos). Sedimentar las células a 450xg durante 3 minutos a 4° C. Desechar los sobrenadantes y lavar las células 2 veces en tampón FACS antes de resuspender las células en Tampón FACS a 200 ul/pocillo. Sedimentar las células a 450xg durante 3 minutos a 4° C. Desechar el sobrenadante y resuspender las células en Tampón CytoFix a 100 ul/pocillo. Analizar las reacciones por citometría de flujo (BD FACSArray). Se usa el software FlowJo para el análisis de datos FACS activando la población principal de células en el pocillo de control sin teñir y aplicar la activación a todo el conjunto de datos. Los datos se exportan como una tabla de la intensidad de fluorescencia media geométrica (MFI) en el canal rojo para la activación aplicada.

30 Ensayo Termofluor

La tecnología termofluor es una medida cinética del despliegue de una molécula a medida que se calienta. A medida que la molécula se calienta, un colorante (ANS) puede unirse a la molécula a medida que se despliega. El colorante emitirá fluorescencia cuando se una a la molécula, y esta fluorescencia se mide a lo largo del tiempo. En este ensayo, el despliegue de los anticuerpos se midió de 37-95° C, y se detectó cada 0,5° C. También se midieron las Tms de las moléculas originales tanto en la forma murina como de quimera (10H10, M1, 5G9 y CNTO860), junto con 2 mAbs con Tms conocidas para ser usadas como controles del ensayo (Emmp 4A5, y Emmp 5F6).

Este ensayo se usó para predecir la estabilidad térmica de las variantes de la biblioteca de adaptación del marco humano. Diluir anticuerpos purificados a 0,5 mg/ml en PBS y añadir 2 ul de muestra a cada pocillo para un total de 1ug de muestra por pocillo. Cada muestra se añade por duplicado. El ANS de stock está a 500mM en DMSO. Diluir ANS de stock 1:12 en DMSO (a 40mM); Elaborarla solución Tinte/Tween combinando 20 ul de la solución ANS 40mM, 2,8 ul de 10% de Tween y 1,98ml de PBS; agregar 2ul de solución Tinte/Tween y 2ul de aceite. Centrifugar las placas (2 minutos a 450 rpm). Ajustes del termofluor: obturador configurado en manual, Temperatura de la rampa es 0,5C/seg., Rampa continua, Temperatura de la Rampa: 50-95° C. Espera seleccionada 15s a Temperatura alta, Tiempo de exposición 10s/1 rep., Ganancia normal = 2, Seleccionado "Imagen SC/placa individual".

Cromatografía de Interacción Cruzada (CID)

Para determinar la interacción de los varios anticuerpos con otros anticuerpos humanos, se realizaron experimentos de cromatografía usando una columna acoplada con IgG humana (Sigma Aldrich). Brevemente, se acoplaron 50 mg de IgG humana a una columna de NHS-Sefarosa de 1 ml (GE Healthcare) siguiendo las instrucciones del fabricante. La IgG no acoplada se eliminó mediante lavado con Tris 0,1 M, pH 8, NaCl 0,5 M y los grupos NHS sin reaccionar se bloquearon con el mismo tampón. La eficacia de acoplamiento se determinó midiendo la concentración de proteína restante en el tampón de acoplamiento sin reaccionar y se lava utilizando el kit de ensayo Coomassie Plus de Pierce (Thermo Pierce) y restando de la cantidad de proteína antes de la inmovilización. También se preparó una columna de control usando el mismo protocolo solo que no se añadió proteína a la resina.

La columna de control se ejecutó primero en un HPLC Dionex UltiMate 3000 después de equilibrar con PBS, pH 7 a un caudal de 0,1 ml/min. Se inyectaron primero 201 de la solución de proteína de stock para asegurar que los sitios de unión no específicos estaban bloqueados, seguido de 201 de 10% de acetona para comprobar la

integridad de la columna.

Las muestras a analizar se diluyeron a 0,1 mg/ml en PBS, pH 7. Se inyectaron 20 microl de cada muestra en cada columna y se dejó funcionar a 0,1 ml/min durante 30 min. Se registraron los tiempos de retención y se calculó el factor de retención (k') para cada variante.

El cálculo de k' es la diferencia en el tiempo de retención en una columna derivada de proteína (columna acoplada a IgG), t_R , y el tiempo de retención en una columna sin proteína acoplada a ella. El cálculo también tiene en cuenta el tiempo de retención de la acetona en ambas columnas para estandarizar la columna. Los valores aceptables para k' son menores de 0,3.

Solubilidad

Para determinar la solubilidad de los varios anticuerpos a temperatura ambiente, se realizaron experimentos de concentración usando dispositivos de filtro centrífugos. Brevemente, se añadieron preparaciones de anticuerpos en PBS a dispositivos de filtro centrífugo Vivaspin-15 (15 ml) (30,000 MWCO, Sartorius, Goettingen, Alemania) a temperatura ambiente. Los filtros se centrifugaron a 3000 xg durante intervalos de 20 minutos en una centrífuga Beckman Allegra X15-R usando un rotor de cubo oscilante. Una vez que los volúmenes se redujeron a aproximadamente 2 ml, el sobrenadante se transfirió a un dispositivo de filtro Vivaspin-4 (4 ml) (30,000 MWCO) y se centrifugó a 4.000 xg durante intervalos de 20 minutos. Una vez que el volumen se redujo a 500 l, la muestra se transfirió a un dispositivo de filtro Vivaspin-500 y se centrifugó a 15.000 xg en una centrífuga Eppendorf 5424 durante 15 minutos. Esto se repitió hasta que la concentración de proteína alcanzó 100 mg/ml o más. La concentración de proteína se determinó mediante absorbancia a 280 nm y 310 nm en un espectrofotómetro BioTek SynergyHT TM con una dilución apropiada. En este punto, se detuvo la centrifugación y la muestra se mantuvo a temperatura ambiente durante la noche para alcanzar el equilibrio. A la mañana siguiente, se comprobó la muestra en busca de signos de precipitación. Si la concentración era superior a 100 mg/ml, se detuvo el proceso.

Ensayo de Inhibición de IL-8 Inducida por Factor VIIA

Este ensayo se usó para evaluar si los anticuerpos que se unen a TF neutralizan o no la liberación de IL-8 inducida por FVIIa de células humanas que expresan TF. Se colocaron en placas células de adenocarcinoma de mama humano (MDA-MB-231) (ATCC: HTB-26), adaptadas para crecer en DMEM y 10% de SFB (Gibco: N° de catálogo 11995 y N° de catálogo 16140), en placas de cultivo celular de 96 pocillos (Nunc: N° de catálogo 167008) a una densidad de 20000 células por pocillo (100.000 células/ml) usando técnicas de cultivo celular estándar. Se permitió que las células se recuperasen durante dos días antes de comenzar el tratamiento con anticuerpos a 2 ug/ml y someterlas a una dilución en serie o 1:2 o 1:4 en DMEM sin FBS. El anticuerpo se añadió una hora antes del tratamiento con FVIIa humano (Innovative Research: N° de catálogo IHFVIIa, lote: 2824) a una concentración final de 50 nM en DMEM sin FBS. Las células se colocaron en la incubadora durante 24 horas. Después del tratamiento, se recogió el sobrenadante y se detectó la cantidad de IL-8 mediante ELISA de acuerdo con el protocolo del fabricante (R&D Systems: N° de catálogo D8000C). Brevemente, se leyó la densidad óptica (DO) de cada muestra de tratamiento a 450 nm y 540 nm. La lectura a 540 nm se usó para corregir la imperfección óptica en la placa de ensayo mientras que la lectura corregida a 450 nm (DO 450 menos DO 540) se usó para calcular el contenido de IL-8 en las muestras de tratamiento usando una Curva Estándar de IL-8 preparada de acuerdo con el protocolo del fabricante. Los pocillos con células que no reciben tratamiento de anticuerpos y FVIIa se usaron para definir el nivel endógeno de IL-8 mientras que los pocillos con células que solo recibieron FVIIa se usaron para definir el nivel de IL-8 "sin inhibición", definiendo de esta manera los niveles de IL-8 mínimo y máximo, respectivamente. Las muestras de tratamiento de titulación de MAb se normalizaron a los niveles de IL-8 máximo y mínimo como se ha definido con anterioridad y se expresaron como porcentaje de inhibición. Los datos normalizados se representaron o en gráficos de barras o se ajustaron a un ajuste de curva logística de cuatro parámetros para extraer los valores de EC_{50} para cada MAb.

Ensayo de coagulación

Este ensayo se usó para determinar si los anticuerpos de TF anti-humanos bloquean o no la coagulación *in vitro* usando plasma humano en presencia de calcio y preparación de TF humano recombinante añadida (Innovin, Dade Behring Inc). Los anticuerpos de TF anti-humano se diluyeron a 2 mg/ml de anticuerpo en HBSS (Gibco, N° de catálogo 14175). El plasma humano agrupado con citrato de Na (George King Biomedical, Novi, MI) se centrifuga a 1000 rpm durante 5 minutos y el plasma despejado se transfiere a un tubo nuevo. En cada pocillo de una placa de ensayo de 96 pocillos despejada (NUNC, N° de catálogo 439454), se añaden 25 ul del anticuerpo diluido a 100 ul de plasma humano. La reacción se inicia añadiendo 125 ul de Innovin (Dade Behring Inc., N° de catálogo B4212) diluido 1:500 en HBSS con $CaCl_2$ 22 mM a cada pocillo que contiene plasma con o sin anticuerpo. La reacción de coagulación se monitoriza cinéticamente a OD 405, inmediatamente después del inicio de la reacción y durante 30 minutos a 37° C usando un lector SpectraMax M2e (Molecular Devices, Sunnyvale, CA). Se determina $T_{1/2}$ máximo para cada anticuerpo usando el software Softmax Pro como el tiempo en segundos que tarda en alcanzar el 50% de la densidad óptica máxima. El tiempo en segundos para las muestras se normalizó a una referencia en cada placa,

sin embargo, estadísticamente no hubo diferencia entre las muestras listadas a 150 segundos y 200 segundos que fue el tiempo medio para las muestras sin anticuerpos, para 10H10, y todas las variantes derivadas de 10H10 y adaptadas humanas.

5 EJEMPLO 1: SECUENCIACIÓN DE 10H10

El anticuerpo murino conocido como 10H10 generado en The Scripps Research Institute en La Jolla, CA (US5223427, Morrisey et al. 1988 Thromb Res. 52(3): 247-261) se produce por el hibridoma TF9.10H10-3.2.2. No se había informado anteriormente de las secuencias del anticuerpo del clon de hibridoma 10H10.

Las secuencias se identificaron usando el método 5'RACE (Focus 25 (2):25-27, 2003 ; Maruyama 1994 Gene 138, 171-174) donde las dos cadenas de anticuerpos, VH y VL, se amplificaron utilizando 5' GeneRacer™ (Invitrogen), cebador, y cebador de consenso 3' complementario a una secuencia dentro de la región constante de IgG1 de ratón y la región constante Kappa de ratón, respectivamente. Se utilizó amplificación por PCR anidada usando cebador 5'GeneRacer Nested y un cebador de consenso 3' para generar productos de VL más adecuados para el análisis de secuencia.

Se seleccionaron por lo menos 16 clones para identificar la región variable de cada cadena. Se usaron cebadores para secuenciar a través de la región desconocida de los insertos. Los datos de la secuencia en bruto se descargaron del Secuenciador ABI DNA a Vector NTI (Invitrogen Informax) para el análisis de la secuencia. Se identificaron una VH funcional y una VL funcional. Ambos genes de VH y VL se analizaron adicionalmente para encontrar sus secuencias señal nativas, FR, CDR y segmentos J.

Las FR y CDR de 10H10 se numeran secuencialmente, y se segmentan siguiendo la definición de Kabat (Kabat et al., 5ª edición, Public Health Service, NIH, Washington, DC, 1991), excepto en la región correspondiente a la CDR-1 de VH. Para esta región, se usó una combinación de definición de Kabat y Chothia (Raghunathan, G., US2009/0118127 A1; Chothia y Lesk, J Mol Biol 196(4): 901-17, 1987).

Tabla 1. Secuencia 10H10 de las regiones variables y sus estructuras de secuencia

Nombre de la Proteína	Secuencia de polipéptido	Subdominios
Región Variable de la Cadena Pesada de 10H10 (SEQ ID NO: 4)	QVHLQQSGAELMKPGASVKISCKAS	FR1 = 1 a 25 CDR1 = 26 a 35 (SEQ ID NO: 6) FR2 = 36 a 49 CDR2 = 50 a 66 (SEQ ID NO: 7) FR3 = 67 a 98 CDR3 = 99 a 109 (SEQ ID NO: 8) FR4 (JH3) = 110 a 120
	GYTFITYWIE	
	WVKQRPGHGLEWIG	
	DILPGSGSTNYNENFKG	
	KATFTADSSSNTAYMQLSSLTSEDSAV YYCAR	
	SGYYGNSGFAY WGQGTLLVTVSA	
Región Variable de la Cadena Ligera de 10H10 (SEQ ID NO: 5)	DIVMTQSPSSLTVTAGEKVTMSC	FR 1 = 1 a 23 CDR1 = 24 a 40 (SEQ ID NO: 9) FR2 = 41 a 55 CDR2 = 56 a 62 (SEQ ID NO: 10) FR3 = 63 a 94 CDR3 = 95 a 103 (SEQ ID NO: 11) FR4 (K5) = 104 a 113
	KSSQSLSSGNQKNYLT	
	WYQQIPGQPPELLIY	
	WASTRES	
	GVPDRFTGSGSGTDFTLTINSVQAEDLA VYYC	
	QNDYTYPLT FGAGTKLELK	

Las regiones V clonadas se diseñaron con regiones constantes de IgG1/Kappa humanas y se clonaron en vectores de expresión de mamífero para la expresión recombinante en líneas celulares HEK293 o CHO creando un anticuerpo quimérico ratón-humano designado M1, que se usó en el desarrollo del ensayo como un anticuerpo de

referencia. La región V de HC también se diseñó con dominio CH1 de IgG1 humana solamente y una hexahistidina C-terminal con el propósito de producir un 10H10Fab usado en el análisis de estructuras cristalinas.

5 EJEMPLO 2: MAPEO DE EPITOPO DE UN ANTICUERPO DE FACTOR TISULAR NO ANTICOAGULANTE

El mapeo de epítopos para 10H10 se realizó mediante determinación de estructuras cristalinas de un complejo entre el ECD de TF humano y el fragmento Fab correspondiente. El ECD de TF humano His-etiquetado (residuos 5-213 de la SEQ ID NO: 1) se expresó en *Escherichia coli* y se purificó por cromatografía de afinidad y intercambio de iones usando una columna HisTrap HP (GE Healthcare) y una columna Q HP (GE Healthcare), respectivamente. Las versiones quiméricas His-etiquetadas (regiones V de ratón, dominios constantes humanos) de Fab de 10H10 se expresaron en células HEK y se purificaron usando cromatografía por afinidad (columna TALON, GE Healthcare) y de exclusión por tamaño (una columna HiLoad Superdex 200, GE Healthcare).

15 El complejo se preparó mezclando el Fab con el ECD de TF humano en la relación molar 1:1,2 (exceso de TF). La mezcla se incubó durante 20 minutos a temperatura ambiente y se cargó en una columna Superdex 200 (GE Healthcare) equilibrada con HEPES 20 mM, pH 7.5 y NaCl 0,1 M. Las fracciones correspondientes al pico principal se agruparon, se concentraron a 10 mg/ml, y se usaron para la cristalización. El complejo se cristalizó por el método de difusión de vapor a 20° C. El complejo 10H10:TF se cristalizó de una solución que contenía 18% de PEG 8000 en CHES 0,1 M, pH 9.5. Para la recogida de datos por rayos X, se empapó un cristal del complejo durante unos segundos en el licor madre suplementado con 20% de glicerol, y se congeló instantáneamente en la corriente de nitrógeno a 100 K. Las intensidades de difracción de rayos X se midieron usando un generador de rayos X de microfoco Rigaku MicroMaxTM-007HF equipado con un detector de CCD Saturn 944 y un sistema de crioenfriamiento X-stream™ 2000 (Rigaku). La estructura se determinó mediante reemplazo molecular usando el paquete de programas CCP4 para cristalografía macromolecular (Collaborative Computational Project, Número 4. 1994. Acta Cryst. D50, 760-763).

30 El ECD de TF consiste de dos dominios topológicamente idénticos con el pliegue de inmunoglobulina. El dominio N-terminal abarca los residuos 1-103, y el dominio C-terminal abarca los residuos 104-210 (del ECD, SEQ ID NO: 1). Se descubrió que el epítipo de 10H10 estaba centrado en los residuos K149-D150 del ECD, que llega a una cavidad profunda entre los dominios variables de las cadenas pesada y ligera de 10H10. La interfaz entre 10H10 y TF es extensa e involucra los seis giros de la CDR (Fig. 1).

35 Los descubrimientos notables son que el epítipo de TF de 10H10 no se superpone con los sitios de unión a FVII y FX (Figs. 2 y 3). Además, los epítopos de 10H10 y 5G9 (otro anticuerpo de unión a TF-humano murino con capacidad para bloquear la coagulación y cuyo epítipo se ha publicado anteriormente, Huang et al., 1998 J Mol Biol 275:873-94) se superponen parcialmente explicando la unión competitiva entre estos dos anticuerpos para TF humano (Fig. 2 y 3).

40 Interfaz ECD:10H10 de TF humano

45 10H10 se une a TF en la interfaz entre los dominios N- y C- terminales del ECD. La superficie convexa de TF se ajusta a la superficie cóncava de la CDR del anticuerpo. El área total cubierta tras la formación del complejo es de más de 1.100 Å² en cada una de las moléculas que interactúan. Las seis CDR están implicadas en contactos directos con TF (contactos definidos como una distancia interatómica de 4 Å). En total, hay 24 residuos de epítopos y 25 residuos de paratopos. Los L1, H1 y H3 de CDR forman la mayoría de los contactos. Los residuos que forman el epítipo y el paratopo del complejo 10H10:TF se muestran esquemáticamente en la FIG. 1.

50 El epítipo de 10H10 incluye dos segmentos del dominio N y tres segmentos del dominio C del ECD de TF. Los dos segmentos del dominio N interactúan con el anticuerpo: los residuos 65-70 interactúan con H-CDR1 y H-CDR3 y el residuo 104 interactuando con H-CDR1. Los tres segmentos en el dominio C interactúan con el anticuerpo: los residuos 195 y 197 interactúan con H-CDR1 y H-CDR2, los residuos 171-174 interactúan con L-CDR1 y L-CDR3, y los residuos 129-150 interactúan con L- CDR1, L-CDR3, H-CDR1 y H-CDR3; Los residuos de TF K149-D150 están en el centro del epítipo; alcanzando una cavidad profunda formada entre los dominios de VL y VH donde sus compañeros primarios son D97 de la región variable de LC (SEQ ID NO: 5) y W33 de la región variable de HC (SEQ ID NO: 4) de 10H10, respectivamente.

55 B. Especificidad de Anticuerpos

60 Las secuencias de aminoácidos del ECD de TF de humano, de mono cynomolgus (cyno) (SEQ ID NO: 2) y de ratón (SEQ ID NO: 3) se alinean en la FIG. 2. Hay una gran similitud entre las secuencias de ECD de TF humano y de cynomolgus, y las dos son solo un residuo diferentes en los residuos de contacto de 10H10: posición 197 de la SEQ ID NO: 1, que es R(Arg) en la secuencia de cyno. Como el T197 en la secuencia humana es contactado por un único residuo de H-CDR2, es explicable el alto nivel de reactividad cruzada observado para el presente conjunto de anticuerpos derivados de 10H10.

Alineando las secuencias de TF humano y de ratón, los residuos del epítipo que determinan la especificidad de especie de 10H10 eran evidentes ya que se producen diferencias de aminoácidos significativas en los residuos del epítipo: entre los 24 contactos de residuos de 10H10 en TF humano, las secuencias humana y de ratón difieren en las posiciones 68, 69, 70 y 104; en el dominio N y las posiciones 136, 142, 145 y 197 en el dominio C de la SEQ ID NO: 1 frente a la SEQ ID NO: 3. Las diferencias son consistentes con la afinidad de unión disminuida de 10H10 para TF de ratón.

La FIG. 2 también indica los sitios de interacción en TF humanos para FVII y FX en base a un modelo 3D teórico (FIG. 3) que describe su asociación en un complejo ternario (Norledge et al., Proteins 53:640-648, 2003). El anticuerpo 5G9 se une a TF en un epítipo que se solapa parcialmente con el sitio de unión de FX. Por lo tanto 5G9 compete con FX y esto provoca el bloqueo de la cascada de coagulación. El 10H10 difiere del 5G9 en que no bloquea la coagulación mientras que efectivamente interrumpe la señalización a través de los PAR asociados a TF. En base al modelo del complejo TF/FVII/FX ternario, se esperaba que el epítipo de 10H10 estuviera en la superficie libre del TF y centrado alrededor de los residuos K149-D150. La unión de 10H10 mapeado por mutagénesis y el mapeo de epítopos peptídicos proporcionó evidencia temprana de que este era el caso.

La presente estructura cristalina del complejo entre ECD de TF y Fab de 10H10 proporciona un mapeo espacial de la manera en que el anticuerpo puede unirse a TF sin impedir la interacción de FVII y FX con TF o entre sí. El epítipo de 10H10 como se revela por la estructura cubre la superficie libre de TF, ya que teóricamente existe en el complejo ternario. Además, el epítipo de 10H10 se solapa parcialmente con el epítipo 5G9 MAb de bloqueo de la coagulación (Huang 1998 *supra*), los residuos comunes son K149 y N171. Ni 10H10 ni 5G9 bloquean la unión de FVII a TF. Los epítopos de 10H10 y FX tampoco se superponen, pero se produce un choque estérico entre el dominio constante del Fab y el dominio de la proteasa (globular) de FX en el modelo actual. Debe tenerse en cuenta sine embargo, que la orientación de FX puede de hecho diferir del modelo y que la asociación entre FX y TF puede permitir cierta flexibilidad en el dominio de proteasa. También hay una flexibilidad considerable en el ángulo de codo entre los dominios variable y constante de Fab que pueden permitir evitar el choque sobre la unión de 10H10 al complejo ternario.

EJEMPLO 3: ADAPTACIÓN DE LOS DOMINIOS DE UNIÓN PARA SU USO EN HUMANOS

La eficacia de una proteína terapéutica puede estar limitada por reacciones inmunes no deseadas. Los anticuerpos monoclonales no humanos pueden tener tramos sustanciales de secuencias de aminoácidos lineales y conformaciones estructurales locales que pueden provocar una respuesta inmune en humanos. La transferencia de los residuos responsables de la inmunoespecificidad de la unión al objetivo de un MAb no humano a un andamiaje de anticuerpo humano da como resultado la mayoría de las veces una pérdida sustancial de afinidad de unión para el antígeno objetivo. Por lo tanto, es muy valioso usar principios de diseño de sonido para crear moléculas de anticuerpos que provocan reacciones inmunogénicas mínimas a la vez que se retienen los perfiles de unión y biofísicos de la molécula no humana original cuando se inyectan en humanos.

Como se ha descrito anteriormente en la US20090118127A1 y ejemplificado en Fransson et al. 2010 J Mol Biol 398:214-231, se usó un proceso de dos pasos para tanto humanizar y restaurar o mejorar la afinidad de unión para generar una especie de anticuerpos que muestre los efectos objetivo del anticuerpo murino 10H10 cuando se acopla a TF humano. El proceso de dos pasos, denominado adaptación de marco humano (HFA), consiste de 1) selección de marco humano y 2) un paso de maduración por afinidad.

En el proceso de HFA, los residuos del sitio de unión (CDR) se combinan con genes de la línea germinal humana seleccionados en base a la similitud de secuencia y consideraciones estructurales. Los dos sistemas de asignaciones de CDR para anticuerpos son: la definición de Kabat que se basa en la variabilidad de la secuencia del anticuerpo y la definición de Chothia basada en los análisis de las estructuras tridimensionales de anticuerpos. Entre las seis CDR, uno u otro sistema puede usarse cuando divergen. En el caso de las CDR de cadena ligera, se usa la definición de Kabat.

En el caso de CDR3 de la cadena pesada, tanto la definición de Kabat como la de Chothia son idénticas. En el caso de CDR1 de la cadena pesada, la definición de Chothia se usó para definir el inicio y la definición de Kabat como el final (patrón definido por W seguido de un aminoácido hidrófobo como V, I o A). En el caso de VH-CDR2, se usó la definición de Kabat. Sin embargo, en la mayoría de estructuras de anticuerpos, esta definición basada en la secuencia asigna una porción de FR3 como perteneciente a CDR2. Por tanto, también podría usarse una versión más corta de esta CDR, que finaliza con siete (7) residuos antes en la región C-terminal de esta CDR, denominada Kabat-7 en la presente.

Selección de FR Humano

Las FR humanas, definidas como las regiones en las regiones V no comprendidas en el sitio de unión al antígeno, se seleccionaron del repertorio de los genes de la línea germinal humana IGHV e IGHJ funcionales. El repertorio de secuencias de genes de la línea germinal humana se obtuvo buscando en la base de datos IMGT

(Lefranc 2005) y compilando todos los alelos "01". De esta compilación, se eliminaron de la compilación los genes redundantes (100% idénticos a nivel de aminoácido) y aquellos con residuos de cisteína desemparejados. La última actualización de la compilación de genes se realizó el 1 de octubre de 2007.

5 La selección inicial de secuencias humanas para HFA de VH se basó en la similitud de secuencia de los genes de la línea germinal VH humana con la longitud completa de la región VH de ratón que incluye FR-1 a 3 así como H-CDR-1 y H-CDR-2. En la etapa siguiente, las secuencias humanas seleccionadas se ordenaron por rango usando una puntuación que tiene en cuenta tanto la longitud de las CDR como las similitudes de secuencia entre las CDR de las secuencias de ratón y humanas. Se usó una matriz de mutación estándar, como la matriz de sustitución BLOSUM 62 (Henikoff y Henikoff 1992 Proc Natl Acad Sci USA 15;89(22):10915-9) para puntuar alineamientos de las CDR de secuencias de ratón y humanas y se aplicó una penalización grande si había una inserción y/o eliminación en los giros de las CDR. La FR-4 humana se seleccionó en base a la similitud de secuencia de los genes de la línea germinal IGHJ (Lefranc 2005) con la secuencia de 10H10 de ratón, IGHJ4 (SEQ ID NO: 60).

15 Se usó un procedimiento similar para seleccionar FR humanas para VL. En este caso IGVK, los genes de la línea germinal seleccionados usando el mismo procedimiento que el usado para los genes de IGHV, sirvieron como genes para seleccionar FR 1-3 y L-CDR 1 - 3. Se seleccionó el gen IGJ-K2 humano (SEQ ID NO: 61) como FR4 para todas las variantes.

20 Se seleccionaron once VH y siete VL cadenas de línea germinal. Los genes de VH seleccionados fueron predominantemente de la familia de genes IGVH-1: 6 secuencias de IGVH1 con IGVH1-69 e IGVH1-f usadas con H-CDR2 más largas y más cortas, 2 de IGVH3 y, un gen de IGVH5 usado con H-CDR2 tanto larga como corta. Los genes de VL representaron seis de IGVK2 y uno de IGVK4 de la familia de genes.

25 Por lo tanto, las variantes H15, H19 y H21 de VH que tienen la H-CDR2 más larga (SEQ ID NO: 7) se corresponden a H22, H23 y H24, respectivamente, donde se usó la CDR-H2 de ratón más corta (SEQ ID NO: 27). El prefijo "s" denota variantes de prueba con menos residuos de ratón y más residuos humanos en la región de cadena beta. La designación de la región V usada y las secuencias de genes usadas se muestran en las Tablas 2 y 3 a continuación.

30

Tabla 2.

ID del Polipéptido	Gen de IMGT Usado
H13	VH-10H10
H14	IGHV1-2
H15	IGHV5-in
H16	IGHV1-46
H17	IGHV1-3
H18	IGHV3-74
H19	IGHV1-69
H20	IGHV1-18
H21	IGHV1-f
H22	s1_IGHV5-a
H23	s1_IGHV1-69
H24	s1_IGHV1-f

35

40

45

50

55

60

65

Tabla 3.

ID del Péptido	Nombre del Gen de IMGT
L1	VL-10H10
L2	IGKV4-1_B3
L3	O1 IGKV2D40_
L4	IGKV2D-28_A3
L5	IGKV2D-29_A2
L6	IGKV2-30_17
L7	IGKV2-24_A232
L8	IGKV2D-26_A21

5 Se expresó una biblioteca de 96 Mabs, que representa las 11 variantes de FR humanas de cadena pesada y 7 de cadena ligera más las cadenas quiméricas de 10H10 murinas en células HEK 293E en un formato de 96 pocillos para proporcionar sobrenadantes para el examen primario. Para el examen primario, usando métodos recombinantes estándar, el ADN que codifica los dominios variables seleccionados se recombinó para formar MAb completos que se expresaron transitoriamente en placas de 96 pocillos en células HEK 293E. El fluido sobrenadante de los cultivos se probó para la actividad (unión) 96 horas después de la transfección.

20 Se eligieron diecinueve variantes para la expresión a escala piloto en células HEK 293-F y la purificación basada en los resultados del examen primario. La expresión a escala piloto se realizó transitoriamente en células HEK 293F o CHO-S a un volumen de 750 ml. Los sobrenadantes recogidos se purificaron mediante cromatografía de Proteína A y las proteínas purificadas se evaluaron por su afinidad y actividad funcional. Adicionalmente, las proteínas purificadas se sometieron a caracterización biofísica mediante SDS-PAGE, SE-HPLC y cromatografía de interacción cruzada (CIC). Se calcularon también los puntos isoeléctricos teóricos (pI) para cada variante. A partir de las caracterizaciones a escala piloto, se transfectó un conjunto de candidatos principales finales en biorreactores WAVE y se purificaron mediante cromatografía de Proteína A,

35 Evaluación de la Unión

40 La unión de las variantes del anticuerpo quimérico original, M1, y HFA tanto a TF humano como de cyno se realizó como un formato de ELISA directo usando detección quimioluminiscente. Para el examen primario de las variantes de la biblioteca en sobrenadantes crudos, las muestras o controles se normalizaron a 50 ng/ml en medio FreeStyle 293 HEK gastado (Gibco) y se ensayaron en determinaciones de concentración individuales. En el presente ensayo, la concentración de anticuerpo fue de 5 ng (0,1 ml usado) y el ECD de TF y el antígeno fue His6-TF-ECD₁₋₂₁₉ usado a una concentración final de 10 ng/pocillo.

45 Los resultados del examen de la biblioteca combinatoria completa mostraron que, excepto H14, todos las demás VH se unen a hTF con fuerzas variables. Hay varias variantes de HFA que dieron una señal de unión más alta que el 10H10 original (H13, L1), particularmente algunas combinaciones de L3 y L5. H18 y H21 no se unen al antígeno humano así como a otras VH y mostraron unión insignificante al antígeno de cyno. Entre las VL, L6 y L8 tampoco se unieron a ningún antígeno mientras que otras se unieron a niveles detectables. H14 y L8 también produjeron expresión baja cuando se combinaron con cualquier VL. Hubo 50 de los 77 anticuerpos (combinaciones VH, VL) que demostraron la unión a TF como se muestra en la Tabla 4.

Tabla 4. ID de secuencias de VH y VL para las 50 variantes de FR humanas de unión a TF humano

ID del Anticuerpo	ID del Péptido de Cadena Ligera	Cadena Ligera SEQ ID NO:	ID del Péptido de Cadena Pesada	Cadena Pesada SEQ ID NO:
M1	L1	5	H13	4
M9	L2	22	H15	12
M10	L3	23	H15	12
M11	L4	24	H15	12
M12	L5	25	H15	12

ES 2 672 267 T3

(continuación)

	<u>ID del Anticuerpo</u>	<u>ID del Péptido de Cadena Ligera</u>	<u>Cadena Ligera SEQ.ID NO:</u>	<u>ID del Péptido de Cadena Pesada</u>	<u>Cadena Pesada SEQ.ID NO:</u>
5	M14	L7	26	H15	12
	M16	L2	22	H16	13
	M17	L3	23	H16	13
10	M18	L4	24	H16	13
	M19	L5	25	H16	13
15	M21	L7	26	H16	13
	M23	L2	22	H17	14
	M24	L3	23	H17	14
20	M25	L4	24	H17	14
	M26	L5	25	H17	14
	M28	L7	26	H17	14
25	M30	L2	22	H18	15
	M31	L3	23	H18	15
	M32	L4	24	H18	15
30	M33	L5	25	H18	15
	M35	L7	26	H18	15
35	M37	L2	22	H19	16
	M38	L3	23	H19	16
	M39	L4	24	H19	16
40	M40	L5	25	H19	16
	M42	L7	26	H19	16
	M44	L2	22	H20	17
45	M45	L3	23	H20	17
	M46	L4	24	H20	17
	M47	L5	25	H20	17
50	M49	L7	26	H20	17
	M51	L2	22	H21	18
55	M52	L3	23	H21	18
	M53	L4	24	H21	18
	M54	L5	25	H21	18
60	M56	L7	26	H21	18
	M58	L2	22	H22	19
65	M59	L3	23	H22	19

(continuación)

ID del Anticuerpo	ID del Péptido de Cadena Ligera	Cadena Ligera SEQ ID NO:	ID del Péptido de Cadena Pesada	Cadena Pesada SEQ ID NO:
5 M60	L4	24	H22	19
M61	L5	25	H22	19
M63	L7	26	H22	19
10 M65	L2	22	H23	20
M66	L3	23	H23	20
15 M67	L4	24	H23	20
M68	L5	25	H23	20
M70	L7	26	H23	20
20 M72	L2	22	H24	21
M73	L3	23	H24	21
M74	L4	24	H24	21
25 M75	L5	25	H24	21
M77	L7	26	H24	21

30 En base a la afinidad de unión relativa para TF usando un ELISA, se seleccionaron diez variantes para ampliar a escala la expresión y la purificación. Un resumen de las K_D medidas por BIAcore, datos de ensayo ELISA, unión de células completas, inhibición de inducción de IL-8 de de células MDA-MB231 por FVIIa 50 nM por 2 ug/ml de Mab, y TMS como se miden por el ensayo Termofluor son se muestra en la Tabla 5.

35 Tabla 5.

MAB	VH	VL	Biacore K_D (nM)		Hu TF EC50 (ng/ml)	Cyno TF EC50 (ng/ml)	Unión de Células Completas, % Medio	Inducción de IL-8, Inhibición % Media	Tm ° C
			Humano	Cyno					
40 M1	H13	L1	0.56	1.34	11.71	17.33	101%	106%	74.18
M10	H15	L3	0.77	1.57	10.47	19.63	98%	104%	75.01
45 M11	H15	L4	0.37	1.52	9.94	18.69	114%	93%	75.86
M12	H15	L5	0.55	2.24	10.05	22.8	124%	102%	79.72
M16	H16	L2	0.66	1.96	9.31	23.39	109%	109%	78.56
50 M19	H16	L5	0.41	2.81	9.22	29.61	111%	106%	77.58
M58	H22	L2	0.2	1.18	9.03	19.81	94%	106%	82.18
M59	H22	L3	0.4	1.28	8.8	18.67	95%	103%	75.94
55 M60	H22	L4	0.47	1.31	8.35	17.79	101%	106%	76.77
M61	H22	L5	0.21	1.71	8.3	24.07	111%	112%	81.16
60 M9	H15	L2	0.61	1.55	9.8	19.93	107%	106%	79.43

65 Varias de las nuevas variantes de MAb humanas mostraron mayor afinidad para TF que para M1 (que tenía las cadenas variables de 10H10: H13 y L1) y algunas eran inferiores. La K_D para M61 (0,21 nM) es 2,5 veces menor que la del MAb original murino (K_D = 0,56 nM). Los datos en la Tabla 5 incluyen cuatro Mabs que comprenden H15 y cuatro con H22 ambos construidos a partir del mismo gen de línea germinal (IGHV5-a). Aquellos con H22, y la H-

CDR2 más corta, mostraron generalmente una afinidad de unión mayor que las moléculas correspondientes con H15. Aunque muchas de las nuevas variantes se unieron a TF de cyno, la clasificación de la afinidad de unión a cyno difería de la de la unión a TF humano.

5 La Tm de MAb de 10H10 de ratón fue de 74,2° C. La Tm de las moléculas seleccionadas varió de Tms de 75 a 82,2° C. Por tanto, el proceso de HFA dio como resultado la creación de constructos de anticuerpos con nuevas regiones Fd que tienen afinidad de unión aumentada para TF de primate humano y no humano y también produjo variantes de anticuerpos completos estables con dominios humanos.

10 La caracterización adicional de los nuevos constructos de anticuerpos verificó que los anticuerpos eran capaces de reconocer TF nativo en células originarias de tejido tumoral humano (células derivadas de cáncer de mama MDA-MB231), y señalización de TF reducida en presencia de VIIa como se mide por inducción suprimida de IL-8 de MDA-MB231.

15 La caracterización biofísica adicional (cromatografía de solubilidad y de interacción cruzada) y los resultados del ensayo condujeron a la selección de M59, compuesto por las regiones variables H22 y L3, para la maduración de la afinidad.

20 **EJEMPLO 4: MADURACIÓN DE ANTICUERPOS**

Las bibliotecas de Fab se construyeron en un sistema de presentación de fagos pIX como se describe en la Patente US N° 6.472.147 (Scripps) y los solicitantes de la solicitud en trámite publicada como WO2009/085462 con modificaciones menores a los sitios de enzimas de restricción.

25 En base a la estructura experimental de 10H10 en complejo con hTF, se diseñaron dos bibliotecas comenzando con el emparejamiento M59 de H116 (SEQ ID NO: 19) y L3 (SEQ ID NO: 23) para la diversificación de ambas VL y VH. Las bibliotecas difirieron en cuanto a las posiciones apuntadas para la diversificación, así como en los aminoácidos usados para diversificar las posiciones apuntadas. Una biblioteca diversificó un total de ocho de las posiciones que representan cada CDR, que se había demostrado anteriormente que estaban en contacto con TF. El énfasis en el diseño se puso en L1, L3, H1 y H2. Las posiciones en contacto en L2 no se diversificaron ni en la mayoría de las posiciones en H3. Se evitaron aminoácidos lábiles o reactivos como Cys y Met.

35 Se diseñó un segundo conjunto de bibliotecas para diversificar los aminoácidos en la periferia del sitio de unión al antígeno determinado calculando las accesibilidades de solvente de la estructura cristalina de Fab unida y no unida. Los residuos cubiertos tras la unión pero también en contacto con las moléculas de solventes se dirigieron para diversificación. Se identificaron un total de 12 residuos (6 en VL y 6 en VH) usando este método, que se diversificó con un conjunto reducido de ocho aminoácidos, que incluyen: Arg (R), Asn (N), Asp (D), Gly (G), His (H), Ser (S), Trp (W) y Tyr (Y). El tamaño de las bibliotecas combinadas se estimó en 8¹² o 10¹⁰ variantes, que pueden cubrirse usando técnicas de clonación de restricción de bibliotecas estándar.

40 Para la biblioteca de residuos de contacto de CDR, las posiciones se diversificaron con 15 aminoácidos (todos excepto Met, Cys, Lys, Gln y Glu) usando un enfoque sintético de dímero de nucleótido (dímero N).

45 Las bibliotecas Fab mostradas en la proteína cubierta de fago IX se adsorbieron frente a hT-ECD biotinilada de acuerdo con esquemas de adsorción, conocidos en la técnica, dirigidos a aumentar la afinidad seleccionando para una disociación más lenta (aumento en el valor de disociación) o una asociación más rápida (disminución en el valor de asociación), o se usaron ambos. La adsorción usó TF tanto humano como de cyno como antígeno objetivo. El fago fue producido mediante infección por fago auxiliar. Los aglutinantes se recuperaron mediante la adición de perlas SA para formar un complejo perla/antígeno/fago. Después del lavado final, el fago se rescató por infección de células de Escherichia coli TG-1 en crecimiento exponencial. El fago se produjo de nuevo y se sometió a rondas adicionales de adsorción.

50 El gen pIX se escindió por digestión con NheI/Spel a partir de los clones seleccionados y, después de la religación, el ADN se transformó en células TG-1 y se cultivó en placas LB/Agar durante la noche. Los cultivos nocturnos se usaron para (i) PCR de colonias y secuenciación para las regiones V, y (ii) producción de Fab solubles. Las proteínas Fab solubles se capturaron en placas mediante un anticuerpo policlonal anti-Fd(CH1). Después de lavado y bloqueo apropiados, se añadió hTF biotinilado a una concentración de 0,2 nM y se detectó hTF biotinilado mediante estreptavidina conjugada con HRP y lectura de quimioluminiscencia como antes. En esta concentración de hTF, es posible la clasificación de las variantes de Fab, definida como el porcentaje de unión del original, en la que el Fab original presente como control en todas las placas, se define como un 100% de unión.

55 Mediante este criterio, se seleccionaron 381 Fab que se unen a TF humano al 100% o más en relación con el Fab M59.

65

Un análisis de los clones seleccionados indicó que ciertos cambios en Y2, 15, T6 e Y7 de la CDR1 de la cadena pesada (SEQ ID NO: 6) correspondiente a las posiciones 27 y 30-32 de la región V (SEQ ID NO: 4 o 19) tuvieron éxito. Aunque no es un residuo de contacto, la posición 27 solo permitía un aminoácido aromático (Tyr y Phe). Para las posiciones 30-32, que tienen contacto directo con K68, T101, Y103 y L104 de TF humano SEQ ID NO: 1 en el Fab de 10H10 (FIG. 1), la posición 30 era relativamente permisiva, pero las 31 y 32 estaban restringidas (Tabla 6).

En L-CDR2, los cambios en L3, S6 y S8 (SEQ ID NO: 7) corresponden a las posiciones L52, S55 y S57 de la SEQ ID NO: 4 o 19, que son residuos que tienen contacto directo con P194, S195 y T197 de TF humano SEQ ID NO: 1 en el Fab de 10H10 (FIG. 1) hubo un conjunto algo restringido de sustituciones permitidas.

En H-CDR3, la posición N6 (SEQ ID NO: 8) correspondiente a N104 de la SEQ ID NO: 4 o 19, que hace contacto directo con F147, G148 y K149 de TF-ED humano (SEQ ID NO: 1) parecía estar restringida.

Los cambios de aminoácidos permitidos en cada una de las posiciones de la biblioteca seleccionadas por adsorción de fagos y detección por afinidad de unión comparable en el ensayo de captura en fase sólida usando TF-ECD1-219 humano 0,2 nM se muestran en la Tabla 6.

Tabla 6.

	HC_CDR1				HC_CDR2						HC_CDR3	
Contacto con Antígeno en	No	Sí	Sí	Sí	Sí	No	Sí	No	Sí	No	Sí	No
Posición en HC (SEQ ID NO: 19)	Y27	130	T31	Y32	L52	G54	S55	G56	S57	N59	N104	S105
Diversidad de Secuencia	Y	I	T	Y	L	G	S	G	S	N	N	S
	F	V	P	H	I	W	T	N	Y	V	S	A
		G	A	F	V	A	V	S	W	T		
		N	S			H	P	L	F	L		
		A				V		R	A	I		
		T				Y			H	H		
		R				F					W	
		S									A	
		L									D	
		O									R	
	Y									F		
	A											
	D											
	H											

Para VL en los clones seleccionados, se muestran en la Tabla 7 como relativamente permisivos cambios en S9, G10, N11 y K13 de L-CDR1 (SEQ ID NO: 9) correspondientes a las posiciones 32, 33, 34 y 36 de la región variable de LC (SEQ ID NO: 5 o 23), que se muestran por mapeo de epítopos para contactar con E174, D129, S142, R144 y D145 de TF humano SEQ ID NO: 1 (FIG. 1). Para L-CDR2, el residuo W1, posición 56 en la SEQ ID NO: 5 o 23 (número de residuo de Kabat 50), es un residuo de contacto mientras que el residuo E61 mostró tolerabilidad limitada para la sustitución. En la cadena ligera de CDR3 (SEQ ID NO: 9) correspondiente a las posiciones de residuos 97-100 de la SEQ ID NO: 5 o 23, que tienen contacto directo con K149, D150, N171 y T172 de TF humano SEQ ID NO: 1 (FIG. 1), la posición D97 (posición de Kabat 91) estaba restringida. La selección basada en la unión de afinidad con el uso de aminoácidos permisivos del clon TF-ECD1-219 humano se resume en la Tabla 7.

Tabla 7.

	LC-CDR1					LC-CDR2		LC-CDR3				
5	Contacto con Antígeno	Sí	Sí	Sí	Sí	Sí	No	Sí	Sí	Sí	Sí	
	Posición en LC (SEQ ID NO: 23)	S31	S32	G33	N34	K36	W56	E61	D97	Y98	T99	Y100
10	Diversidad de Secuencia	A	A	A	A	A	A	A	D	A	A	F
		D	F	F	F	H	G	D		D	D	H
		F	G	G	G	I	H	E		F	F	I
15		G	H	H	I	L	w	G		G	G	L
		H	I	I	L	N		H		H	H	N
		I	L	L	N	P		N		I	L	W
20		L	N	N	P	R		P		L	N	Y
		N	P	P	R	S		S		N	R	
		P	R	R	S	V		T		S	S	
25		S	S	S	T			V		T	T	
		T	T	T	V			Y		V	V	
		V	V	V	Y					Y	Y	
30		W	W	W								
	Y	Y	Y									

35 En resumen, se identificaron una serie de variantes de Fab mejoradas por afinidad mediante la construcción de una biblioteca de fagos basada en el abigarramiento dirigido de posiciones de CDR de aminoácido en las posiciones de contacto con TF humano de antígeno para los dominios variables H22 (SEQ ID NO: 19) y L3 (SEQ ID NO: 23), seguido de adsorción y selección de especies con afinidad en el ensayo de examen de unión comparable o mejor en comparación con las secuencias de partida.

40 En general, se obtuvieron aumentos modestos en la afinidad para el emparejamiento de VH y VL seleccionado de las bibliotecas de HFA diseñadas. Sin embargo, de la biblioteca de VH donde se abigarraron los residuos de contacto, el aminoácido original se re-seleccionó después de una adsorción de fagos rigurosa. Solo se cambiaron significativamente dos posiciones de paratopos, como se explica a partir del análisis estructural. Estos dos reemplazos de aminoácidos introducidos en las CDR durante la maduración por afinidad, T31P y S57F, implican residuos de contacto. La mejora de 5 veces de la afinidad puede atribuirse a la interfaz aumentada de F57 que está en contacto con S195 de TF. La interacción de VL con TF parece ser plástica, permitiendo que muchos cambios en los residuos de contacto así como en los residuos colindantes.

50 De los 381 emparejamientos de VH y VL, 43 fueron seleccionados para caracterización adicional. Los 43 MAbs seleccionados representaban 27 VH y 8 VL diferentes (ver la Tabla 8 para el emparejamiento de las secuencias de cadena pesada y cadena ligera) y podrían clasificarse en tres subgrupos: las variantes del Grupo 1 tienen la misma cadena ligera (L3, SEQ ID NO: 23), y el Grupo 2 y el Grupo 3 están representados por ocho cadenas ligeras emparejadas con dos cadenas pesadas diferentes (H116 y H171, SEQ ID NO: 131 y 67, respectivamente).

Tabla 8.

ID de MAb	ID de LC	LC SEQ ID NO:	ID de HC	HC SEQ ID NO:	
60	M1583	L3	23	H177	129
	M1584	L3	23	H173	130
65	M1585	L3	23	H139	131

ES 2 672 267 T3

(continuación)

	ID de MAb	ID de LC	LC SEQ ID NO:	ID de HC	HC SEQ ID NO:
5	M1586	L3	23	H164	132
	M1587	L3	23	H116	133
	M1588	L3	23	H179	134
10	M1589	L3	23	H187	135
	M1590	L3	23	H117	136
	M1591	L3	23	H122	137
15	M1592	L3	23	H165	138
	M1593	L3	23	H171	139
20	M1594	L3	23	H158	140
	M1595	L3	23	H160	141
	M1596	L3	23	H185	142
25	M1597	L3	23	H134	143
	M1598	L3	23	H137	144
	M1599	L3	23	H130	145
30	M1601	L3	23	H105	146
	M1602	L3	23	H106	147
	M1604	L3	23	H138	148
35	M1605	L3	23	H168	149
	M1606	L3	23	H181	150
40	M1607	L3	23	H189	151
	M1610	L3	23	H115	153
	M1611	L3	23	H128	154
45	M1612	L3	23	H133	155
	M1613	L3	23	H136	156
50	M1638	L138	157	H22	19
	M1639	L320	158	H22	19
	M1640	L327	159	H22	19
55	M1641	L335	160	H22	19
	M1642	L369	161	H22	19
	M1643	L162	162	H22	19
60	M1644	L225	163	H22	19
	M1645	L283	164	H22	19
65	M1646	L138	157	H171	139

(continuación)

ID de MAb	ID de LC	LC SEQ ID NO:	ID de HC	HC SEQ ID NO:
M1647	L320	158	H171	139
M1648	L327	159	H171	139
M1649	L335	160	H171	139
M1650	L369	161	H171	139
M1651	L162	162	H171	139
M1652	L225	163	H171	139
M1653	L283	164	H171	139

Del grupo de 27 anticuerpos que tienen la misma cadena ligera que M59 (L3, SEQ ID NO: 23), las 27 cadenas pesadas difieren en tres posiciones en H-CDR1 (GYTFX₁X₂X₃WIE (SEQ ID NO: 83) donde X1 se selecciona de A, D, G, I, L, N, P, R, S, T, V, Y; y X2 se selecciona de A, P, S y T y X3 se selecciona de F, H, y Y); excepto en H189 donde H-CDR1 es GFTFITYWIA (SEQ ID NO: 81), y en cuatro posiciones en H-CDR2 (DIX₁PGX₂GX₃TX₄ (SEQ ID NO: 107) donde X1 se selecciona de I y L, X2 se selecciona de S y T, X3 se selecciona de A, F, H y w; y X4 se selecciona de D, H, I, L y N; excepto en H189 donde H-CDR2 es DILPASSSTN (SEQ ID NO: 105)) mientras que H-CDR3 y las FR no se alteraron de la secuencia de H22 (SEQ ID NO: 19) y es SGYYGNSGFAY (SEQ ID NO: 8). Las composiciones únicas de las cadenas pesadas para estos 27 Mabs se dan a continuación (Tabla 9).

Tabla 9.

MAb	LC SEQ ID NO:	ID de HC	HC SEQ ID NO:	HC-CDR 1	SEQ ID NO: para H-CDR1	HC-CDR2	SEQ ID NO: para H-CDR2
M1583	23	H177	129	GYTFGPYWIE	82	DIIPGSGWTN	100
M1584	23	H173	130	GYTFVTYWIE	77	DILPGTGyTV	99
M1585	23	H139	131	GYTFSPFWIE	70	DIIPGTGYTN	93
M1586	23	H164	132	GYTFPTYWIE	73	DIIPGTGWTN	95
M1587	23	H116	133	GYTFIPYWIE	63	DILPGSGFTT	86
M1588	23	H179	134	GYTFGPFWIE	78	DILPGSGYTN	101
M1589	23	H187	135	GYTFGPHWIE	80	DILPGTGyTN	104
M1590	23	H117	136	GYTFPLPYWIE	64	DIIPGTGFTN	88
M1591	23	H122	137	GYTFRPYWIE	65	DIIPGTGYTN	93
M1592	23	H165	138	GYTFSPHWIE	74	DILPGSGYTI	96
M1593	23	H171	139	GYTFAPYWIE	76	DILPGTGFTT	98
M1594	23	H158	140	GYTFPPYWIE	72	DILPGTGyTV	99
M1595	23	H160	141	GYTFYPYWIE	72	DILPGTGFTN	94
M1596	23	H185	142	GYTFPTYWIE	68	DILPGSGHTT	103
M1597	23	H134	143	GYTFSSYWIE	70	DILPGTGATH	90
M1598	23	H137	144	GYTFPTYWIE	68	DILPGTGyTV	99
M1599	23	H130	145	GYTFGPYWIE	82	DILPGTGyTL	89
M1601	23	H105	146	GYTFGPYWIE	82	DILPGTGyTV	99

(continuación)

MAb	LC SEQ ID NO:	ID de HC	HC SEQ ID NO:	HC-CDR 1	SEQ ID NO: para H-CDR1	HC-CDR2	SEQ ID NO: para H-CDR2	
5	M1602	23	H106	147	GYTFDAHWIE	62	DILPGSGFTD	84
	M1604	23	H138	148	GYTFAPYWIE	76	DILPGTGYSW	92
	M1605	23	H168	149	GYTFGTYWIE	75	DILPGTGHTT	97
10	M1606	23	H181	150	GYTFIPHWIE	79	DILPGSGWTN	102
	M1607	23	H189	151	GFTFITYWIA	81	DILPASSSTN	105
15	M1610	23	H115	153	GYTFAPYWIE	76	DIIPGTGYTT	85
	M1611	23	H128	154	GYTFGPYWIE	82	DILPGSGYTT	88
	M1612	23	H133	155	GYTFNPYWIE	66	DILPGTGYSN	104
20	M1613	23	H136	156	GYTFSSHWIE	69	DILPGSGFTH	91

H171 (SEQ ID NO: 139) comprende un cambio adicional en H-CDR1 y H-CDR2 en comparación con H116, que son 131A y S55T.

25 Dos grupos de Mabs están representados por ocho LC (Tabla 10) emparejados con uno de dos HC diferentes: cadena pesada de H22 (SEQ ID NO: 19) o de H171 (SEQ ID NO: 139). Las ocho cadenas ligeras tienen todas las FR de L3 (derivadas de IGKV240_O1) y tienen cambios de secuencia en cinco posiciones en L-CDR1 (KSSQSLLX₁X₂X₃X₄QX₅NYLT (SEQ ID NO: 116) donde X1 se selecciona de F, P, S, T, W e Y; X2 se selecciona de F, S, T, R y V; X3 se selecciona de A, G, P, S, W, Y, y V; X4 se selecciona de G, N, y T; X5 se selecciona de K, R, y S), dos en L-CDR 2 (X₁ASTRX₂S (SEQ ID NO: 120), donde X1 se selecciona de entre H y W; X2 se selecciona de D, E y S) y cuatro en L-CDR3 (QNDX₁X₂X₃PX₄T (SEQ ID NO: 128) donde X1 se selecciona de D, F y L; X2 se selecciona de S, T e Y; donde X3 se selecciona de W e Y; X4 se selecciona de L y M). Las composiciones de las ocho LC se muestran en la Tabla 10.

35 Tabla 10.

LC ID	LC SEQ ID NO:	SEQ ID NO: para L-CDR1	Secuencia de L-CDR1	SEQ ID NO: para L-CDR2	Secuencia de L-CDR2	SEQ ID NO: para L-CDR3	Secuencia de L-CDR3	
40	L138	156	108	KSSQSLLWFVNQKNYLT	117	HASTRES	122	QNDDSYPLT
	L162	161	109	KSSQSLLVYVGQKNYLT	10	WASTRES	121	QNDFSWPLT
	L225	162	110	KSSQSLLFRPTQKNYLT	10	WASTRES	122	QNDDSYPLT
45	L283	163	111	KSSQSLLYTSNQKNYLT	10	WASTRES	123	QNDDYWPLT
	L320	157	112	KSSQSLLYSGNQKNYLT	118	WASTRSS	124	QNDDTYPMT
50	L327	158	113	KSSQSLLPSWNQSNYLT	10	WASTRES	125	QNDFTYPLT
	L335	159	114	KSSQSLLFSANQKNYLT	119	WASTRDS	126	QNDDTYPLT
	L369	160	115	KSSQSLLTSYNQKNYLT	10	WASTRES	127	QNDLTYPLT

55 Algunos de estos Mab se sometieron a caracterización adicional y se probaron en modelos de xenoinjerto *in vivo* (Ejemplo 5).

60 EJEMPLO 5: CARACTERIZACIÓN DE MABS

60 Después de la adaptación del marco humano y la reselección de una biblioteca de variantes basadas en M59 que comprenden una única región variable de LC (L3, SEQ ID NO: 23) y una única región variable de HC (H22, SEQ ID NO: 19), con residuos alterados en algunos Residuos de CDR, los nuevos Mabs se sometieron a ensayos biofísicos y de bioactividad, y se utilizó un emparejamiento, M1587, con residuos de paratopos alterados para examinar si el epítipo originalmente caracterizado para una unión Fab 10H10 a TF-ECD (Ejemplo 2) se había

alterado .

ECD de TF Humano: Interfaz M1587

5 La co-cristalización de anticuerpos adaptados a humanos y madurados por afinidad basados en CDRs de 10H10, M1587 (L3 y H116) con ECD de TF se realizó de la misma manera que para 10H10 (Ejemplo 3) excepto que el complejo M1587-Fab:TF se cristalizó de una solución que contenía un 16% de PEG 3350, acetato de amonio 0,2 M, acetato de sodio 0,1 M, pH 4.5.

10 La comparación de la estructura co-cristalina de ECD de TF humano con la de Fab M1587 madurado por afinidad indica que la adaptación humana y la maduración por afinidad de 10H10 no ha cambiado la huella del epítipo del anticuerpo como se muestra en la Fig. 2, ni ha alterado la conformación de las CDR. Se introdujeron tres sustituciones de aminoácidos (T31P, S57F y N59T) en H-CDR1 y H-CDR2 (SEQ ID NO: 6 y 27, respectivamente, usando las definiciones de CDR descritas en el Ejemplo 2) durante la adaptación del marco humano y la maduración por afinidad (las SEQ ID NO: 6 y 7 se reemplazaron con las SEQ ID NO: 63 y 86) que incluyen los residuos de contacto en los residuos 31 y 57 de H116 (SEQ ID NO: 133) que son T31P y S57F. Hubo una mejora de la afinidad de cinco veces que puede atribuirse a la interfaz aumentada de F57, que está en contacto con S195 de TF. La estructura del ECD de TF humano con Fab M1587 confirmó la conservación del epítipo durante el HFA y la maduración de afinidad incluso aunque se realizaron cambios en los residuos de paratopo de H-CDR1 y H-CDR2.

Resultados del Ensayo Biofísico y Biológico

25 Los datos resumidos para estos anticuerpos se muestran a continuación para el análisis de KD por Biacore (Tabla 11), el tiempo de coagulación de plasma humano por TF humano (Tabla 12) y el EC50 para la liberación de IL8 de células MD-MB-231 estimuladas con FVIIa (Tabla 13, 14 y Fig. 5).

30 La K_D para 43 Mabs maduros por afinidad seleccionados e incluye datos generados para el 10H10 murino y la versión quimérica de ese MAb (M1) con variantes adaptadas al marco humano seleccionado con CDR no modificada de 10H10 (números M menores que 100) se muestran en la Tabla 11. Por tanto, la combinación de selección de marco humano y sustitución de residuos de CDR produjo anticuerpos humanos con K_D en el intervalo de 80 a 950 pM con una disociación (K_{off}) en el intervalo de $2,2 \times 10^{-5}$ seg $^{-1}$ a $2,6 \times 10^{-3}$ seg $^{-1}$; y con una asociación (K_{on}) en el intervalo de 10^4 M $^{-1}$ seg $^{-1}$ a $2,3 \times 10^5$ M $^{-1}$ seg $^{-1}$. Comparado con los valores para el 10H10 murino original o la construcción quimérica, los nuevos Mabs tienen hasta 10 veces menos en la constante de disociación de equilibrio (K_D), de 0,77 nM a 0,08 nM; muestran una asociación más rápida ($K_{on} > 10^5$ M $^{-1}$ seg $^{-1}$), o tienen una disociación más lenta ($K_{off} = 10^5$ seg $^{-1}$). Estas propiedades se pueden usar con ventaja en la selección de un MAb para aplicaciones particulares donde se desea o tiempo de residencia o capacidad de penetrar tejidos.

Tabla 11.

ID del Anticuerpo	k_a (1/Ms) 10^4	k_d (1/s) 10^{-4}	K_D (nM)
M1639	4.69	3.71	0.08
M1645	5.21	4.12	0.08
M1647	3.87	4.02	0.1
M1652	4.44	4.82	0.11
M1641	4.56	5.46	0.12
M1644	5.81	7.19	0.12
M1587	15.7	0.23	0.14
M1604	15.2	0.22	0.14
M1653	2.31	3.76	0.16
M1649	3.85	6.46	0.17
M1593	13.8	0.25	0.18

ES 2 672 267 T3

	ID del Anticuerpo	ka (1/Ms) 10 ⁴	kd (1/s) 10 ⁻⁴	K _D (nM)
5	M1606	16.55	0.29	0.18
	M1643	4.52	8.13	0.18
	M1646	3.5	6.47	0.19
10	M1650	2.33	4.5	0.19
	M1651	2.01	3.88	0.19
	M58	9.48	0.18	0.19
	M1638	4.89	9.92	0.2
15	M61	9.41	0.19	0.2
	M1584	18.4	0.56	0.3
	M1611	19.2	0.59	0.31
20	M1596	13.1	0.43	0.33
	M1598	19.2	0.63	0.33
	M1601	13.7	0.46	0.33
	M1588	17.3	0.6	0.35
25	M1594	12.4	0.43	0.35
	M1607	17	0.6	0.35
	M11	9.73	0.35	0.36
30	M1612	16.5	0.63	0.38
	M1595	17.6	0.68	0.39
	M1599	13.8	0.53	0.39
	M1589	17.4	0.7	0.4
35	M1592	19.1	0.77	0.4
	M1591	13.4	0.56	0.41
	M19	9.88	0.41	0.41
40	M59	9.33	0.38	0.41
	M1583	23.9	1	0.42
	M60	9.75	0.46	0.47
	M1585	18.5	0.9	0.49
45	M46	9	0.44	0.49
	M1610	18.4	1	0.54
	M37	6.9	0.37	0.54
50	M12	9.22	0.51	0.55
	M9	9.73	0.59	0.61
	M1602	13.2	0.82	0.62
	M1605	13.5	0.86	0.64
55	M16	10.2	0.67	0.66
	M1590	15.9	1.09	0.69
	M1648	1.02	7.45	0.73
60	M1640	1.02	7.8	0.76
	10H10	8.88	0.68	0.76
	M1	9.52	0.74	0.77
65	M10	9.26	0.71	0.77

ID del Anticuerpo	ka (1/Ms) 10 ⁴	kd (1/s) 10 ⁻⁴	K _D (nM)
M1586	18.4	1.43	0.78
M1597	8.34	0.66	0.8
M1613	7.57	0.7	0.92
M1642	2.74	26.1	0.95
M42	8.04	0.82	1.02
M26	8.26	0.93	1.13
M68	6.43	1.03	1.6
M51	8.11	2.35	2.9
M52	7.4	2.64	3.57

20 Coagulación

Los nuevos Mabs se caracterizan por la capacidad de unirse a TF humano sin bloquear la coagulación del plasma humano como se mide *in vitro* en presencia de calcio y TF humano exógenamente añadido (Tabla 12). Se ensayaron diecisiete variantes de HFA (número M menor de 100) y 38 variantes maduras por afinidad (M1583 y superiores) y se informó del T_{1/2} Max (el tiempo en segundos para alcanzar el 50% de la densidad óptica máxima).

Todos demuestran respuestas similares a las observadas con 10H10 (Tabla 12) con valores de T_{1/2} Max menores de 205 segundos, indicando que estos anticuerpos no prolongan el tiempo de coagulación cuando se comparan con el control del vehículo sin anticuerpo que era de 159 ± 17 (n = 14). El CNTO860, un anticuerpo de unión a TF humano descrito anteriormente (US7605235 B2) y derivado del anticuerpo murino 5G9 que bloquea la unión de FX a TF, prolonga la coagulación y nunca alcanza la coagulación al de 1800 segundos en el mismo ensayo. Cinco de los 43 MAb descritos en el Ejemplo 4 que tenían CDR alteradas, no se probaron en el ensayo de coagulación debido a que tienen una concentración de partida menor de 2 mg/ml. Los valores M1, M59 y CNTO860 se promediaron a través de pruebas múltiples.

Tabla 12.

ID de MAb	T1/2 Max. (Segundos) (n = 2)	SD (segundos)	ID de anticuerpo	T1/2 Ma. (Segundos) (n = 2)	SD (segundos)
10H10 *	191	2	M1592	163	6
M1 *	173	5	M1593	164	7
CNTO860 *	> 900	11	M1594	165	5
M9	198	3	M1595	163	5
M10	196	6	M1596	163	5
M11	195	5	M1597	157	6
M12	197	7	M1598	155	4
M16	198	5	M1599	151	6
M19	199	5	M1601	180	6
M26	186	4	M1602	163	7
M37	196	5	M1604	165	5
M42	202	7	M1605	160	5
M46	195	6	M1606	157	5

(continuación)

ID de MAb	T1/2 Max. (Segundos) (n = 2)	SD (segundos)	ID de anticuerpo	T1/2 Ma. (Segundos) (n = 2)	SD (segundos)
M51	207	7	M1607	152	6
M52	201	6	M1610	164	4
M58	192	5	M1611	154	10
M59 *	169	4	M1612	163	11
M60	180	4	M1613	165	11
M61	186	10	M1638	163	12
M68	207	11	M1639	167	5
M1583	189	8	M1640	168	9
M1584	199	6	M1641	162	9
M1585	205	12	M1642	166	6
M1586	200	7	M1643	148	6
M1587	202	10	M1644	150	6
M1588	207	10	M1645	154	4
M1589	202	3	M1647	160	6
M1590	180	5	M1648	161	3
M1591	154	6	M1650	150	6

Actividad de Bloqueo de Señal

Los nuevos MAb también pueden describirse en términos de su capacidad para bloquear la señalización a través del complejo TF/FVIIa. La señalización de TF/VIIa/ PAR2 de células de cáncer de mama induce un repertorio de factores proangiogénicos amplio como VEGF25, Cyr61, VEGF-C, CTGF, CXCL1 e IL-8. Se ha informado anteriormente que FVIIa induce IL-8 detectable en MDA-MB-231???, una línea celular de cáncer de mama humano que expresa TF (Albrektsen et al., J Thromb Haemost 5: 1588-1597, 2007). Por lo tanto, este ensayo se usó como un ensayo biológico para evaluar la capacidad de anticuerpos variantes para inhibir la inducción de TF/VIIa de la producción de IL-8.

Los detalles del ensayo se proporcionan anteriormente en la presente y los resultados de probar 19 de las variantes de HFA (M10 - M68) del Ejemplo 3 y 29 de las variantes de CDR del Ejemplo 4 se probaron para la capacidad de inhibir la producción de IL - 8 en una única concentración de TF (0,5 microgramo por ml). Un anticuerpo anti-RSV (B37) que no se une al Factor Tisular, usado como un control negativo. A esta concentración, muchos de los Mabs de HFA fueron capaces de bloquear la inducción de IL-8 en más del 67% (Tabla 13). La Fig. 5 muestra la inhibición relativa de liberación de IL8 por 27 de los MAb que comparten la cadena ligera L3 (SEQ ID NO: 23) y que tienen sustituciones en H-CDR1 o H-CDR2 en comparación con los de 10H10 (SEQ ID NO: 6 y 7, respectivamente). Adicionalmente; cuatro de estos: M1584, M1611, TF7M1612 y TF7M1607 se colocaron en un ensayo de inducción de IL-8 de titulación completa junto con M. Los valores de IC50 relativos calculados respaldan adicionalmente la observación de que las variantes mejoradas por afinidad son más potentes en comparación con M1, la quimera ratón-humano de 10H10 (Tabla 14). Los otros grupos maduros por afinidad de anticuerpos madurados por afinidad descritos en el Ejemplo 4 produjeron resultados similares.

Tabla 13.

ID de variantes	% de inhibición de IL-8	SD
10H10	93.9	8.0
M1	96.1	7.6
M9	102.7	4.5
M10	90.7	0.0
M11	87.9	9.4
M12	98.6	3.1
M16	98.3	6.2
M19	87.3	5.8
M26	79.1	1.3
M37	71.2	11.6
M42	86.0	20.1
M46	82.5	10.7
M51	71.5	9.4
M52	67.7	4.0
M58	88.5	8.5
M59	83.8	8.0
M60	99.6	4.5
M61	106.8	4.9
M68	89.8	11.1

Tabla 14.

ID de MAb	IC50 (ug/ml)
M1	0.527
M59	0.382
M1584	0.332
M1607	0.395
M1611	0.398
M1612	0.413

EJEMPLO 6: ACTIVIDAD ANTITUMOR DEL ANTICUERPO

Modelo de Xenoinjerto de Ratón con MDA-MB-231

Se cultivaron células de cáncer de mama humano MDA-MB-231 en medio DMEM con 10% de SFB y 1% de LNN, se recogieron en fase logarítmica por tripsinización, y se resuspendieron en medio DMEM libre de suero estéril a 5×10^7 células/ml. Se obtuvieron veinte ratones SCID Beige (CB-17/1crCrI-scid-bgBR) hembra de Charles River Laboratories y se aclimataron durante 14 días antes de la experimentación. Aproximadamente a las ocho semanas de edad, a los ratones se les implantaron en la almohadilla de grasa mamaria axilar derecha $2,5 \times 10^6$ células MDA-

5 MB-231. Cuando los tumores tenían aproximadamente 100 mm³ de tamaño, los ratones se estratificaron por tamaño del tumor en grupos de tratamiento (N = 10 por grupo). El tratamiento intraperitoneal con Solución Salina Tamponada con Fosfato de Dulbecco (DPBS) o M1593 a 10 mg/kg de peso corporal, comenzó el día de la estratificación y continuó una vez a la semana para un total de seis dosis. Los tumores y los pesos corporales se registraron una vez a la semana. El estudio terminó cuando el volumen tumoral medio de cada grupo alcanzó 1500 mm³. Las pruebas estadísticas aplicadas fueron ANOVA de medidas repetidas bidireccionales (PRIZM 4.0, GraphPad).

10 En el modelo de xenoinjerto de MDA-MB-231, M1593 inhibió significativamente el crecimiento tumoral a partir del día 22 (*P <0,01) y continuó hasta el día 29 (**P <0,001), momento en el que se sacrificó el grupo de control (tratado con DPBS). El grupo tratado con M1593 se sacrificó el día 36. M1593 inhibió el crecimiento tumoral en aproximadamente el 49% el día 29. Hubo un retraso de crecimiento tumoral de aproximadamente 11 días en el grupo tratado con M1593, con relación al grupo de control tratado con DPBS (FIG. 6).

15 Modelo de Xenoinjerto de Ratón con A431

20 Se cultivaron células de carcinoma de células escamosas humanas A431 en medio DMEM con 10% de SFB y 1% de LNN, se recogieron en fase logarítmica por tripsinización, y se resuspendieron en HBSS estéril a 1 x 10⁷ células/ml. Se obtuvieron veinte ratones SCID Beige (CB-17/lcrCrl-scid-bgBR) hembras de Charles River Laboratories y se aclimataron durante 14 días antes de la experimentación. Aproximadamente a las ocho semanas de edad, a los ratones se les implantaron en el lado derecho 2 x 10⁶ células A431. Cuando los tumores tenían aproximadamente 118 mm³ de tamaño, los ratones se estratificaron por tamaño del tumor en grupos de tratamiento (N = 10 por grupo). El tratamiento intraperitoneal con DPBS o M1593 a 10 mg/kg de peso corporal, comenzó el día de la estratificación y continuó una vez a la semana para un total de seis dosis. Los tumores y los pesos corporales se registraron dos veces a la semana. El estudio finalizó cuando el volumen tumoral medio de cada grupo alcanzó 1000 mm³. Las pruebas estadísticas aplicadas fueron ANOVA de medidas repetidas bidireccionales (PRIZM 4.0, GraphPad).

30 M1593 inhibió significativamente el crecimiento tumoral en el día 22 (* P = 0,0067), momento en el que se sacrificó el grupo de control (tratado con DPBS). El grupo tratado con CNTO592 se sacrificó el día 39. CNTO592 inhibió el crecimiento tumoral en aproximadamente un 54% el día 22. Hubo un retraso del crecimiento tumoral de aproximadamente 17 días en el grupo tratado con M1593, con respecto al grupo de control tratado con DPBS (FIG. 7).

35 **EJEMPLO 7: COMPOSICIONES DE ANTICUERPOS CON F_c ALTERADA**

40 Las variantes del receptor de Fc humano de origen natural tienen afinidades sustancialmente diferentes para la porción Fc de anticuerpos humanos. Además, los estudios clínicos han demostrado tasas de respuesta y supervivencia mejoradas para pacientes con genotipos de Fc de unión ajustada después del tratamiento con mAbs Fc-diseñados (Musolino et al 2008 J Clin Oncol 26:1789-1796 (2008); Bibeau et al 2009 J Clin Oncol 27:1122-1129).

45 Aunque se espera que la inhibición de la señalización de TF reduzca las respuestas celulares que llevan a la proliferación, migración y diseminación metastásica de tumores, el hecho de que el antígeno de TF se muestre en células tumorales proporciona un medio para matar selectivamente a la célula objetivo por mecanismos relacionados con el acoplamiento del receptor de Fc por el anticuerpo de Fc. Se sabe que las características de superficie del dominio de Fc del anticuerpo están influenciadas por la composición de glicano así como por la secuencia primaria de las cadenas pesadas, y la modificación de una o ambas puede alterar la unión del receptor de Fc.

50 El MAb identificado como M1593, se produjo como una IgG1 modificada por glicano baja en fucosa y también como una variante del dominio IgG1-CH2 (S239D, I332E donde la numeración es la del sistema Kabat EU).

Composiciones MAb y métodos de Elaborarlas

55 El anticuerpo con bajo contenido de fucosa (M1593-LF) se produjo electroporando un vector que codifica las cadenas de M1593 (IgG1/Kappa) como se muestra a continuación con péptidos señal en una sublínea de células huésped CHO seleccionada para baja fucosilación de proteínas de la línea de células huésped de CHO. La SEQ ID NO: 165 representa la cadena ligera completa que comprende el dominio variable, los residuos 1-113 (SEQ ID NO: 23 más FR4, SEQ ID NO: 61, subrayado) y el dominio ligero constante kappa humano. Las cadenas pesadas que comprenden los residuos del dominio variable 1-120 (que incluye la SEQ ID NO: 139 y FR4 SEQ ID NO: 60, subrayado) con el isotipo 1 de IgG humana de tipo salvaje CHI, CH2 y CH3, donde las posiciones de Kabat 239 y 332 (que son 242 y 335 de la SEQ ID NO: 167) se modifican de los residuos de tipo salvaje S y D, a D y E, respectivamente para formar la variante M1593-DE.

60 M1593-Cadena ligera

65

DIVMTQTPLSLPVTGEPASISCKSSQSLLSSGNQKNYLTWYLQKPGQSPQLLIYWA
STRESGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCQNDYTYPLTFGQGTGLEIKR
 5 TVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVT
EQDSKDSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID
NO: 165)

10 M1593 - cadena pesada donde la posición S239 de Kabat es D, y 1332 es E

EVQLVQSGAEVKKPGESLRISCKGSGYTFAPYWIEWVRQMPGKGLEWMGDILPGT
 15 GFTTYSPSFQGHVTISADKSISTAYLQWSSLKASDTAMYYCARSGYGNSGFAYWG
QGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTS
GVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKCKVEPKSCDK
 20 THTCPPCPAPELLGPPDVFLLFPKPKDITLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYV
DGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPKEE
 25 KTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENN
YKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
K (SEQ ID NO: 167)

30 La célula CHO se generó mediante subclonación después de cuatro rondas de selección de lectina negativa (selección de no unión a fucosa de lectina de unión) y clasificación FACS para aislar un grupo de células bajas en fucosa de origen natural para ser usadas como una línea celular huésped. Esta línea se derivó de las mismas células huésped usadas para producir M1593 y por lo tanto, las células se cultivan y manejan exactamente de la misma manera. Las células transfectadas se examinaron mediante colocación en placas con metilcelulosa usando proteína G para detección y colonias recogidas en placas de 96 pocillos. Los cultivos se expandieron a
 35 matraces agitadores para titulación. Los clones originales superiores produjeron M1593-LF hasta 708 mg/l (en medio estándar) en cultivos de matraces agitados por lotes.

40 El mapeo de glucopéptidos LC-MS se realizó en dos clones productores de M1593-LF (C2452B y C2452D) para determinar el porcentaje de fucosilación y evaluar la estabilidad del perfil de glicosilación a lo largo del tiempo y el proceso de producción (Tabla 15). Las muestras se recogieron durante un estudio de estabilidad de cultivos del pase 1 alimentado por lotes y pase 10 por lotes y se purificaron. También se analizaron las muestras purificadas de la evaluación del biorreactor. El mapeo de glucopéptidos mostró patrones de glicosilación favorables con bajo
 45 porcentaje total de fucosilación de C2452B y C2452D. Es importante destacar que el porcentaje de fucosilación no aumentó significativamente con el tiempo lo que sugiere que la fucosilación de la célula huésped es estable. Por tanto, el contenido de fucosa para M1593-LF es inferior al 10% y, en general, inferior al 5% y, en algunas preparaciones, inferior al 2%. El mAb producido en la célula CHO huésped seleccionada sin lectina comprendía grupos de glucanos en los que más del 80% estaban fucosilados.

50 Tabla 15.

Clon	% de Fucosilación	Muestra analizada
C2452B	2.81	P1 Matraz agitado alimentado por lotes
C2452B	1.83	p10 Lote de estudio de estabilidad
C2452B	3.67	Biorreactor
C2452D	2.20	P1 Matraz agitado alimentado por lotes
C2452D	2.25	p10 Lote de estudio de estabilidad
C2452D	7.31	Biorreactor

Para la variante de Fc mutante de M1593 (M1593-DE), el plásmido que expresa M1593 se sometió a mutagénesis dirigida al sitio.

Actividad Biológica

Las tres variantes de Fc de TF anti-TF humanas (M1593, M1593-LF y M1593-DE) tienen afinidad por los receptores de Fc tanto humanos como de cynomolgus (FcyRI, FcyRIIa, FcyRIIIa). Estos ensayos se realizaron como se describe en la solicitud pendiente de los solicitantes (Nº de Serie US 61/426619) o usando ensayos de unión basados en resonancia de Plasmones (Biacore) (?).

Los resultados de estos ensayos demostraron que ambos anticuerpos anti-TF modificados con Fc se unían mucho más estrechamente a receptores de FcIIIa humanos recombinantes en comparación con el anticuerpo M1593 de IgG1 no modificado original en 18 veces (M1593-LF) y 40 veces (M1593-DE) (Tabla 16).

Tabla 16: Afinidades de anticuerpos anti-TF para receptores de FcIIIa humanos

<u>MAb</u>	<u>K_D de FcIIIa Humano (M)</u>
M1593 (dominios constantes de IgG1/kappa humanos de tipo salvaje)	2.1 x 10 ⁻⁷
M1593-DE (hlgG1 con S239D/I332E)	5.0 x 10 ⁻⁹
M1593-LF (hlgG1 producido en la sublínea huésped que produce fucosilación reducida en glucanos)	1.2 x 10 ⁻⁸

ADCC es estimulado por el acoplamiento de FcyRIIIa. Los ensayos de ADCC se realizaron como se ha descrito anteriormente (Scallon et al., Mol Immunol 44:1524-1534 2007).

La unión mejorada del receptor de Fc se reflejó en ensayos de ADCC *in vitro* funcionales usando PBMC humanas como células efectoras y la línea celular de cáncer de mama humano MDA-MB-231 como la célula objetivo (Fig. 8).

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Janssen Biotech, Inc.
 Almagro, Juan Carlos
 Anderson, Glenn Mark
 Chi, Ellen
 Martinez, Christian
 Raghunathan, Gopalan
 Swanson, Ronald
 Teplyakov, Alexey
 Tse, Kam-Fai
 Wu, Sheng-Jiun
 Zhou, Hong Mimi

<120> Anticuerpo del Factor Tisular Humanos y Usos del Mismo

<130> CEN5309WOPCT

<140> Desconocido

<141> Adjunto

<150> 61/452,674

<151> 2011-03-15

<160> 167

<170> PatentIn versión 3.5

<210> 1

<211> 263

<212> PRT

<213> Homo sapiens

ES 2 672 267 T3

<400> 1

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

ES 2 672 267 T3

Ile Gln Ser Phe Glu Gln Val Gly Thr Lys Val Asn Val Thr Val Glu
 115 120 125

5 Asp Glu Arg Thr Leu Val Arg Arg Asn Asn Thr Phe Leu Ser Leu Arg
 130 135 140

10 Asp Val Phe Gly Lys Asp Leu Ile Tyr Thr Leu Tyr Tyr Trp Lys Ser
 145 150 155 160

15 Ser Ser Ser Gly Lys Lys Thr Ala Lys Thr Asn Thr Asn Glu Phe Leu
 165 170 175

20 Ile Asp Val Asp Lys Gly Glu Asn Tyr Cys Phe Ser Val Gln Ala Val
 180 185 190

25 Ile Pro Ser Arg Thr Val Asn Arg Lys Ser Thr Asp Ser Pro Val Glu
 195 200 205

30 Cys Met Gly Gln Glu Lys Gly Glu Phe Arg Glu Ile Phe Tyr Ile Ile
 210 215 220

35 Gly Ala Val Val Phe Val Val Ile Ile Leu Val Ile Ile Leu Ala Ile
 225 230 235 240

40 Ser Leu His Lys Cys Arg Lys Ala Gly Val Gly Gln Ser Trp Lys Glu
 245 250 255

45 Asn Ser Pro Leu Asn Val Ser
 260

<210> 2
 <211> 220
 <212> PRT
 <213> Macaca fascicularis

<400> 2

50 Ser Gly Thr Thr Asn Thr Val Ala Ala Tyr Asn Leu Thr Trp Lys Ser
 1 5 10 15

55 Thr Asn Phe Lys Thr Ile Leu Glu Trp Glu Pro Lys Pro Ile Asn Gln
 20 25 30

60 Val Tyr Thr Val Gln Ile Ser Thr Lys Ser Gly Asp Trp Lys Ser Lys
 35 40 45

65 Cys Phe Tyr Thr Ala Asp Thr Glu Cys Asp Leu Thr Asp Glu Ile Val
 50 55 60

ES 2 672 267 T3

Lys Asp Val Lys Gln Thr Tyr Leu Ala Arg Val Phe Ser Tyr Pro Ala
 65 70 75 80
 5 Gly His Val Glu Ser Thr Gly Ser Thr Glu Glu Pro Pro Tyr Glu Asn
 85 90 95
 10 Ser Pro Glu Phe Thr Pro Tyr Leu Glu Thr Asn Leu Gly Gln Pro Thr
 100 105 110
 15 Ile Gln Ser Phe Glu Gln Val Gly Thr Lys Val Asn Val Thr Val Gln
 115 120 125
 20 Asp Glu Trp Thr Leu Val Arg Arg Asn Asp Thr Phe Leu Ser Leu Arg
 130 135 140
 25 Asp Val Phe Gly Lys Asp Leu Ile Tyr Thr Leu Tyr Tyr Trp Lys Ser
 145 150 155 160
 30 Ser Ser Ser Gly Lys Lys Thr Ala Lys Thr Asn Thr Asn Glu Phe Leu
 165 170 175
 35 Ile Asp Val Asp Lys Gly Glu Asn Tyr Cys Phe Ser Val Gln Ala Val
 180 185 190
 40 Ile Pro Ser Arg Arg Thr Ala Asn Arg Lys Ser Thr Asp Ser Pro Val
 195 200 205
 45 Glu Cys Met Gly His Glu Lys Gly Glu Ser Arg Glu
 210 215 220
 <210> 3
 <211> 266
 <212> PRT
 <213> Mus musculus
 <400> 3
 50 Ala Gly Ile Pro Glu Lys Ala Phe Asn Leu Thr Trp Ile Ser Thr Asp
 1 5 10 15
 55 Phe Lys Thr Ile Leu Glu Trp Gln Pro Lys Pro Thr Asn Tyr Thr Tyr
 20 25 30
 60 Thr Val Gln Ile Ser Asp Arg Ser Arg Asn Trp Lys Asn Lys Cys Phe
 35 40 45
 65 Ser Thr Thr Asp Thr Glu Cys Asp Leu Thr Asp Glu Ile Val Lys Asp
 50 55 60

ES 2 672 267 T3

Val Thr Trp Ala Tyr Glu Ala Lys Val Leu Ser Val Pro Arg Arg Asn
 65 70 75 80

5 Ser Val His Gly Asp Gly Asp Gln Leu Val Ile His Gly Glu Glu Pro
 85 90 95

10 Pro Phe Thr Asn Ala Pro Lys Phe Leu Pro Tyr Arg Asp Thr Asn Leu
 100 105 110

15 Gly Gln Pro Val Ile Gln Gln Phe Glu Gln Asp Gly Arg Lys Leu Asn
 115 120 125

20 Val Val Val Lys Asp Ser Leu Thr Leu Val Arg Lys Asn Gly Thr Phe
 130 135 140

25 Leu Thr Leu Arg Gln Val Phe Gly Lys Asp Leu Gly Tyr Ile Ile Thr
 145 150 155 160

30 Tyr Arg Lys Gly Ser Ser Thr Gly Lys Lys Thr Asn Ile Thr Asn Thr
 165 170 175

35 Asn Glu Phe Ser Ile Asp Val Glu Glu Gly Val Ser Tyr Cys Phe Phe
 180 185 190

40 Val Gln Ala Met Ile Phe Ser Arg Lys Thr Asn Gln Asn Ser Pro Gly
 195 200 205

45 Ser Ser Thr Val Cys Thr Glu Gln Trp Lys Ser Phe Leu Gly Glu Thr
 210 215 220

50 Leu Ile Ile Val Gly Ala Val Val Leu Leu Ala Thr Ile Phe Ile Ile
 225 230 235 240

55 Leu Leu Ser Ile Ser Leu Cys Lys Arg Arg Lys Asn Arg Ala Gly Gln
 245 250 255

60 Lys Gly Lys Asn Thr Pro Ser Arg Leu Ala
 260 265

65 <210> 4
 <211> 120
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

<400> 4

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

ES 2 672 267 T3

Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Ile Thr Tyr
 20 25 30
 5 Trp Ile Glu Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly His Gly Leu Glu Trp Ile
 35 40 45
 10 Gly Asp Ile Leu Pro Gly Ser Gly Ser Thr Asn Tyr Asn Glu Asn Phe
 50 55 60
 15 Lys Gly Lys Ala Thr Phe Thr Ala Asp Ser Ser Ser Asn Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 20 Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 25 Ala Arg Ser Gly Tyr Tyr Gly Asn Ser Gly Phe Ala Tyr Trp Gly Gln
 100 105 110
 30 Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ala
 115 120
 <210> 5
 <211> 113
 <212> PRT
 <213> Mus musculus
 35 <400> 5
 Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Thr Val Thr Ala Gly
 1 5 10 15
 40 Glu Lys Val Thr Met Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Ser Ser
 20 25 30
 45 Gly Asn Gln Lys Asn Tyr Leu Thr Trp Tyr Gln Gln Ile Pro Gly Gln
 35 40 45
 50 Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val
 50 55 60
 55 Pro Asp Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr
 65 70 75 80
 60 Ile Asn Ser Val Gln Ala Glu Asp Leu Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Asn
 85 90 95
 65 Asp Tyr Thr Tyr Pro Leu Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu
 100 105 110

Lys

5 <210> 6
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

 <400> 6
 10 Gly Tyr Thr Phe Ile Thr Tyr Trp Ile Glu
 1 5 10

 15 <210> 7
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

 <400> 7
 20 Asp Ile Leu Pro Gly Ser Gly Ser Thr Asn Tyr Asn Glu Asn Phe Lys
 1 5 10 15

 25 Gly

 30 <210> 8
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

 <400> 8
 35 Ser Gly Tyr Tyr Gly Asn Ser Gly Phe Ala Tyr
 1 5 10

 40 <210> 9
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

 <400> 9
 45 Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Ser Ser Gly Asn Gln Lys Asn Tyr Leu
 1 5 10 15

 Thr
 50 <210> 10
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

 <400> 10
 55 Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser
 1 5

 60 <210> 11
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

 <400> 11
 65

ES 2 672 267 T3

Gln Asn Asp Tyr Thr Tyr Pro Leu Thr
 1 5

<210> 12
 <211> 109
 5 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> CDR murina o mutágenos de la misma en marcos del dominio variable de IgG Humana

10 <400> 12

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

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

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

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

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

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

40 Ala Arg Ser Gly Tyr Tyr Gly Asn Ser Gly Phe Ala Tyr
 100 105

<210> 13
 <211> 109
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

45 <220>
 <223> CDR murina o mutágenos de la misma en marcos del dominio variable de IgG Humana

50 <400> 13

55

60

65

ES 2 672 267 T3

1 Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
 5 Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Ile Thr Tyr
 10 Trp Ile Glu Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
 15 Gly Asp Ile Leu Pro Gly Ser Gly Ser Thr Asn Tyr Asn Glu Asn Phe
 20 Lys Gly Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Thr Ser Thr Val Tyr
 25 Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 30 Ala Arg Ser Gly Tyr Tyr Gly Asn Ser Gly Phe Ala Tyr
 <210> 14
 <211> 109
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 35 <220>
 <223> CDR murina o mutágenos de la misma en marcos del dominio variable de IgG Humana
 <400> 14
 40 Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
 45 Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Ile Thr Tyr
 50 Trp Ile Glu Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Arg Leu Glu Trp Met
 55 Gly Asp Ile Leu Pro Gly Ser Gly Ser Thr Asn Tyr Asn Glu Asn Phe
 60 Lys Gly Arg Val Thr Ile Thr Arg Asp Thr Ser Ala Ser Thr Ala Tyr
 65 Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys

ES 2 672 267 T3

Ala Arg Ser Gly Tyr Tyr Gly Asn Ser Gly Phe Ala Tyr
 100 105

5 <210> 15
 <211> 109
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

10 <220>
 <223> CDR murina o mutágenos de la misma en marcos del dominio variable de IgG Humana

<400> 15

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

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

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

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

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

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

40 Ala Arg Ser Gly Tyr Tyr Gly Asn Ser Gly Phe Ala Tyr
 100 105

45 <210> 16
 <211> 109
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

50 <220>
 <223> CDR murina o mutágenos de la misma en marcos del dominio variable de IgG Humana

<400> 16

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

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

65

65

ES 2 672 267 T3

Trp Ile Glu Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
 35 40 45
 5 Gly Asp Ile Leu Pro Gly Ser Gly Ser Thr Asn Tyr Asn Glu Asn Phe
 50 55 60
 10 Lys Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Glu Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 15 Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 20 Ala Arg Ser Gly Tyr Tyr Gly Asn Ser Gly Phe Ala Tyr
 100 105
 <210> 17
 <211> 109
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 25 <220>
 <223> CDR murina o mutágenos de la misma en marcos del dominio variable de IgG Humana
 <400> 17
 30 Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
 1 5 10 15
 35 Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Ile Thr Tyr
 20 25 30
 40 Trp Ile Glu Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
 35 40 45
 45 Gly Asp Ile Leu Pro Gly Ser Gly Ser Thr Asn Tyr Asn Glu Asn Phe
 50 55 60
 50 Lys Gly Arg Val Thr Met Thr Thr Asp Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 55 Met Glu Leu Arg Ser Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 60 Ala Arg Ser Gly Tyr Tyr Gly Asn Ser Gly Phe Ala Tyr
 100 105
 <210> 18
 <211> 109
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 65 <223> CDR murina o mutágenos de la misma en marcos del dominio variable de IgG Humana

ES 2 672 267 T3

<400> 18

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

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

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

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

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

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

35 Ala Thr Ser Gly Tyr Tyr Gly Asn Ser Gly Phe Ala Tyr
 100 105

<210> 19

<211> 109

35 <212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

40 <223> CDR murina o mutágenos de la misma en marcos del dominio variable de IgG Humana

<400> 19

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

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

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

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

60

65

ES 2 672 267 T3

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

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

10 Ala Arg Ser Gly Tyr Tyr Gly Asn Ser Gly Phe Ala Tyr
 100 105

<210> 20
 <211> 109
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

15 <220>
 <223> CDR murina o mutágenos de la misma en marcos del dominio variable de IgG Humana

20 <400> 20

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

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

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

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

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

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

55 Ala Arg Ser Gly Tyr Tyr Gly Asn Ser Gly Phe Ala Tyr
 100 105

<210> 21
 <211> 109
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

60 <220>
 <223> CDR murina o mutágenos de la misma en marcos del dominio variable de IgG Humana

<400> 21

65

ES 2 672 267 T3

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

35 <210> 22
 <211> 103
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 40 <220>
 <223> CDR murina o mutágenos de la misma en marcos del dominio variable de IgG Humana
 <400> 22

45

50

55

60

65

ES 2 672 267 T3

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

30 100

<210> 23
 <211> 103
 <212> PRT
 35 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> CDR murina o mutágenos de la misma en marcos del dominio variable de IgG Humana
 40 <400> 23

45
50
55
60
65

ES 2 672 267 T3

```

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

5  Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Ser Ser
   20                    25                    30

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

15 Ser Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val
   50                    55                    60

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

25 Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Gln Asn
   85                    90                    95

30 Asp Tyr Thr Tyr Pro Leu Thr
   100

<210> 24
<211> 103
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> CDR murina o mutágenos de la misma en marcos del dominio variable de IgG Humana

<400> 24

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

45  Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Ser Ser
   20                    25                    30

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

55  Ser Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val
   50                    55                    60

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

65  Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Gln Asn
   85                    90                    95

   Asp Tyr Thr Tyr Pro Leu Thr
   100

```


ES 2 672 267 T3

<210> 25
 <211> 103
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 5
 <220>
 <223> CDR murina o mutágenos de la misma en marcos del dominio variable de IgG Humana
 <400> 25
 10 Asp Ile Val Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Ser Val Thr Pro Gly
 1 5 10 15
 15 Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Ser Ser
 20 20 25 30
 20 Gly Asn Gln Lys Asn Tyr Leu Thr Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln
 35 40 45
 25 Pro Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val
 50 55 60
 30 Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys
 65 70 75 80
 35 Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Gln Asn
 85 90 95
 40 Asp Tyr Thr Tyr Pro Leu Thr
 100
 40 <210> 26
 <211> 103
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 45 <220>
 <223> CDR murina o mutágenos de la misma en marcos del dominio variable de IgG Humana
 <400> 26
 50
 55
 60
 65

ES 2 672 267 T3

Asp Ile Val Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Ser Pro Val Thr Leu Gly
 1 5 10 15
 5 Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Ser Ser
 20 25 30
 10 Gly Asn Gln Lys Asn Tyr Leu Thr Trp Leu Gln Gln Arg Pro Gly Gln
 35 40 45
 15 Pro Pro Arg Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val
 50 55 60
 20 Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ala Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys
 65 70 75 80
 25 Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Gln Asn
 85 90 95
 30 Asp Tyr Thr Tyr Pro Leu Thr
 100
 35 <210> 27
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Mus musculus
 40 <400> 27
 Asp Ile Leu Pro Gly Ser Gly Ser Thr Asn
 1 5 10
 45 <210> 28
 <211> 25
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 50 <400> 28
 Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Glu
 1 5 10 15
 55 Ser Leu Arg Ile Ser Cys Lys Gly Ser
 20 25
 60 <210> 29
 <211> 25
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 65 <400> 29

ES 2 672 267 T3

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

5 Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser
 20 25

<210> 30
 <211> 25
 10 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 30

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

20 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser
 20 25

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

<400> 31

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

35 Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser
 20 25

<210> 32
 <211> 25
 <212> PRT
 40 <213> Homo sapiens

<400> 32

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

50 Thr Val Lys Ile Ser Cys Lys Val Ser
 20 25

<210> 33
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

55 <400> 33

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

60 <210> 34
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

65 <400> 34

ES 2 672 267 T3

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

5 <210> 35
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

10 <400> 35
 Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Arg Leu Glu Trp Met Gly
 1 5 10

15 <210> 36
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

20 <400> 36
 Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Val Trp Val Ser
 1 5 10

25 <210> 37
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

30 <400> 37
 Trp Val Gln Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Met Gly
 1 5 10

35 <210> 38
 <211> 32
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

40 <400> 38
 His Val Thr Ile Ser Ala Asp Lys Ser Ile Ser Thr Ala Tyr Leu Gln
 1 5 10 15

45 Trp Ser Ser Leu Lys Ala Ser Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys Ala Arg
 20 25 30

50 <210> 39
 <211> 32
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

55 <400> 39
 Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Thr Ser Thr Val Tyr Met Glu
 1 5 10 15

60 Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg
 20 25 30

65 <210> 40
 <211> 32
 <212> PRT

ES 2 672 267 T3

<213> Homo sapiens

<400> 40

5 Arg Val Thr Ile Thr Arg Asp Thr Ser Ala Ser Thr Ala Tyr Met Glu
1 5 10 15

10 Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg
20 25 30

<210> 41

<211> 32

<212> PRT

15 <213> Homo sapiens

<400> 41

20 Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln
1 5 10 15

25 Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg
20 25 30

<210> 42

<211> 32

<212> PRT

30 <213> Homo sapiens

<400> 42

35 Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Glu Ser Thr Ser Thr Ala Tyr Met Glu
1 5 10 15

40 Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg
20 25 30

<210> 43

<211> 32

<212> PRT

45 <213> Homo sapiens

<400> 43

50 Arg Val Thr Met Thr Thr Asp Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr Met Glu
1 5 10 15

55 Leu Arg Ser Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg
20 25 30

<210> 44

60 <211> 32

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 44

65

65

ES 2 672 267 T3

Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Thr Ser Thr Asp Thr Ala Tyr Met Glu
 1 5 10 15
 5 Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Thr
 20 25 30
 <210> 45
 <211> 39
 10 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 45
 15 Tyr Ser Pro Ser Phe Gln Gly His Val Thr Ile Ser Ala Asp Lys Ser
 1 5 10 15
 20 Ile Ser Thr Ala Tyr Leu Gln Trp Ser Ser Leu Lys Ala Ser Asp Thr
 20 25 30
 25 Ala Met Tyr Tyr Cys Ala Arg
 35
 <210> 46
 <211> 39
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 30 <400> 46
 35 Tyr Ala Gln Lys Phe Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Glu Ser
 1 5 10 15
 40 Thr Ser Thr Ala Tyr Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr
 20 25 30
 45 Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg
 35
 <210> 47
 <211> 39
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 50 <400> 47
 55 Tyr Ala Glu Lys Phe Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Thr Ser
 1 5 10 15
 60 Thr Asp Thr Ala Tyr Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr
 20 25 30
 65 Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Thr
 35
 <210> 48
 <211> 23

ES 2 672 267 T3

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

 5 Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys
 20
 <210> 53
 <211> 15
 <212> PRT
 10 <213> Homo sapiens

 <400> 53

 Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr
 15 1 5 10 15

 <210> 54
 <211> 15
 <212> PRT
 20 <213> Homo sapiens

 <400> 54

 Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Gln Leu Leu Ile Tyr
 25 1 5 10 15

 <210> 55
 <211> 15
 <212> PRT
 30 <213> Homo sapiens

 <400> 55

 35 Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro Gln Leu Leu Ile Tyr

 1 5 10 15

 40 <210> 56
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

 45 <400> 56

 Trp Leu Gln Gln Arg Pro Gly Gln Pro Pro Arg Leu Leu Ile Tyr
 1 5 10 15

 50 <210> 57
 <211> 32
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

 55 <400> 57

 Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr
 1 5 10 15

 60 Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Ala Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys
 20 25 30

 65 <210> 58

ES 2 672 267 T3

<211> 32
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

5 <400> 58

Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr
 1 5 10 15

10

Leu Lys Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys
 20 25 30

<210> 59
 <211> 32
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

20 <400> 59

Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ala Gly Thr Asp Phe Thr
 1 5 10 15

25

Leu Lys Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys
 20 25 30

<210> 60
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

35 <400> 60

Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 1 5 10

<210> 61
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

45 <400> 61

Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 1 5 10

<210> 62
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> CDR murina o mutágenos de la misma en marcos del dominio variable de IgG Humana

<400> 62

Gly Tyr Thr Phe Asp Ala His Trp Ile Glu
 1 5 10

<210> 63
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

65

ES 2 672 267 T3

<220>
 <223> CDR murina o mutágenos de la misma en marcos del dominio variable de IgG Humana

5 <400> 63

Gly Tyr Thr Phe Ile Pro Tyr Trp Ile Glu
 1 5 10

10 <210> 64
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

15 <220>
 <223> CDR murina o mutágenos de la misma en marcos del dominio variable de IgG Humana

<400> 64

20 Gly Tyr Thr Phe Leu Pro Tyr Trp Ile Glu
 1 5 10

<210> 65
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

25 <220>
 <223> CDR murina o mutágenos de la misma en marcos del dominio variable de IgG Humana

30 <400> 65

Gly Tyr Thr Phe Arg Pro Tyr Trp Ile Glu
 1 5 10

35 <210> 66
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

40 <220>
 <223> CDR murina o mutágenos de la misma en marcos del dominio variable de IgG Humana

<400> 66

45 Gly Tyr Thr Phe Asn Pro Tyr Trp Ile Glu
 1 5 10

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

50 <220>
 <223> CDR murina o mutágenos de la misma en marcos del dominio variable de IgG Humana

<400> 67

55 Gly Tyr Thr Phe Ser Ser Tyr Trp Ile Glu
 1 5 10

<210> 68
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

65

ES 2 672 267 T3

<220>
 <223> CDR murina o mutágenos de la misma en marcos del dominio variable de IgG Humana

5 <400> 68

Gly Tyr Thr Phe Thr Pro Tyr Trp Ile Glu
 1 5 10

10 <210> 69
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

15 <220>
 <223> CDR murina o mutágenos de la misma en marcos del dominio variable de IgG Humana

<400> 69

20 Gly Tyr Thr Phe Ser Ser His Trp Ile Glu
 1 5 10

<210> 70
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

25 <220>
 <223> CDR murina o mutágenos de la misma en marcos del dominio variable de IgG Humana

30 <400> 70

Gly Tyr Thr Phe Ser Pro Phe Trp Ile Glu
 1 5 10

35 <210> 71
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

40 <220>
 <223> CDR murina o mutágenos de la misma en marcos del dominio variable de IgG Humana

<400> 71

45 Gly Tyr Thr Phe Pro Pro Tyr Trp Ile Glu
 1 5 10

50 <210> 72
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

55 <220>
 <223> CDR murina o mutágenos de la misma en marcos del dominio variable de IgG Humana

<400> 72

60 Gly Tyr Thr Phe Tyr Pro Tyr Trp Ile Glu
 1 5 10

<210> 73
 <211> 10
 <212> PRT

65

ES 2 672 267 T3

<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> CDR murina o mutágenos de la misma en marcos del dominio variable de IgG Humana

5
<400> 73

Gly Tyr Thr Phe Pro Thr Tyr Trp Ile Glu
1 5 10

10
<210> 74
<211> 10
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

15
<220>
<223> CDR murina o mutágenos de la misma en marcos del dominio variable de IgG Humana

20
<400> 74

Gly Tyr Thr Phe Ser Pro His Trp Ile Glu
1 5 10

25
<210> 75
<211> 10
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

30
<220>
<223> CDR murina o mutágenos de la misma en marcos del dominio variable de IgG Humana

35
<400> 75

Gly Tyr Thr Phe Gly Thr Tyr Trp Ile Glu
1 5 10

40
<210> 76
<211> 10
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

45
<220>
<223> CDR murina o mutágenos de la misma en marcos del dominio variable de IgG Humana

50
<400> 76

Gly Tyr Thr Phe Ala Pro Tyr Trp Ile Glu
1 5 10

55
<210> 77
<211> 10
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

60
<220>
<223> CDR murina o mutágenos de la misma en marcos del dominio variable de IgG Humana

65
<400> 77

Gly Tyr Thr Phe Val Thr Tyr Trp Ile Glu
1 5 10

70
<210> 78

ES 2 672 267 T3

<211> 10
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

5 <220>
 <223> CDR murina o mutágenos de la misma en marcos del dominio variable de IgG Humana

<400> 78

10 Gly Tyr Thr Phe Gly Pro Phe Trp Ile Glu
 1 5 10

<210> 79
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

15 <220>
 <223> CDR murina o mutágenos de la misma en marcos del dominio variable de IgG Humana

20 <400> 79

 Gly Tyr Thr Phe Ile Pro His Trp Ile Glu
 1 5 10

25 <210> 80
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

30 <220>
 <223> CDR murina o mutágenos de la misma en marcos del dominio variable de IgG Humana

<400> 80

35 Gly Tyr Thr Phe Gly Pro His Trp Ile Glu
 1 5 10

<210> 81
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

40 <220>
 <223> CDR murina o mutágenos de la misma en marcos del dominio variable de IgG Humana

45 <400> 81

 Gly Phe Thr Phe Ile Thr Tyr Trp Ile Ala
 1 5 10

50

55 <210> 82
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

60 <220>
 <223> CDR murina o mutágenos de la misma en marcos del dominio variable de IgG Humana

<400> 82

65

ES 2 672 267 T3

		Gly	Tyr	Thr	Phe	Gly	Pro	Tyr	Trp	Ile	Glu
		1				5					10

5 <210> 83
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

10 <220>
 <223> CDR murina o mutágenos de la misma en marcos del dominio variable de IgG Humana

15 <220>
 <221> MUTAGENO
 <222> (5)..(5)
 <223> Xaa se selecciona de A, D, G, I, L, N, P, R, S, T, V, y Y

20 <220>
 <221> MUTAGENO
 <222> (6)..(6)
 <223> Xaa se selecciona de A, P, S, y T

25 <220>
 <221> MUTAGENO
 <222> (7)..(7)
 <223> Xaa se selecciona de F, H, y Y

<400> 83

		Gly	Tyr	Thr	Phe	Xaa	Xaa	Xaa	Trp	Ile	Glu
		1				5					10

30 <210> 84
 <211> 10
 <212> PRT
 35 <213> Secuencia Artificial

40 <220>
 <223> CDR murina o mutágenos de la misma en marcos del dominio variable de IgG Humana

<400> 84

		Asp	Ile	Leu	Pro	Gly	Ser	Gly	Phe	Thr	Asp
		1				5					10

45 <210> 85
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

50 <220>
 <223> CDR murina o mutágenos de la misma en marcos del dominio variable de IgG Humana

<400> 85

		Asp	Ile	Ile	Pro	Gly	Thr	Gly	Tyr	Thr	Thr
		1				5					10

55 <210> 86
 <211> 10
 60 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

65 <220>
 <223> CDR murina o mutágenos de la misma en marcos del dominio variable de IgG Humana

ES 2 672 267 T3

<400> 86

5 **Asp Ile Leu Pro Gly Ser Gly Phe Thr Thr**
 1 5 10

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

10

<220>
 <223> CDR murina o mutágenos de la misma en marcos del dominio variable de IgG Humana

<400> 87

15 **Asp Ile Ile Pro Gly Thr Gly Phe Thr Asn**
 1 5 10

<210> 88
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

20

<220>
 <223> CDR murina o mutágenos de la misma en marcos del dominio variable de IgG Humana

25

<400> 88

30 **Asp Ile Leu Pro Gly Ser Gly Tyr Thr Thr**
 1 5 10

<210> 89
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

35

<220>
 <223> CDR murina o mutágenos de la misma en marcos del dominio variable de IgG Humana

40

<400> 89

45 **Asp Ile Leu Pro Gly Thr Gly Tyr Thr Leu**
 1 5 10

<210> 90
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

50

<220>
 <223> CDR murina o mutágenos de la misma en marcos del dominio variable de IgG Humana

<400> 90

55 **Asp Ile Leu Pro Gly Thr Gly Ala Thr His**
 1 5 10

<210> 91
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

60

<220>
 <223> CDR murina o mutágenos de la misma en marcos del dominio variable de IgG Humana

65

ES 2 672 267 T3

<400> 91

5 **Asp Ile Leu Pro Gly Ser Gly Phe Thr His**
 1 5 10

<210> 92
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

10

<220>
 <223> CDR murina o mutágenos de la misma en marcos del dominio variable de IgG Humana

<400> 92

15 **Asp Ile Leu Pro Gly Thr Gly Tyr Thr Trp**
 1 5 10

<210> 93
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

20

<220>
 <223> CDR murina o mutágenos de la misma en marcos del dominio variable de IgG Humana

25

<400> 93

30 **Asp Ile Ile Pro Gly Thr Gly Tyr Thr Asn**
 1 5 10

<210> 94
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

35

<220>
 <223> CDR murina o mutágenos de la misma en marcos del dominio variable de IgG Humana

40

<400> 94

45 **Asp Ile Leu Pro Gly Thr Gly Phe Thr Asn**
 1 5 10

<210> 95
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

50

<220>
 <223> CDR murina o mutágenos de la misma en marcos del dominio variable de IgG Humana

<400> 95

55 **Asp Ile Ile Pro Gly Thr Gly Trp Thr Asn**
 1 5 10

<210> 96
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

60

<220>
 <223> CDR murina o mutágenos de la misma en marcos del dominio variable de IgG Humana

65

ES 2 672 267 T3

<400> 96

5 **Asp Ile Leu Pro Gly Ser Gly Tyr Thr Ile**
 1 5 10

<210> 97
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

10

<220>
 <223> CDR murina o mutágenos de la misma en marcos del dominio variable de IgG Humana

<400> 97

15 **Asp Ile Leu Pro Gly Thr Gly His Thr Thr**
 1 5 10

<210> 98
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

20

<220>
 <223> CDR murina o mutágenos de la misma en marcos del dominio variable de IgG Humana

25

<400> 98

30 **Asp Ile Leu Pro Gly Thr Gly Phe Thr Thr**
 1 5 10

<210> 99
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

35

<220>
 <223> CDR murina o mutágenos de la misma en marcos del dominio variable de IgG Humana

40

<400> 99

45 **Asp Ile Leu Pro Gly Thr Gly Tyr Thr Val**
 1 5 10

<210> 100
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

50

<220>
 <223> CDR murina o mutágenos de la misma en marcos del dominio variable de IgG Humana

<400> 100

55 **Asp Ile Ile Pro Gly Ser Gly Trp Thr Asn**
 1 5 10

<210> 101
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

60

<220>
 <223> CDR murina o mutágenos de la misma en marcos del dominio variable de IgG Humana

65

ES 2 672 267 T3

<400> 101

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

5 <210> 102
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

10 <220>
 <223> CDR murina o mutágenos de la misma en marcos del dominio variable de IgG Humana

<400> 102

15 **Asp Ile Leu Pro Gly Ser Gly Trp Thr Asn**
 1 5 10

20 <210> 103
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

25 <220>
 <223> CDR murina o mutágenos de la misma en marcos del dominio variable de IgG Humana

<400> 103

30 **Asp Ile Leu Pro Gly Ser Gly His Thr Thr**
 1 5 10

<210> 104
 <211> 10
 <212> PRT
 35 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> CDR murina o mutágenos de la misma en marcos del dominio variable de IgG Humana

40 <400> 104

Asp Ile Leu Pro Gly Thr Gly Tyr Thr Asn
 1 5 10

45 <210> 105
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

50 <220>
 <223> CDR murina o mutágenos de la misma en marcos del dominio variable de IgG Humana

<400> 105

55 **Asp Ile Leu Pro Ala Ser Ser Ser Thr Asn**
 1 5 10

<210> 106
 <211> 10
 60 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> CDR murina o mutágenos de la misma en marcos del dominio variable de IgG Humana

65

ES 2 672 267 T3

<400> 106

Asp Ile Leu Pro Gly Ser Gly His Thr Ile
1 5 10

5
 <210> 107
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

10
 <220>
 <223> CDR murina o mutágenos de la misma en marcos del dominio variable de IgG Humana

15
 <220>
 <221> MUTAGENO
 <222> (3)..(3)
 <223> Xaa se selecciona de I y L

20
 <220>
 <221> MUTAGENO
 <222> (6)..(6)
 <223> Xaa se selecciona de S y T

25
 <220>
 <221> MUTAGENO
 <222> (8)..(8)
 <223> Xaa se selecciona de A, F, H, y W

30
 <220>
 <221> MUTAGENO
 <222> (10)..(10)
 <223> Xaa se selecciona de D, H, I, L, y N

35
 <400> 107

Asp Ile Xaa Pro Gly Xaa Gly Xaa Thr Xaa
1 5 10

40
 <210> 108
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

45
 <220>
 <223> CDR murina o mutágenos de la misma en marcos del dominio variable de IgG Humana

<400> 108

Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Trp Phe Val Asn Gln Lys Asn Tyr Leu
1 5 10 15

50
 Thr

55
 <210> 109
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

60
 <220>
 <223> CDR murina o mutágenos de la misma en marcos del dominio variable de IgG Humana

<400> 109

65

ES 2 672 267 T3

Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Tyr Val Tyr Gly Gln Lys Asn Tyr Leu
 1 5 10 15

5 **Thr**

<210> 110
 <211> 17
 <212> PRT
 10 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> CDR murina o mutágenos de la misma en marcos del dominio variable de IgG Humana

15 <400> 110

Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Phe Arg Pro Thr Gln Lys Asn Tyr Leu
 1 5 10 15

20 **Thr**

<210> 111
 <211> 17
 25 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> CDR murina o mutágenos de la misma en marcos del dominio variable de IgG Humana

30 <400> 111

Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Tyr Thr Ser Asn Gln Lys Asn Tyr Leu
 1 5 10 15

35 **Thr**

<210> 112
 <211> 17
 40 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 45 <223> CDR murina o mutágenos de la misma en marcos del dominio variable de IgG Humana

<400> 112

Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Tyr Ser Gly Asn Gln Arg Asn Tyr Leu
 1 5 10 15

50 **Thr**

55 <210> 113
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

60 <220>
 <223> CDR murina o mutágenos de la misma en marcos del dominio variable de IgG Humana

<400> 113

65

ES 2 672 267 T3

Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Pro Ser Trp Asn Gln Ser Asn Tyr Leu
1 5 10 15

5 Thr
 <210> 114
 <211> 17
 <212> PRT
 10 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> CDR murina o mutágenos de la misma en marcos del dominio variable de IgG Humana

15 <400> 114
Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Phe Ser Ala Asn Gln Arg Asn Tyr Leu
1 5 10 15

20 Thr
 <210> 115
 <211> 17
 25 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> CDR murina o mutágenos de la misma en marcos del dominio variable de IgG Humana

30 <400> 115
Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Thr Ser Tyr Asn Gln Arg Asn Tyr Leu
1 5 10 15

35 Thr
 <210> 116
 <211> 17
 40 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 45 <223> CDR murina o mutágenos de la misma en marcos del dominio variable de IgG Humana
 <220>
 <221> MUTAGENO
 <222> (8)..(8)
 50 <223> Xaa se selecciona de F, P, S, T, W, y Y
 <220>
 <221> MUTAGENO
 <222> (9)..(9)
 55 <223> Xaa se selecciona de F, S, T, R, y V
 <220>
 <221> MUTAGENO
 <222> (10)..(10)
 60 <223> Xaa se selecciona de A, G, P, S, W, Y, y V
 <220>
 <221> MUTAGENO
 <222> (11)..(11)
 65 <223> Xaa se selecciona de G, N, y T

<220>
 <221> MUTAGENO
 <222> (13)..(13)
 5 <223> Xaa se selecciona de K, R, y S
 <400> 116

Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Xaa Xaa Xaa Xaa Gln Xaa Asn Tyr Leu
 10 **1 5 10 15**

Thr

15 <210> 117
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

20 <220>
 <223> CDR murina o mutágenos de la misma en marcos del dominio variable de IgG Humana
 <400> 117

25 **His Ala Ser Thr Arg Glu Ser**
1 5

30 <210> 118
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

35 <220>
 <223> CDR murina o mutágenos de la misma en marcos del dominio variable de IgG Humana
 <400> 118

40 **Trp Ala Ser Thr Arg Ser Ser**
1 5

45 <210> 119
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

50 <220>
 <223> CDR murina o mutágenos de la misma en marcos del dominio variable de IgG Humana
 <400> 119

Trp Ala Ser Thr Arg Asp Ser
1 5

55 <210> 120
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

60 <220>
 <223> CDR murina o mutágenos de la misma en marcos del dominio variable de IgG Humana
 <220>
 <221> MUTAGENO
 65 <222> (1)..(1)

ES 2 672 267 T3

<223> Xaa se selecciona de H y W

<220>
 <221> MUTAGENO

5 <222> (6)..(6)
 <223> Xaa se selecciona de D, E, y S

<400> 120

10 Xaa Ala Ser Thr Arg Xaa Ser
 1 5

<210> 121
 <211> 9

15 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> CDR murina o mutágenos de la misma en marcos del dominio variable de IgG Humana

20 <400> 121

Gln Asn Asp Phe Ser Trp Pro Leu Thr
 1 5

25 <210> 122
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

30 <220>
 <223> CDR murina o mutágenos de la misma en marcos del dominio variable de IgG Humana

35 <400> 122

Gln Asn Asp Asp Ser Tyr Pro Leu Thr
 1 5

40 <210> 123
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

45 <220>
 <223> CDR murina o mutágenos de la misma en marcos del dominio variable de IgG Humana

<400> 123

50 Gln Asn Asp Asp Tyr Trp Pro Leu Thr
 1 5

<210> 124
 <211> 9
 <212> PRT

55 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> CDR murina o mutágenos de la misma en marcos del dominio variable de IgG Humana

60 <400> 124

Gln Asn Asp Asp Thr Tyr Pro Met Thr
 1 5

65 <210> 125

ES 2 672 267 T3

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

5 <220>
 <223> CDR murina o mutágenos de la misma en marcos del dominio variable de IgG Humana

<400> 125

10 Gln Asn Asp Phe Thr Tyr Pro Leu Thr
 1 5

<210> 126
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

15 <220>
 <223> CDR murina o mutágenos de la misma en marcos del dominio variable de IgG Humana

20 <400> 126

Gln Asn Asp Asp Thr Tyr Pro Leu Thr
 1 5

25 <210> 127
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

30 <220>
 <223> CDR murina o mutágenos de la misma en marcos del dominio variable de IgG Humana

<400> 127

35 Gln Asn Asp Leu Thr Tyr Pro Leu Thr
 1 5

40 <210> 128
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

45 <220>
 <223> CDR murina o mutágenos de la misma en marcos del dominio variable de IgG Humana

<220>
 <221> MUTAGENO
 <222> (4)..(4)
 <223> Xaa se selecciona de D, F, y L

50 <220>
 <221> MUTAGENO
 <222> (5)..(5)
 <223> Xaa se selecciona de S, T, y Y

55 <220>
 <221> MUTAGENO
 <222> (6)..(6)
 <223> Xaa se selecciona de W y Y

60 <220>
 <221> MUTAGENO
 <222> (8)..(8)
 <223> Xaa se selecciona de L y M

65

ES 2 672 267 T3

<400> 128

5 Gln Asn Asp Xaa Xaa Xaa Pro Xaa Thr
1 5

<210> 129
<211> 109
<212> PRT
10 <213> Secuencia Artificial

<220>
<223> CDR murina o mutágenos de la misma en marcos del dominio variable de IgG Humana

15 <400> 129

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

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

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

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

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

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

45 Ala Arg Ser Gly Tyr Tyr Gly Asn Ser Gly Phe Ala Tyr
100 105

<210> 130
<211> 109
<212> PRT
50 <213> Secuencia Artificial

<220>
<223> CDR murina o mutágenos de la misma en marcos del dominio variable de IgG Humana

55 <400> 130

60

65

ES 2 672 267 T3

	65					70					75				80	
5	Leu	Gln	Trp	Ser	Ser	Leu	Lys	Ala	Ser	Asp	Thr	Ala	Met	Tyr	Tyr	Cys
					85					90					95	
10	Ala	Arg	Ser	Gly	Tyr	Tyr	Gly	Asn	Ser	Gly	Phe	Ala	Tyr			
				100					105							
15	<210>	132														
	<211>	109														
	<212>	PRT														
	<213>	Secuencia Artificial														
	<220>															
	<223>	CDR murina o mutágenos de la misma en marcos del dominio variable de IgG Humana														
20	<400>	132														
	Glu	Val	Gln	Leu	Val	Gln	Ser	Gly	Ala	Glu	Val	Lys	Lys	Pro	Gly	Glu
	1				5					10					15	
25	Ser	Leu	Arg	Ile	Ser	Cys	Lys	Gly	Ser	Gly	Tyr	Thr	Phe	Pro	Thr	Tyr
				20					25					30		
30	Trp	Ile	Glu	Trp	Val	Arg	Gln	Met	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu	Glu	Trp	Met
			35					40					45			
35	Gly	Asp	Ile	Ile	Pro	Gly	Thr	Gly	Trp	Thr	Asn	Tyr	Ser	Pro	Ser	Phe
		50					55					60				
40	Gln	Gly	His	Val	Thr	Ile	Ser	Ala	Asp	Lys	Ser	Ile	Ser	Thr	Ala	Tyr
	65					70					75					80
45	Leu	Gln	Trp	Ser	Ser	Leu	Lys	Ala	Ser	Asp	Thr	Ala	Met	Tyr	Tyr	Cys
					85					90					95	
50	Ala	Arg	Ser	Gly	Tyr	Tyr	Gly	Asn	Ser	Gly	Phe	Ala	Tyr			
				100					105							
55	<210>	133														
	<211>	109														
	<212>	PRT														
	<213>	Secuencia Artificial														
	<220>															
	<223>	CDR murina o mutágenos de la misma en marcos del dominio variable de IgG Humana														
	<400>	133														
60	Glu	Val	Gln	Leu	Val	Gln	Ser	Gly	Ala	Glu	Val	Lys	Lys	Pro	Gly	Glu
	1				5					10					15	
65																

ES 2 672 267 T3

Ser Leu Arg Ile Ser Cys Lys Gly Ser Gly Tyr Thr Phe Ile Pro Tyr
 20 25 30
 5 Trp Ile Glu Trp Val Arg Gln Met Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Met
 35 40 45
 10 Gly Asp Ile Leu Pro Gly Ser Gly Phe Thr Thr Tyr Ser Pro Ser Phe
 50 55 60
 15 Gln Gly His Val Thr Ile Ser Ala Asp Lys Ser Ile Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 20 Leu Gln Trp Ser Ser Leu Lys Ala Ser Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 25 Ala Arg Ser Gly Tyr Tyr Gly Asn Ser Gly Phe Ala Tyr
 100 105
 30 <210> 134
 <211> 109
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 35 <220>
 <223> CDR murina o mutágenos de la misma en marcos del dominio variable de IgG Humana
 40 <400> 134
 Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Glu
 1 5 10 15
 45 Ser Leu Arg Ile Ser Cys Lys Gly Ser Gly Tyr Thr Phe Gly Pro Phe
 20 25 30
 50 Trp Ile Glu Trp Val Arg Gln Met Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Met
 35 40 45
 55 Gly Asp Ile Leu Pro Gly Ser Gly Tyr Thr Asn Tyr Ser Pro Ser Phe
 50 55 60
 60 Gln Gly His Val Thr Ile Ser Ala Asp Lys Ser Ile Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 65 Leu Gln Trp Ser Ser Leu Lys Ala Ser Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Ser Gly Tyr Tyr Gly Asn Ser Gly Phe Ala Tyr
 100 105

ES 2 672 267 T3

<210> 135
 <211> 109
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 5
 <220>
 <223> CDR murina o mutágenos de la misma en marcos del dominio variable de IgG Humana
 <400> 135
 10 Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Glu
 1 5 10 15
 15 Ser Leu Arg Ile Ser Cys Lys Gly Ser Gly Tyr Thr Phe Gly Pro His
 20 25 30
 20 Trp Ile Glu Trp Val Arg Gln Met Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Met
 35 40 45
 25 Gly Asp Ile Leu Pro Gly Thr Gly Tyr Thr Asn Tyr Ser Pro Ser Phe
 50 55 60
 30 Gln Gly His Val Thr Ile Ser Ala Asp Lys Ser Ile Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 35 Leu Gln Trp Ser Ser Leu Lys Ala Ser Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 40 Ala Arg Ser Gly Tyr Tyr Gly Asn Ser Gly Phe Ala Tyr
 100 105
 <210> 136
 <211> 109
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> CDR murina o mutágenos de la misma en marcos del dominio variable de IgG Humana
 <400> 136
 50 Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Glu
 1 5 10 15
 55 Ser Leu Arg Ile Ser Cys Lys Gly Ser Gly Tyr Thr Phe Leu Pro Tyr
 20 25 30
 60 Trp Ile Glu Trp Val Arg Gln Met Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Met
 35 40 45
 65

ES 2 672 267 T3

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

5

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

10

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

15

Ala Arg Ser Gly Tyr Tyr Gly Asn Ser Gly Phe Ala Tyr
 100 105

<210> 137
 <211> 109
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

20

<220>
 <223> CDR murina o mutágenos de la misma en marcos del dominio variable de IgG Humana

25

<400> 137

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

30

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

35

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

40

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

45

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

50

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

55

Ala Arg Ser Gly Tyr Tyr Gly Asn Ser Gly Phe Ala Tyr
 100 105

<210> 138
 <211> 109
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

60

<220>
 <223> CDR murina o mutágenos de la misma en marcos del dominio variable de IgG Humana

65

<400> 138

ES 2 672 267 T3

1 Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Glu
 5 Ser Leu Arg Ile Ser Cys Lys Gly Ser Gly Tyr Thr Phe Ser Pro His
 10 Trp Ile Glu Trp Val Arg Gln Met Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Met
 15 Gly Asp Ile Leu Pro Gly Ser Gly Tyr Thr Ile Tyr Ser Pro Ser Phe
 20 Gln Gly His Val Thr Ile Ser Ala Asp Lys Ser Ile Ser Thr Ala Tyr
 25 Leu Gln Trp Ser Ser Leu Lys Ala Ser Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys
 30 Ala Arg Ser Gly Tyr Tyr Gly Asn Ser Gly Phe Ala Tyr
 <210> 139
 <211> 109
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> CDR murina o mutágenos de la misma en marcos del dominio variable de IgG Humana
 <400> 139
 40 Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Glu
 45 Ser Leu Arg Ile Ser Cys Lys Gly Ser Gly Tyr Thr Phe Ala Pro Tyr
 50 Trp Ile Glu Trp Val Arg Gln Met Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Met
 55 Gly Asp Ile Leu Pro Gly Thr Gly Phe Thr Thr Tyr Ser Pro Ser Phe
 60 Gln Gly His Val Thr Ile Ser Ala Asp Lys Ser Ile Ser Thr Ala Tyr
 65 Leu Gln Trp Ser Ser Leu Lys Ala Ser Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys
 70 Ala Arg Ser Gly Tyr Tyr Gly Asn Ser Gly Phe Ala Tyr
 75
 80
 85
 90
 95
 100
 105

ES 2 672 267 T3

<210> 140
 <211> 109
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

5

<220>
 <223> CDR murina o mutágenos de la misma en marcos del dominio variable de IgG Humana

<400> 140

10

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

15

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

20

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

25

Gly Asp Ile Leu Pro Gly Thr Gly Tyr Thr Val Tyr Ser Pro Ser Phe
 50 55 60

30

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

35

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

40

Ala Arg Ser Gly Tyr Tyr Gly Asn Ser Gly Phe Ala Tyr
 100 105

40

<210> 141
 <211> 109
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

45

<220>
 <223> CDR murina o mutágenos de la misma en marcos del dominio variable de IgG Humana

<400> 141

50

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

55

Ser Leu Arg Ile Ser Cys Lys Gly Ser Gly Tyr Thr Phe Tyr Pro Tyr

60

65

ES 2 672 267 T3

				20					25					30			
5	Trp	Ile	Glu	Trp	Val	Arg	Gln	Met	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu	Glu	Trp	Met	
			35					40					45				
10	Gly	Asp	Ile	Leu	Pro	Gly	Thr	Gly	Phe	Thr	Asn	Tyr	Ser	Pro	Ser	Phe	
		50					55					60					
15	Gln	Gly	His	Val	Thr	Ile	Ser	Ala	Asp	Lys	Ser	Ile	Ser	Thr	Ala	Tyr	
	65					70					75					80	
20	Leu	Gln	Trp	Ser	Ser	Leu	Lys	Ala	Ser	Asp	Thr	Ala	Met	Tyr	Tyr	Cys	
					85					90					95		
25	Ala	Arg	Ser	Gly	Tyr	Tyr	Gly	Asn	Ser	Gly	Phe	Ala	Tyr				
				100					105								
	<210> 142																
	<211> 109																
	<212> PRT																
	<213> Secuencia Artificial																
	<220>																
30	<223> CDR murina o mutágenos de la misma en marcos del dominio variable de IgG Humana																
	<400> 142																
35	Glu	Val	Gln	Leu	Val	Gln	Ser	Gly	Ala	Glu	Val	Lys	Lys	Pro	Gly	Glu	
	1				5					10					15		
40	Ser	Leu	Arg	Ile	Ser	Cys	Lys	Gly	Ser	Gly	Tyr	Thr	Phe	Thr	Pro	Tyr	
				20					25					30			
45	Trp	Ile	Glu	Trp	Val	Arg	Gln	Met	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu	Glu	Trp	Met	
			35					40					45				
50	Gly	Asp	Ile	Leu	Pro	Gly	Ser	Gly	His	Thr	Thr	Tyr	Ser	Pro	Ser	Phe	
		50					55					60					
55	Gln	Gly	His	Val	Thr	Ile	Ser	Ala	Asp	Lys	Ser	Ile	Ser	Thr	Ala	Tyr	
	65					70					75					80	
60	Leu	Gln	Trp	Ser	Ser	Leu	Lys	Ala	Ser	Asp	Thr	Ala	Met	Tyr	Tyr	Cys	
					85					90					95		
65	Ala	Arg	Ser	Gly	Tyr	Tyr	Gly	Asn	Ser	Gly	Phe	Ala	Tyr				
				100					105								
	<210> 143																
	<211> 109																
	<212> PRT																

ES 2 672 267 T3

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> CDR murina o mutágenos de la misma en marcos del dominio variable de IgG Humana

5

<400> 143

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

35

<210> 144

<211> 109

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

40

<220>

<223> CDR murina o mutágenos de la misma en marcos del dominio variable de IgG Humana

<400> 144

45

50

55

60

65

ES 2 672 267 T3

1 Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Glu
 5 Ser Leu Arg Ile Ser Cys Lys Gly Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Pro Tyr
 10 Trp Ile Glu Trp Val Arg Gln Met Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Met
 15 Gly Asp Ile Leu Pro Gly Thr Gly Tyr Thr Val Tyr Ser Pro Ser Phe
 20 Gln Gly His Val Thr Ile Ser Ala Asp Lys Ser Ile Ser Thr Ala Tyr
 25 Leu Gln Trp Ser Ser Leu Lys Ala Ser Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys
 30 Ala Arg Ser Gly Tyr Tyr Gly Asn Ser Gly Phe Ala Tyr
 <210> 145
 <211> 109
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> CDR murina o mutágenos de la misma en marcos del dominio variable de IgG Humana
 <400> 145
 40 Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Glu
 45 Ser Leu Arg Ile Ser Cys Lys Gly Ser Gly Tyr Thr Phe Gly Pro Tyr
 50 Trp Ile Glu Trp Val Arg Gln Met Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Met
 55 Gly Asp Ile Leu Pro Gly Thr Gly Tyr Thr Leu Tyr Ser Pro Ser Phe
 60 Gln Gly His Val Thr Ile Ser Ala Asp Lys Ser Ile Ser Thr Ala Tyr
 65 Leu Gln Trp Ser Ser Leu Lys Ala Ser Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys
 Ala Arg Ser Gly Tyr Tyr Gly Asn Ser Gly Phe Ala Tyr
 100 105

ES 2 672 267 T3

<210> 146
 <211> 109
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 5
 <220>
 <223> CDR murina o mutágenos de la misma en marcos del dominio variable de IgG Humana
 <400> 146
 10 Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Glu
 1 5 10 15
 15 Ser Leu Arg Ile Ser Cys Lys Gly Ser Gly Tyr Thr Phe Gly Pro Tyr
 20 25 30
 20 Trp Ile Glu Trp Val Arg Gln Met Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Met
 35 40 45
 25 Gly Asp Ile Leu Pro Gly Thr Gly Tyr Thr Val Tyr Ser Pro Ser Phe
 50 55 60
 30 Gln Gly His Val Thr Ile Ser Ala Asp Lys Ser Ile Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 35 Leu Gln Trp Ser Ser Leu Lys Ala Ser Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 40 Ala Arg Ser Gly Tyr Tyr Gly Asn Ser Gly Phe Ala Tyr
 100 105
 40 <210> 147
 <211> 109
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 45 <220>
 <223> CDR murina o mutágenos de la misma en marcos del dominio variable de IgG Humana
 <400> 147
 50
 55
 60
 65

ES 2 672 267 T3

1 Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Glu
 5 Ser Leu Arg Ile Ser Cys Lys Gly Ser Gly Tyr Thr Phe Asp Ala His
 10 Trp Ile Glu Trp Val Arg Gln Met Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Met
 15 Gly Asp Ile Leu Pro Gly Ser Gly Phe Thr Asp Tyr Ser Pro Ser Phe
 20 Gln Gly His Val Thr Ile Ser Ala Asp Lys Ser Ile Ser Thr Ala Tyr
 25 Leu Gln Trp Ser Ser Leu Lys Ala Ser Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys
 Ala Arg Ser Gly Tyr Tyr Gly Asn Ser Gly Phe Ala Tyr
 30 <210> 148
 <211> 109
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 35 <220>
 <223> CDR murina o mutágenos de la misma en marcos del dominio variable de IgG Humana
 <400> 148
 40
 45
 50
 55
 60
 65

ES 2 672 267 T3

	Glu	Val	Gln	Leu	Val	Gln	Ser	Gly	Ala	Glu	Val	Lys	Lys	Pro	Gly	Glu
	1				5					10					15	
5	Ser	Leu	Arg	Ile	Ser	Cys	Lys	Gly	Ser	Gly	Tyr	Thr	Phe	Ala	Pro	Tyr
				20					25					30		
10	Trp	Ile	Glu	Trp	Val	Arg	Gln	Met	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu	Glu	Trp	Met
			35					40					45			
15	Gly	Asp	Ile	Leu	Pro	Gly	Thr	Gly	Tyr	Thr	Trp	Tyr	Ser	Pro	Ser	Phe
		50					55					60				
20	Gln	Gly	His	Val	Thr	Ile	Ser	Ala	Asp	Lys	Ser	Ile	Ser	Thr	Ala	Tyr
	65					70					75					80
25	Leu	Gln	Trp	Ser	Ser	Leu	Lys	Ala	Ser	Asp	Thr	Ala	Met	Tyr	Tyr	Cys
					85					90					95	
30	Ala	Arg	Ser	Gly	Tyr	Tyr	Gly	Asn	Ser	Gly	Phe	Ala	Tyr			
				100					105							
30	<210>	149														
	<211>	109														
	<212>	PRT														
	<213>	Secuencia Artificial														
35	<220>															
	<223>	CDR murina o mutágenos de la misma en marcos del dominio variable de IgG Humana														
40	<400>	149														
40	Glu	Val	Gln	Leu	Val	Gln	Ser	Gly	Ala	Glu	Val	Lys	Lys	Pro	Gly	Glu
	1				5					10					15	
45	Ser	Leu	Arg	Ile	Ser	Cys	Lys	Gly	Ser	Gly	Tyr	Thr	Phe	Gly	Thr	Tyr
				20					25					30		
50	Trp	Ile	Glu	Trp	Val	Arg	Gln	Met	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu	Glu	Trp	Met
			35					40					45			
55	Gly	Asp	Ile	Leu	Pro	Gly	Thr	Gly	His	Thr	Thr	Tyr	Ser	Pro	Ser	Phe
		50					55					60				
60	Gln	Gly	His	Val	Thr	Ile	Ser	Ala	Asp	Lys	Ser	Ile	Ser	Thr	Ala	Tyr
	65					70					75					80
65	Leu	Gln	Trp	Ser	Ser	Leu	Lys	Ala	Ser	Asp	Thr	Ala	Met	Tyr	Tyr	Cys
					85					90					95	
70	Ala	Arg	Ser	Gly	Tyr	Tyr	Gly	Asn	Ser	Gly	Phe	Ala	Tyr			
				100					105							

ES 2 672 267 T3

<210> 150
 <211> 109
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 5
 <220>
 <223> CDR murina o mutágenos de la misma en marcos del dominio variable de IgG Humana
 <400> 150
 10 Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Glu
 1 5 10 15
 15 Ser Leu Arg Ile Ser Cys Lys Gly Ser Gly Tyr Thr Phe Ile Pro His
 20 25 30
 20 Trp Ile Glu Trp Val Arg Gln Met Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Met
 35 40 45
 25 Gly Asp Ile Leu Pro Gly Ser Gly Trp Thr Asn Tyr Ser Pro Ser Phe
 50 55 60
 30 Gln Gly His Val Thr Ile Ser Ala Asp Lys Ser Ile Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 35 Leu Gln Trp Ser Ser Leu Lys Ala Ser Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 40 Ala Arg Ser Gly Tyr Tyr Gly Asn Ser Gly Phe Ala Tyr
 100 105
 40 <210> 151
 <211> 109
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 45 <220>
 <223> CDR murina o mutágenos de la misma en marcos del dominio variable de IgG Humana
 <400> 151
 50
 55
 60
 65

ES 2 672 267 T3

1 Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Glu
 5 Ser Leu Arg Ile Ser Cys Lys Gly Ser Gly Phe Thr Phe Ile Thr Tyr
 10 Trp Ile Ala Trp Val Arg Gln Met Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Met
 15 Gly Asp Ile Leu Pro Ala Ser Ser Ser Thr Asn Tyr Ser Pro Ser Phe
 20 Gln Gly His Val Thr Ile Ser Ala Asp Lys Ser Ile Ser Thr Ala Tyr
 25 Leu Gln Trp Ser Ser Leu Lys Ala Ser Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys
 30 Ala Arg Ser Gly Tyr Tyr Gly Asn Ser Gly Phe Ala Tyr
 35 <210> 152
 <211> 109
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 40 <220>
 <223> CDR murina o mutágenos de la misma en marcos del dominio variable de IgG Humana
 45 <400> 152
 50 Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Glu
 55 Ser Leu Arg Ile Ser Cys Lys Gly Ser Gly Tyr Thr Phe Gly Pro Tyr
 60 Trp Ile Glu Trp Val Arg Gln Met Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Met
 65 Gly Asp Ile Leu Pro Gly Ser Gly His Thr Ile Tyr Ser Pro Ser Phe
 70 Gln Gly His Val Thr Ile Ser Ala Asp Lys Ser Ile Ser Thr Ala Tyr

ES 2 672 267 T3

	65					70						75				80
5	Leu	Gln	Trp	Ser	Ser	Leu	Lys	Ala	Ser	Asp	Thr	Ala	Met	Tyr	Tyr	Cys
					85					90					95	
10	Ala	Arg	Ser	Gly	Tyr	Tyr	Gly	Asn	Ser	Gly	Phe	Ala	Tyr			
				100					105							
15	<210> 153															
	<211> 109															
	<212> PRT															
	<213> Secuencia Artificial															
	<220>															
	<223> CDR murina o mutágenos de la misma en marcos del dominio variable de IgG Humana															
20	<400> 153															
	Glu	Val	Gln	Leu	Val	Gln	Ser	Gly	Ala	Glu	Val	Lys	Lys	Pro	Gly	Glu
	1				5					10					15	
25	Ser	Leu	Arg	Ile	Ser	Cys	Lys	Gly	Ser	Gly	Tyr	Thr	Phe	Ala	Pro	Tyr
				20					25					30		
30	Trp	Ile	Glu	Trp	Val	Arg	Gln	Met	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu	Glu	Trp	Met
			35					40					45			
35	Gly	Asp	Ile	Ile	Pro	Gly	Thr	Gly	Tyr	Thr	Thr	Tyr	Ser	Pro	Ser	Phe
		50					55					60				
40	Gln	Gly	His	Val	Thr	Ile	Ser	Ala	Asp	Lys	Ser	Ile	Ser	Thr	Ala	Tyr
	65					70					75					80
45	Leu	Gln	Trp	Ser	Ser	Leu	Lys	Ala	Ser	Asp	Thr	Ala	Met	Tyr	Tyr	Cys
					85					90					95	
50	Ala	Arg	Ser	Gly	Tyr	Tyr	Gly	Asn	Ser	Gly	Phe	Ala	Tyr			
				100					105							
55	<210> 154															
	<211> 109															
	<212> PRT															
	<213> Secuencia Artificial															
	<220>															
	<223> CDR murina o mutágenos de la misma en marcos del dominio variable de IgG Humana															
60	<400> 154															
	Glu	Val	Gln	Leu	Val	Gln	Ser	Gly	Ala	Glu	Val	Lys	Lys	Pro	Gly	Glu
	1				5					10					15	
65																

ES 2 672 267 T3

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

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

10 Gly Asp Ile Leu Pro Gly Ser Gly Tyr Thr Thr Tyr Ser Pro Ser Phe
 50 55 60

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

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

25 Ala Arg Ser Gly Tyr Tyr Gly Asn Ser Gly Phe Ala Tyr
 100 105

30 <210> 155
 <211> 109
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

35 <220>
 <223> CDR murina o mutágenos de la misma en marcos del dominio variable de IgG Humana

40 <400> 155

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

45 Ser Leu Arg Ile Ser Cys Lys Gly Ser Gly Tyr Thr Phe Asn Pro Tyr
 20 25 30

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

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

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

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

Ala Arg Ser Gly Tyr Tyr Gly Asn Ser Gly Phe Ala Tyr
 100 105

65 <210> 156

ES 2 672 267 T3

<211> 109
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

5 <220>
 <223> CDR murina o mutágenos de la misma en marcos del dominio variable de IgG Humana

<400> 156

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

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

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

25 Gly Asp Ile Leu Pro Gly Ser Gly Phe Thr His Tyr Ser Pro Ser Phe
 50 55 60

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

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

40 Ala Arg Ser Gly Tyr Tyr Gly Asn Ser Gly Phe Ala Tyr
 100 105

<210> 157
 <211> 103
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

45 <220>
 <223> CDR murina o mutágenos de la misma en marcos del dominio variable de IgG Humana

<400> 157

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

55 Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Trp Phe
 20 25 30

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

65

ES 2 672 267 T3

Ser Pro Gln Leu Leu Ile Tyr His Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val
 50 55 60

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

10
 Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Gln Asn
 85 90 95

15
 Asp Asp Ser Tyr Pro Leu Thr
 100

<210> 158
 <211> 103
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> CDR murina o mutágenos de la misma en marcos del dominio variable de IgG Humana

25
 <400> 158

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

30
 Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Tyr Ser
 20 25 30

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

40
 Ser Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Ser Ser Gly Val
 50 55 60

45
 Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys
 65 70 75 80

50
 Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Gln Asn
 85 90 95

55
 Asp Asp Thr Tyr Pro Met Thr
 100

<210> 159
 <211> 103
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

60
 <220>
 <223> CDR murina o mutágenos de la misma en marcos del dominio variable de IgG Humana

65
 <400> 159

ES 2 672 267 T3

1 Asp Ile Val Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Pro Gly
 5 5 10 15
 5 Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Pro Ser
 20 25 30
 10 Trp Asn Gln Ser Asn Tyr Leu Thr Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln
 35 40 45
 15 Ser Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val
 50 55 60
 20 Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys
 65 70 75 80
 25 Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Gln Asn
 85 90 95
 30 Asp Phe Thr Tyr Pro Leu Thr
 100
 30 <210> 160
 <211> 103
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 35 <220>
 <223> CDR murina o mutágenos de la misma en marcos del dominio variable de IgG Humana
 40 <400> 160
 40 Asp Ile Val Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Pro Gly
 1 5 10 15
 45 Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Phe Ser
 20 25 30
 50 Ala Asn Gln Arg Asn Tyr Leu Thr Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln
 35 40 45
 55 Ser Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Asp Ser Gly Val
 50 55 60
 60 Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys
 65 70 75 80
 65 Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Gln Asn
 85 90 95
 70 Asp Asp Thr Tyr Pro Leu Thr
 100

ES 2 672 267 T3

<210> 161
 <211> 103
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

5

<220>
 <223> CDR murina o mutágenos de la misma en marcos del dominio variable de IgG Humana

<400> 161

10

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

15

Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Thr Ser
 20 25 30

20

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

25

Ser Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val
 50 55 60

30

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

35

Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Gln Asn
 85 90 95

Asp Leu Thr Tyr Pro Leu Thr
 100

40

<210> 162
 <211> 103
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

45

<220>
 <223> CDR murina o mutágenos de la misma en marcos del dominio variable de IgG Humana

<400> 162

50

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

Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Tyr Val

55

60

65

ES 2 672 267 T3

				20					25					30			
5	Tyr	Gly	Gln	Lys	Asn	Tyr	Leu	Thr	Trp	Tyr	Leu	Gln	Lys	Pro	Gly	Gln	
			35					40					45				
10	Ser	Pro	Gln	Leu	Leu	Ile	Tyr	Trp	Ala	Ser	Thr	Arg	Glu	Ser	Gly	Val	
		50					55					60					
15	Pro	Asp	Arg	Phe	Ser	Gly	Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Asp	Phe	Thr	Leu	Lys	
	65					70					75					80	
20	Ile	Ser	Arg	Val	Glu	Ala	Glu	Asp	Val	Gly	Val	Tyr	Tyr	Cys	Gln	Asn	
					85					90					95		
25	Asp	Phe	Ser	Trp	Pro	Leu	Thr										
				100													
	<210> 163																
	<211> 103																
	<212> PRT																
	<213> Secuencia Artificial																
	<220>																
30	<223> CDR murina o mutágenos de la misma en marcos del dominio variable de IgG Humana																
	<400> 163																
35	Asp	Ile	Val	Met	Thr	Gln	Thr	Pro	Leu	Ser	Leu	Pro	Val	Thr	Pro	Gly	
	1				5					10					15		
40	Glu	Pro	Ala	Ser	Ile	Ser	Cys	Lys	Ser	Ser	Gln	Ser	Leu	Leu	Phe	Arg	
				20					25					30			
45	Pro	Thr	Gln	Lys	Asn	Tyr	Leu	Thr	Trp	Tyr	Leu	Gln	Lys	Pro	Gly	Gln	
			35					40					45				
50	Ser	Pro	Gln	Leu	Leu	Ile	Tyr	Trp	Ala	Ser	Thr	Arg	Glu	Ser	Gly	Val	
		50					55					60					
55	Pro	Asp	Arg	Phe	Ser	Gly	Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Asp	Phe	Thr	Leu	Lys	
	65					70					75					80	
60	Ile	Ser	Arg	Val	Glu	Ala	Glu	Asp	Val	Gly	Val	Tyr	Tyr	Cys	Gln	Asn	
					85					90					95		
	Asp	Asp	Ser	Tyr	Pro	Leu	Thr										
				100													
	<210> 164																
	<211> 103																
65	<212> PRT																

ES 2 672 267 T3

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> CDR murina o mutágenos de la misma en marcos del dominio variable de IgG Humana

5

<400> 164

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

35

<210> 165

<211> 220

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

40

<220>

<223> CDR murina o mutágenos de la misma en marcos del dominio variable de IgG Humana

<400> 165

45

50

55

60

65

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

ES 2 672 267 T3

Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys
 65 70 75 80
 5 Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Gln Asn
 85 90 95
 10 Asp Tyr Thr Tyr Pro Leu Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile
 100 105 110
 15 Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp
 115 120 125
 20 Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn
 130 135 140
 25 Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu
 145 150 155 160
 30 Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp
 165 170 175
 35 Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr
 180 185 190
 40 Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser
 195 200 205
 45 Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 210 215 220
 <210> 166
 <211> 450
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> CDR murina o mutágenos de la misma en marcos del dominio variable de IgG Humana
 50 <400> 166
 Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Glu
 1 5 10 15
 55 Ser Leu Arg Ile Ser Cys Lys Gly Ser Gly Tyr Thr Phe Ala Pro Tyr
 20 25 30
 60 Trp Ile Glu Trp Val Arg Gln Met Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Met
 35 40 45
 65

ES 2 672 267 T3

	Gly	Asp	Ile	Leu	Pro	Gly	Thr	Gly	Phe	Thr	Thr	Tyr	Ser	Pro	Ser	Phe
	50						55					60				
5	Gln	Gly	His	Val	Thr	Ile	Ser	Ala	Asp	Lys	Ser	Ile	Ser	Thr	Ala	Tyr
	65					70					75					80
10	Leu	Gln	Trp	Ser	Ser	Leu	Lys	Ala	Ser	Asp	Thr	Ala	Met	Tyr	Tyr	Cys
					85					90					95	
15	Ala	Arg	Ser	Gly	Tyr	Tyr	Gly	Asn	Ser	Gly	Phe	Ala	Tyr	Trp	Gly	Gln
				100					105					110		
20	Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Ala	Ser	Thr	Lys	Gly	Pro	Ser	Val
			115					120					125			
25	Phe	Pro	Leu	Ala	Pro	Ser	Ser	Lys	Ser	Thr	Ser	Gly	Gly	Thr	Ala	Ala
	130						135					140				
30	Leu	Gly	Cys	Leu	Val	Lys	Asp	Tyr	Phe	Pro	Glu	Pro	Val	Thr	Val	Ser
	145					150					155					160
35	Trp	Asn	Ser	Gly	Ala	Leu	Thr	Ser	Gly	Val	His	Thr	Phe	Pro	Ala	Val
					165					170					175	
40	Leu	Gln	Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Val	Val	Thr	Val	Pro
				180					185					190		
45	Ser	Ser	Ser	Leu	Gly	Thr	Gln	Thr	Tyr	Ile	Cys	Asn	Val	Asn	His	Lys
			195					200					205			
50	Pro	Ser	Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys	Lys	Val	Glu	Pro	Lys	Ser	Cys	Asp
	210						215					220				
55	Lys	Thr	His	Thr	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu	Leu	Leu	Gly	Gly
	225					230					235					240
60	Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile
				245						250					255	
65	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	His	Glu
				260					265					270		
70	Asp	Pro	Glu	Val	Lys	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	His
		275						280					285			
75	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Tyr	Asn	Ser	Thr	Tyr	Arg

ES 2 672 267 T3

	290		295		300														
5	Val 305	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu	His	Gln	Asp 315	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys 320			
10	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys 325	Val	Ser	Asn	Lys	Ala 330	Leu	Pro	Ala	Pro	Ile	Glu 335			
15	Lys	Thr	Ile	Ser 340	Lys	Ala	Lys	Gly	Gln 345	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln 350	Val	Tyr			
20	Thr	Leu	Pro	Pro 355	Ser	Arg	Asp	Glu	Leu	Thr	Lys	Asn	Gln 365	Val	Ser	Leu			
25	Thr	Cys 370	Leu	Val	Lys	Gly	Phe 375	Tyr	Pro	Ser	Asp	Ile 380	Ala	Val	Glu	Trp			
30	Glu 385	Ser	Asn	Gly	Gln	Pro 390	Glu	Asn	Asn	Tyr	Lys 395	Thr	Thr	Pro	Pro	Val 400			
35	Leu	Asp	Ser	Asp	Gly 405	Ser	Phe	Phe	Leu	Tyr	Ser 410	Lys	Leu	Thr	Val 415	Asp			
40	Lys	Ser	Arg	Trp 420	Gln	Gln	Gly	Asn	Val 425	Phe	Ser	Cys	Ser	Val 430	Met	His			
45	Glu	Ala	Leu	His 435	Asn	His	Tyr	Thr	Gln 440	Lys	Ser	Leu	Ser 445	Leu	Ser	Pro			
50	Gly	Lys																	
55																			
60																			
65																			

<210> 167
 <211> 450
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> CDR murina o mutágenos de la misma en marcos del dominio variable de IgG Humana

<400> 167

55	Glu 1	Val	Gln	Leu	Val 5	Gln	Ser	Gly	Ala	Glu 10	Val	Lys	Lys	Pro	Gly 15	Glu			
60	Ser	Leu	Arg	Ile 20	Ser	Cys	Lys	Gly	Ser 25	Gly	Tyr	Thr	Phe	Ala 30	Pro	Tyr			
65	Trp	Ile	Glu	Trp	Val	Arg	Gln	Met	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu	Glu	Trp	Met			

ES 2 672 267 T3

				35					40					45			
5	Gly	Asp	Ile	Leu	Pro	Gly	Thr	Gly	Phe	Thr	Thr	Tyr	Ser	Pro	Ser	Phe	
	50						55					60					
10	Gln	Gly	His	Val	Thr	Ile	Ser	Ala	Asp	Lys	Ser	Ile	Ser	Thr	Ala	Tyr	
	65					70					75					80	
15	Leu	Gln	Trp	Ser	Ser	Leu	Lys	Ala	Ser	Asp	Thr	Ala	Met	Tyr	Tyr	Cys	
				85						90					95		
20	Ala	Arg	Ser	Gly	Tyr	Tyr	Gly	Asn	Ser	Gly	Phe	Ala	Tyr	Trp	Gly	Gln	
				100					105					110			
25	Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Ala	Ser	Thr	Lys	Gly	Pro	Ser	Val	
			115						120				125				
30	Phe	Pro	Leu	Ala	Pro	Ser	Ser	Lys	Ser	Thr	Ser	Gly	Gly	Thr	Ala	Ala	
		130						135				140					
35	Leu	Gly	Cys	Leu	Val	Lys	Asp	Tyr	Phe	Pro	Glu	Pro	Val	Thr	Val	Ser	
	145					150					155					160	
40	Trp	Asn	Ser	Gly	Ala	Leu	Thr	Ser	Gly	Val	His	Thr	Phe	Pro	Ala	Val	
				165						170					175		
45	Leu	Gln	Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Val	Val	Thr	Val	Pro	
				180					185					190			
50	Ser	Ser	Ser	Leu	Gly	Thr	Gln	Thr	Tyr	Ile	Cys	Asn	Val	Asn	His	Lys	
				195				200					205				
55	Pro	Ser	Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys	Lys	Val	Glu	Pro	Lys	Ser	Cys	Asp	
		210					215					220					
60	Lys	Thr	His	Thr	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu	Leu	Leu	Gly	Gly	
	225					230					235				240		
65	Pro	Asp	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile	
				245						250					255		
70	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	His	Glu	
				260					265					270			
75	Asp	Pro	Glu	Val	Lys	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	His	
		275						280					285				

ES 2 672 267 T3

	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Tyr	Asn	Ser	Thr	Tyr	Arg
	290						295					300				
5	Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu	His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys
	305					310					315					320
10	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Ala	Leu	Pro	Ala	Pro	Glu	Glu
					325					330					335	
15	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val	Tyr
				340					345					350		
20	Thr	Leu	Pro	Pro	Ser	Arg	Asp	Glu	Leu	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser	Leu
			355					360					365			
25	Thr	Cys	Leu	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	Val	Glu	Trp
	370						375					380				
30	Glu	Ser	Asn	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn	Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro	Pro	Val
	385					390					395					400
35	Leu	Asp	Ser	Asp	Gly	Ser	Phe	Phe	Leu	Tyr	Ser	Lys	Leu	Thr	Val	Asp
					405					410					415	
40	Lys	Ser	Arg	Trp	Gln	Gln	Gly	Asn	Val	Phe	Ser	Cys	Ser	Val	Met	His
				420					425					430		
45	Glu	Ala	Leu	His	Asn	His	Tyr	Thr	Gln	Lys	Ser	Leu	Ser	Leu	Ser	Pro
			435					440						445		
50	Gly	Lys														
	450															
55																
60																
65																

Reivindicaciones

- 5 **1.** Un anticuerpo aislado que se une al factor tisular humano en donde el anticuerpo comprende una región variable de la cadena pesada de la SEQ ID NO: 139 y una región variable de la cadena ligera de la SEQ ID NO: 23.
- 2.** El anticuerpo de la reivindicación 1, que comprende una cadena ligera del anticuerpo de la SEQ ID NO: 165 y una cadena pesada del anticuerpo seleccionada de la SEQ ID NO: 166 y la SEQ ID NO: 167.
- 10 **3.** Un anticuerpo de acuerdo con cualquier reivindicación anterior para su uso en un método para tratar un sujeto humano que padece de una afección en la que la expresión de TF y la bioactividad local resultante de la expresión de TF está relacionada directa o indirectamente con la afección a ser tratada, en donde:
- 15 (i) la afección es cáncer, opcionalmente en donde el cáncer se selecciona de tumores sólidos primarios, metástasis; carcinomas, adenocarcinomas, melanomas, tumores líquidos, linfomas, leucemias, mielomas, cánceres de tejidos blandos, sarcomas, osteosarcoma, timoma, linfosarcoma, fibrosarcoma, leiomiomas, lipomas, glioblastoma, astrosarcoma, cáncer de próstata, mama, ovario, estómago, páncreas, laringe, esófago, testículos, hígado, parótida, tracto biliar, colon, recto, cuello uterino, útero, endometrio, tiroides, pulmón, riñón o vejiga;
- 20 (ii) la afección se selecciona de tumores benignos, hemangiomas, neuromas acústicos, neurofibromas, tracomas y granulomas piógenos; placas arterosclericas; enfermedades angiogénicas oculares, retinopatía diabética, retinopatía del precocidad, degeneración macular, rechazo de injerto corneal, glaucoma neovascular, fibroplasia retrolental, rubeosis, retinoblastoma, uveítis y Pterygia (crecimiento de vasos sanguíneos anormal) del ojo; artritis reumatoide; psoriasis; curación de heridas retardada; endometriosis; vasculogénesis; granulaciones; cicatrices hipertróficas (queloides); fracturas sin unión; esclerodermia;
- 25 tracoma; adherencias vasculares; angiogénesis miocárdica; colaterales coronarios; colaterales cerebrales; malformaciones arteriovenosas; angiogénesis de la extremidad isquémica; Síndrome de Osler-Webber; neovascularización de placas; telangiectasia; articulaciones hemofílicas; angiofibroma; displasia fibromuscular; granulación de heridas; enfermedad de Crohn; y aterosclerosis.
- 30 **4.** Una composición farmacéutica útil para tratar a un sujeto que comprende un anticuerpo de la reivindicación 1 o la reivindicación 2 en una preparación farmacéuticamente aceptable.
- 5.** Un kit que comprende un anticuerpo de acuerdo con cualquiera de la reivindicación 1 o la reivindicación 2 en una forma estable e instrucciones de uso.
- 35 **6.** Un ácido nucleico aislado que codifica los dominios de unión a anticuerpo de un anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 1 o la reivindicación 2.
- 7.** Un vector que comprende por lo menos un polinucleótido de la reivindicación 6.
- 40 **8.** Una célula huésped que comprende el vector de la reivindicación 7.
- 9.** El anticuerpo aislado de la reivindicación 1, o fragmento de unión al antígeno del mismo que tiene un isotipo de IgG1 o IgG4, opcionalmente en donde la región Fc comprende el isotipo IgG1 humano donde las posiciones de Kabat 239 y 332 (que son las 242 y 335 de la SEQ ID NO: 167) se modifican a partir de los residuos S y D de tipo salvaje, a las mutaciones D y E en la región de Fc.
- 45
- 50
- 55
- 60
- 65

Fig. 1

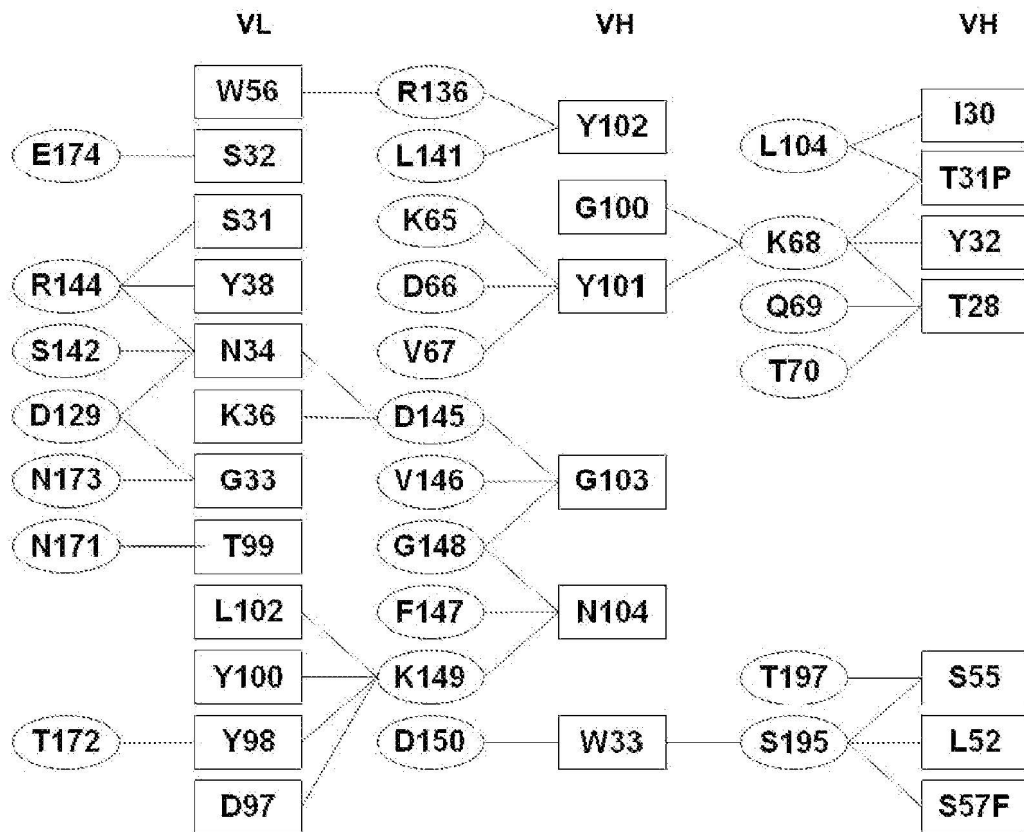


Fig. 2

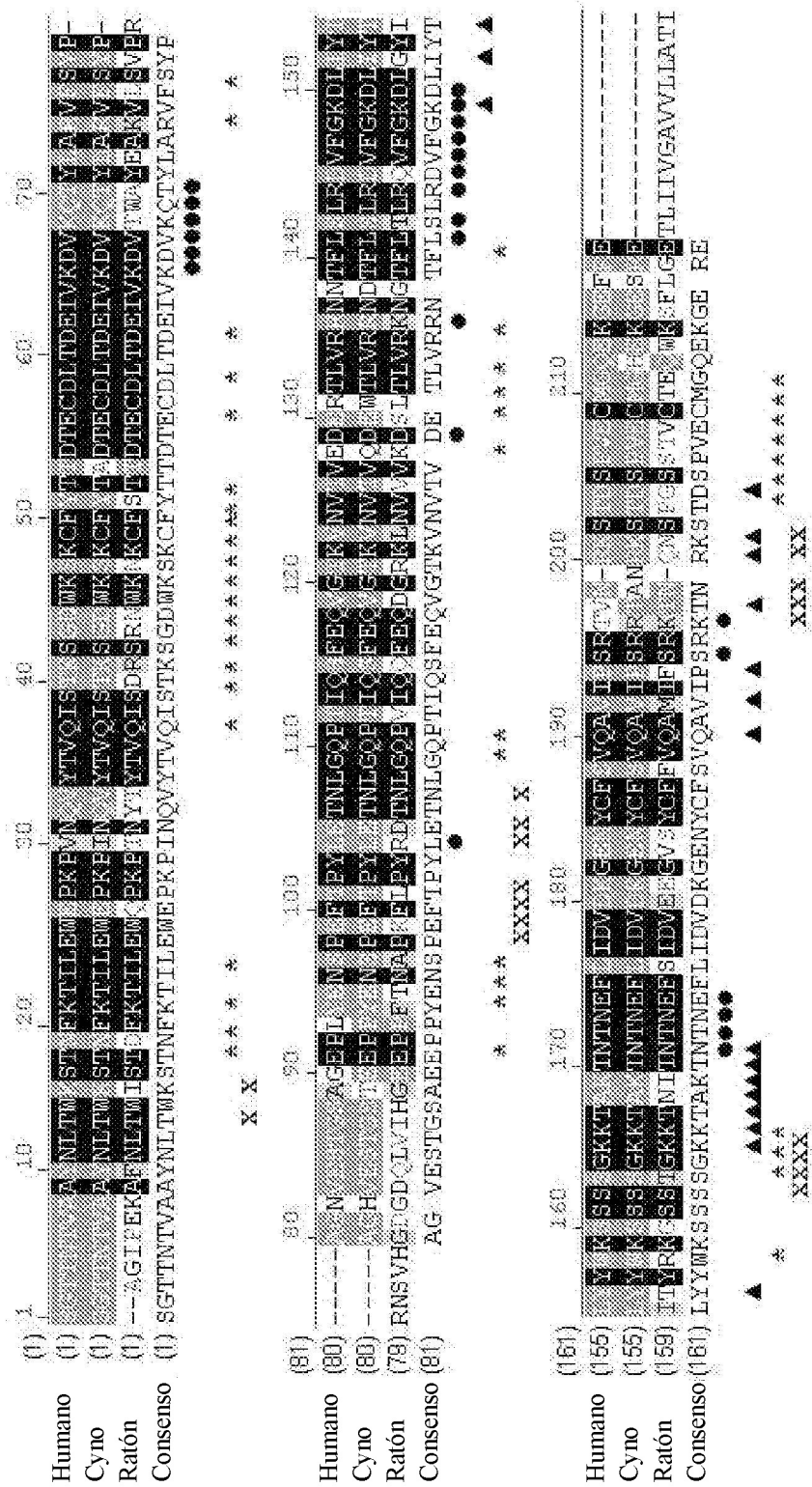


Fig. 3

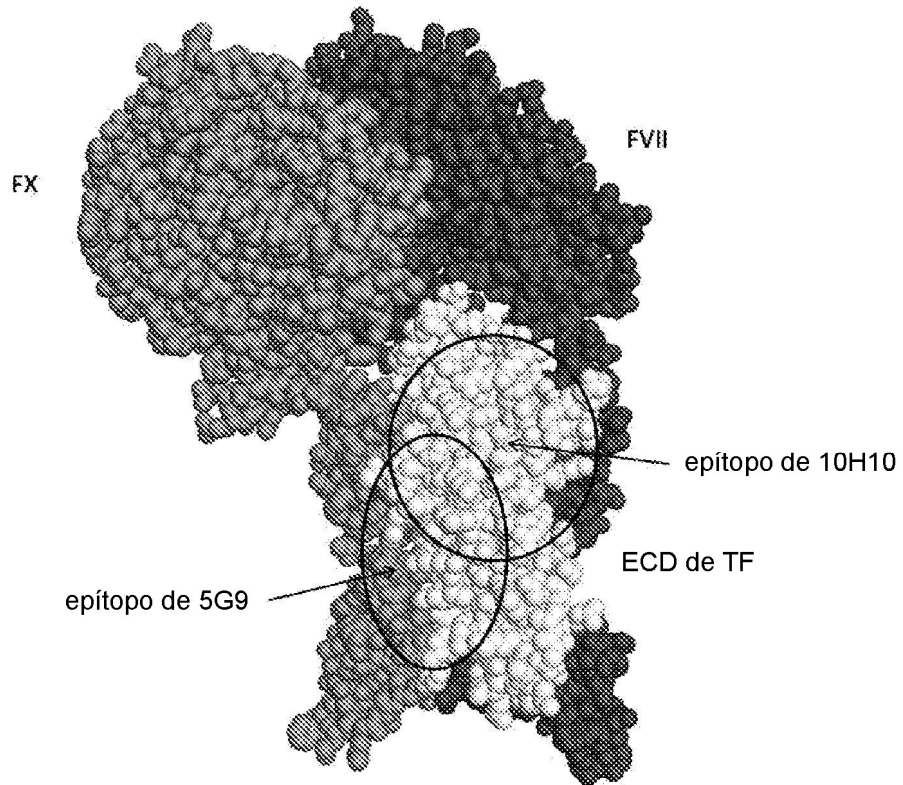


Fig. 4

```

1                                     50
mu anti-TF 10H10 HCV (1) QVHLQQSGAELMKPGASVKISCKASGYTFITYWIEWVKQRPGHGLEWIGD
    M59 - H22 HCV (1) EVQLVQSGAEVKKKPGESLRISCKGSGYTFITYWIEWVRQMPGKGLEWMGD
    M1587 - H116 HCV (1) EVQLVQSGAEVKKKPGESLRISCKGSGYTFIPYWIEWVRQMPGKGLEWMGD
    M1593 - H171 HCV (1) EVQLVQSGAEVKKKPGESLRISCKGSGYTFAPYWIEWVRQMPGKGLEWMGD
Residuos de Contacto * * * * *
    
```

```

51                                     100
mu anti-TF 10H10 HCV (51) ILPGSGSTNYNENFKGKATFTADSSSNTAYMQLSSLTSEDSAVYYCARSG
    M59 - H22 HCV (51) ILPGSGSTNYSFSFQGHVTISADKSISTAYLQWSSLKASDTAMYYCARSG
    M1587 - H116 HCV (51) ILPGSGFTTYSFSFQGHVTISADKSISTAYLQWSSLKASDTAMYYCARSG
    M1593 - H171 HCV (51) ILPGTGFTTYSFSFQGHVTISADKSISTAYLQWSSLKASDTAMYYCARSG
Residuos de Contacto * * * *
    
```

```

101                                     120
mu anti-TF 10H10 HCV (101) YYGNSGFAYWGQGLVTVSA
    M59 - H22 HCV (101) YYGNSGFAYWGQGLVTVSS
    M1587 - H116 HCV (101) YYGNSGFAYWGQGLVTVSS
    M1593 - H171 HCV (101) YYGNSGFAYWGQGLVTVSS
Residuos de Contacto * * * *
    
```

```

1                                     50
mu anti-TF 10H10 LCV (1) DIVMTQSPSSLTVTAGEKVTMSCKSSQSLSSGNQKNYLTWYQQIPGQPP
    M1593 - L3 LCV (1) DIVMTQTPSLPVTPEPASICKSSQSLSSGNQKNYLTWYLQKPGQSP
Residuos de Contacto * * * *
    
```

```

51                                     100
mu anti-TF 10H10 LCV (51) KLLIYWASTRESGVPDRFTGSGSGTDFTLTINSVQAEDLAVYYCQNDYTY
    M1593 - L3 LCV (51) QLLIYWASTRESGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGYYCQNDYTY
Residuos de Contacto * * * *
    
```

```

101                                     113
mu anti-TF 10H10 LCV (101) PLTFGAGTKLELK
    M1593 - L3 LCV (101) PLTFGQGTKLEIK
Residuos de Contacto *
    
```

Fig. 5

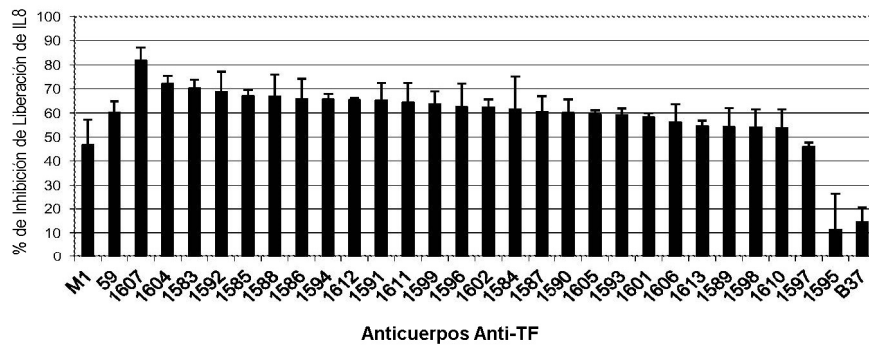


Fig. 6

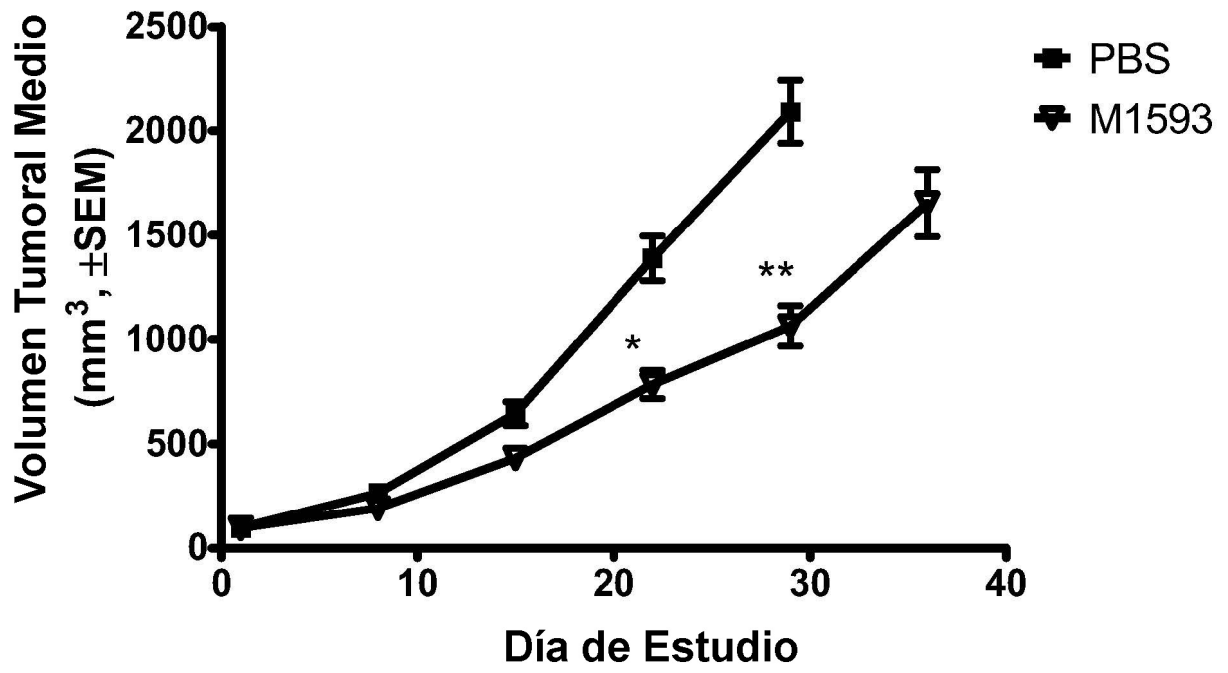


Fig. 7

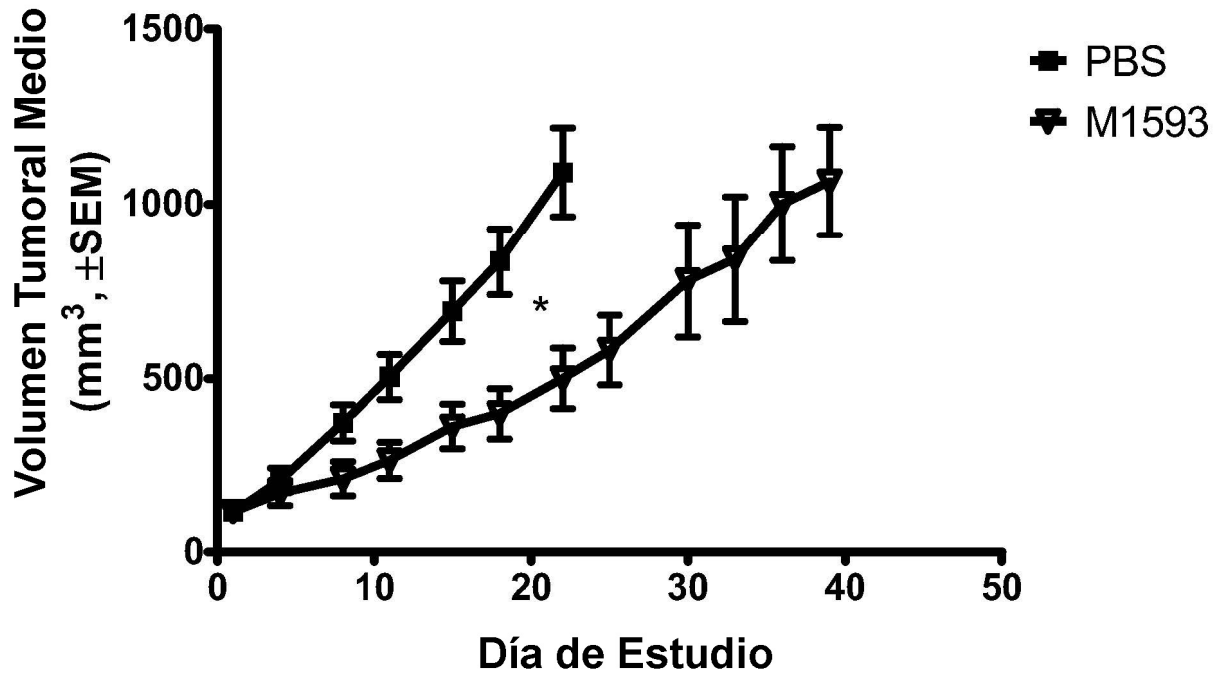


Fig. 8

