

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 757 930**

51 Int. Cl.:

A61K 38/36 (2006.01)

C07K 14/16 (2006.01)

C07K 14/745 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **02.03.2012 PCT/EP2012/053619**

87 Fecha y número de publicación internacional: **07.09.2012 WO12117091**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **02.03.2012 E 12707095 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **23.10.2019 EP 2680875**

54 Título: **Direccionamiento de factores de coagulación al TLT-1 en plaquetas activadas**

30 Prioridad:

02.03.2011 EP 11156682
04.03.2011 US 201161449254 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
30.04.2020

73 Titular/es:

NOVO NORDISK HEALTH CARE AG (100.0%)
Thurgauerstrasse 36/38
8050 Zürich, CH

72 Inventor/es:

HILDEN, IDA;
PESCHKE, BERND;
BREINHOLT, JENS y
KOFOD-HANSEN, MIKAEL

74 Agente/Representante:

PONS ARIÑO, Ángel

ES 2 757 930 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Direccionamiento de factores de coagulación al TLT-1 en plaquetas activadas

5 Campo de la invención

En la presente descripción se describen proteínas procoagulantes, polinucleótidos que codifican proteínas de fusión procoagulantes, células que expresan proteínas de fusión procoagulantes, un proceso para preparar proteínas procoagulantes y usos de dichas proteínas procoagulantes.

10

Antecedentes de la invención

Las plaquetas normales en reposo fluyen libremente a lo largo de la circulación sanguínea cuando el endotelio está intacto. Cuando la barrera endotelial de una sola capa se daña, las plaquetas en reposo se adhieren a las estructuras subendoteliales por medio de receptores de glicoproteína (GP). Por ejemplo, GPIIb/IIIa y GP-VI se unen al colágeno; GPIIb/IIIa se une a la fibronectina; GPIIb/IIIa se une a la laminina y GPIb-V-IX se une a polímeros del Factor von Willebrand (vWF). La adhesión a los componentes del tejido extravascular expuesto después de una lesión en los vasos, junto con la influencia de factores producidos localmente en el sitio de la lesión, por ejemplo, la serina proteasa trombina, conduce a la activación de las plaquetas. En el proceso complejo de activación, las plaquetas cambian de forma y exponen determinados fosfolípidos en su superficie. Además, los receptores ya presentes en la superficie de la plaqueta en estado de reposo se activan después de la activación de las plaquetas. Adicionalmente, la activación plaquetaria conduce a la liberación y exposición en la superficie de moléculas que en el estado de reposo se almacenan intracelularmente en gránulos alfa y gránulos densos y por lo tanto no se presentan en la superficie de plaquetas en el estado de reposo. El GPIIb/IIIa es un ejemplo de un receptor plaquetario presente en la superficie de plaquetas tanto en reposo como activadas. El GPIIb/IIIa existe en plaquetas en reposo en una conformación cerrada e inactiva y durante la activación plaquetaria asume una conformación abierta y activa capaz de unir sus ligandos, lo que incluye fibrinógeno y fibrina. Un ejemplo de un receptor almacenado intracelularmente en los gránulos alfa en plaquetas en reposo, pero liberado y expuesto en la superficie de la plaqueta activada, es el transcripto 1 similar a TREM (TLT-1) (Washington y otros, Blood, 104, 1042-1047 (2004), Gattis y otros, Journal of Biological Chemistry, 281, 13396-13403 (2006)) al cual se refiere la presente solicitud.

La cascada de la coagulación sanguínea se inicia cuando las células que portan el factor tisular (TF) en el subendotelio se exponen a componentes que circulan en la sangre. La exposición del TF al factor de coagulación circulante VIIa (FVIIa) desencadena la formación de pequeñas cantidades de trombina, que sirve como una señal procoagulante que conduce al reclutamiento y activación posterior de las plaquetas adheridas al sitio de la lesión. La coagulación se propaga y se amplifica posteriormente en la superficie de las plaquetas activadas, lo que conduce eventualmente a una explosión de la generación de trombina, que a su vez conduce a la activación y polimerización del fibrinógeno a fibras de fibrina, la reticulación y la estabilización del coágulo hemostático. Una característica atribuida a varios de los componentes de la cascada de coagulación es su capacidad para asociarse específicamente con la membrana fosfolipídica de las plaquetas activadas. Con este fin, el FVIIa, así como también, por ejemplo, los factores de coagulación IX y X (FIX y FX, respectivamente) y sus formas activadas correspondientes (FVIIa, FIXa y FXa, respectivamente), poseen una región rica en ácido γ -carboxiglutarámico (dominio Gla) que les permite dirigirse y unirse a la superficie de plaquetas activadas. El factor de coagulación VIII (FVIII) se asocia con plaquetas activadas mediante la unión a través de su cadena ligera. El mecanismo de unión del factor de coagulación XI (FXI) a las plaquetas es más controvertido, pero evidencia creciente sugiere que las plaquetas afectan al FXI y al FXIa y que la unión del FXI a las plaquetas requiere residuos en el dominio FXI A3 (Emsley y otros, 2010, Blood, Vol. 115, p. 2569).

La unión a la membrana aumenta fuertemente la actividad de los factores de coagulación tales como FVIIa. Sin embargo, sus interacciones con las membranas plaquetarias son de afinidad variable. Por ejemplo, la constante de unión (K_D) para el FVIIa a la superficie de las plaquetas está en el intervalo micromolar bajo. La mejora de la unión a las plaquetas y la localización de los factores de coagulación en la superficie de las plaquetas activadas puede aumentar su actividad. Por lo tanto, es conveniente un medio para hacerlo.

En sujetos con una coagulopatía, tales como seres humanos con hemofilia A, B o C, diversas etapas de la cascada de coagulación se tornan disfuncionales debido a, por ejemplo, la ausencia o presencia insuficiente de un factor de coagulación funcional. Dicha disfunción de una parte de la coagulación resulta en una coagulación insuficiente de la sangre, lo que conduce a sangrados espontáneos, por ejemplo, en articulaciones y potencialmente un sangrado peligroso para la vida.

Un objeto de la presente invención es proporcionar un compuesto que sea adecuado para su uso como un fármaco procoagulante en dichos sujetos. Un segundo objeto de la presente invención es proporcionar moléculas procoagulantes que tengan mayor actividad, en comparación con los factores de coagulación a partir de los que se derivan. Un tercer objeto de la presente invención es proporcionar moléculas que regulen positivamente la coagulación sanguínea en un microambiente adecuado fisiológicamente. Un cuarto objeto de la presente invención es proporcionar moléculas procoagulantes que tengan vidas medias más largas que el factor de coagulación del que se derivan. Un quinto objeto de la presente invención es proporcionar moléculas procoagulantes que no den lugar a una caída en el

conteo de plaquetas. Un objeto adicional de la presente invención es dirigir un factor de coagulación a la superficie de plaquetas activadas. Un objeto particular de la invención es aumentar la generación de FIXa y/o FXa en la superficie de la plaqueta activada. Por lo tanto, el objeto es permitir la iniciación de la coagulación de la sangre en la superficie de plaquetas activadas que se localizan intravascular o extravascularmente.

El documento WO06/096828 describe proteínas quiméricas que comprenden el factor tisular soluble (sTF) y un dominio de unión a fosfatidil serina (PS), tal como Anexina V. La PS se expone en la superficie de células activadas, tales como monocitos, células endoteliales y células que experimentan apoptosis, así como también en plaquetas activadas y en reposo. Las proteínas quiméricas son tanto procoagulantes como anticoagulantes; esto último debido al hecho de que, en dosis más altas, los constructos compiten con factores de coagulación en la unión al PS en las plaquetas activadas. Por lo tanto, las proteínas quiméricas del documento WO06/096828 tienen un conjunto diferente de propiedades que las proteínas procoagulantes descritas en la presente descripción.

El documento US 2008/0131423 describe anticuerpos para TLT-1 monocatenarios, o fragmentos funcionales o variantes de estos, para modular la actividad plaquetaria en un sujeto. El contexto presentado es una enfermedad o trastorno asociado con la agregación plaquetaria, tal como enfermedades cardiovasculares, enfermedades inflamatorias, cáncer y sepsis; particularmente trombosis, ataque cardíaco, aterosclerosis y accidente cerebrovascular. Los Fv sc anti-TLT-1 que se describen específicamente son capaces de inhibir la agregación plaquetaria mediada por trombina. Por lo tanto, los anticuerpos para TLT-1 de cadena simple descritos en el documento US 2008/0131423 tienen un conjunto de propiedades diferente que los anticuerpos, y fragmentos de estos, comprendidos en las proteínas procoagulantes descritas en la presente descripción.

Breve descripción de la invención

Las proteínas procoagulantes descritas en la presente descripción se dirigen específicamente a plaquetas activadas, presentes en los sitios de lesión. Las proteínas descritas se basan en la identificación de receptores particulares y epítopos componentes que aparecen en las membranas plaquetarias cuando las plaquetas ya no están en reposo sino activas o en el proceso de activarse. Se describe por lo tanto, además, un método para aumentar la coagulación en la superficie de plaquetas activadas.

Las proteínas procoagulantes descritas en la presente descripción comprenden (i) al menos un factor de coagulación, unido covalentemente a (ii) un anticuerpo o un fragmento de este que es capaz de unirse a (iii) un receptor, y/o un fragmento o variante de este, que se expone en la superficie de plaquetas activadas y se expone en un menor grado (y en algunos ensayos no se expone de manera detectable) en la superficie de plaquetas en reposo. El TLT-1 es un ejemplo de dicho receptor y las proteínas procoagulantes pueden, por ejemplo, unirse, al TLT-1 (16-162), TLT-1 (20-125) o TLT-1 (126-162). El factor de coagulación puede ser una serina proteasa en forma de zimógeno, por ejemplo, FVII, FIX o FX o la forma activada correspondiente FVIIa, FIXa y FXa, o un derivado de una serina proteasa; FV o un derivado de este, FVIII o un derivado de este o FXI o un derivado de este. El factor de coagulación y el anticuerpo o fragmento de anticuerpo se unen opcionalmente por medio de un enlazador. Las proteínas procoagulantes descritas en la presente descripción pueden ser proteínas de fusión o conjugados químicos. Por lo tanto, la invención se refiere, además, a su fabricación. Un proceso para preparar una composición que comprende al menos una proteína procoagulante descrita en la presente descripción implica conjugar químicamente (i), un anticuerpo para TLT-1 o un fragmento de este, con un grupo reactivo (RS1) de un enlazador y hacer reaccionar (ii), el factor de coagulación, con otro grupo reactivo (RS2) de dicho enlazador.

En este caso, dicho enlazador puede ser un polímero, tal como polietilenglicol (PEG).

Además, se proporciona: una secuencia de nucleótidos aislada que codifica una cualquiera de las proteínas procoagulantes descritas en la presente descripción; un vector que comprende una secuencia de nucleótidos aislada que, a su vez, codifica una cualquiera de las proteínas procoagulantes descritas en la presente descripción; una célula aislada que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica una cualquiera de las proteínas procoagulantes descritas en la presente descripción. Dicha secuencia de nucleótidos puede expresarse, a su vez, mediante un vector intracelular. Dicha célula aislada puede ser una célula eucariota, tal como una célula de mamífero, tal como una célula BHK o una CHO o una HEK.

De manera similar, se describe una proteína procoagulante para su uso como un medicamento y para el tratamiento de una coagulopatía. En una modalidad, una cantidad eficaz terapéuticamente de dicha proteína se administra por vía parenteral, tal como administrada por vía intravenosa o subcutánea, a un individuo que lo necesita. Dicho individuo que lo necesita puede tener cualquier coagulopatía congénita, adquirida y/o iatrogénica.

Descripción de los dibujos

Figura 1: Secuencias de aminoácidos y nucleótidos del TLT-1 humano. En la Figura 1, se muestran las secuencias de aminoácidos y nucleótidos que representan el hTLT-1. Aquí, la secuencia de nucleótidos en la posición 1-45 codifica el péptido señal predicho, la secuencia de nucleótidos en la posición 46-486 codifica el dominio extracelular del hTLT-

1, la secuencia de nucleótidos en la posición 487-555 codifica la región transmembrana y la secuencia de nucleótidos en la posición 556-933 codifica el dominio intracelular del hTLT-1.

5 Figura 2:Secuencias de aminoácidos y nucleótidos que representan el dominio extracelular del TLT-1 humano que contiene una etiqueta His-6 C-terminal. En la Figura 2, se muestran las secuencias de aminoácidos y nucleótidos que representan el dominio extracelular del hTLT-1 con una etiqueta His C-terminal. Aquí, la secuencia subrayada (7-15) indica las posiciones de una secuencia kozak, la secuencia de nucleótidos en la posición 16-60 codifica el péptido señal predicho, la secuencia de nucleótidos en la posición 61-501 codifica el dominio extracelular del hTLT-1 y la secuencia de nucleótidos en la posición 502-519 codifica la etiqueta 6xHis (en negritas). Además, se muestran los sitios de enzima de restricción HindIII (secuencia de nucleótidos en la posición 1-6) y EcoRI (secuencia de nucleótidos en la posición 523-528) y el codón de parada se marca con un asterisco (520-522).

15 Figura 3A-D:El dominio variable de 0012LC y 0012HC, lo que incluye la numeración de Kabat:3A) El dominio variable de 0012LC; 3B) El dominio variable de 0012LC – numeración de Kabat; 3C) El dominio variable de 0012HC; 3D) El dominio variable de 0012HC – numeración de Kabat.En la Figura 3A, la secuencia de nucleótidos en la posición 1-57 codifica la secuencia del péptido señal LC; las secuencias de nucleótidos en la posición 58-396 codifican el dominio variable de 0012LC. En la Figura 3B, las secuencias en negritas y gris representan las posiciones de las CDR de 0012LC de acuerdo con la numeración de Kabat. En la Figura 3C, la secuencia de nucleótidos en la posición 1-54 codifica el péptido señal 0012HC, la secuencia de nucleótidos en la posición 55-396 codifica el dominio variable de 0012HC. En la Figura 3D, las secuencias en negritas y gris representan las posiciones de las CDR de 0012HC de acuerdo con la numeración de Kabat.

25 Figura 4:El dominio variable de 0012LC junto con la región constante de la LC kappa humana, y una etiqueta HPC4 (codificada por pTT-0012LC.HPC4). En la Figura 4, las secuencias de nucleótidos en la posición 1-57 codifican el péptido señal LC, la secuencia de nucleótidos 58-396 codifica el dominio variable de 0012LC, la secuencia de nucleótidos 397-714 codifica la región constante de la 0012LC kappa humana, y la secuencia de nucleótidos 715-750 codifica una etiqueta HPC4.

30 Figura 5:El dominio variable de 0012HC junto con la región constante de la IgG4 humana (pTT-0012HC). En la Figura 5, la secuencia de nucleótidos 1-54 codifica el péptido señal HC, la secuencia de nucleótidos 55-396 codifica el dominio variable de 0012HC y la secuencia de nucleótidos 397-1377 codifica la región constante de la IgG4 humana (en negritas).

35 Figura 6:Cobertura de secuencias de péptidos del TLT-1 analizados por HX en presencia y ausencia del mAb0023. La secuencia primaria del hTLT-1 se muestra por encima de los péptidos analizados por HX (se muestra como barras horizontales). Los péptidos que muestran patrones de intercambio similares tanto en presencia como en ausencia de 0023 se muestran en blanco, mientras que los péptidos que muestran una incorporación reducida de deuterio tras la unión de 0023 son de color negro.

40 Figura 7:Cobertura de secuencias de péptidos del TLT-1 analizados por HX en presencia y ausencia del mAb0051. La secuencia primaria del hTLT-1 se muestra por encima de los péptidos analizados por HX (se muestra como barras horizontales). Los péptidos que muestran patrones de intercambio similares tanto en presencia como en ausencia de 0051 se muestran en blanco, mientras que los péptidos que muestran una incorporación reducida de deuterio tras la unión de 0051 son de color negro.

45 Figura 8:Cobertura de secuencias de péptidos del TLT-1 analizados por HX en presencia y ausencia del mAb0062. La secuencia primaria del hTLT-1 se muestra por encima de los péptidos analizados por HX (se muestra como barras horizontales). Los péptidos que muestran patrones de intercambio similares tanto en presencia como en ausencia de 0062 se muestran en blanco, mientras que los péptidos que muestran una incorporación reducida de deuterio tras la unión de 0062 son de color negro.

50 Figura 9:Cobertura de secuencias de péptidos del TLT-1 analizados por HX en presencia y ausencia del mAb0061 (mAb0012). La secuencia primaria del hTLT-1 se muestra por encima de los péptidos analizados por HX (se muestra como barras horizontales). Los péptidos que muestran patrones de intercambio similares tanto en presencia como en ausencia de 0061 se muestran en blanco, mientras que los péptidos que muestran una incorporación reducida de deuterio tras la unión de 0061 son de color negro.

55 Figura 10:Cobertura de secuencia de péptidos de la región 126-162 del TLT-1 analizados por HX.La secuencia primaria del hTLT-1 se muestra por encima de los péptidos analizados por HX (se muestra como barras horizontales). Todos los péptidos mostraron una incorporación reducida de deuterio tras la unión de mAb0061 (mAb0012).

60 Figura 11A:Efecto del FVIIa-Fab1029 sobre la formación de un coágulo de fibrina inducida por TF en sangre total humana (HWB) a partir de un donante normal medido por tromboelastografía (TEG). La formación del coágulo en HWB recalcificada (curva HWB) se induce mediante TF 0,03 pM (Innovin®). La curva "Hemofilia" muestra la formación de coágulos retrasada e inadecuada cuando la HWB se suplementa con anticuerpo anti-FVIII 10 µg/ml. Otras curvas muestran las curvas obtenidas cuando la condición similar a la hemofilia inducida por el anticuerpo contra el FVIII se

revierte mediante diversas concentraciones (0; 0,25; 0,5; 1,0 nM) de ya sea FVIIa-Fab1029 o rFVIIa, como se indica. La actividad de puenteo de FVIII de FVIIa-Fab1029 se muestra más potente que la de rFVIIa.

5 Figura 11B: Efecto del FVIIa-Fab1029 sobre la formación de un coágulo de fibrina inducida por TF en sangre total humana (HWB) a partir de un donante normal medido por tromboelastografía (TEG). Tiempo R determinado a partir de los trazos de TEG del experimento mostrado en la Figura 11A.

10 La sangre total humana estabilizada con citrato (HWB) se extrae a partir de donantes normales. Las condiciones similares a hemofilia se obtienen mediante la incubación de HWB con anticuerpo anti-FVIII 10 µg/ml (anti-Factor VIII humano de oveja; Hematologic Technologies Inc) durante 30 min a temperatura ambiente. La formación de coágulos se mide mediante tromboelastografía (analizador TEG serie 5000, Haemoscope Corporation, Niles, IL, EE.UU.). Se añaden diversas concentraciones (0; 0,25; 0,5; 1,0 nM) del FVIIa-Fab1029 o rFVIIa a la HWB con citrato similar a hemofilia. La coagulación se inicia cuando se transfieren 340 µl de HWB normal o similar a hemofilia a un recipiente del tromboelastógrafo que contiene 20 µl de CaCl₂ 0,2 M con TF lipidado 0,03 pM (Innovin[®], Dade Behring GmbH (Marburg, Alemania). El trazo de TEG se sigue continuamente por hasta 120 min. Se registran las variables de TEG siguientes: Tiempo R (tiempo de coagulación, es decir, el tiempo desde el inicio de la coagulación hasta que se obtuvo una amplitud de 2 mm), ángulo α (desarrollo de coágulos medido como el ángulo entre el valor de R y el punto de inflexión del trazo de TEG), K (velocidad de la cinética del coágulo para alcanzar un cierto nivel de resistencia del coágulo, amplitud = 20 mm), y MA (amplitud máxima del trazo de TEG que refleja la resistencia mecánica máxima del coágulo).

25 Figura 12: Efecto del FIX-Fab0135 en la formación de un coágulo de fibrina inducida por TF en sangre total humana (HWB) a partir de un donante normal medido mediante tromboelastografía (TEG). La formación del coágulo en HWB recalcificada (curva HWB) se induce mediante TF 0,03 pM (Innovin[®]). La curva "Hemofilia" muestra la formación de coágulos retrasada e inadecuada cuando la HWB se suplementa con anticuerpo anti-FVIII 10 µg/ml. Otras curvas muestran los trazos de TEG obtenidos cuando la condición similar a hemofilia A inducida por el anticuerpo FVIII se revierte mediante diversas concentraciones (0,1; 0,2; 1,0; 5,0; 10 nM) del FIX-Fab0135. Las curvas de TEG obtenidas cuando la proteína de fusión FIX se reemplaza por rFVIIa 1 nM o rFIX 10 nM se muestran para la comparación.

30 Figura 13: El FIX-Fab0135 dirigido a las vesículas fosfolípídicas enriquecidas con TLT-1 promueve notablemente la activación de FX inducida por FVIIa en ausencia del FVIII. Diversas concentraciones (0,05 – 100 nM) de rFVIIa se incuban durante 15 min en tampón Hepes (o) o en tampón Hepes que contiene FIX 10 nM (□); FIXa 10 nM (■) o FIX-Fab0135 10 nM (▲). A continuación, esto se mezcla y se incuba durante 3 min con FX 100 nM y vesículas fosfolípídicas enriquecidas con TLT-1 a una dilución de 1:4000 en ausencia o en presencia de FVIII 5 nM, como se indica. La reacción se detiene con EDTA, y la generación del FXa se mide en un ensayo cromogénico.

35 Figura 14: Expresión del TLT-1 en plaquetas humanas. La figura muestra la cantidad de TLT-1 en plaquetas en sangre total dividida en ventanas de análisis en dispersión frontal y lateral en el análisis de citometría de flujo. La fluorescencia media dentro de la ventana de análisis de plaquetas se usó para calcular la cantidad de TLT-1 mediante el uso de una curva estándar obtenida a partir de perlas con un número definido de sitios de unión para el anticuerpo de detección. Las plaquetas se activaron con el péptido activador del receptor activado por proteasas-1 SFLLRN (0,3-30 µM). Para asegurar la expresión máxima del TLT-1 se usó una combinación de SFLLRN (30 µM) y Convulxina (Cvln) (100 ng/ml) como control. La expresión del TLT-1 se midió mediante dos anticuerpos anti-TLT-1 diferentes, mAb0136; gráfico de barras izquierdo y mAb0123; gráfico de barras derecho. Los datos se presentan como media ± sem con el número de donantes de sangre que varía de 2 a 4 en los diferentes grupos.

50 Figura 15: Tiempo de sangrado reducido en dependencia de la dosis de FVIIa-Fab9015 (izquierda) y pérdida de sangre (derecha) en ratones KOKI TLT-1 con hemofilia inducida por anticuerpo en comparación con ratones hemofílicos que recibieron vehículo. Una dosis de FVIIa-Fab9015 20 nmol/kg fue significativamente más eficaz en comparación con 20 nmol/kg de rFVIIa.

55 Figura 16: Conteo de plaquetas en ratones KOKI TLT-1 hemofílicos transitorios dosificados con FVIIa-Fab9015 (20 o 4 nmol/kg), rFVIIa (20 nmol/kg) o vehículo. Los ratones se dosificaron a los -5 min, se observó el sangrado de 0 a 30 min, y se observó el conteo de plaquetas durante 120 min después de la inducción del sangrado.

60 Figura 17A: El gráfico de barras muestra la cantidad máxima de trombina generada por 25 nM de rFVIIa (barra sin rellenar) o FVIIa-Fab9015 (barra rellena). La generación de trombina se midió en condiciones de hemofilia A inducida (anticuerpos policlonales anti-FVIII humano de oveja) con una concentración de plaquetas establecida de 150 000 plt/µl. La reacción se inició con la activación de plaquetas mediante la adición del péptido activador del PAR-1 SFLLRN (30 µM) y el agonista del GPIV Convulxina (100 ng/ml).

65 Figura 17B: El gráfico de barras muestra la cantidad máxima de trombina generada por 5 nM de rFVIIa (barra sin rellenar) o FVIIa-Fab9015 (barra rellena). La generación de trombina se midió en condiciones de hemofilia A con una concentración de plaquetas establecida de 150 000 plt/µl. La reacción se inició con la activación de plaquetas mediante la adición del péptido activador del PAR-1 SFLLRN (30 µM) y el agonista del GPIV Convulxina (100 ng/ml).

Figura 18: La figura muestra que el efecto del FVIIa-Fab9015 dependió de la activación de plaquetas. Se añadió FVIIa-Fab9015 25 nM a plasma humano rico en plaquetas (150 000 plt/ μ l) hecho similar a hemofilia A mediante la adición de anticuerpos anti-FVIII humano de oveja. Las muestras con plaquetas no activadas muestran una deficiente generación de trombina (línea punteada), el péptido activador del PAR-1 SFLLRN (10 μ M) proporciona algún aumento en la generación de trombina (línea discontinua) y las plaquetas activadas tanto con SFLLRN (30 μ M) como con el agonista del GPVI Convulxina (100 ng/ml) proporcionan la mayor generación de trombina (línea sólida).

Figura 19: La figura muestra que el aumento en la generación de trombina con FVIIa-Fab9015 en comparación con rFVIIa fue dependiente del TLT-1. Los trazos originales muestran la generación de trombina en plasma humano rico en plaquetas (150 000 plt/ μ l) hecho similar a hemofilia A mediante la adición de anticuerpos policlonales anti-FVIII humano de oveja. La generación de trombina se inició mediante la adición del péptido activador del PAR-1 SFLLRN (30 μ M) y el agonista del GPVI Convulxina (100 ng/ml). Como se muestra por los trazos, el FVIIa-Fab9015 (5 nM) (línea sólida) proporciona un pico de trombina significativamente mayor que el rFVIIa (5 nM) (línea punteada). Al incubarse previamente las muestras con TLT-1 soluble (100 nM) la capacidad generadora de trombina del FVIIa-Fab9015 se redujo significativamente (línea discontinua). Esto confirma que el efecto del 9015 depende de la unión al TLT-1 en la plaqueta activada.

Figura 20: La figura muestra que el aumento en la generación de trombina con FIX-Fab0155 en comparación con rFIX fue dependiente del TLT-1. Los trazos originales muestran la generación de trombina en plasma deficiente en FIX que contiene plaquetas humanas (150 000 plt/ μ l). La generación de trombina se inició mediante la adición del péptido activador del PAR-1 SFLLRN (30 μ M) y el agonista del GPVI Convulxina (100 ng/ml). Como se muestra por los trazos, el FIX-Fab0155 1 nM (línea sólida) proporciona un pico de trombina significativamente mayor que el rFIX (línea gris). La preincubación del TLT-1 soluble (100 nM) redujo significativamente la capacidad generadora de trombina del FIX-Fab0155 (línea discontinua) lo que confirma la dependencia del TLT-1.

Figura 21: Autoactivación de la proteína de fusión FVII-Fab5001 en presencia del Factor Tisular soluble (sTF). La actividad proteolítica se midió en presencia de fosfolípidos (PC:PS) y sTF. Los resultados son los promedios de dos mediciones independientes y se dan en valores de k_{cat}/K_m relativos en comparación con wtFVIIa.

Figura 22A: Ninguno de los anticuerpos para TLT-1 (mAb0023, mAb0051, mAb0061, mAb0062) afectan la agregación plaquetaria. La figura muestra trazos originales de mediciones de transmisión de la luz en plasma rico en plaquetas donde las plaquetas se han activado con SFLLRN (1 μ M). Las muestras se incubaron previamente con anticuerpo anti-TLT-1 o anticuerpo control irrelevante (10 nM) 3 min antes de la activación de plaquetas.

Figura 22B: Ninguno de los anticuerpos para TLT-1 (mAb0023, mAb0051, mAb0061, mAb0062) afecta la agregación plaquetaria. La figura muestra trazos originales de mediciones de transmisión de la luz en plasma rico en plaquetas en el que las plaquetas se han activado con SFLLRN (10 μ M). Las muestras se han incubado previamente con anticuerpo anti-TLT-1 o anticuerpo control irrelevante (10 nM) 3 min antes de la activación de plaquetas.

Figura 23: Efecto del FIX-mAb0145 sobre la formación de coágulos de fibrina inducida por TF en sangre total humana (HWB) a partir de un donante normal medida por tromboelastografía (TEG). Se muestran el tiempo R obtenido a partir de los trazos del TEG con HWB normal y sangre con "hemofilia" suplementada con diversas concentraciones de FIX-mAb0145 o rFIX.

Figura 24: El gráfico de barras muestra la cantidad máxima de trombina generada por 25 nM de FVIIa-Fab9015, FVIIa-Fab1029 y FVIIa-Fab1001. Los tres constructos mostraron aumento de potencia en comparación con rFVIIa (25 nM). La generación de trombina se midió en condiciones de hemofilia A inducida (anticuerpos policlonales anti-FVIII humano de oveja) con una concentración de plaquetas establecida de 150 000 plt/ μ l. La reacción se inició con la activación de plaquetas mediante la adición del péptido activador del PAR-1 SFLLRN (30 μ M) y el agonista del GPVI Convulxina (100 ng/ml). Las barras muestran la media \pm SD de la generación de trombina máxima (n=2-5).

Figura 25: La figura muestra el aumento en potencia del FVIIa-Fab5001 en comparación con el rFVIIa de tipo silvestre. Los trazos originales muestran la generación de trombina en plasma deficiente en Factor VIII que contiene plaquetas humanas lavadas (150 000 plt/ μ l). En las muestras activadas la generación de trombina se inició por la adición del péptido activador del PAR-1 SFLLRN (30 μ M) y el agonista del GPVI Convulxina (100 ng/ml). Como se muestra por los trazos, el FVIIa-Fab5001 (25 nM) (línea sólida) proporciona aproximadamente un pico de trombina cuatro veces mayor que el rFVIIa de tipo silvestre (25 nM) (línea punteada). No hubo aumento de la potencia con las plaquetas inactivadas (línea discontinua).

SECUENCIAS

Las secuencias son las siguientes:

La SEQ ID NO: 1 proporciona la secuencia de nucleótidos del (h)TLT-1 humano.

La SEQ ID NO: 2 proporciona la secuencia de aminoácidos del hTLT-1.

ES 2 757 930 T3

- La SEQ ID NO: 3 proporciona la secuencia de nucleótidos del dominio extracelular del hTLT-1-His6.
- La SEQ ID NO: 4 proporciona la secuencia de aminoácidos del dominio extracelular del hTLT-1-His6.
- 5 Las SEQ ID NO: 5 a 8 proporcionan las secuencias de aminoácidos de los fragmentos del hTLT-1: hTLT-1.20-125, hTLT-1.16-162, hTLT-1.126-162 y hTLT-1.129-142.
- La SEQ ID NO: 9 proporciona la secuencia de nucleótidos del dominio variable de la LC del mAb0012.
- 10 La SEQ ID NO: 10 proporciona la secuencia de aminoácidos del dominio variable de la LC del mAb0012.
- La SEQ ID NO: 11 proporciona la secuencia de nucleótidos del dominio variable de la HC del 0012.
- La SEQ ID NO: 12 proporciona la secuencia de aminoácidos del dominio variable de la HC del 0012.
- 15 La SEQ ID NO: 13 proporciona la secuencia de nucleótidos de la cadena pesada del mAb0012.
- La SEQ ID NO: 14 proporciona la secuencia de nucleótidos de la cadena ligera del mAb0012 y el Fab0012.
- 20 La SEQ ID NO: 15 proporciona la secuencia de nucleótidos de la cadena pesada del mAb0023.
- La SEQ ID NO: 16 proporciona la secuencia de nucleótidos de la cadena ligera del mAb0023 y el Fab0023.
- La SEQ ID NO: 17 proporciona la secuencia de nucleótidos de la cadena pesada del mAb0051.
- 25 La SEQ ID NO: 18 proporciona la secuencia de nucleótidos de la cadena ligera del mAb0051 y el Fab0051.
- La SEQ ID NO: 19 proporciona la secuencia de nucleótidos de la cadena pesada del mAb0052.
- 30 La SEQ ID NO: 20 proporciona la secuencia de nucleótidos de la cadena pesada del mAb0062.
- La SEQ ID NO: 21 proporciona la secuencia de nucleótidos de la cadena ligera del mAb0052, el Fab0052 y el mAb0062.
- 35 La SEQ ID NO: 22 proporciona la secuencia de nucleótidos de la cadena pesada del mAb0061.
- La SEQ ID NO: 23 proporciona la secuencia de nucleótidos de la cadena pesada del mAb0082.
- La SEQ ID NO: 24 proporciona la secuencia de nucleótidos de la cadena ligera del mAb0061, el Fab0061, el mAb0082 y el Fab0082.
- 40 La SEQ ID NO: 25 proporciona la secuencia de nucleótidos de la VH-CH1 del Fab0012.
- La SEQ ID NO: 26 proporciona la secuencia de nucleótidos de la VH-CH1 del Fab0023.
- 45 La SEQ ID NO: 27 proporciona la secuencia de nucleótidos de la VH-CH1 del Fab0051.
- La SEQ ID NO: 28 proporciona la secuencia de nucleótidos de la VH-CH1 del Fab0052.
- 50 La SEQ ID NO: 29 proporciona la secuencia de nucleótidos de la VH-CH1 del Fab0061.
- La SEQ ID NO: 30 proporciona la secuencia de nucleótidos de la VH-CH1 del Fab0082.
- La SEQ ID NO: 31 proporciona la secuencia de nucleótidos de la bisagra-CH2-CH3 de hlgG4.
- 55 La SEQ ID NO: 32 proporciona la secuencia de aminoácidos del mAb0012, HC (VH de ratón-CH1-CH2-CH3 de IgG4 humana).
- La SEQ ID NO: 33 proporciona la secuencia de aminoácidos del mAb0012, LC (VL de ratón - CL Kappa humana) y Fab0012, LC (VL de ratón - CL Kappa humana).
- 60 La SEQ ID NO: 34 proporciona la secuencia de aminoácidos del mAb0023, HC (VH de ratón-CH1-CH2-CH3 de IgG4 humana).
- 65 La SEQ ID NO: 35 proporciona la secuencia de aminoácidos del mAb0023, LC (VL de ratón - CL Kappa humana) y Fab0023, LC (VL de ratón - CL Kappa humana).

ES 2 757 930 T3

- La SEQ ID NO: 36 proporciona la secuencia de aminoácidos del mAb0051, HC (VH de ratón-CH1-CH2-CH3 de IgG4 humana).
- 5 La SEQ ID NO: 37 proporciona la secuencia de aminoácidos del mAb0051, LC (VL de ratón - CL Kappa humana) y Fab0051, LC (VL de ratón - CL Kappa humana).
- La SEQ ID NO: 38 proporciona la secuencia de aminoácidos del mAb0052, HC (VH de ratón-CH1-CH2-CH3 de IgG4 humana).
- 10 La SEQ ID NO: 39 proporciona la secuencia de aminoácidos del mAb0052, LC (VL de ratón - CL Kappa humana); Fab0052, LC (VL de ratón - CL Kappa humana); mAb0062, LC (VL de ratón - CL Kappa humana).
- La SEQ ID NO: 40 proporciona la secuencia de aminoácidos del mAb0061, HC (VH de ratón-CH1-CH2-CH3 de IgG4 humana).
- 15 La SEQ ID NO: 41 proporciona la secuencia de aminoácidos del mAb0061, LC (VL de ratón - CL Kappa humana); Fab0061, LC (VL de ratón - CL Kappa humana) y mAb0082, LC (VL de ratón - CL Kappa humana); Fab0082, LC (VL de ratón - CL Kappa humana).
- 20 La SEQ ID NO: 42 proporciona la secuencia de aminoácidos del mAb0062, HC (VH de ratón-CH1-CH2-CH3 de IgG4 humana).
- La SEQ ID NO: 43 proporciona la secuencia de aminoácidos del mAb0082, HC (VH de ratón-CH1-CH2-CH3 de IgG4 humana).
- 25 La SEQ ID NO: 44 proporciona la secuencia de aminoácidos del Fab0012, VH de ratón - CH1 de IgG4 humana.
- La SEQ ID NO: 45 proporciona la secuencia de aminoácidos del Fab0023, VH de ratón - CH1 de IgG4 humana.
- 30 La SEQ ID NO: 46 proporciona la secuencia de aminoácidos del Fab0051, VH de ratón - CH1 de IgG4 humana.
- La SEQ ID NO: 47 proporciona la secuencia de aminoácidos del Fab0052, VH de ratón - CH1 de IgG4 humana.
- La SEQ ID NO: 48 proporciona la secuencia de aminoácidos del Fab0082, VH de ratón - CH1 de IgG4 humana.
- 35 Las SEQ ID NO: 49-58 proporcionan las secuencias de aminoácidos de los enlazadores opcionales L2-L10. Los enlazadores opcionales se enumeran y se listan en la Tabla 3.
- La SEQ ID NO: 59 proporciona la secuencia de aminoácidos de la etiqueta de purificación HPC4.
- 40 Las SEQ ID NO: 60-145 proporcionan las secuencias de ácidos nucleicos de los cebadores usados durante el desarrollo de los constructos de expresión descritos en los ejemplos 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 17, 18, 19, 20, 24, 25.
- 45 La SEQ ID NO: 146 proporciona la secuencia de aminoácidos de VH-CH1 del Fab0061.
- La SEQ ID NO: 147 proporciona la secuencia de aminoácidos de la bisagra-CH2-CH3 del hIgG4.
- La SEQ ID NO: 148 proporciona la secuencia de aminoácidos de una etiqueta His6.
- 50 La SEQ ID NO: 149 proporciona la secuencia de aminoácidos del hTLT-1.18-188.
- La SEQ ID NO: 150 proporciona la secuencia de ácidos nucleicos del cebador núm. 1004.
- 55 La SEQ ID NO: 151 proporciona la secuencia de ácidos nucleicos del cebador núm. 1005.
- La SEQ ID NO: 152 proporciona la secuencia de aminoácidos de la HC del Fab0100.
- La SEQ ID NO: 153 proporciona la secuencia de aminoácidos de la LC del Fab0100.
- 60 La SEQ ID NO: 154 proporciona la secuencia de ácidos nucleicos del Factor FV humano de tipo silvestre.
- La SEQ ID NO: 155 proporciona la secuencia de aminoácidos del Factor FV humano de tipo silvestre.
- 65 La SEQ ID NO: 156 proporciona la secuencia de ácidos nucleicos del Factor FVII humano de tipo silvestre.

- La SEQ ID NO: 157 proporciona la secuencia de aminoácidos del Factor FVII humano de tipo silvestre.
- La SEQ ID NO: 158 proporciona la secuencia de ácidos nucleicos del Factor FVIII humano de tipo silvestre.
- 5 La SEQ ID NO: 159 proporciona la secuencia de aminoácidos del Factor FVIII humano de tipo silvestre.
- La SEQ ID NO: 160 proporciona la secuencia de ácidos nucleicos del Factor FIX humano de tipo silvestre.
- La SEQ ID NO: 161 proporciona la secuencia de aminoácidos del Factor FIX humano de tipo silvestre.
- 10 La SEQ ID NO: 162 proporciona la secuencia de ácidos nucleicos del Factor FX humano de tipo silvestre.
- La SEQ ID NO: 163 proporciona la secuencia de aminoácidos del Factor FX humano de tipo silvestre.
- 15 La SEQ ID NO: 164 proporciona la secuencia de ácidos nucleicos del Factor FXI humano de tipo silvestre.
- La SEQ ID NO: 165 proporciona la secuencia de aminoácidos del Factor FXI humano de tipo silvestre.
- La SEQ ID NO: 166 proporciona la secuencia de ADN del 0012LC.C36A-HPC4.
- 20 La SEQ ID NO: 167 proporciona la secuencia de aminoácidos del 0012LC.C36A-HPC4.
- La SEQ ID NO: 168 proporciona la secuencia de ADN del 0012VH-CH1-HPC4.
- 25 La SEQ ID NO: 169 proporciona la secuencia de aminoácidos del 0012VH-CH1-HPC4.
- La SEQ ID NO: 170 proporciona la secuencia de ADN del 0012VH.T60N-CH1-YGPPC.
- La SEQ ID NO: 171 proporciona el 0012VH.T60N-CH1-YGPPC.
- 30 La SEQ ID NO: 172 proporciona la secuencia de ADN del FIX-L4b-0012LC.
- La SEQ ID NO: 173 proporciona la secuencia de aminoácidos del FIX-L4b-0012LC.
- 35 La SEQ ID NO: 174 proporciona la secuencia de aminoácidos del 0003 Fab-LC: 0062Fab-LC-HPC4.
- La SEQ ID NO: 175 proporciona la secuencia de aminoácidos del 0003 Fab-HC: 0062Fab-VH-CH1-YGPPC.
- La SEQ ID NO: 176 proporciona la secuencia de aminoácidos del 0197-0000-0074 Fab-HC: 0197-0000-0051Fab-VH-CH1-YGPPC.
- 40 La SEQ ID NO: 177 proporciona la secuencia de aminoácidos del 0074 Fab-LC: 0051Fab-LC-HPC4.
- La SEQ ID NO: 178 proporciona la secuencia de aminoácidos del 0004 Fab-HC: 0023Fab-VH-CH1-YGPPC.
- 45 La SEQ ID NO: 179 proporciona la secuencia de aminoácidos del 0004Fab-LC: 0023Fab-LC-HPC4.
- La SEQ ID NO: 180 proporciona la secuencia de aminoácidos del FVII-L4b-0062VH-CH1-HPC4 humano.
- 50 La SEQ ID NO: 181 proporciona la secuencia de aminoácidos del FVII 407C humano.
- La SEQ ID NO: 182 proporciona la secuencia de aminoácidos del FIX-L4b-0061LC humano.

55 Descripción de la invención

Las proteínas procoagulantes descritas en la presente descripción comprenden al menos un factor de coagulación, o variante funcional de este y un anticuerpo, o un fragmento de este, que es capaz de unirse a un receptor que solo está presente (en el sentido ubicuo de la palabra) en una plaqueta que experimenta los cambios morfológicos y funcionales asociados con la activación o en una plaqueta activada. Dichos receptores podrían originarse a partir de los gránulos alfa o gránulos densos de las plaquetas en reposo, un ejemplo particular de dicho receptor es el transcrito 1 similar a TREM (TLT-1).

60

Las moléculas procoagulantes pueden ser proteínas de fusión. El término "proteína de fusión", en la presente descripción, se refiere a proteínas que se crean a través de la unión en marco de dos o más secuencias de ADN, que originalmente codifican proteínas o péptidos separados, o fragmentos de estas. La traducción de la secuencia de ADN de la proteína de fusión resultará en una secuencia de proteínas única, que puede tener propiedades funcionales

65

derivadas de cada una de las proteínas o péptidos originales. Las secuencias de ADN que codifican proteínas de fusión pueden crearse artificialmente mediante métodos de biología molecular estándar tales como PCR solapada o ligadura de ADN y el ensamble se realiza mediante la exclusión del codón de parada en la primera secuencia de ADN de extremo 5' a la vez que se retiene el codón de parada en la secuencia de ADN de extremo 3'. La secuencia de ADN de la proteína de fusión resultante puede insertarse en un vector de expresión apropiado que soporta la expresión de proteína de fusión heteróloga en organismos huésped estándar tales como bacterias, levaduras, hongos, células de insectos o células de mamíferos.

Las proteínas de fusión pueden contener una secuencia del péptido enlazador o separador que separa las partes de proteína o péptido que definen la proteína de fusión. La secuencia del péptido enlazador o separador puede facilitar el plegado correcto de las partes de proteína o péptido individuales y puede hacer más probable que las partes de proteína o péptido individuales retengan sus propiedades funcionales individuales. Las secuencias del péptido enlazador o separador pueden insertarse en secuencias de ADN de la proteína de fusión durante el ensamble en marco de los fragmentos de ADN individuales que constituyen la secuencia de ADN completa de la proteína de fusión, es decir, durante PCR solapada o ligadura de ADN.

Alternativamente, las proteínas procoagulantes descritas en la presente descripción pueden ser conjugados de su factor de coagulación constituyente y contrapartes de anticuerpo, de manera que el factor de coagulación y el anticuerpo se fabrican independientemente uno de otro y, después, se unen sintéticamente.

Como se mencionó anteriormente, las moléculas procoagulantes descritas en la presente descripción pueden unirse específicamente al transcritto 1 similar a TREM (TLT-1). La activación de receptores expresados en células mieloides (TREM) tiene un papel bien establecido en la biología de diversos linajes mieloides, y juegan papeles importantes en la regulación de la inmunidad innata y adaptativa. El TLT-1 pertenece a la misma familia de proteínas, aunque el gen TLT-1 se expresa solo en un linaje único, específicamente en megacariocitos y trombocitos (plaquetas) y se encuentra exclusivamente en los gránulos alfa de los megacariocitos y las plaquetas. El TLT-1 es una proteína transmembrana que se expone en la superficie de plaquetas activadas tras la liberación de gránulos alfa. Hasta la fecha, el TLT-1 no se ha encontrado en la superficie de plaquetas en reposo o en la superficie de cualesquiera otros tipos de células.

La porción extracelular del TLT-1 se conoce que se compone de un único dominio similar a inmunoglobulinas (similar a Ig) conectado a la membrana celular de las plaquetas mediante una región enlazadora llamada el tallo (Gattis y otros, *Jour Biol Chem*, 2006, Vol. 281, Núm. 19, pp. 13396–13403). El dominio similar a Ig del TLT-1 humano (hTLT-1) se compone de 105 residuos y se une a la membrana mediante el tallo de 37 aminoácidos. Por lo tanto, se espera que el dominio similar a Ig del TLT-1 tenga una libertad de movimiento considerable.

El segmento transmembrana putativo del hTLT-1 es de 20 aminoácidos de longitud. El TLT-1 tiene, además, un motivo de inhibición basado en tirosina del inmunorreceptor (ITIM) citoplasmático, que puede funcionar como un motivo de transducción de la señal intracelular.

El papel del TLT-1 en la biología de las plaquetas todavía no se ha dilucidado completamente; se ha demostrado que el TLT-1 se une al fibrinógeno y se cree que el TLT-1 juega un papel en la regulación de la coagulación e inflamación en el sitio de una lesión. Se ha informado una forma soluble del TLT-1 que contiene el dominio similar a Ig (Gattis y otros, *Jour Biol Chem*, 2006, Vol. 281, Núm. 19, pp. 13396–13403). Las funciones específicas del TLT-1 soluble frente al unido a plaquetas aún está por establecerse.

Giomerarelli y otros (*Thrombosis and Haemostasis* (2007) 97, 955-963) informaron la generación de moléculas scFv anti-TLT-1 mediante el uso de técnicas de presentación de fagos. Se encontró que algunas de las moléculas scFv anti-TLT-1 inhibían la agregación plaquetaria humana mediada por trombina. Por lo tanto, las moléculas scFv anti-TLT-1 con dichas características pueden tener propiedades antitrombóticas, similares a las moléculas scFv anti-GPIIb/IIIa descritas por Schwartz y otros (*FASEB Journal*, (2004), 18, 1704-1706).

En la presente descripción se describen proteínas de fusión o conjugados que comprenden un factor de coagulación unido a un anticuerpo anti-TLT-1, o fragmentos de unión a antígeno de este, lo que incluye las scFv. El anticuerpo anti-TLT-1 o fragmentos de este sirven para dirigir el factor de coagulación unido a la superficie de plaquetas activadas mediante la unión al TLT-1 con el propósito de suministrar una actividad procoagulante en la superficie de plaquetas activadas. En este contexto, la inhibición de la agregación plaquetaria no es una propiedad conveniente del anticuerpo anti-TLT-1. Por lo tanto, se prefiere que los anticuerpos anti-TLT-1 no interfieran con las funciones del TLT-1, y en particular no inhiban la agregación plaquetaria.

Un receptor tal como el TLT-1 comprende epítomos que son objetivos útiles para las proteínas procoagulantes descritas en la presente descripción. Las proteínas procoagulantes pueden unirse a cualquier parte del TLT-1 que esté disponible para la unión *in vivo*, tal como residuos accesibles de la superficie del dominio similar a Ig, o parte del tallo. Por lo tanto, las proteínas de fusión pueden unirse a uno o más residuos dentro del TLT-1 (20-125), TLT-1 (16-162), TLT-1 (126-162) y/o TLT-1 (129-142) (los números entre paréntesis se refieren a residuos de aminoácidos en la SEQ ID NO: 2).

- 5 En una modalidad preferida, las proteínas procoagulantes se unen al tallo del TLT-1, tal como uno o más residuos del TLT-1 (126-162) o TLT-1 (129-142). Es poco probable que las proteínas procoagulantes que se unen al tallo del TLT-1 interfieran con la función del dominio similar a Ig. En otra modalidad preferida, fusionar el factor de coagulación al C-terminal de un anticuerpo, o fragmento de este, posicionará el factor de coagulación aún más favorablemente en la superficie celular de las plaquetas activadas, con relación a la de FVII y FVIIa.
- 10 En otra modalidad preferida, las proteínas procoagulantes descritas en la presente descripción se unen al TLT-1 sin interferir en la agregación plaquetaria.
- 15 En otra modalidad, las proteínas procoagulantes descritas en la presente descripción se unen al TLT-1 sin competir con la unión del fibrinógeno al TLT-1.
- 20 El TLT-1 puede ser de cualquier vertebrado, tal como cualquier mamífero, tal como un roedor (tal como un ratón, rata o cobayo), un lagomorfo (tal como un conejo), un artiodáctilo (tal como un cerdo, vaca, oveja o camello) o un primate (tal como un mono o un ser humano). El TLT-1 es, preferentemente, TLT-1 humano. El TLT-1 puede traducirse a partir de cualquier genotipo o alelo de origen natural que da lugar a una proteína TLT-1 funcional. Un ejemplo no limitante de un TLT-1 humano es la secuencia polipeptídica de SEQ ID NO: 2. La SEQ ID NO: 2 incluye el péptido señal (residuos 1-15 (MGLTLLLLLLGLEG) de la SEQ ID NO: 2, y el polipéptido TLT-1 maduro corresponde a los residuos 16-311 de la SEQ ID NO: 2.
- 25 Las proteínas procoagulantes descritas en la presente descripción comprenden un anticuerpo, o un fragmento de este, que se ha levantado contra el TLT-1. El anticuerpo o fragmento de este puede o no resultar en un cambio en la estructura conformacional del TLT-1. Además, el anticuerpo o fragmento de este puede o no resultar en señalización intracelular, como resultado de la unión al TLT-1. En una modalidad, el anticuerpo o fragmento de este es capaz de unirse al tallo del TLT-1. Por lo tanto, el anticuerpo o fragmento de este usa un receptor de origen natural, o porción de este, para lograr el efecto que es único para y proporcionado por las proteínas procoagulantes descritas en la presente descripción.
- 30 El término "anticuerpo", en la presente descripción, se refiere a una proteína, derivada a partir de una secuencia de inmunoglobulina de la línea germinal, que es capaz de unirse específicamente a un antígeno, que es el TLT-1 o una porción de este. El término incluye anticuerpos de longitud completa de cualquier isotipo (es decir, IgA, IgE, IgG, IgM y/o IgY) y cualquier fragmento o cadena simple de estos.
- 35 Los anticuerpos de longitud completa comprenden generalmente al menos cuatro cadenas polipeptídicas: es decir, dos cadenas pesadas (H) y dos cadenas ligeras (L) que se interconectan mediante enlaces disulfuro. Una subclase de inmunoglobulina de particular interés farmacéutico es la familia IgG, que puede subdividirse en isotipos IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4. Las moléculas de IgG consisten en dos cadenas pesadas, interconectadas por dos o más enlaces disulfuro, y dos cadenas ligeras, cada una unida a una cadena pesada mediante un enlace disulfuro. Una cadena pesada puede comprender una región variable de cadena pesada (VH) y hasta tres regiones constantes de cadena pesada (CH): CH1, CH2 y CH3. Una cadena ligera puede comprender una región variable de cadena ligera (VL) y una región constante de cadena ligera (CL). Las regiones VH y VL pueden subdividirse adicionalmente en regiones de hipervariabilidad, denominadas regiones determinantes de la complementariedad (CDR), intercaladas con regiones que están más conservadas, denominadas regiones marco (FR). Las regiones VH y VL se componen, típicamente, de tres CDR y cuatro FR, dispuestas del extremo amino terminal al extremo carboxilo terminal en el orden siguiente: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4. Las regiones hipervariables de las cadenas pesada y ligera forman un dominio que es capaz de interactuar con un antígeno (TLT-1), mientras que la región constante de un anticuerpo puede mediar la unión de la inmunoglobulina a los tejidos o factores del huésped, lo que incluye diversas células del sistema inmunitario (células efectoras), receptores Fc y el primer componente (C1q) del sistema de complemento clásico.
- 40 El componente de anticuerpo de las proteínas procoagulantes puede ser un anticuerpo monoclonal. Dicho anticuerpo puede ser un anticuerpo quimérico, un anticuerpo injertado con CDR, un anticuerpo humano, un anticuerpo humanizado o una porción de unión a antígeno de cualquiera de estos. Para la producción de anticuerpos, el animal experimental es un mamífero adecuado, tal como una cabra, conejo, rata o ratón.
- 45 En términos estructurales, un anticuerpo monoclonal se representa por una especie molecular única que tiene una especificidad de unión y afinidad única por un epítipo en particular. Los anticuerpos monoclonales (mAb) para las proteínas procoagulantes descritas en la presente descripción pueden producirse mediante una variedad de técnicas bien conocidas, lo que incluye la metodología de anticuerpos monoclonales convencional, por ejemplo, la técnica estándar de hibridación de células somáticas de Kohler y Milstein (1975) *Nature* 256: 495, o la transformación viral u oncogénica de linfocitos B. El sistema animal preferido para preparar hibridomas es el sistema murino. La producción de hibridomas en el ratón es un procedimiento muy bien establecido. Los protocolos y técnicas de inmunización para el aislamiento de los esplenocitos inmunizados para la fusión se conocen en la técnica. Además, se conocen las parejas de fusión (*por ejemplo*, células de mieloma murino) y los procedimientos de fusión.
- 50 Para generar hibridomas que producen anticuerpos monoclonales adecuados, los esplenocitos y/o células de nódulo linfático de ratones inmunizados pueden aislarse y fusionarse a una línea celular inmortalizada apropiada, tal como

una línea celular de mieloma de ratón. Los hibridomas resultantes pueden tamizarse para determinar la producción de anticuerpos específicos de antígeno. Los hibridomas secretores de anticuerpo pueden volver a colocarse en placas, tamizarse de nuevo, y si aún son positivos para la IgG adecuada, los anticuerpos monoclonales pueden subclonarse al menos dos veces mediante dilución limitante. A continuación, los subclones estables pueden cultivarse *in vitro* para generar pequeñas cantidades de anticuerpo en medio de cultivo tisular para la caracterización.

Los anticuerpos para las proteínas procoagulantes descritas en la presente descripción pueden prepararse, expresarse, crearse o aislarse por medios recombinantes, tales como (a) anticuerpos aislados de un animal (*por ejemplo*, un ratón) que es transgénico o transcromosómico para los genes de inmunoglobulinas de interés o un hibridoma preparado a partir de este, (b) anticuerpos aislados a partir de una célula huésped transformada para expresar el anticuerpo de interés, *por ejemplo*, a partir de un transfectoma, (c) anticuerpos aislados a partir de una biblioteca recombinante y combinatoria de anticuerpos, y (d) anticuerpos preparados, expresados, creados o aislados por cualquier otro medio que implique el corte y empalme de secuencias génicas de inmunoglobulinas a otras secuencias de ADN.

Varios anticuerpos monoclonales adecuados, mostrados en la Tabla 1, se identifican en la presente descripción por medio del prefijo "mAb" junto con un número de 4 dígitos. Por lo tanto, el anticuerpo monoclonal puede ser mAb0012 o una variante de este. El anticuerpo monoclonal puede ser mAb0023 o una variante de este. El anticuerpo monoclonal puede ser mAb0051 o una variante de este. El anticuerpo monoclonal puede ser mAb0061 o una variante de este. El anticuerpo monoclonal puede ser mAb0062 o una variante de este. El anticuerpo monoclonal puede ser mAb0082 o una variante de este.

Tabla 1: Ejemplos no limitantes de anticuerpos monoclonales adecuados

ID del mAb	HC	LC
0012	SEQ ID NO: 32	SEQ ID NO: 33
0023	SEQ ID NO: 34	SEQ ID NO: 35
0051	SEQ ID NO: 36	SEQ ID NO: 37
0052	SEQ ID NO: 38	SEQ ID NO: 39
0061	SEQ ID NO: 40	SEQ ID NO: 41
0062	SEQ ID NO: 42	SEQ ID NO: 39
0082	SEQ ID NO: 43	SEQ ID NO: 41

El término "porción de unión al antígeno" de un anticuerpo se refiere a uno o más fragmentos de un anticuerpo que retienen la capacidad para unirse específicamente a un antígeno, tal como TLT-1 u otro receptor objetivo, como se describe en la presente descripción. Se ha demostrado que la función de unión al antígeno de un anticuerpo puede realizarse por fragmentos de un anticuerpo de longitud completa. El componente anticuerpo de las proteínas procoagulantes puede ser, por lo tanto, un fragmento de un anticuerpo, tal como un fragmento de un anticuerpo monoclonal. Los ejemplos de fragmentos de unión abarcados dentro del término "porción de unión al antígeno" de un anticuerpo incluyen un fragmento Fab, un fragmento F(ab')₂, un fragmento Fab', un fragmento Fd, un fragmento Fv, un fragmento ScFv, un fragmento dAb y una región determinante de la complementariedad (CDR) aislada. Los anticuerpos monocatenarios tales como scFv y anticuerpos de cadena pesada tales como VHH y anticuerpos de camello también pretenden abarcarse dentro del término "porción de unión al antígeno" de un anticuerpo. Estos fragmentos de anticuerpos pueden obtenerse mediante el uso de técnicas convencionales conocidas por los expertos en la técnica, y los fragmentos pueden tamizarse para determinar su utilidad de la misma manera que los anticuerpos intactos.

Un fragmento "Fab" incluye un dominio variable y un dominio constante de la cadena ligera y un dominio variable y el primer dominio constante (C_{H1}) de la cadena pesada. Un fragmento Fab' incluye uno o más enlaces disulfuro carboxi terminales a las cadenas pesada o ligera. Los fragmentos de anticuerpo F(ab')₂ comprenden un par de fragmentos Fab que se unen de manera covalente generalmente cerca del carboxi terminal mediante cisteínas bisagra. Además, se conocen en la técnica otros acoplamientos químicos de fragmentos de anticuerpos.

Un fragmento "Fv" es un fragmento de anticuerpo que contiene un sitio completo de reconocimiento y de unión al antígeno y comprende generalmente un dímero de un dominio variable de cadena pesada y un dominio variable de cadena ligera en una asociación estrecha que puede ser de naturaleza covalente, por ejemplo, en un fragmento de dominio variable de cadena simple (scFv). Es en esta configuración que las tres regiones hipervariables de cada dominio variable interactúan para definir un sitio de unión al antígeno en la superficie del dímero V_H-V_L. Colectivamente, las seis regiones hipervariables o un subconjunto de estas confieren la especificidad de unión al antígeno para el anticuerpo. Sin embargo, incluso un único dominio variable que comprende solamente tres regiones hipervariables específicas para un antígeno tiene la capacidad para reconocer y unirse al antígeno, aunque usualmente a una afinidad menor que la del sitio de unión completo (Cai y Garen, *Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU.*, 93: 6280-6285, 1996). Por ejemplo, los anticuerpos de camélidos de origen natural que sólo tienen un dominio variable de cadena pesada (VHH) pueden unirse al antígeno (Desmyter y otros, *J. Biol. Chem.*, 277: 23645-23650, 2002; Bond y otros, *J. Mol. Biol.* 2003; 332: 643-655).

Los fragmentos de anticuerpos "Fv de cadena simple" o "scFv" comprenden los dominios V_H y V_L de un anticuerpo, donde estos dominios se presentan en una sola cadena polipeptídica. Generalmente, el polipéptido Fv comprende, además, un enlazador polipeptídico entre los dominios V_H y V_L que permite al scFv formar la estructura deseada para la unión al antígeno. Para una revisión de scFv, ver Pluckthun, 1994, En: *The Pharmacology of Monoclonal Antibodies*, Vol. 113, Ed. Rosenberg y Moore. Springer-Verlag, Nueva York, pp. 269-315.

El término "diacuerpos" se refiere a fragmentos de anticuerpos pequeños con dos sitios de unión a antígenos, en los que los fragmentos comprenden un dominio variable de cadena pesada (V_H) conectado a un dominio variable de cadena ligera (V_L) en la misma cadena polipeptídica (V_H y V_L). Mediante el uso de un enlazador que es demasiado corto para permitir el apareamiento entre los dos dominios variables en la misma cadena, los dominios variables se fuerzan a aparearse con dominios complementarios de otra cadena, lo que crea dos sitios de unión a antígenos. Los diacuerpos se describen más completamente, por ejemplo, en los documentos EP 404,097; WO 93/11161; y Hollinger y otros, 1993, *Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU.*, 90:6444-6448.

La expresión "anticuerpos lineales" se refiere a anticuerpos como se describe en Zapata y otros, 1995, *Protein Eng.*, 8(10):1057-1062. Brevemente, estos anticuerpos contienen un par de segmentos Fd en tándem (V_H-C_{H1}-V_H-C_{H1}) que, junto con los polipéptidos de cadena ligera complementarios, forman un par de regiones de unión al antígeno. Los anticuerpos lineales pueden ser biespecíficos o monoespecíficos.

El término "monocuerpo", como se usa en la presente descripción, se refiere a una molécula de unión a antígeno con un dominio variable de cadena pesada y ningún dominio variable de cadena ligera. Un monocuerpo puede unirse a un antígeno en ausencia de cadenas ligeras y tiene típicamente tres regiones hipervariables, por ejemplo, las CDR denominadas CDRH1, CDRH2, y CDRH3. Un monocuerpo de cadena pesada de IgG tiene dos moléculas de unión a antígeno de cadena pesada conectadas mediante un enlace disulfuro. El dominio variable de cadena pesada comprende una o más regiones hipervariables, preferentemente, una región CDRH3 o HVL-H3.

El término "región hipervariable", cuando se usa en la presente descripción, se refiere a los residuos de aminoácidos de un anticuerpo que son responsables de la unión al antígeno. La región hipervariable comprende residuos de aminoácidos de una "región determinante de la complementariedad" o "CDR" (definida por secuencia como los residuos 24-34 (L1), 50-56 (L2) y 89-97 (L3) en el dominio variable de cadena ligera y 31-35 (H1), 50-65 (H2) y 95-102 (H3) en el dominio variable de cadena pesada; Kabat y otros, *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5ta Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1991)) y/o aquellos residuos de un "bucle hipervariable" (definido por la estructura y diferente para cada anticuerpo; ver, por ejemplo: Chothia y Lesk, 1987, *J. Mol. Biol.* 196:901-917). En un ejemplo, los residuos HVL pueden incluir, 26-32 (L1), 50-52 (L2) y 91-96 (L3) en el dominio variable de cadena ligera y 26-32 (H1), 53-55 (H2) y 96-101 (H3) en el dominio variable de cadena pesada.

En una modalidad de la invención, la porción de unión al TLT-1 de la proteína procoagulante es un fragmento Fab. Varios fragmentos Fab adecuados, mostrados en la Tabla 2, se identifican en la presente descripción por medio del prefijo "Fab" junto con un número de 4 dígitos. El fragmento Fab puede ser Fab0003 o una variante de este. El fragmento Fab puede ser Fab0004 o una variante de este. El fragmento Fab puede ser Fab0012 o una variante de este. El fragmento Fab puede ser Fab0023 o una variante de este. El fragmento Fab puede ser Fab0051 o una variante de este. El fragmento Fab puede ser Fab0052 o una variante de este. El fragmento Fab puede ser Fab0061 o una variante de este. El fragmento Fab puede ser Fab0062 o una variante de este. El fragmento Fab puede ser Fab0074 o una variante de este. El fragmento Fab puede ser Fab0082 o una variante de este. El fragmento Fab puede ser Fab0084 o una variante de este.

Tabla 2: Ejemplos no limitantes de fragmentos Fab adecuados

ID del Fab	VH-CH1	LC
Fab0003	SEQ ID NO: 175	SEQ ID NO: 174
Fab0004	SEQ ID NO: 178	SEQ ID NO: 179
Fab0012	SEQ ID NO: 44	SEQ ID NO: 33
Fab0023	SEQ ID NO: 45	SEQ ID NO: 35
Fab0051	SEQ ID NO: 46	SEQ ID NO: 37
Fab0052	SEQ ID NO: 47	SEQ ID NO: 39
Fab0061	SEQ ID NO: 146	SEQ ID NO: 41
Fab0074	SEQ ID NO: 176	SEQ ID NO: 177
Fab0082	SEQ ID NO: 48	SEQ ID NO: 41
Fab0084	SEQ ID NO: 171	SEQ ID NO: 167

Como se mencionó anteriormente, un anticuerpo para las proteínas procoagulantes descritas en la presente descripción puede ser un anticuerpo humano o un anticuerpo humanizado. Se pretende que el término "anticuerpo humano", como se usa en la presente descripción, incluya anticuerpos que tienen regiones variables en las que tanto las regiones marco como las regiones CDR se derivan de secuencias de inmunoglobulinas de la línea germinal humana. Además, si el anticuerpo contiene una región constante, la región constante también se deriva de secuencias

de inmunoglobulinas de la línea germinal humana. Los anticuerpos humanos descritos en la presente descripción pueden incluir residuos de aminoácidos no codificados por secuencias de inmunoglobulinas de la línea germinal humana (*por ejemplo*, mutaciones introducidas por mutagénesis aleatoria o específica de sitio *in vitro*, o por mutación somática *in vivo*). Sin embargo, el término "anticuerpo humano", como se usa en la presente descripción, no pretende incluir anticuerpos en los que las secuencias de CDR derivadas de la línea germinal de otra especie de mamífero, tal como un ratón, se han injertado en secuencias marco humanas.

Dicho anticuerpo humano puede ser un anticuerpo monoclonal humano. Dicho anticuerpo monoclonal humano puede producirse mediante un hibridoma que incluye una célula B obtenida a partir de un animal no humano transgénico, por ejemplo, un ratón transgénico, cuyo genoma comprende un transgén de cadena pesada humana y un transgén de cadena ligera fusionados a una célula inmortalizada.

Los anticuerpos humanos pueden prepararse mediante la inmunización *in vitro* de linfocitos humanos seguido de transformación de los linfocitos con el virus Epstein-Barr.

El término "derivados de anticuerpos humanos" se refiere a cualquier forma modificada del anticuerpo humano, por ejemplo, un conjugado del anticuerpo y otro agente o anticuerpo.

El término "anticuerpo humanizado", en la presente descripción, se refiere a anticuerpos en los que las secuencias de CDR derivadas de la línea germinal de otra especie de mamífero, tal como un ratón, se han injertado en secuencias marco humanas. Pueden hacerse modificaciones de la región marco adicionales dentro de las secuencias marco humanas.

Los anticuerpos pueden analizarse para determinar la unión a la proteína objetivo mediante, por ejemplo, ELISA o transferencia de Western estándar. Un ensayo ELISA puede usarse, además, para tamizar en busca de hibridomas que muestran reactividad positiva con la proteína objetivo. La especificidad de unión de un anticuerpo puede determinarse, además, mediante el monitoreo de la unión del anticuerpo a células que expresan la proteína objetivo, por ejemplo, mediante citometría de flujo.

La especificidad de un anticuerpo para la proteína objetivo puede estudiarse adicionalmente al determinar si el anticuerpo se une o no a otras proteínas. Por ejemplo, cuando se desea producir un anticuerpo que se une específicamente al TLT-1 o una parte en particular, por ejemplo, un epítipo, del TLT-1, la especificidad del anticuerpo puede evaluarse al determinar si el anticuerpo se une o no, además, a otras moléculas o formas modificadas del TLT-1 que carecen de la parte de interés.

Los "fragmentos" de polipéptidos o anticuerpos de acuerdo con pueden hacerse mediante truncamiento de los anticuerpos monoclonales correspondientes, por ejemplo, mediante la eliminación de uno o más aminoácidos de los extremos N y/o C terminal de un polipéptido. Hasta 10, hasta 20, hasta 30, hasta 40 o más aminoácidos pueden eliminarse del N y/o C terminal de esta manera. Los fragmentos pueden generarse, además, mediante una o más deleciones internas.

"Epítipo", en la presente descripción, se refiere al área o región en un antígeno (Ag), que es una estructura molecular sobre la superficie de una plaqueta activada, a la que la porción del anticuerpo (Ab) de la proteína procoagulante es capaz de unirse específicamente, es decir, el área o región que está en contacto físico con el Ab. Un epítipo de un antígeno puede comprender residuos de aminoácidos en el Ag que se involucran directamente en la unión al Ab (componente inmunodominante del epítipo) y otros residuos de aminoácidos, que no se involucran directamente en la unión, tales como los residuos de aminoácidos del Ag bloqueados eficazmente por el Ab (en otras palabras, el residuo de aminoácido está dentro de la "superficie excluida al solvente" y/o la "huella" del Ab). El término epítipo, en la presente descripción, incluye ambos tipos de sitios de unión dentro de cualquier región particular de un receptor, tal como TLT-1, que se une específicamente a un anticuerpo anti-TLT-1, o fragmento de este, a menos que se indique de cualquier otra manera (por ejemplo, en algunos contextos la invención se refiere a anticuerpos que se unen directamente a residuos de aminoácidos particulares). Los receptores tales como el TLT-1 pueden comprender una cantidad de epítipos diferentes, que pueden incluir, sin limitación, (1) epítipos peptídicos lineales, (2) epítipos conformacionales que incluyen uno o más aminoácidos no contiguos ubicados cerca entre sí en la conformación del receptor maduro; y (3) epítipos postraduccionales que incluyen, ya sea en su totalidad o en parte, estructuras moleculares unidas covalentemente al TLT-1, tales como grupos carbohidrato.

El epítipo para un par anticuerpo (Ab)/antígeno (Ag) dado puede definirse y caracterizarse a niveles diferentes de detalle mediante el uso de una variedad de métodos experimentales y computacionales de mapeo de epítipos. Los métodos experimentales incluyen mutagénesis, cristalografía de rayos X, espectroscopía de Resonancia Magnética Nuclear (NMR), Espectrometría de Masa de Intercambio Hidrógeno-Deuterio (HX-MS) y diversos métodos de unión por competencia. Como cada método depende de un principio único, la descripción de un epítipo se une íntimamente al método mediante el cual se ha determinado. Por lo tanto, el epítipo para un par Ab/Ag dado se definirá de manera diferente en dependencia del método de mapeo de epítipos empleado.

A su nivel más detallado, el epítipo para la interacción entre el Ag y el Ab puede definirse mediante las coordenadas espaciales que definen los contactos atómicos presentes en la interacción Ag-Ac, así como también la información acerca de sus contribuciones relativas a las termodinámicas de unión. A un nivel menos detallado, el epítipo puede caracterizarse mediante las coordenadas espaciales que definen los contactos atómicos entre el Ag y el Ab. A un nivel aún menos detallado, el epítipo puede caracterizarse mediante los residuos de aminoácidos que comprende como se define por un criterio específico, por ejemplo, la distancia entre átomos en el Ab y el Ag. A un nivel aún menos detallado, el epítipo puede caracterizarse a través de la función, por ejemplo, mediante la unión por competencia con otros Ab. Además, el epítipo puede definirse más genéricamente como que comprende residuos de aminoácidos cuya sustitución por otro aminoácido alterará las características de la interacción entre el Ab y el Ag.

En el contexto de una estructura cristalina derivada por rayos X definida por coordenadas espaciales de un complejo entre un Ab, por ejemplo, un fragmento Fab, y su Ag, el término epítipo en la presente descripción, a menos que se especifique de cualquier otra manera o se contradiga por el contexto, se define específicamente, como residuos del receptor de plaquetas caracterizado por tener un átomo pesado (es decir, un átomo que no es hidrógeno) dentro de una distancia de 4 Å a partir de un átomo pesado en el Ab.

A partir del hecho de que las descripciones y definiciones de epítipos, en dependencia del método de mapeo de epítipos usado, se obtienen a niveles diferentes de detalle, se deduce que la comparación de epítipos para Ab diferentes en el mismo Ag puede conducirse de manera similar en niveles diferentes de detalle.

Se dice que los epítipos descritos en el nivel de aminoácido, por ejemplo, determinados a partir de una estructura por rayos X, son idénticos si contienen el mismo conjunto de residuos de aminoácidos. Se dice que los epítipos se solapan si los epítipos comparten al menos un aminoácido. Se dice que los epítipos son separados (únicos) si los epítipos no comparten ningún residuo de aminoácido.

Se dice que los epítipos caracterizados por unión de competencia se solapan si la unión de los Ab correspondientes son mutuamente excluyentes, es decir, si la unión de un Ab excluye la unión simultánea del otro Ab. Se dice que los epítipos son separados (únicos) si el Ag es capaz de acomodar la unión de ambos Ab correspondientes simultáneamente. Además, existen casos en los que uno o más anticuerpos no tienen epítipos solapados pero no pueden unirse simultáneamente. Debido a la estructura terciaria y cuaternaria de un antígeno, un anticuerpo puede no ser capaz de acceder a su epítipo debido a la unión previa de otro anticuerpo.

Las proteínas procoagulantes pueden ser capaces de unirse al mismo epítipo que el mAb0012. Las proteínas procoagulantes pueden ser capaces de unirse al mismo epítipo que el mAb0023. Las proteínas procoagulantes pueden ser capaces de unirse al mismo epítipo que el mAb0051. Las proteínas procoagulantes pueden ser capaces de unirse al mismo epítipo que el mAb0061. Las proteínas procoagulantes pueden ser capaces de unirse al mismo epítipo que el mAb0062. Las proteínas procoagulantes pueden ser capaces de unirse al mismo epítipo que el mAb0082.

El epítipo puede comprender uno o más residuos seleccionados del grupo que consiste en K133, I134, G135, S136, L137, A138, N140, A141, F142, S143, D144, P145 y A146 de la SEQ ID NO: 4 (que corresponden a K133, I134, G135, S136, L137, A138, N140, A141, F142, S143, D144, P145 y A146 de la SEQ ID NO: 2).

El epítipo puede comprender uno o más residuos seleccionados del grupo que consiste en V17, Q18, C19, H20, Y21, R22, L23, Q24, D25, V26, K27, A28, L63, G64, G65, G66, L67, L68, G89, A90, R91, G92, P93, Q94, I95 y L96 de la SEQ ID NO: 5 (que corresponden a V36, Q37, C38, H39, Y40, R41, L42, Q43, D44, V45, K46, A47, L82, G83, G84, G85, L86, L87, G108, A109, R110, G111, P112, Q113, I114 y L115 de la SEQ ID NO: 2).

El epítipo puede comprender uno o más residuos seleccionados del grupo que consiste en L36, P37, E38, G39, C40, Q41, P42, L43, V44, S45, S46, A47, V73, T74, L75, Q76, E77, E78, D79, A80, G81, E82, Y83, G84, C85, M86, R91, G92, P93, Q94, I95, L96, H97, R98, V99, S100 y L101 de la SEQ ID NO: 5 (que corresponde a L55, P56, E57, G58, C59, Q60, P61, L62, V63, S64, S65, A66, V92, T93, L94, Q95, E96, E97, D98, A99, G100, E101, Y102, G103, C104, M105, R110, G111, P112, Q113, I114, L115, H116, R117, V118, S119 y L120 de la SEQ ID NO: 2).

El epítipo puede comprender uno o más residuos seleccionados del grupo que consiste en V17, Q18, C19, H20, Y21, R22, L23, Q24, D25, K27, A28, R91, G92, P93, Q94, I95, L96, H97, R98, V99, S100 y L101 de la SEQ ID NO: 5 (que corresponde a V36, Q37, C38, H39, Y40, R41, L42, Q43, D44, V45, K46, A47, R110, G111, P112, Q113, I114, L115, H116, R117, V118, S119 y L120 de la SEQ ID NO: 2).

El epítipo puede comprender uno o más residuos seleccionados del grupo que consiste en E5, T6, H7, K8, I9, G10, S11, L12, A13, E14, N15, A16, F17, S18, D19 y P20 de la SEQ ID NO: 7 (que corresponde a E130, T131, H132, K133, I134, G135, S136, L137, A138, E139, N140, A141, F142, S143, D144 y P145 de la SEQ ID NO: 2).

El epítipo puede comprender uno o más residuos seleccionados del grupo que consiste en K8, I9, G10, S11, L12, A13, N15, A16, F17, S18, D19, P20 y A21 de la SEQ ID NO: 7 (que corresponden a K133, I134, G135, S136, L137, A138, N140, A141, F142, S143, D144, P145 y A146 de la SEQ ID NO: 2).

La definición del término "paratopo" se deriva de la definición anterior de "epítopo" al invertir la perspectiva. Por lo tanto, el término "paratopo" se refiere al área o región en el Ab al que se une específicamente un Ag, es decir, a la que hace contacto físico con el Ag.

5 El paratopo puede comprender uno o más residuos seleccionados del grupo que consiste en H50, N52, Y56, H58, Y73, F79, S115, T116, V118 y Y120 de la cadena ligera (L) anti-TLT-1 (SEQ ID NO: 33), y residuos V20, F45, R49, Y50, W51, E68, T75, N77, S116, G117, V118 y T120 de la cadena pesada (H) anti-TLT-1 (SEQ ID NO: 32).

10 En el contexto de una estructura cristalina derivada por rayos X definida por coordenadas espaciales de un complejo entre un Ab, por ejemplo, un fragmento Fab, y su antígeno, el término paratopo en la presente descripción, a menos que se especifique de cualquier otra manera o se contradiga por el contexto, se define específicamente, como residuos de Ag caracterizados por tener un átomo pesado (es decir, un átomo que no es hidrógeno) dentro de una distancia de 4 Å a partir de un átomo pesado en el receptor de plaquetas.

15 El epítopo y paratopo para un par anticuerpo (Ab)/antígeno (Ag) dado puede identificarse mediante métodos de rutina. Por ejemplo, la ubicación general de un epítopo puede determinarse mediante la evaluación de la capacidad de un anticuerpo para unirse a fragmentos o variantes diferentes del TLT-1. Los aminoácidos específicos dentro del TLT-1 que hacen contacto con un anticuerpo (epítopo) y los aminoácidos específicos en un anticuerpo que hacen contacto con el TLT-1 (paratopo) también pueden determinarse mediante el uso de métodos de rutina, tales como los descritos en los ejemplos. Por ejemplo, el anticuerpo y la molécula objetivo pueden combinarse y el complejo Ab/Ag puede cristalizarse. La estructura cristalina del complejo puede determinarse y usarse para identificar sitios específicos de interacción entre el anticuerpo y su objetivo.

25 Las proteínas de fusión que comprenden un anticuerpo o fragmento de este también pueden definirse en términos de sus regiones determinantes de la complementariedad (CDR). El término "región determinante de la complementariedad" o "región hipervariable", en la presente descripción, se refiere a los residuos de aminoácidos de un anticuerpo que son responsables de la unión al antígeno. Las regiones determinantes de la complementariedad o "CDR" se componen generalmente de residuos de aminoácidos 24-34 (L1), 50-56 (L2) y 89-97 (L3) en el dominio variable de cadena ligera y 31-35 (H1), 50-65 (H2) y 95-102 (H3) en el dominio variable de cadena pesada; (Kabat y otros (1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest, Quinta Edición, U.S. Department of Health and Human Services, publicación de NIH Núm. 91-3242) y/o los residuos de un "bucle hipervariable" (residuos 26-32 (L1), 50-52 (L2) y 91-96 (L3) en el dominio variable de cadena ligera y 26-32 (H1), 53-55 (H2) y 96-101 (H3) en el dominio variable de cadena pesada; Chothia y Lesk, J. Mol. Biol 1987;196:901-917). Típicamente, la numeración de los residuos de aminoácidos en esta región se realiza mediante el método descrito en Kabat y otros, más arriba. Las frases tales como "posición Kabat", "residuo Kabat", y "de acuerdo con Kabat", en la presente descripción, se refieren a este sistema de numeración para dominios variables de cadena pesada o dominios variables de cadena ligera. Mediante el uso del sistema de numeración de Kabat, la secuencia de aminoácidos lineal real de un péptido puede contener menos aminoácidos o aminoácidos adicionales que corresponden a un acortamiento de, o inserción en, una FR o CDR del dominio variable. Por ejemplo, un dominio variable de cadena pesada puede incluir inserciones de aminoácidos (residuos 52a, 52b y 52c, de acuerdo con Kabat) después del residuo 52 de CDR H2 y residuos insertados (por ejemplo, residuos 82a, 82b, y 82c, etcétera, de acuerdo con Kabat) después del residuo 82 de la FR de cadena pesada. La numeración de Kabat de los residuos puede determinarse para un anticuerpo dado mediante alineación en regiones de homología de la secuencia del anticuerpo con una secuencia "estándar" numerada según Kabat.

45 Los términos "región marco" o residuos "FR" se refieren a los residuos de aminoácidos VH o VL que no están dentro de las CDR, como se define en la presente descripción.

En una modalidad, la cadena pesada de un anticuerpo, o fragmento de este, para las proteínas procoagulantes descritas en la presente descripción comprende:

- 50
- una secuencia CDR1 de los aminoácidos 50 a 54 (DYFMY) de la SEQ ID NO: 34, en donde uno de estos aminoácidos puede sustituirse por un aminoácido diferente; y/o
 - una secuencia CDR2 de los aminoácidos 69 a 85 (YISNGGDSSSYPTVKG) de la SEQ ID NO: 34, en donde uno, dos, tres o cuatro de estos aminoácidos pueden sustituirse por un aminoácido diferente; y/o
 - una secuencia CDR3 de los aminoácidos 118 a 129 (NKNWDDYIDMDY) de la SEQ ID NO: 34, en donde uno, dos o tres de estos aminoácidos pueden sustituirse por un aminoácido diferente.

60 En otra modalidad, la cadena ligera de un anticuerpo, o fragmento de este, para las proteínas procoagulantes descritas en la presente descripción comprende:

- 65
- una secuencia CDR1 de los aminoácidos 44 a 60 (KSSQSLNLSRTRKNYLA) de la SEQ ID NO: 35, en donde uno, dos, tres o cuatro de estos aminoácidos pueden sustituirse con un aminoácido diferente; y/o

ES 2 757 930 T3

- una secuencia CDR2 de los aminoácidos 76 a 82 (WASTRES) de la SEQ ID NO: 35, en donde uno o dos de estos aminoácidos pueden sustituirse con un aminoácido diferente; y/o

5

- una secuencia CDR3 de los aminoácidos 115 a 122 (KQSYNLLT) de la SEQ ID NO: 35, en donde uno o dos de estos aminoácidos pueden sustituirse con un aminoácido diferente.

En otra modalidad, la cadena pesada de un anticuerpo, o fragmento de este, para las proteínas procoagulantes descritas en la presente descripción comprende:

10

- una secuencia CDR1 de los aminoácidos 50 a 54 (DYSMH) de la SEQ ID NO: 36, en donde uno de estos residuos de aminoácidos puede sustituirse por un aminoácido diferente; y/o

15

- una secuencia CDR2 de los aminoácidos 69 a 85 (VISTYYGDVRYNPKFKG) de la SEQ ID NO: 36, en donde uno, dos, tres o cuatro de estos aminoácidos pueden sustituirse por un aminoácido diferente; y/o

- una secuencia CDR3 de los aminoácidos 118 a 129 (APMITTGAWFAY) de la SEQ ID NO: 36, en donde uno, dos o tres de estos aminoácidos pueden sustituirse por un aminoácido diferente.

20

En otra modalidad, la cadena ligera de un anticuerpo, o fragmento de este, para las proteínas procoagulantes descritas en la presente descripción comprende:

- una secuencia CDR1 de los aminoácidos 44 a 54 (KASQSVSNDVA) de la SEQ ID NO: 37, en donde uno, dos o tres de estos aminoácidos pueden sustituirse con un aminoácido diferente; y/o

25

- una secuencia CDR2 de los aminoácidos 70 a 76 (YASSRYT) de la SEQ ID NO: 37, en donde uno o dos de estos aminoácidos pueden sustituirse con un aminoácido diferente; y/o

30

- una secuencia CDR3 de los aminoácidos 109 a 117 (QQDYSSPYT) de la SEQ ID NO: 37, en donde uno o dos de estos aminoácidos pueden sustituirse con un aminoácido diferente.

En otra modalidad, la cadena pesada de un anticuerpo, o fragmento de este, para las proteínas procoagulantes descritas en la presente descripción comprende:

35

- una secuencia CDR1 de los aminoácidos 50 a 54 (SHWIE) de la SEQ ID NO: 42, en donde uno de estos aminoácidos puede sustituirse por un aminoácido diferente; y/o

- una secuencia CDR2 de los aminoácidos 69 a 85 (EILPGSGNTNYNEKFKG) de la SEQ ID NO: 42, en donde uno, dos, tres o cuatro de estos aminoácidos pueden sustituirse por un aminoácido diferente; y/o

40

- una secuencia CDR3 de los aminoácidos 118 a 130 (GYYGLNYDWYFDV) de la SEQ ID NO: 42, en donde uno, dos o tres de estos aminoácidos pueden sustituirse por un aminoácido diferente.

En otra modalidad, la cadena ligera de un anticuerpo, o fragmento de este, para las proteínas procoagulantes descritas en la presente descripción comprende:

45

- una secuencia CDR1 de los aminoácidos 44 a 54 (RASQDISNYLN) de la SEQ ID NO: 39, en donde uno, dos o tres de estos aminoácidos pueden sustituirse con un aminoácido diferente; y/o

50

- una secuencia CDR2 de los aminoácidos 70 a 76 (YTSRLHS) de la SEQ ID NO: 39, en donde uno o dos de estos aminoácidos pueden sustituirse con un aminoácido diferente; y/o

- una secuencia CDR3 de los aminoácidos 109 a 117 (QQDTKLPYT) de la SEQ ID NO: 39, en donde uno o dos de estos aminoácidos pueden sustituirse con un aminoácido diferente.

55

En otra modalidad, la cadena pesada de un anticuerpo, o fragmento de este, para las proteínas procoagulantes descritas en la presente descripción comprende:

- una secuencia CDR1 de los aminoácidos 49 a 53 (RYWMT) de la SEQ ID NO: 40, en donde uno de estos aminoácidos puede sustituirse por un aminoácido diferente; y/o

60

- una secuencia CDR2 de los aminoácidos 68 a 84 (EINPDSSTINYNPSLKD) de la SEQ ID NO: 40, en donde uno, dos, tres o cuatro de estos aminoácidos pueden sustituirse por un aminoácido diferente; y/o

- una secuencia CDR3 de los aminoácidos 117 a 121 (GVFTS) de la SEQ ID NO: 40, en donde uno, dos o tres de estos aminoácidos pueden sustituirse por un aminoácido diferente.

65

En otra modalidad, la cadena ligera de un anticuerpo, o fragmento de este, para las proteínas procoagulantes descritas en la presente descripción comprende:

- 5 • una secuencia CDR1 de los aminoácidos 43 a 58 (RSSQLVHRNGNTYFH) de la SEQ ID NO: 41, en donde uno, dos, tres o cuatro de estos aminoácidos pueden sustituirse con un aminoácido diferente; y/o
- una secuencia CDR2 de los aminoácidos 74 a 80 (KVSNRFS) de la SEQ ID NO: 41, en donde uno o dos de estos aminoácidos pueden sustituirse con un aminoácido diferente; y/o
- 10 • una secuencia CDR3 de los aminoácidos 113 a 121 (SQSTHVPYT) de la SEQ ID NO: 41, en donde uno o dos de estos aminoácidos pueden sustituirse con un aminoácido diferente.

En otra modalidad, la cadena pesada de un anticuerpo, o fragmento de este, para las proteínas procoagulantes descritas en la presente descripción comprende:

- 15 • una secuencia CDR1 de los aminoácidos 49 a 53 (RYWMT) de la SEQ ID NO: 32, en donde uno de estos aminoácidos puede sustituirse por un aminoácido diferente; y/o
- una secuencia CDR2 de los aminoácidos 68 a 84 (EINPDSSTINYTPSLKD) de la SEQ ID NO: 32, en donde uno, dos, tres o cuatro de estos aminoácidos pueden sustituirse por un aminoácido diferente; y/o
- 20 • una secuencia CDR3 de los aminoácidos 117 a 121 (GVFTS) de la SEQ ID NO: 32, en donde uno, dos o tres de estos aminoácidos pueden sustituirse por un aminoácido diferente.

25 En otra modalidad, la cadena ligera de un anticuerpo, o fragmento de este, para las proteínas procoagulantes descritas en la presente descripción comprende:

- una secuencia CDR1 de los aminoácidos 43 a 58 (RSSQLVHRNGNTYFH) de la SEQ ID NO: 33, en donde uno, dos, tres o cuatro de estos aminoácidos pueden sustituirse con un aminoácido diferente; y/o
- 30 • una secuencia CDR2 de los aminoácidos 74 a 80 (KVSNRFS) de la SEQ ID NO: 33, en donde uno o dos de estos aminoácidos pueden sustituirse con un aminoácido diferente; y/o
- una secuencia CDR3 de los aminoácidos 113 a 121 (SQSTHVPYT) de la SEQ ID NO: 33, en donde uno o dos de estos aminoácidos pueden sustituirse con un aminoácido diferente.
- 35

Los anticuerpos monoclonales, o fragmentos de estos, para las proteínas procoagulantes descritas en la presente descripción pueden ser variantes de glicosilación. Las variantes de glicosilación de anticuerpos son variantes en las que se altera el patrón de glicosilación de un anticuerpo. Por alteración se entiende eliminar uno o más restos de carbohidratos encontrados en el anticuerpo, añadir uno o más restos de carbohidratos al anticuerpo, cambiar la composición de glicosilación (patrón de glicosilación), el grado de glicosilación.

Los anticuerpos se glicosilan en posiciones conservadas en sus regiones constantes (Jefferis y Lund, *Chem. Immunol.* 1997; 65:111-128; Wright y Morrison, *Trends Biotechnol.* 1997; 15:26-32). Las cadenas laterales de oligosacárido de las inmunoglobulinas pueden afectar la función de una proteína (Boyd y otros, *Mol. Immunol.* 1996; 32:1311-1318), y la interacción intramolecular entre porciones de la glicoproteína puede afectar la conformación y la superficie tridimensional presentada de la glicoproteína. Los oligosacáridos pueden servir, además, para dirigir una glicoproteína dada a determinadas moléculas basado en estructuras de reconocimiento específicas. Por ejemplo, se ha informado que en la IgG agalactosilada, el resto de oligosacárido "salta" fuera del espacio inter-CH₂ y los residuos de N-acetilglucosamina terminales se vuelven disponibles para unirse a la proteína de unión de la manosa (Malhotra y otros, *Nature Med.* 1995; 1:237-243). La eliminación por glicopeptidasa de los oligosacáridos de CAMPATH-1H (un anticuerpo IgG1 monoclonal murino recombinante humanizado que reconoce el antígeno CDw52 de los linfocitos humanos) producidos en células de ovario de hámster chino (CHO) resultó en una reducción completa en la lisis mediada por el complemento (CMCL) (Boyd y otros, *Mol. Immunol.* 1996; 32:1311-1318), mientras que la eliminación selectiva de residuos de ácido siálico mediante el uso de neuraminidasa no produjo pérdida de DMCL. Se ha informado, además, que la glicosilación de anticuerpos afecta la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC). En particular, las células CHO con expresión regulada por tetraciclina de $\beta(1,4)$ -N-acetilglucosaminiltransferasa III (GnTIII), una formación catalizadora de glicosiltransferasa de GlcNAc de bisección, se informó que tiene una actividad aumentada de ADCC (Umana y otros. *Nature Biotech.* 1999; 17:176-180).

La glicosilación de anticuerpos es típicamente ligada a N o ligada a O. Ligada a N se refiere a la unión del resto carbohidrato a la cadena lateral de un residuo de asparagina. Las secuencias de tripéptidos asparagina-X-serina y asparagina-X-treonina, donde X es cualquier aminoácido excepto prolina, son las secuencias de reconocimiento para la unión enzimática del resto carbohidrato a la cadena lateral de la asparagina. Por lo tanto, la presencia de cualquiera de estas secuencias de tripéptidos en un polipéptido crea un sitio de glicosilación potencial. La glicosilación ligada a

O se refiere a la unión de uno de los azúcares N-aceilgalactosamina, galactosa, o xilosa a un ácido hidroxiamino, más comúnmente serina o treonina, aunque también puede usarse 5-hidroxiprolina o 5-hidroxilisina.

La adición de sitios de glicosilación al anticuerpo se logra convenientemente mediante la alteración de la secuencia de aminoácidos de manera que contenga una o más de las secuencias de tripéptidos descritas anteriormente (para sitios de glicosilación ligados a N). Además, la alteración también puede hacerse mediante la adición de, o sustitución por, uno o más residuos de serina o treonina a la secuencia del anticuerpo original (para sitios de glicosilación ligados a O). De manera similar, la eliminación de sitios de glicosilación puede lograrse mediante la alteración de aminoácidos dentro de los sitios de glicosilación naturales del anticuerpo.

La secuencia de aminoácidos se altera generalmente mediante la alteración de la secuencia de ácidos nucleicos subyacente. Las moléculas de ácido nucleico que codifican variantes de secuencias de aminoácidos de un anticuerpo TLT-1 se preparan mediante una variedad de métodos conocidos en la técnica. Estos métodos incluyen el aislamiento a partir de una fuente natural (en el caso de variantes de secuencias de aminoácidos de origen natural) o la preparación mediante mutagénesis mediada por oligonucleótidos (o dirigida a un sitio), mutagénesis por PCR, y mutagénesis por casete de una variante preparada anteriormente o una versión no variante del anticuerpo TLT-1.

La glicosilación (lo que incluye el patrón de glicosilación) de anticuerpos puede alterarse, además, sin alterar la secuencia de aminoácidos o la secuencia de nucleótidos subyacente. La glicosilación depende en gran medida de la célula huésped usada para expresar el anticuerpo. Dado que el tipo de célula usada para la expresión de glicoproteínas recombinantes, por ejemplo, anticuerpos, como productos terapéuticos potenciales rara vez es la célula natural, pueden esperarse variaciones significativas en el patrón de glicosilación de los anticuerpos (ver, por ejemplo, Hse y otros, *J. Biol. Chem.* 1997; 272:9062-9070). Además de la elección de las células huésped, los factores que afectan la glicosilación durante la producción recombinante de anticuerpos incluyen el modo de crecimiento, la formulación de los medios, la densidad de cultivo, la oxigenación, el pH y los esquemas de purificación. Se han propuesto diversos métodos para alterar el patrón de glicosilación logrado en un organismo huésped particular, lo que incluye introducir o sobreexpresar determinadas enzimas implicadas en la producción de oligosacáridos (patentes de los Estados Unidos Núms. 5,047,335; 5,510,261 y 5,278,299). La glicosilación, o determinados tipos de glicosilación, puede eliminarse enzimáticamente de la glicoproteína, por ejemplo, mediante el uso de endoglicosidasa H (Endo H). Además, la célula huésped recombinante puede modificarse por ingeniería genética, por ejemplo, hacerla defectuosa en el procesamiento de determinados tipos de polisacáridos. Estas y técnicas similares se conocen bien en la técnica.

La estructura de glicosilación de anticuerpos puede analizarse fácilmente mediante técnicas convencionales de análisis de carbohidratos, lo que incluye cromatografía de lectina, NMR, espectrometría de masas, HPLC, GPC, análisis composicional de monosacárido, digestión enzimática secuencial y HPAEC-PAD, que usa cromatografía de intercambio aniónico a pH elevado para separar oligosacáridos en base a la carga. Los métodos para liberar oligosacáridos para propósitos analíticos también se conocen, e incluyen, sin limitación, tratamiento enzimático, eliminación mediante el uso de un ambiente alcalino duro para liberar principalmente estructuras ligadas a O, y métodos químicos mediante el uso de hidrazina anhidra para liberar oligosacáridos ligados a N y a O.

Además de su porción de unión al TLT-1, que implica un anticuerpo monoclonal o fragmento de este, las proteínas procoagulantes descritas en la presente descripción comprenden además un componente del factor de coagulación, cuya función es regular positivamente la coagulación de la sangre en los alrededores de la plaqueta activada.

Los factores de coagulación de las proteínas de fusión procoagulantes o los conjugados descritos en la presente descripción pueden estar en su forma inactiva o en su forma activada. El factor de coagulación puede ser una serina proteasa, en cuyo caso la forma inactiva del factor de coagulación corresponde a la forma zymógena y la forma activada corresponde a la forma activa catalíticamente. El factor de coagulación puede ser un polipéptido del FVII (FVII o FVIIa), un polipéptido del FVIII (es decir, FVIII o FVIIIa), un polipéptido del FIX (FIX o FIXa), un polipéptido del FX (FX o FXa) o un polipéptido del FXI (FXI o FXIa). Los polipéptidos del FVII, FVIII, FIX, FX y FXI de la presente invención incluyen, además, variantes, tales como variantes truncadas, y derivados de dichos factores de coagulación. Las variantes de FVII, FIX, FX y FXI incluirán variantes des-Gla truncadas, es decir, variantes de dichos factores de coagulación que carecen del dominio Gla responsable de la interacción con las membranas fosfolipídicas de dichos factores de coagulación.

Si el factor de coagulación es un polipéptido de FVII, el componente FVII puede ser capaz de unirse al factor tisular y es, preferentemente, capaz de escindir FIX o FX. Si el factor de coagulación es un polipéptido de FVIII, el componente FVIII es, preferentemente, capaz de unirse a FIXa y apoyar la escisión de FX. Si el factor de coagulación es un polipéptido de FIXa, es, preferentemente, capaz de escindir FX. Si el factor de coagulación es FXa, entonces es, preferentemente, capaz de escindir protrombina (FII). Si el factor de coagulación es un polipéptido de FXIa entonces es, preferentemente, capaz de escindir FIX.

En una modalidad particular, el factor de coagulación es un polipéptido de FV. El factor V se sintetiza por el hígado y el Factor V secretado circula en plasma como un polipéptido de cadena única de 330 kDa que es el procoagulante inactivo (Huang y otros (2008) *Haemophilia* 14: 1164-9). FV se compone de 2196 aminoácidos, lo que incluye un péptido señal de 28 aminoácidos. Se compone de seis dominios A1 (Aa 30-329), A2 (Aa 348-684), B (Aa 692-1573),

- A3 (Aa 1578-1907), C1 (Aa 1907-2061), y C2 (Aa 2066-2221). Los dominios A y C de las dos proteínas son aproximadamente 40 % homólogos con los dominios equivalentes del FVIII, pero los dominios B no se conservan. Como es el caso con el FVIII, la actividad del FV se regula estrechamente a través de proteólisis específica del sitio. La trombina, y en menor medida el Factor Xa (FXa), es responsable primariamente de la activación del FV a través de escisiones proteolíticas en las posiciones Arg⁷⁰⁹-Ser⁷¹⁰, Arg¹⁰¹⁸-Thr¹⁰¹⁹ y Arg¹⁵⁴⁵-Ser¹⁵⁴⁶. Estas escisiones liberan el dominio B y crean una molécula dimérica compuesta de una cadena pesada de 105 kDa que contiene los dominios A1 y A2 y una cadena ligera de 71 a 74 kDa que contiene los dominios A3, C1 y C2. Estas dos cadenas se mantienen juntas por calcio en los residuos Asp¹³⁹ y Asp¹⁴⁰ y por interacciones hidrófobas. La cadena pesada proporciona los contactos tanto para FXa como para la protrombina, mientras que los dos dominios C en la cadena ligera son necesarios para la interacción del FVa con la superficie fosfolipídica. Por lo tanto, el Factor V es activo como un cofactor para el FXa del complejo de la trombinasa y la enzima FXa activada requiere calcio y FVa para convertir la protrombina a trombina en la membrana de la superficie celular. El dominio A3 en la cadena ligera se implica tanto en interacciones FXa como fosfolipídicas. En conjunto, las dos cadenas FVa unen al FXa con la superficie fosfolipídica formada por el tapón de plaquetas en el sitio de lesión y permiten que FXa se una de manera eficiente y escinda la protrombina para generar trombina. El Factor V es capaz de unirse a plaquetas activadas. Aunque el FV se encuentra predominantemente como un componente soluble en el plasma sanguíneo, una fracción del FV está presente, además, en el gránulo α de plaquetas, lo que es importante para la hemostasia normal como se evidencia por la deficiencia del Factor V específico de plaquetas (Janeway y otros (1996) Blood 87: 3571-8).
- Una secuencia del Factor V humano de tipo silvestre se proporciona en la SEQ ID NO: 155. El término "polipéptido del Factor V", en la presente descripción, se refiere a moléculas del Factor V de tipo silvestre así como también a variantes del FV, derivados del FV y conjugados del FV. Dichas variantes, derivados y conjugados pueden exhibir sustancialmente la misma actividad biológica, o mejorada, con relación al Factor V humano de tipo silvestre.
- El Factor V puede derivarse de plasma o producirse de manera recombinante, mediante el uso de métodos de producción y purificación bien conocidos. El grado y ubicación de la glicosilación, gammacarboxilación y otras modificaciones postraduccionales puede variar en dependencia de la célula huésped elegida y sus condiciones de crecimiento.
- Los polipéptidos del Factor V pueden analizarse mediante el uso de ensayos de coagulación disponibles comercialmente, tales como el ensayo *in vitro* Hemoclot Factor V Reagent (Aniara, Ohio, EE.UU.: Núm. de Cat. ACK071K).
- En una modalidad particular, el factor de coagulación es un polipéptido FVIIa. El Factor VII (FVII) es una glicoproteína producida principalmente en el hígado. La proteína madura se compone de 406 residuos de aminoácidos y se compone de cuatro dominios según se definió por homología. Existe un dominio Gla N-terminal seguido de dos dominios similares al factor de crecimiento epidérmico (EGF) y un dominio de serina proteasa C-terminal. El FVII circula en plasma como una molécula de cadena simple. Tras activarse hacia FVII activado (FVIIa), la molécula es hendida entre los residuos Arg¹⁵² e Ile¹⁵³, lo que resulta en una proteína bicatenaria mantenida unida por un enlace disulfuro. La cadena ligera contiene los dominios Gla y similares a EGF, mientras que la cadena pesada es el dominio de proteasa. El FVIIa requiere la unión a su factor tisular cofactor de superficie celular para volverse completamente activo biológicamente.
- El término "Factor VII(a)", en la presente descripción, abarca el zimógeno no hendido, el Factor VII, así como también la proteasa hendida y por lo tanto activada, el Factor VIIa. El "Factor VII(a)" incluye variantes alélicas naturales del FVII(a) que pueden existir y producirse de un individuo a otro. Una secuencia del Factor VIIa humano de tipo silvestre se proporciona en la SEQ ID NO: 157, así como también en Proc Natl Acad Sci EE.UU. 1986; 83:2412-2416.
- El término "polipéptido del Factor VII(a)", en la presente descripción, se refiere a moléculas del Factor VIIa de tipo silvestre, así como también a variantes del FVII(a), derivados del FVII(a) y conjugados del FVII(a). Dichas variantes, derivados y conjugados pueden exhibir sustancialmente la misma actividad biológica, o mejorada, con relación al Factor VIIa humano de tipo silvestre.
- El término "variante del FVII(a)", como se usa en la presente descripción, pretende designar el Factor FVII que tiene la secuencia de la SEQ ID NO: 157, en donde uno o más aminoácidos de la proteína parental se han sustituido por otro aminoácido y/o en donde uno o más aminoácidos de la proteína parental se han eliminado y/o en donde uno o más aminoácidos se han insertado en la proteína y/o en donde uno o más aminoácidos se han añadido a la proteína parental. Dicha adición puede tener lugar ya sea en el extremo N terminal o en el extremo C terminal de la proteína parental o en ambos. El "análogo" o "análogos" dentro de esta definición todavía tiene actividad FVII en su forma activada. En una modalidad, una variante es al menos 90 % idéntica con la secuencia de la SEQ ID NO: 157. En otra modalidad, una variante es al menos 95 %, tal como al menos 96 %, tal como al menos 97 %, tal como al menos 98 %, tal como al menos 99 % idéntica con la secuencia de la SEQ ID NO: 157. Como se usa en la presente descripción, cualquier referencia a una posición específica se refiere a la posición correspondiente en la SEQ ID NO: 157.
- Los ejemplos no limitantes de variantes del FVII(a) que tienen sustancialmente la misma o mayor actividad proteolítica en comparación con el Factor VII(a) humano de tipo silvestre recombinante incluyen los descritos en los documentos

WO 01/83725, WO 02/22776, WO 02/077147, WO 03/037932, WO 04/029090, WO 05/024006, WO 07/031559 y EP 05108713.8, US 7173000 B2 y JP4451514 B2.

5 El término "actividad biológica mejorada" se refiere a polipéptidos del FVII(a) que muestran i) sustancialmente la misma o mayor actividad proteolítica en comparación con el Factor VIIa humano de tipo silvestre recombinante en presencia y/o ausencia del factor tisular o ii) a polipéptidos del FVII(a) con sustancialmente la misma o mayor afinidad por TF en comparación con el Factor VIIa humano de tipo silvestre recombinante o iii) a polipéptidos del FVII(a) con sustancialmente la misma o mayor vida media en plasma en comparación con el Factor VIIa humano de tipo silvestre recombinante, o iv) a polipéptidos del FVII(a) con sustancialmente la misma o mayor afinidad por la plaqueta activada.
10 La actividad biológica de un polipéptido FVIIa puede medirse mediante el uso de una variedad de ensayos conocidos por el experto en la técnica, tales como los ensayos de hidrólisis *in vitro* y proteólisis *in vitro* descritos en los ejemplos 26 y 27.

15 El FVII(a) puede derivarse de plasma o producirse de manera recombinante, mediante el uso de métodos de producción y purificación bien conocidos. El grado y ubicación de la glicosilación, gammacarboxilación y otras modificaciones postraduccionales puede variar en dependencia de la célula huésped elegida y sus condiciones de crecimiento.

20 Los residuos gammacarboxilados en la secuencia FVII más abajo se representan por "γ".

SEQ ID NO: 157: Factor VII de coagulación humano de tipo silvestre

ANAFLYLVRPGSLYRYCKYYQCSFYARVIFKDAYRTKLFWISYSDGDCASSPCQNGGSCDQLQSYICF

25 CLPAFEGRNCETHKDDQLICVNENGGCEQYCSHTGTGRSCRCHEGYSLLDGVSTPTVEYPCIP

ILEKNASKPQGRIVGGKVC PKGECPWQVLLLVNGAQLCGGTLINTIWWVSAAHCFKIKNWRNLI AVL

30 GEHDLSEHDGDEQSRRVAQVIIPSTYVPGTTNHDIALRLHQPVVLTDHVPLCLPERTFSERTLAFV

RFSLVSGWGQLLDRGATALEMLVLPRLMTQDCLQSRKVGDSPNITEYMFCA GYSDGSKD SCK

GDSGGPHATHYRGTWYLTGIVSWGQCAVGHFGVYTRV SQYIEWLQKLMRSEPRPGVLLRAPFP

35 En otra modalidad particular, el factor de coagulación es un polipéptido FVIII. El Factor VIII (FVIII) es una glicoproteína grande y compleja que se produce principalmente por los hepatocitos. El FVIII se compone de 2351 aminoácidos, lo que incluye un péptido de señalización, y contiene varios dominios distintos según se define por homología. Existen tres dominios A, un dominio B único y dos dominios C. El orden de dominio puede enumerarse como NH₂-A1-A2-B-A3-C1-C2-COOH. El FVIII circula en el plasma como dos cadenas, separado en el borde B-A3. Las cadenas se conectan mediante enlaces iónicos de metal bivalente. La cadena A1-A2-B se denomina la cadena pesada (HC) mientras que la A3-C1-C2 se denomina cadena ligera (LC). Las regiones ácidas pequeñas C-terminal del A1 (la región a₁) y A2 (la región a₂) y N-terminal del dominio A3 (la región a₃) juegan papeles importantes en su interacción con otras proteínas de coagulación, lo que incluye la trombina y el factor de von Willebrand (vWF o VWF), la proteína portadora para el FVIII, *in vivo*.

45 Las moléculas de FVIII endógeno circulan *in vivo* como un agrupamiento de moléculas con dominios B de varios tamaños, el más corto tiene el C-terminal en la posición 740, es decir, en el C-terminal de A2-a₂. Estas moléculas de FVIII con dominios B de longitud diferente tienen todas actividad procoagulante total. Tras la activación con la trombina, el FVIII es hendido en el C-terminal de A1-a₁ en la posición 372, el C-terminal de A2-a₂ en la posición 740, y entre a₃ y A3 en la posición 1689, la última escisión libera la región a₃, con pérdida concomitante de afinidad por vWF. La molécula del FVIII activado se denomina FVIIIa. La activación permite la interacción de FVIIIa con superficies fosfolipídicas como plaquetas activadas y el Factor IX activado (FIXa): se forma el complejo tenasa, lo que permite la activación eficiente del Factor X (FX).

55 Los términos "Factor VIII(a)" y "FVIII(a)" incluyen tanto FVIII como FVIIIa. El "Factor VIII" o "FVIII", en la presente descripción, se refiere a una glicoproteína plasmática humana que es un miembro de la vía de coagulación intrínseca y es esencial para la coagulación de la sangre. El "FVIII natural" es la molécula FVIII humana derivada de la secuencia de longitud completa como se muestra en la SEQ ID NO: 159 (aminoácidos 1-2332). El "FVIII(a)" incluye variantes alélicas naturales del FVIII(a) que pueden existir y producirse de un individuo a otro.

60 Las moléculas/variantes del FVIII pueden ser moléculas de FVIII truncadas en el dominio B, en donde los dominios restantes corresponden estrechamente a las secuencias como se expone en los números de aminoácidos 1-740 y 1649-2332 de la SEQ ID NO: 159. En dichas variantes, así como también en el FVIII derivado de la secuencia de longitud completa, las mutaciones pueden introducirse para, por ejemplo, reducir la capacidad de unión a vWF. Las modificaciones de aminoácidos, tales como sustituciones y deleciones, pueden introducirse en la molécula para modificar la capacidad de unión del FVIII con diversos otros componentes tales como LRP, diversos receptores, otros

65

factores de coagulación, superficies celulares, introducción y/o supresión de sitios de glicosilación. Otras mutaciones que no suprimen la actividad del FVIII también pueden acomodarse en una molécula/variante del FVIII que puede usarse para los propósitos de la presente invención.

5 El dominio B del FVIII se extiende de los aminoácidos 741-1648 de la SEQ ID NO: 159. El dominio B es hendido en varios sitios diferentes, lo que genera gran heterogeneidad en las moléculas de FVIII en plasma circulante. Se desconoce la función exacta del dominio B fuertemente glicosilado. Lo que se conoce es que el dominio B es indispensable para la actividad del FVIII en la cascada de coagulación. De esta forma, el FVIII recombinante se produce frecuentemente en forma de variantes eliminadas/truncadas del dominio B.

10 El FVIII endógeno de longitud completa se sintetiza como una molécula precursora de cadena simple. Antes de la secreción, el precursor es hendido en la cadena pesada y la cadena ligera. El FVIII recombinante con dominio B eliminado puede producirse por medio de dos estrategias diferentes. Ya sea la cadena pesada sin el dominio B y la cadena ligera se sintetizan individualmente como dos cadenas polipeptídicas diferentes (estrategia de dos cadenas) o el FVIII con dominio B eliminado se sintetiza como una cadena polipeptídica precursora única (estrategia de cadena simple) que se escinde en las cadenas pesada y ligera de la misma manera que el precursor de FVIII de longitud completa.

15 En un polipéptido precursor de FVIII con dominio B eliminado, producido por la estrategia de cadena simple, los restos de cadena pesada y ligera se separan frecuentemente por un enlazador. Para minimizar el riesgo de introducir epítopos inmunogénicos en el FVIII con dominio B eliminado, la secuencia del enlazador se deriva, preferentemente, del dominio B del FVIII. Como mínimo, el enlazador debe comprender un sitio de reconocimiento para la proteasa que escinde el polipéptido precursor de FVIII con dominio B eliminado en las cadenas pesada y ligera. En el dominio B del FVIII de longitud completa, los aminoácidos 1644-1648 constituyen este sitio de reconocimiento. El sitio de escisión de trombina que conduce a la eliminación del enlazador en la activación del FVIII con dominio B eliminado se ubica en la cadena pesada. Por lo tanto, es poco probable que el tamaño y la secuencia de aminoácidos del enlazador influyan en su eliminación de la molécula FVIII restante por la activación de la trombina. La delección/truncamiento del dominio B es una ventaja para la producción del FVIII. No obstante, las partes del dominio B pueden incluirse en el enlazador sin reducir la productividad. El efecto negativo del dominio B sobre la productividad no se ha atribuido a ningún tamaño o secuencia específica del dominio B.

20 Las moléculas de FVIII para la presente invención son capaces de funcionar en la cascada de coagulación de una manera que es funcionalmente similar, o equivalente, al FVIII, lo que induce la formación de FXa mediante la interacción con FIXa en una plaqueta activada y respalda la formación de un coágulo de sangre. La actividad del FVIII puede evaluarse *in vitro* mediante el uso de técnicas bien conocidas en la técnica. Los análisis de coágulos, los ensayos de activación de FX (frecuentemente denominados ensayos cromogénicos), los ensayos de generación de trombina y la tromboelastografía de sangre total son ejemplos de dichas técnicas *in vitro*, dos de las cuales se describen en los ejemplos 28 y 29. Las moléculas de FVIII de acuerdo con la presente invención, tienen actividad de FVIII que es al menos la misma de un FVIII humano natural.

25 El término "variante de FVIII", como se usa en la presente descripción, pretende designar el Factor FVIII que tiene la secuencia de la SEQ ID NO: 159, en donde uno o más aminoácidos de la proteína parental se han sustituido por otro aminoácido y/o en donde uno o más aminoácidos de la proteína parental se han eliminado y/o en donde uno o más aminoácidos de la proteína parental se han insertado en la proteína y/o en donde uno o más aminoácidos se han añadido a la proteína parental. Dicha adición puede tener lugar ya sea en el extremo N terminal o en el extremo C terminal de la proteína parental o en ambos. El "análogo" o "análogos" dentro de esta definición todavía tiene actividad de FVIII en su forma activada. En una modalidad, una variante es al menos 90 % idéntica con la secuencia de la SEQ ID NO: 159. En otra modalidad, una variante es al menos 95 %, tal como al menos 96 %, tal como al menos 97 %, tal como al menos 98 %, tal como al menos 99 % idéntica con la secuencia de la SEQ ID NO: 159. Como se usa en la presente descripción, cualquier referencia a una posición específica se refiere a la posición correspondiente en la SEQ ID NO: 159.

30 El FVIII puede derivarse de plasma o producirse de manera recombinante, mediante el uso de métodos de producción y purificación bien conocidos. El grado y ubicación de la glicosilación, gammacarboxilación y otras modificaciones postraduccionales puede variar en dependencia de la célula huésped elegida y sus condiciones de crecimiento.

35 En otra modalidad particular, el factor de coagulación es un polipéptido del Factor IX. El Factor IX (FIX) es, en su forma activa FIXa, una serina proteasa similar a tripsina que cumple un papel clave en la hemostasia mediante la generación, como parte del complejo de tenasa, de la mayoría del Factor Xa requerido para respaldar una formación de trombina adecuada durante la coagulación (revisado en (Hoffman y Monroe, III 2001)).

40 El Factor IX (FIX) es un factor de coagulación dependiente de vitamina K con similitudes estructurales al Factor VII, protrombina, Factor X, y proteína C. La forma de zimógeno circulante se compone de 415 aminoácidos divididos en cuatro dominios distintos que comprenden un dominio N-terminal rico en ácido γ -carboxiglutámico (Gla), dos dominios EGF y un dominio C-terminal serina proteasa similar a tripsina. La activación del FIX se produce por proteólisis limitada en Arg¹⁴⁵-Ala¹⁴⁶ y Arg¹⁸⁰-Val¹⁸¹ lo que libera un fragmento de 35 aa, el denominado péptido de activación (Schmidt y

Bajaj 2003). El péptido de activación es fuertemente glicosilado, y contiene dos glicanos ligados a N y hasta cuatro glicanos ligados a O.

El "Factor IX" o "FIX", como se usa en la presente descripción, se refiere a una glicoproteína del Factor IX plasmático humano que es un miembro de la vía de coagulación intrínseca y es esencial para la coagulación de la sangre. El "Factor IX(a)" incluye variantes alélicas naturales de FIX(a) que pueden existir y producirse de un individuo a otro. El Factor IX(a) puede derivarse de plasma o producirse de manera recombinante mediante el uso de métodos de producción y purificación bien conocidos. El grado y ubicación de la glicosilación, gammacarboxilación y otras modificaciones postraduccionales puede variar en dependencia de la célula huésped elegida y sus condiciones de crecimiento. A menos que se especifique o se indique de cualquier otra manera, Factor IX significa cualquier molécula de proteína Factor IX humano funcional en su papel normal en la coagulación, lo que incluye cualquier fragmento, análogo y derivado de esta.

Un ejemplo de un "FIX de tipo silvestre" es la molécula FIX humana de longitud completa, como se muestra en la SEQ ID NO: 161.

Se pretende que los términos "análogos de FIX", como se usa en la presente descripción, designen el Factor FIX que tiene la secuencia de la SEQ ID NO: 161, en donde uno o más aminoácidos de la proteína parental se han sustituido por otro aminoácido y/o en donde uno o más aminoácidos de la proteína parental se han eliminado y/o en donde uno o más aminoácidos se han insertado en la proteína y/o en donde uno o más aminoácidos se han añadido a la proteína parental. Dicha adición puede tener lugar ya sea en el extremo N terminal o en el extremo C terminal de la proteína parental o en ambos. El "análogo" o "análogos" dentro de esta definición todavía tiene actividad FIX en su forma activada. En una modalidad, una variante es al menos 90 % idéntica con la secuencia de la SEQ ID NO: 161. En una modalidad adicional, una variante es al menos 95 % idéntica con la secuencia de la SEQ ID NO: 161. Como se usa en la presente descripción, cualquier referencia a posiciones específicas se refiere a la posición correspondiente en la SEQ ID NO: 161. Los ejemplos no limitantes de variantes FIX(a) que tienen sustancialmente la misma actividad, actividad de puento del FVIII o actividad proteolítica aumentada en comparación con el Factor IX(a) humano de tipo silvestre recombinante incluyen los descritos en Milanov P, Ivanciu L, Abriss D, Quade-Lyssa P, Miesbach W, Alesci S, Tonn T, Grez M, Seifried E, Schüttrumpf (2012) J.Blood 119: 602-11 y el documento US 2011/0217284 A1. A menos que se especifique de cualquier otra manera, los dominios del Factor IX incluyen los residuos de aminoácidos siguientes: El dominio Gla es la región desde el residuo Tyr1 hasta el residuo Lys43; el EGF1 es la región desde el residuo Gln44 hasta el residuo Leu84; el EGF2 es la región desde el residuo Asp85 hasta el residuo Arg145; el péptido de activación es la región desde el residuo Ala146 hasta el residuo Arg180; y el dominio de proteasa es la región desde el residuo Val181 hasta el residuo Thr414. La cadena ligera se refiere a la región que abarca el dominio Gla, EGF1 y EGF2, mientras que la cadena pesada se refiere al dominio de proteasa.

El Factor IX puede derivarse de plasma o producirse de manera recombinante, mediante el uso de métodos de producción y purificación bien conocidos. El grado y ubicación de la glicosilación, gammacarboxilación y otras modificaciones postraduccionales puede variar en dependencia de la célula huésped elegida y sus condiciones de crecimiento.

Un kit de ensayo disponible comercialmente conocido como kit 'Hyphen BioMed Chromogenic Factor IX (Aniara)' puede usarse para evaluar el nivel de actividad del polipéptido FIX. En este ensayo, el Factor XIa activa el Factor IX en Factor IXa, que junto con el Factor VIII:C activado, fosfolípidos y Ca²⁺, activa el Factor X en Factor Xa. La cantidad de Factor Xa generado se midió a 405 nm por la cantidad de pNA liberada del sustrato cromogénico específico para el Factor Xa SXa-11.

Los residuos gammacarboxilados en la secuencia FVII más abajo se representan por "γ".

SEQ ID NO: 161: Factor IX de coagulación humano de tipo silvestre

YNSGKLYγFVQGNLYRγCMYYKCSFYγARγVFYNTγRT

TγFWKQYVDGDQCESNPCLNGGSCKDDINSYECWCPFGFEGKNCELDVTCNIKNGRCEQFCKNSA

DNKVVCSCTEGYRLAENQKSCEPAVPFPCGRV SVSQTSLTRAEA VFPD VDYV-

NSTEAEITLDNITQSTQSFNDFTRVVGGEDAKPGQFPWQVVLNGK VDAFCGG-

SIVNEKWIVTAAHCVETGVKITV VAGEHNIEETEHTEQKRN VIRIIPHNNYN AAINKYNH DI-

ALLELDEPLVLNSYVTPICIA DKEYNIFLKF GSGYVSGWGRV FHKGRSALVLQYLRVPLVDRATCLR

STKFTYNNMFCAGFHEGGRDSCQGD SGGPHVTEVEGTSFLTGIISWGEECAMKGYGIYTKVSRVY

NWIKETKLT

En otra modalidad particular, el factor de coagulación es un polipéptido FX. El Factor X (FX) de coagulación es un factor de coagulación dependiente de la vitamina K con similitudes estructurales al Factor VII, protrombina, Factor IX (FIX) y proteína C. Se sintetiza con una pre-pro-secuencia de 40 residuos que contiene una secuencia señal hidrófoba (Aa 1-31) que se dirige a la proteína para la secreción. El propéptido es importante para dirigir la γ -carboxilación a la cadena ligera del Factor X. El zimógeno de FX humano circulante se compone de 445 aminoácidos divididos en cuatro dominios distintos que comprenden un dominio N-terminal rico en ácido gamma-carboxiglutámico (Gla), dos dominios EGF, y un dominio C-terminal de serina proteasa similar a tripsina. La forma de dos cadenas maduras del FX se compone de una cadena ligera (Aa41-179) y una cadena pesada (Aa183-488) que se mantienen juntas mediante un puente disulfuro (Cys¹⁷² - Cys³⁴²). La cadena ligera contiene 11 residuos Gla, que son importantes para la unión dependiente de Ca²⁺ del FX a membranas fosfolípicas cargadas negativamente. El Factor X de coagulación humano de tipo silvestre tiene dos sitios de N-glicosilación (Asn²²¹ y Asn²³¹) y dos sitios de O-glicosilación (Thr¹⁹⁹ y Thr²¹¹) en el péptido de activación. La β -hidroxilación se produce en Asp¹⁰³ en el primer dominio EGF, lo que resulta en ácido β -hidroxiaspártico (Hya). La activación del FX se produce por proteólisis limitada en Arg²³⁴-Ile²³⁵ lo que libera un péptido de activación de 52 aminoácidos (Aa 183-234). En la vía extrínseca, esto se produce tras la exposición del factor tisular (TF) en la membrana de células subendoteliales al plasma y la activación posterior del FVIIa. La activación a través de la vía intrínseca se produce con la interacción del Factor IXa, el Factor VIIIa, el calcio y las superficies fosfolípicas ácidas. La protrombina es el sustrato más importante del Factor Xa, pero la activación requiere del Factor Va cofactor de FXa, calcio y superficie fosfolípica ácida. La deficiencia de FX es un trastorno de sangrado autosómico recesivo raro con una incidencia de 1:1 000 000 en la población general (Dewerchin y otros (2000) *Thromb Haemost* 83: 185-190). Aunque produce una tendencia de sangrado variable, los pacientes con una deficiencia de FX grave tienden a ser los más seriamente afectados entre los pacientes con defectos de coagulación raros. La prevalencia de la deficiencia de FX heterocigótica es de aproximadamente 1:500, pero usualmente es asintomática clínicamente.

Un ejemplo de un "FX de tipo silvestre" es la molécula FX humana de longitud completa, como se muestra en la SEQ ID NO: 163.

"Polipéptido Factor X", en la presente descripción, se refiere a cualquier molécula de proteína Factor X funcional capaz de activar la trombina, lo que incluye fragmentos, análogos y derivados de la SEQ ID NO: 163.

El término "análogo de FX", como se usa en la presente descripción, pretende designar el Factor FX que tiene la secuencia de la SEQ ID NO: 163, en donde uno o más aminoácidos de la proteína parental se han sustituido por otro aminoácido y/o en donde uno o más aminoácidos de la proteína parental se han eliminado y/o en donde uno o más aminoácidos se han insertado en la proteína y/o en donde uno o más aminoácidos se han añadido a la proteína parental. Dicha adición puede tener lugar ya sea en el extremo N terminal o en el extremo C terminal de la proteína parental o en ambos. El "análogo" o "análogos" dentro de esta definición todavía tiene actividad FX en su forma activada. En una modalidad, una variante es al menos 90 % idéntica con la secuencia de SEQ ID NO: 163. En una modalidad adicional, una variante es al menos 95 % idéntica con la secuencia de SEQ ID NO: 163. Como se usa en la presente descripción, cualquier referencia a posiciones específicas se refiere a la posición correspondiente en la SEQ ID NO: 163.

El FX puede derivarse de plasma o producirse de manera recombinante, mediante el uso de métodos de producción y purificación bien conocidos. El grado y ubicación de la glicosilación, gammacarboxilación y otras modificaciones postraduccionales puede variar en dependencia de la célula huésped elegida y sus condiciones de crecimiento.

En otra modalidad particular, el factor de coagulación es un polipéptido del Factor XI. El Factor XI (FXI) es el zimógeno de una proteasa de coagulación sanguínea, el Factor XIa (FXIa), que contribuye a la hemostasia mediante la activación del Factor IX. El factor se produce por el hígado (Emsley y otros (2010) *Blood* 115:2569-77). La proteína es un dímero unido por enlaces disulfuro de 160 kDa de 607 subunidades de aminoácidos idénticas, donde cada una contiene 4 repeticiones de 90 o 91 aminoácidos denominadas dominios manzana (desde el N terminal: A1: Aa 20-103, A2: Aa 110-193, A3: Aa 200-283, A4: Aa 291-374) y un dominio C terminal catalítico similar a tripsina. La proteína se expresa con un péptido señal Aa1-18. La estructura es diferente a las de las proteasas de coagulación dependientes de vitamina K bien caracterizadas. El FXI circula en sangre como un complejo con el kininógeno de alto peso molecular (HK). La precalicreína (PK), el zimógeno de la proteasa calicreína, es un homólogo monomérico del FXI con la misma estructura de dominio que también circula en complejo con el HK. El factor zimógeno se activa en Factor XIa por el Factor XIIa (FXIIa), la trombina, y también es autocatalítico. La activación de la escisión se produce en el bucle de activación que contiene el sitio de escisión Arg369-Ile370. Dado que la deficiencia en FXI provoca un sangrado relativamente leve, el FXI tiene un papel especulativo en la generación temprana de fibrina. Se postula que el FXIa es parte de un bucle de retroalimentación que mantiene la generación de trombina a través de la activación del FIX para consolidar la coagulación. Determinados tejidos con actividad fibrinolítica sólida parecen importantes para la actividad de FXIa, lo que incluye orofaringe y tracto urinario, ya que estos son sitios comunes de sangrado en pacientes deficientes en FXI. La deficiencia de FXI congénita se asocia con un trastorno de sangrado leve a moderado. Se han informado más de 180 otras mutaciones génicas de FXI asociadas con la deficiencia de FXI (<http://www.factorxi.org>, <http://www.isth.org>), lo que incluye más de 100 sustituciones de aminoácidos simples (sin sentido). La deficiencia grave prevalece en las personas de ascendencia judía (Seligsohn y otros (2007) *Thromb Haemost*. 98:84-89). La tasa de portador es de aproximadamente 5 % en judíos Ashkenazi, con deficiencia grave (homocigota) encontrada en 1 de

cada 450 personas. Como un ejemplo, una mutación severa en Glu117Stop resulta en una proteína truncada y los homocigotos carecen completamente de antígeno FXI plasmático.

El Factor XIa activa el Factor IX mediante la escisión selectiva de Arg¹⁴⁵-Ala¹⁴⁶ y Arg¹⁸⁰-Val¹⁸¹.

El término "análogo de FXI", como se usa en la presente descripción, pretende designar el Factor XI que tiene la secuencia de la SEQ ID NO: 165, en donde uno o más aminoácidos de la proteína parental se han sustituido por otro aminoácido y/o en donde uno o más aminoácidos de la proteína parental se han eliminado y/o en donde uno o más aminoácidos se han insertado en la proteína y/o en donde uno o más aminoácidos se han añadido a la proteína parental. Dicha adición puede tener lugar ya sea en el extremo N terminal o en el extremo C terminal de la proteína parental o en ambos. El "análogo" o "análogos" dentro de esta definición todavía tiene actividad FX en su forma activada. En una modalidad, una variante es al menos 90 % idéntica con la secuencia de la SEQ ID NO: 165. En una modalidad adicional, una variante es al menos 95 % idéntica con la secuencia de SEQ ID NO: 165. Como se usa en la presente descripción, cualquier referencia a una posición específica se refiere a la posición correspondiente en la SEQ ID NO: 165.

El FXI puede derivarse de plasma o producirse de manera recombinante, mediante el uso de métodos de producción y purificación bien conocidos. El grado y ubicación de la glicosilación, y otras modificaciones postraduccionales puede variar en dependencia de la célula huésped elegida y sus condiciones de crecimiento.

El término "identidad", como se conoce en la técnica, se refiere a una relación entre las secuencias de dos o más proteínas, según se determina mediante la comparación de las secuencias. En la técnica, "identidad" significa, además, el grado de relación de las secuencias entre las polipéptidos, según se determina por la cantidad de coincidencias entre las cadenas de dos o más residuos de aminoácidos. La "identidad" mide el por ciento de coincidencias idénticas entre la más pequeña de dos o más secuencias con los alineamientos de huecos (en caso de existir) dirigidos por un modelo matemático en particular o un programa de computadora (es decir, "algoritmos"). La identidad de polipéptidos relacionados puede calcularse fácilmente mediante métodos conocidos. Dichos métodos incluyen los descritos en Computational Molecular Biology, Lesk, A. M., ed., Oxford University Press, Nueva York, 1988; Biocomputing: Informatics and Genome Projects, Smith, D. W., ed., Academic Press, Nueva York, 1993; Computer Analysis of Sequence Data, Parte 1, Griffin, A. M., y Griffin, H. G., eds., Humana Press, Nueva Jersey, 1994; Sequence Analysis in Molecular Biology, von Heinje, G., Academic Press, 1987; Sequence Analysis Primer, Gribskov, M. y Devereux, J., eds., M. Stockton Press, Nueva York, 1991; y Carillo y otros, SIAM J. Applied Math. 48, 1073 (1988).

Los métodos preferidos para determinar la identidad se diseñan para dar la mayor coincidencia entre las secuencias analizadas. Los métodos para determinar la identidad se describen en programas de computadora disponibles públicamente. Los métodos de programas de computadora preferidos para determinar la identidad entre dos secuencias incluyen el paquete de programas GCG, lo que incluye GAP (Devereux y otros, Nucl. Acid. Res., 12, 387, (1984); Genetics Computer Group, University of Wisconsin, Madison, Wis.), BLASTP, BLASTN, y FASTA (Altschul y otros, J. Mol. Biol. 215, 403-410, (1990)). El programa BLASTX está disponible públicamente del Centro Nacional para la Información Biotecnológica (NCBI) y otras fuentes (BLAST Manual, Altschul y otros, NCB/NLM/NIH Bethesda, Md. 20894; Altschul y otros, más arriba). También puede usarse el bien conocido algoritmo de Smith Waterman para determinar la identidad.

Por ejemplo, mediante el uso del algoritmo informático GAP (Genetics Computer Group, Universidad de Wisconsin, Madison, Wis.), dos polipéptidos, para los cuales se va a determinar el por ciento de identidad de secuencia, se alinean para una coincidencia óptima de sus aminoácidos respectivos (el "rango coincidente", según se determina por el algoritmo). Una penalización por abertura de hueco (que se calcula como 3 veces la diagonal promedio; la "diagonal promedio" es el promedio de la diagonal de la matriz de comparación que se usa; la "diagonal" es la puntuación o número asignado a cada coincidencia perfecta de aminoácidos por la matriz de comparación en particular) y una penalización por extensión del hueco (que es usualmente {la fracción (1/10)} veces la penalización por abertura de hueco), así como también una matriz de comparación tal como PAM 250 o BLOSUM 62 se usan junto con el algoritmo. El algoritmo también usa una matriz de comparación estándar (ver Dayhoff y otros, Atlas of Protein Sequence and Structure, vol. 5, sup.3 (1978) para la matriz de comparación PAM 250; Henikoff y otros, Proc. Natl. Acad. Sci EE.UU., 89, 10915-10919 (1992) para la matriz de comparación BLOSUM 62).

Los parámetros preferidos para una comparación de secuencias de péptidos incluyen los siguientes: Algoritmo: Needleman y otros, J. Mol. Biol. 48, 443-453 (1970); Matriz de comparación: BLOSUM 62 de Henikoff y otros, PNAS EE.UU. 89, 10915-10919 (1992); Penalización por hueco: 12, Penalización por longitud del hueco: 4, Umbral de similitud: 0.

El programa GAP es útil con los parámetros anteriores. Los parámetros mencionados anteriormente son los parámetros predeterminados para las comparaciones de proteínas (junto con sin penalización por huecos en los extremos) mediante el uso del algoritmo GAP.

Por lo tanto, las proteínas procoagulantes descritas en la presente descripción comprenden (i) al menos un componente del factor de coagulación y (ii) un anticuerpo o fragmento de este capaz de unirse a un receptor, y/o un

fragmento de este, en donde el receptor se presenta solamente (en el sentido no ubicuo de la palabra) en la superficie de plaquetas activadas. En una modalidad preferida, dicho receptor es el TLT-1. Las proteínas procoagulantes descritas en la presente descripción se modifican, preferentemente, de manera que sus partes constituyentes pueden funcionar independientemente una de otra. Por ejemplo, dicho componente del factor de coagulación es capaz de regular positivamente la coagulación de la sangre. Igualmente, dicho componente de "anticuerpo" es, preferentemente, capaz de unirse a un receptor tal como el TLT-1, sin impedimento por la presencia de dicho componente del factor de coagulación. El extremo carboxi del componente del factor de coagulación puede unirse covalentemente al extremo amino del componente de anticuerpo del constructo, o viceversa. Dicho componente de anticuerpo del constructo, preferentemente, no se unirá o demostrará poca afinidad por cualquier otro receptor desencadenante expresado en células mieloides (TREM). El constructo puede o no comprender un enlazador entre dicho factor de coagulación y dichos constituyentes de anticuerpos. Dicho enlazador opcional puede ser uno cualquiera de los enlazadores descritos en la Tabla 3, o puede ser cualquier otro enlazador que se une tanto al factor de coagulación como a las partes constituyentes del anticuerpo del constructo, de manera que ambos sean funcionales. En una modalidad, el factor de coagulación y los componentes anti-TLT-1 se expresan como proteínas de fusión. En una modalidad, el factor de coagulación y los componentes anti-TLT-1 se conjugan químicamente.

Las proteínas procoagulantes en donde la parte (ii) es un mAb pueden comprender dos polipéptidos del factor de coagulación (parte (i)). El factor de coagulación puede fusionarse a una HC del mAb; el factor de coagulación puede fusionarse a una LC del mAb. El factor de coagulación puede fusionarse a un anticuerpo, o fragmento de este, que, a su vez, se fusiona a una HC del mAb o a una LC del mAb.

Por lo tanto, una proteína procoagulante de la presente invención puede comprender (i) al menos un polipéptido FV y (ii) un anticuerpo, o fragmento de este, que es capaz de unirse al TLT-1.

Una proteína procoagulante de la presente invención puede comprender (i) al menos un polipéptido FVII y (ii) un anticuerpo, o fragmento de este, que es capaz de unirse al TLT-1.

Una proteína procoagulante de la presente invención puede comprender (i) al menos un polipéptido FVIII y (ii) un anticuerpo, o fragmento de este, que es capaz de unirse al TLT-1.

Una proteína procoagulante de la presente invención puede comprender (i) al menos un polipéptido FIX y (ii) un anticuerpo, o fragmento de este, que es capaz de unirse al TLT-1.

Una proteína procoagulante de la presente invención puede comprender (i) al menos un polipéptido FX y (ii) un anticuerpo, o fragmento de este, que es capaz de unirse al TLT-1.

Una proteína procoagulante de la presente invención puede comprender (i) al menos un polipéptido FXI y (ii) un anticuerpo, o fragmento de este, que es capaz de unirse al TLT-1.

Las proteínas procoagulantes pueden comprender, además, un enlazador. Ejemplos no limitantes de secuencias de aminoácidos enlazadoras, que pueden usarse cuando las proteínas procoagulantes se fabrican como proteínas de fusión, se muestran en la Tabla 3. Por lo tanto, dicho enlazador puede ser L1. El enlazador puede ser L2. El enlazador puede ser L3. El enlazador puede ser L4. El enlazador puede ser L5. El enlazador puede ser L6. El enlazador puede ser L7. El enlazador puede ser L8. El enlazador puede ser L9. El enlazador puede ser L10.

Tabla 3: Ejemplos no limitantes de enlazadores opcionales

ID del enlazador	Longitud (AA)	Secuencia enlazadora
L0	0	sin enlazador
L1	2	GS
L2	7	GSGGGGS
L3	12	GSGGGGSGGGGS
L4a	17	GSGGGGSGGGGSGGGGS
L4b	17	GGGGSGGGSGGGGSGS
L5	22	GGGGSGSGGGSGGGGSGGGGS
L6	27	GGGGSGGGSGSGGGGSGGGGSGGGGS
L7	32	GGGGSGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGS
L8	37	GGGGSGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGS
L9	42	GGGGSGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGS
L10	16	YGPPSPSPAPEFLGG

Como se mencionó anteriormente, la parte extracelular del TLT-1 se compone de un dominio similar a inmunoglobulina y un tallo. Las proteínas procoagulantes descritas en la presente descripción pueden ser capaces de unirse a cualquiera de estos. Cuando la parte (ii) de la proteína procoagulante es capaz de unirse al dominio similar a inmunoglobulina, un enlazador más largo puede permitir a la parte (i) de dicha proteína de fusión adoptar una posición y orientación relevante funcionalmente sobre la superficie de la plaqueta activada, lo que facilita de esta manera su función.

Una proteína procoagulante que es capaz de unirse al tallo del TLT-1 está adyacente a la membrana de plaquetas. Una proteína procoagulante que es capaz de unirse al tallo puede comprender un enlazador, pero la inclusión de un enlazador no afecta necesariamente la función de la parte del factor de coagulación de la proteína de fusión.

Como se describió anteriormente, las proteínas procoagulantes descritas en la presente descripción son capaces de unirse a un receptor que se presenta en plaquetas que experimentan activación o que están completamente activas, tal como el TLT-1. El término "afinidad de unión" pretende referirse a la propiedad de las proteínas procoagulantes, o el componente de anticuerpo de las proteínas procoagulantes, de unirse o no a su objetivo. La afinidad de unión puede cuantificarse mediante la determinación de la constante de unión (K_D) para un componente de anticuerpo y su objetivo. De manera similar, la especificidad de unión de un componente de anticuerpo a su objetivo puede definirse en términos de las constantes de unión comparativas (K_D) del anticuerpo para su objetivo en comparación con la constante de unión con respecto al anticuerpo y otra molécula no objetivo.

Típicamente, la K_D para el anticuerpo con respecto al objetivo será de 2 veces, preferentemente, 5 veces, con mayor preferencia, 10 veces menor que la K_D con respecto a la otra molécula no objetivo, tal como material no relacionado o material acompañante en el ambiente. Con mayor preferencia, la K_D será 50 veces menor, aún con mayor preferencia, 100 veces menor, y aún con mayor preferencia, 200 veces menos.

El valor de esta constante de unión puede determinarse directamente mediante métodos bien conocidos, y puede calcularse incluso para mezclas complejas mediante métodos tales como aquellos, por ejemplo, expuestos en Caceci y otros (Byte 9:340-362, 1984). Por ejemplo, la K_D puede establecerse mediante el uso de un ensayo de unión a filtro de nitrocelulosa de doble filtro tal como el descrito por Wong y Lohman (Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU. 90, 5428-5432, 1993). Otros ensayos estándar para evaluar la capacidad de unión de anticuerpos hacia los objetivos se conocen en la técnica e incluyen, por ejemplo, ELISA, transferencias de Western, RIA y análisis de citometría de flujo. La cinética de unión (por ejemplo, las constantes de tasa de asociación y de tasa de disociación) y la afinidad de unión del anticuerpo pueden evaluarse, además, mediante ensayos estándar conocidos en la técnica, tales como análisis de resonancia de plasmón de superficie (SPR).

Puede realizarse un ensayo de unión competitiva en el que la unión del anticuerpo al objetivo se compara con la unión del objetivo por otro ligando conocido del objetivo, u otro anticuerpo.

Los valores de K_D para el anticuerpo, o fragmento de este, también pueden ser al menos 1×10^{-15} M, tal como al menos 1×10^{-14} M, tal como al menos 1×10^{-13} M, tal como al menos 1×10^{-12} M, tal como al menos 1×10^{-11} M, tal como al menos 1×10^{-10} M, tal como aproximadamente 3×10^{-9} M, tal como al menos 1×10^{-9} M, o al menos 1×10^{-8} M. Un anticuerpo puede tener una K_d (o K_i) por su objetivo de 1×10^{-7} M o menos, 1×10^{-8} M o menos o 1×10^{-9} M o menos.

Los valores de K_D preferidos para el anticuerpo, o fragmento de este, pueden ser 1×10^{-15} M a 1×10^{-14} M, tal como 1×10^{-14} M a 1×10^{-13} M, tal como 1×10^{-13} M a 1×10^{-12} M, tal como 1×10^{-12} M a 1×10^{-11} M, tal como 1×10^{-11} M a 1×10^{-10} M, tal como 1×10^{-10} M a 1×10^{-9} M tal como aproximadamente 3×10^{-9} M, tal como 1×10^{-9} M a 2×10^{-8} M.

Un anticuerpo o fragmento de este que se une específicamente a su objetivo puede unirse a su objetivo con una alta afinidad, tal como una K_D como se discutió anteriormente, y puede unirse a otras moléculas no objetivo con una menor afinidad. Por ejemplo, el anticuerpo puede unirse a moléculas no objetivo con una K_D de 1×10^{-6} M o más, con mayor preferencia, 1×10^{-5} M o más, con mayor preferencia, 1×10^{-4} M o más, con mayor preferencia, 1×10^{-3} M o más, aún con mayor preferencia, 1×10^{-2} M o más. Una proteína procoagulante descrita en la presente descripción es, preferentemente, capaz de unirse a su objetivo con una afinidad que es al menos dos veces, 10 veces, 50 veces, 100 veces, 200 veces, 500 veces, 1000 veces o 10 000 veces o mayor que su afinidad por unirse a otra molécula no objetivo, tal como otras TREM diferentes de TLT-1.

Los efectos funcionales de las proteínas procoagulantes de la invención pueden evaluarse por medio de diversos experimentos *in vitro* e *in vivo*. Los experimentos *in vitro* pueden diseñarse para evaluar la función de las proteínas de fusión como un todo, así como también sus partes de componente (i) de factor de coagulación y (ii) de anticuerpo. *In vivo*, las proteínas de fusión pueden analizarse en un modelo de sangrado de cola en ratones hemofílicos que se transfunden con plaquetas humanas. Además, *in vivo*, las proteínas de fusión pueden analizarse en un modelo de sangrado de cola en ratones hemofílicos con el gen TLT-1 humano insertado ("humanizado" con respecto al TLT-1).

Como se mencionó anteriormente, las proteínas procoagulantes pueden proporcionarse en forma de proteínas de fusión o conjugados químicos. En el caso anterior, la invención se refiere, además, a polinucleótidos que codifican las proteínas procoagulantes de la invención. Por lo tanto, un polinucleótido puede codificar cualquier proteína

procoagulante como se describe en la presente descripción. Los términos “molécula de ácido nucleico” y “polinucleótido” se usan indistintamente en la presente descripción y se refieren a una forma polimérica de nucleótidos de cualquier longitud, ya sea desoxirribonucleótidos o ribonucleótidos, o análogos de estos. Los ejemplos no limitantes de polinucleótidos incluyen un gen, un fragmento génico, ARN mensajero (ARNm), ADNc, polinucleótidos recombinantes, plásmidos, vectores, ADN aislado de cualquier secuencia, ARN aislado de cualquier secuencia, sondas de ácido nucleico, y cebadores. Un polinucleótido puede proporcionarse en forma aislada o purificada.

Una secuencia de ácido nucleico que “codifica” un polipéptido seleccionado es una molécula de ácido nucleico que se transcribe (en el caso del ADN) y se traduce (en el caso del ARNm) en un polipéptido *in vivo*, cuando se coloca bajo el control de secuencias reguladoras apropiadas. Los límites de la secuencia codificante se determinan por un codón de iniciación en el extremo 5' (amino) y un codón de detención de la traducción en el extremo 3' (carboxi). Para los propósitos de la invención, dichas secuencias de ácido nucleico pueden incluir ADNc a partir de ARNm viral, procariota o eucariota, secuencias genómicas de ADN o ARN viral o procariota, e incluso secuencias de ADN sintéticas. Una secuencia de terminación de la transcripción puede ubicarse en dirección 3' a la secuencia codificante.

Los polinucleótidos pueden sintetizarse de acuerdo con métodos bien conocidos en la técnica, como se describe a manera de ejemplo en Sambrook y otros (1989, Molecular Cloning - a laboratory manual; Cold Spring Harbor Press).

Las moléculas de ácido nucleico pueden proporcionarse en forma de un casete de expresión que incluye secuencias control unidas operativamente a la secuencia insertada, lo que permite de esta forma la expresión del anticuerpo *in vivo*. Estos casetes de expresión, a su vez, se proporcionan típicamente dentro de vectores (por ejemplo, plásmidos o vectores virales recombinantes). Dicho casete de expresión puede administrarse directamente a un sujeto huésped. Alternativamente, un vector que comprende un polinucleótido puede administrarse a un sujeto huésped. Preferentemente, el polinucleótido se prepara y/o se administra mediante el uso de un vector genético. Un vector adecuado puede ser cualquier vector que sea capaz de portar una cantidad suficiente de información genética, y permitir la expresión de un polipéptido de la invención.

La presente invención incluye, por lo tanto, vectores de expresión que comprenden dichas secuencias de polinucleótidos. Dichos vectores de expresión se construyen rutinariamente en la técnica de biología molecular y pueden implicar, por ejemplo, el uso de ADN plasmídico e iniciadores, promotores, potenciadores y otros elementos apropiados, tales como, por ejemplo, señales de poliadenilación que pueden ser necesarias, y que se ubican en la orientación correcta, para permitir la expresión de un péptido de la invención. Otros vectores adecuados serían evidentes para los expertos en la técnica. A manera de un ejemplo adicional con respecto a esto, nos referimos a Sambrook y otros.

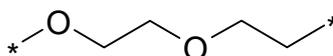
La invención incluye, además, células aisladas que se han modificado para expresar proteínas de fusión de acuerdo con la invención. Dichas

células incluyen líneas celulares eucariotas superiores, transitorias, o preferentemente, estables, tales como células de mamíferos o células de insectos; células eucariotas inferiores, tales como levadura; o células procariotas tales como células bacterianas. Los ejemplos particulares de células que pueden modificarse mediante la inserción de vectores o casetes de expresión que codifican un constructo de la invención incluyen células HEK293T, CHO, HeLa y COS de mamíferos. Preferentemente, la línea celular seleccionada será una que no sólo es estable, sino que permite además la glicosilación madura y la expresión en la superficie celular de un polipéptido.

Dichas líneas celulares pueden cultivarse mediante el uso de métodos de rutina para producir una proteína de fusión o constructo como se describe en la presente descripción. Alternativamente, los polinucleótidos, casetes de expresión o vectores pueden administrarse a una célula a partir de un sujeto *ex vivo* y regresar después la célula al cuerpo del sujeto.

Alternativamente, las proteínas procoagulantes pueden obtenerse mediante conjugación química del anticuerpo (tal como un mAb), o un fragmento de este, y el factor de coagulación. En este caso, un enlazador entre las dos proteínas puede contener uno o más restos químicos que no se presentan en aquellos aminoácidos que se codifican por el ADN.

En una modalidad, un resto químico usado en el enlazador comprende la estructura birradical con la estructura



en donde * muestra las posiciones de conexión de este birradical.

El término “birradical” se refiere a un compuesto químico con electrones pares con dos centros radicales libres que actúan independientemente uno de otro.

En otra modalidad, un resto químico usado en el enlazador comprende un polímero: una macromolécula compuesta de unidades estructurales repetidas que se conectan típicamente mediante enlaces químicos covalentes. Dicho polímero puede ser hidrófilo.

5 El término hidrófilo o "soluble en agua" se refiere a restos que tienen algún grado detectable de solubilidad en agua. Los métodos para detectar y/o cuantificar la solubilidad en agua se conocen bien en la técnica.

10 Los polímeros solubles en agua ilustrativos de acuerdo con la invención incluyen péptidos, sacáridos, (poli)éteres, (poli)aminas y ácidos (poli)carboxílicos. Los péptidos pueden tener secuencias mezcladas y componerse de un único aminoácido, por ejemplo, (poli)lisina. Un polisacárido ilustrativo es el ácido (poli)siálico. Un (poli)éter ilustrativo es el (poli)etilenglicol. La (poli)etilenimina es una poliamina ilustrativa, y el ácido (poli)acrílico es un ácido (poli)carboxílico representativo.

15 El polímero hidrófilo de acuerdo con la presente invención es, preferentemente, de origen no natural. En un ejemplo, el grupo modificador de origen no natural es un grupo modificador polimérico, en el que al menos un resto polimérico no es de origen natural. En otro ejemplo, el grupo modificador de origen no natural es un carbohidrato modificado. El locus de funcionalización con el grupo modificador se selecciona de manera que no evita que el "azúcar modificado" se añada enzimáticamente a un polipéptido. "Azúcar modificado" se refiere, además, a cualquier resto glicosilo mimético que se funcionaliza con un grupo de modificación y que es un sustrato para una enzima natural o modificada, tal como una glicosiltransferasa.

25 Muchos otros polímeros también son adecuados para la invención. Las cadenas principales poliméricas que son no peptídicas y solubles en agua, son particularmente útiles en la invención. Los ejemplos de polímeros adecuados incluyen otros poli(alquilenglicoles), tales como poli(propilenglicol) ("PPG"), copolímeros de etilenglicol y propilenglicol, poli(poliol oxietilado), poli(alcohol oléfmico), poli(vinilpirrolidona), poli(hidroxipropilmetacrilamida), poli([alfa]-hidroxi ácido), poli(alcohol vinílico), polifosfaceno, polioxazolona, poli(N-acriloilmorfolina), tal como se describe en la Patente de Estados Unidos Núm. 5,629,384, la cual se incorpora como referencia en su totalidad, en la presente descripción, así como también, copolímeros, terpolímeros, y sus mezclas.

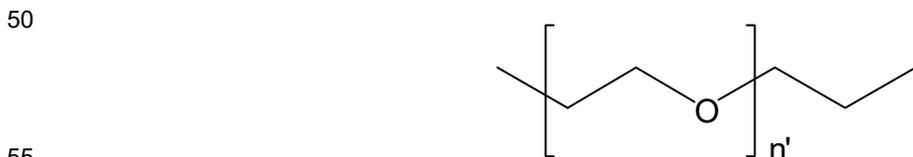
30 El enlazador polimérico puede alterar una propiedad de la proteína procoagulante, tal como su biodisponibilidad, su actividad biológica o su vida media en el cuerpo.

El enlazador polimérico es, preferentemente, lineal.

35 Aunque el peso molecular de cada cadena polimérica individual puede variar, está típicamente en el intervalo de aproximadamente 1000 Da (1 kDa) a aproximadamente 40 000 Da (40 kDa), tal como de aproximadamente 1000 Da a aproximadamente 12 000 Da; tal como de aproximadamente 2000 a aproximadamente 11 000 Da; tal como de aproximadamente 2000 a aproximadamente 3000 Da; de aproximadamente 3000 a aproximadamente 4000 Da; de aproximadamente 4000 a aproximadamente 5000 Da; de aproximadamente 5000 a aproximadamente 6000 Da; de aproximadamente 6000 a aproximadamente 7000 Da; de aproximadamente 7000 a aproximadamente 8000 Da; de aproximadamente 8000 a aproximadamente 9000 Da; de aproximadamente 9000 a aproximadamente 10 000 Da; o de aproximadamente 10 000 a aproximadamente 11 000 Da. Debe entenderse que estos tamaños representan estimaciones en lugar de medidas exactas. De acuerdo con una modalidad preferida, las moléculas de acuerdo con la invención se conjugan con una población heterogénea de polímeros hidrófilos.

45 En una modalidad particular, un resto químico usado en el enlazador comprende polietilenglicol (PEG).

El término "PEG", en la presente descripción, se refiere a un birradical que comprende la estructura



en donde n' es un entero mayor que 1.

60 El PEG se prepara mediante polimerización de óxido de etileno y está disponible comercialmente en un amplio intervalo de pesos moleculares. El PEG para su uso de acuerdo con la presente invención es, preferentemente, lineal.

Además, "PEG" puede referirse a un compuesto de polietilenglicol, o derivado de este, con o sin agentes de acoplamiento, restos de acoplamiento o activadores (por ejemplo, con un resto de ácido carboxílico/éster activo, ceto, alcoxiamina, tiol, triflato, tresilato, aziridina, oxirano, alquino, azida o maleimida).

65

En una modalidad particular, el PEG para su uso de acuerdo con la invención es monodisperso. En otra modalidad particular, el PEG para su uso de acuerdo con la invención es polidisperso.

5 El PEG polidisperso se compone de moléculas de PEG que tienen diversos pesos moleculares. La distribución de tamaño puede caracterizarse estadísticamente por su peso molecular promedio ponderal (M_w) y su peso molecular promedio numérico (M_n), cuya relación se denomina índice de polidispersión (M_w/M_n) (ver por ejemplo, "Polymer Synthesis and Characterization", J. A. Naim, Universidad de Utah, 2003). El M_w y el M_n pueden medirse mediante espectroscopía de masa.

10 El índice de polidispersión puede ser un número que es mayor o igual a uno y puede estimarse a partir de los datos cromatográficos de permeación en gel. Cuando el índice de polidispersión es 1, el producto es monodisperso y por lo tanto se compone de compuestos con un peso molecular único. Cuando el índice de polidispersión es mayor que 1, el polímero es polidisperso, y el índice de polidispersión indica cuán amplia es la distribución de polímeros con diferentes pesos moleculares. El índice de polidispersión aumenta típicamente con el peso molecular del PEG. En
15 modalidades particulares, el índice de polidispersión del PEG para su uso de acuerdo con la invención es i) inferior a 1,06, ii) inferior a 1,05, iii) inferior a 1,04, iv) inferior a 1,03 o v) entre 1,02 y 1,03.

Se dispone de diferentes formas de PEG, en dependencia del iniciador usado para el proceso de polimerización.

20 Numerosos métodos para la conjugación de sustituyentes de PEG se describen en *Advanced Drug Delivery Reviews*, 2002, 54, 459–476, *Nature Reviews Drug Discovery*, 2003, 2, 214–221 DOI:10.1038/nrd1033, *Adv Polym Sci*, 2006, 192, 95–134, DOI 10.1007/12_022, Springer-Verlag, Berlín Heidelberg, 2005, y referencias en ellas. Alternativamente, la conjugación del sustituyente polimérico hidrófilo podría llevarse a cabo mediante el uso de métodos enzimáticos. Dichos métodos son, por ejemplo, el uso de glicosiltransferasas como se describe en el documento WO2003/031464 o el uso de transglutaminasas como se describe en el documento WO2006134148.

30 Para efectuar la unión covalente de la(s) molécula(s) polimérica(s) al polipéptido, los grupos hidroxilo terminales de la molécula polimérica se proporcionan en forma activada, es decir, con grupos funcionales reactivos. Las moléculas poliméricas activadas adecuadas se disponen comercialmente, por ejemplo, de Sigma-Aldrich Corporation, St. Louis, MO, EE.UU., Rapp Polymere GmbH, Tübingen, Alemania, o de PolyMASC Pharmaceuticals plc, Reino Unido. Alternativamente, las moléculas poliméricas pueden activarse por métodos convencionales conocidos en la técnica, por ejemplo, como se describe en el documento WO 90/13540. Los ejemplos específicos de polímeros de PEG activados se describen en la Patente de Estados Unidos Núm. 5,932,462 y la Patente de Estados Unidos Núm. 5,643,575. Además, las publicaciones siguientes describen moléculas de polímero útiles y/o productos químicos por
35 PEGilación: WO2003/031464, WO2004/099231.

La conjugación del anticuerpo monoclonal, fragmento de este o factor de coagulación con las moléculas poliméricas activadas puede realizarse mediante el uso de cualquier método convencional, por ejemplo, como se describe en las referencias siguientes (que describen, además, los métodos adecuados para la activación de moléculas poliméricas):
40 R. F. Taylor, (1991), "Protein immobilisation. Fundamental and applications", Marcel Dekker, N.Y.; S. S. Wong, (1992), "Chemistry of Protein Conjugation and Crosslinking", CRC Press, Boca Raton; G. T. Hermanson y otros, (1993), "Immobilized Affinity Ligand Techniques", Academic Press, N.Y., 'Bioconjugate Techniques, Segunda Edición, Greg T. Hermanson, 2008, Amsterdam, Elsevier). El experto estará al tanto de que el método de activación y/o la química de conjugación a usarse depende del(de los) grupo(s) de unión del polipéptido (ejemplos de los cuales se proporcionaron adicionalmente anteriormente), así como también de los grupos funcionales del polímero (por ejemplo, que sean amina, hidroxilo, carboxilo, aldehído, sulfhidrilo, succinimidilo, maleimida, vinilsulfona o haloacetato). La PEGilación puede dirigirse hacia la conjugación a todos los grupos de unión disponibles en el polipéptido (es decir, dichos grupos de unión que se exponen en la superficie del polipéptido) o pueden dirigirse hacia uno o más grupos de
45 unión específicos, por ejemplo, el grupo amino N-terminal. Además, la conjugación puede lograrse en una etapa o de manera escalonada.
50

En otra modalidad, un resto químico usado como enlazador es el almidón de hidroxietilo. El término "almidón de hidroxietilo" (HES/HAES), como se usa en la presente descripción, se refiere a un derivado de almidón no iónico. Los diferentes tipos de almidones de hidroxietilo se describen típicamente por su peso molecular promedio, típicamente
55 alrededor de 130 a 200 kDa.

En otra modalidad, un resto químico usado en el enlazador comprende ácido polisialico.

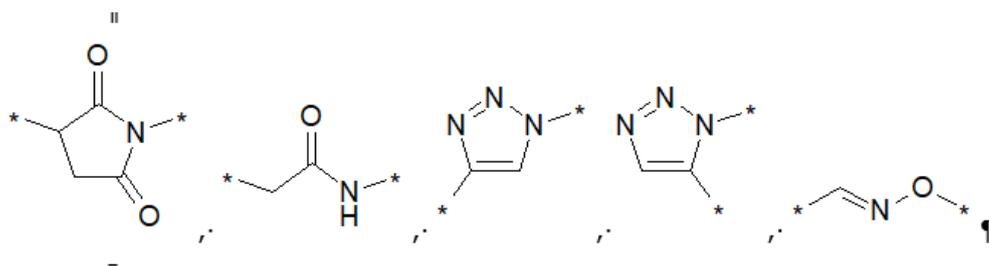
60 En otra modalidad, un resto químico usado en el enlazador se une a al menos una de las proteínas de un glicano: un polisacárido o un oligosacárido que se une a una proteína.

En otra modalidad, un resto químico usado en el enlazador se une a al menos una de las proteínas de un glicano ligado a O.

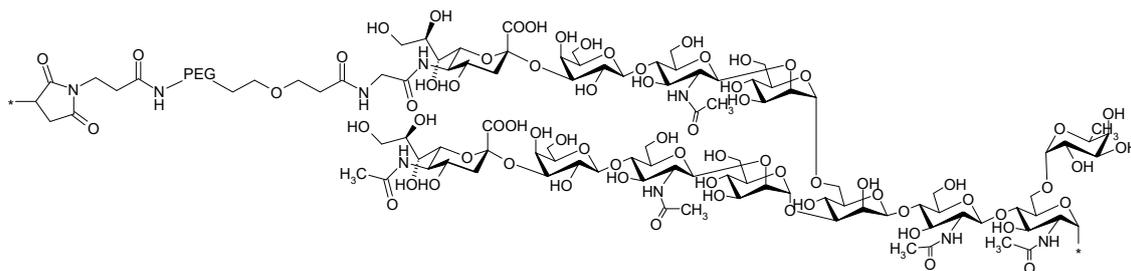
65 En otra modalidad, un resto químico usado en el enlazador se une a al menos una de las proteínas de un glicano ligado a N.

Tanto los N-glicanos como los O-glicanos se unen a proteínas tales como mAb y factores de coagulación mediante las células que producen estas proteínas. La maquinaria de N-glicosilación celular reconoce y glicosila señales de N-glicosilación (motivos N-X-S/T) en la cadena de aminoácidos, a medida que la proteína nascente se transloca desde el ribosoma al retículo endoplásmico (Kiely y otros 1976; Glabe y otros 1980). Igualmente, los O-glicanos se unen a sitios de O-glicosilación específicos en la cadena de aminoácidos, pero los motivos que desencadenan la O-glicosilación son mucho más heterogéneos que las señales de N-glicosilación, y nuestra capacidad para predecir sitios de O-glicosilación en las secuencias de aminoácidos todavía es inadecuada (Julenius y otros 2004). Los métodos de conjugación de polipéptidos con varios grupos poliméricos laterales se describen, por ejemplo, en el documento WO0331464.

En otra modalidad, un resto químico usado en el enlazador comprende un resto químico, que se usa para unir dicho enlazador a al menos una de las proteínas con una estructura seleccionada de los birradicales:

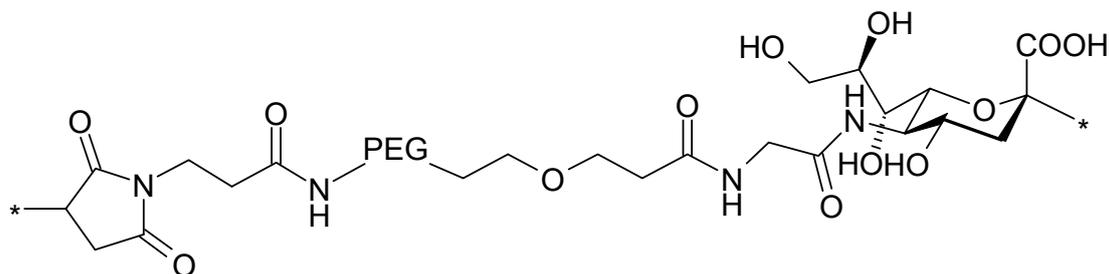


En una modalidad, el enlazador comprende la estructura birradical de



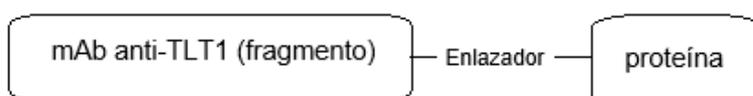
en donde * muestra las posiciones de conexión de este birradical.

En otra modalidad, el enlazador comprende la estructura



en donde * muestra las posiciones de conexión de este birradical.

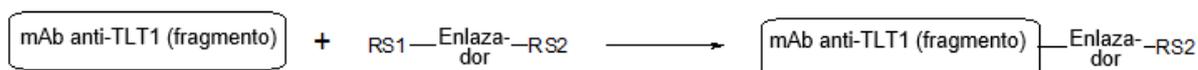
Un compuesto de la fórmula general



en donde "mAb anti-TLT-1 (fragmento)" puede ser un mAb de tamaño completo contra TLT-1 o un fragmento o un análogo derivado de este intelectualmente, tal como un fragmento FAB o un sc-FAB con ninguna, una o más

mutaciones puntuales, el enlazador puede ser un polímero soluble en agua tal como PEG, ácido polisilícico, o un almidón de hidroxietilo, y la proteína es cualquier proteína que se cree tiene una o más propiedades mejoradas cuando se une al mAb anti-TLT-1 (fragmento), puede prepararse, por ejemplo, en un procedimiento en dos etapas.

5 Durante la primera etapa, un enlazador, con dos grupos reactivos diferentes RS1 y RS2, puede unirse al mAb anti-TLT-1 (fragmento). La reacción puede ejecutarse con selectividad de sitio baja o de forma selectiva, de manera que RS1 solo reacciona en una o pocas posiciones del mAb anti-TLT-1 (fragmento). Como un ejemplo no exclusivo, RS1 podría ser un aldehído y reaccionar por aminación reductora solamente con el N-terminal del mAb anti-TLT-1 (fragmento) mediante aminación reductora, conocida por un experto en la técnica. En otro ejemplo no exclusivo, RS1
10 podría ser un grupo maleimida, que puede reaccionar con un tiol libre en el mAb anti-TLT-1 (fragmento).



15 Durante la segunda etapa, el grupo reactivo RS2 puede hacerse reaccionar con baja selectividad de sitio o selectividad de sitio con una molécula FVIIa. Como un ejemplo no exclusivo, una reacción selectiva de sitio en FVIIa puede obtenerse cuando RS2 es un derivado de ácido siálico, que puede reaccionar en presencia de una enzima adecuada tal como ST3Gal-III con glicanos ligados a N, que no terminan exclusivamente con ácidos siálicos.



20 El orden de unión del enlazador a las dos proteínas, específicamente el mAb anti-TLT-1 (fragmento) y la proteína pueden cambiarse, lo que une de esta manera la molécula RS1-Enlazador-RS2 primero a la molécula de proteína y luego al mAb anti-TLT-1 (fragmento).

30 En otro aspecto, la presente invención proporciona composiciones y formulaciones que comprenden moléculas de la invención, tales como las proteínas de fusión, polinucleótidos, vectores y células descritos en la presente descripción. Por ejemplo, la invención proporciona una composición farmacéutica que comprende una o más proteínas de fusión de la invención, formuladas junto con un portador aceptable farmacéuticamente.

35 En consecuencia, un objetivo es proporcionar una formulación farmacéutica que comprende dicho anticuerpo que se presenta en una concentración de 0,25 mg/ml a 250 mg/ml, y en donde dicha formulación tiene un pH de 2,0 a 10,0. La formulación puede comprender, además, un sistema tampón, conservante(s), agente(s) de tonicidad, agente(s) quelante(s), estabilizantes y tensioactivos. El uso de conservantes, agentes isotónicos, agentes quelantes, estabilizantes y tensioactivos en las composiciones farmacéuticas se conoce bien por el experto. Puede hacerse referencia a Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 19^{na} edición, 1995.

40 En una modalidad, la formulación farmacéutica es una formulación acuosa. Dicha formulación es típicamente una solución o una suspensión. El término "formulación acuosa" se define como una formulación que comprende al menos 50 % p/p de agua. Igualmente, el término "solución acuosa" se define como una solución que comprende al menos 50 % p/p de agua, y el término "suspensión acuosa" se define como una suspensión que comprende al menos 50 % p/p de agua.

50 En otro aspecto, la composición farmacéutica es una formulación liofilizada, a la que el médico o el paciente añaden solventes y/o diluyentes antes de su uso.

En un aspecto adicional, la formulación farmacéutica comprende una solución acuosa de dicho anticuerpo, y un tampón, en donde el anticuerpo se presenta en una concentración de 1 mg/ml o más, y en donde dicha formulación tiene un pH de aproximadamente 2,0 a aproximadamente 10,0.

55 El término "tratamiento", como se usa en la presente descripción, se refiere a la terapia médica de cualquier sujeto humano u otro animal que necesita de esto. Se espera que dicho sujeto se haya sometido a un examen físico por parte de un médico, o un profesional médico veterinario, quien ha dado un diagnóstico presuntivo o definitivo que indicaría que el uso de dicho tratamiento específico es beneficioso para la salud de dicho sujeto humano u otro animal. El tiempo y el propósito de dicho tratamiento pueden variar de un individuo a otro, de acuerdo con el *status quo* de la salud del sujeto. Además, se contempla la administración preventiva o profiláctica de anticuerpos, donde la prevención se define como retrasar o evitar el agravamiento de la manifestación de uno o más síntomas de una enfermedad o trastorno. Por lo tanto, dicho tratamiento puede ser profiláctico, paliativo, sintomático y/o curativo.

65 En términos de la presente invención, los tratamientos profilácticos, paliativos, sintomáticos y/o curativos pueden representar aspectos separados de la invención.

Una coagulopatía que resulta en una tendencia hemorrágica aumentada puede provocarse por cualquier deficiencia cualitativa o cuantitativa de cualquier componente procoagulativo de la cascada de coagulación normal, o por cualquier regulación positiva de la fibrinólisis. Tales coagulopatías pueden ser congénitas y/o adquiridas y/o iatrogénicas y se identifican por un experto en la técnica.

5 Los ejemplos no limitantes de hipocoagulopatías congénitas son la hemofilia A, la hemofilia B, la deficiencia del Factor VII, la deficiencia del Factor X, la deficiencia del Factor XI, la enfermedad de von Willebrand y las trombocitopenias tales como la trombocitopenia de Glanzmann y el síndrome de Bernard-Soulier.

10 Un ejemplo no limitante de una coagulopatía adquirida es la deficiencia de serina proteasa causada por la deficiencia de la vitamina K; tal deficiencia de la vitamina K puede provocarse por la administración de un antagonista de vitamina K, tal como la warfarina. La coagulopatía adquirida puede producirse, además, después de un trauma extenso. En este caso, conocido de cualquier otra manera como el “ciclo vicioso de sangramiento”, se caracteriza por hemodilución (trombocitopenia por dilución y dilución de factores de coagulación), hipotermia, consumo de factores de coagulación y trastornos metabólicos (acidosis). La terapia con fluidos y el aumento de la fibrinólisis pueden exacerbar esta situación. Dicha hemorragia puede ser de cualquier parte del cuerpo.

15 La hemofilia A con “inhibidores” (es decir, aloanticuerpos contra el Factor VIII) y la hemofilia B con “inhibidores” (es decir, aloanticuerpos contra el Factor IX) son ejemplos no limitantes de coagulopatías que son parcialmente congénitas y parcialmente adquiridas.

20 Un ejemplo no limitante de una coagulopatía iatrogénica es una sobredosis de medicación anticoagulante - tal como heparina, aspirina, warfarina y otros inhibidores de la agregación plaquetaria - que pueden prescribirse para tratar la enfermedad tromboembólica. Un segundo ejemplo no limitante de coagulopatía iatrogénica es la que se induce por una terapia de fluido excesiva y/o inapropiada, tal como la que puede inducirse mediante una transfusión de sangre.

25 En una modalidad, la hemorragia se asocia con la hemofilia A o B. En otra modalidad, la hemorragia se asocia con la hemofilia A o B con inhibidores adquiridos. En otra modalidad, la hemorragia se asocia con la enfermedad de von Willebrand. En otra modalidad, la hemorragia se asocia con graves daños tisulares. En otra modalidad, la hemorragia se asocia con trauma grave. En otra modalidad, la hemorragia se asocia con cirugía. En otra modalidad, la hemorragia se asocia con gastritis y/o enteritis hemorrágica. En otra modalidad, la hemorragia es un sangrado uterino profuso, tal como en el desprendimiento de la placenta. En otra modalidad, la hemorragia se produce en órganos con una posibilidad limitada de hemostasia mecánica, tal como intracraneal, intraauricular o intraocularmente. En otra modalidad, la hemorragia se asocia con terapia anticoagulante.

30 En una modalidad adicional, la hemorragia puede asociarse con trombocitopenia. En individuos con trombocitopenia, los constructos descritos en la presente descripción pueden administrarse conjuntamente con plaquetas.

35 La siguiente es una lista no limitante de modalidades de la presente invención:

40 Modalidad 1: Una proteína procoagulante que comprende (i) al menos un factor de coagulación, unido covalentemente a (ii) un anticuerpo, o fragmento de este, que es capaz de unirse al (iii) TLT-1, y/o un fragmento o variante de este.

45 Modalidad 2: La proteína procoagulante de acuerdo con la modalidad 1, en donde (iii) es TLT-1, o un fragmento o variante de este.

Modalidad 3: La proteína procoagulante de acuerdo con la modalidad 2, en donde (iii) es TLT-1 (16-162).

50 Modalidad 4: La proteína procoagulante de acuerdo con la modalidad 2, en donde (iii) es TLT-1 (20-125).

Modalidad 5: La proteína procoagulante de acuerdo con la modalidad 2, en donde (iii) es TLT-1 (126-162).

55 Modalidad 6: La proteína procoagulante de acuerdo con una cualquiera de las modalidades 1-2, en donde (i) es una serina proteasa o un derivado de esta.

Modalidad 7: La proteína procoagulante de acuerdo con la modalidad 3, en donde (i) es un polipéptido del Factor VII.

Modalidad 8: La proteína procoagulante de acuerdo con la modalidad 3, en donde (i) es un polipéptido del Factor IX.

60 Modalidad 9: La proteína procoagulante de acuerdo con la modalidad 3, en donde (i) es un polipéptido del Factor X.

Modalidad 10: La proteína procoagulante de acuerdo con una cualquiera de las modalidades 1-2, en donde (i) es un polipéptido del Factor V.

65 Modalidad 11: La proteína procoagulante de acuerdo con una cualquiera de las modalidades 1-2, en donde (i) es un polipéptido del Factor VIII.

Modalidad 12: La proteína procoagulante de acuerdo con una cualquiera de las modalidades 1-2, en donde (i) es un polipéptido del Factor XI.

5 Modalidad 13: La proteína procoagulante de acuerdo con una cualquiera de las modalidades 1-6, en donde (ii) es un anticuerpo monoclonal o un fragmento de este.

10 Modalidad 14: La proteína procoagulante de acuerdo con la modalidad 10, en donde (ii) es un fragmento Fab, un fragmento F(ab')₂, un fragmento Fab', un fragmento Fd, un fragmento Fv, un fragmento ScFv, un fragmento dAb o una región determinante de la complementariedad (CDR) aislada.

Modalidad 15: La proteína procoagulante de acuerdo con la modalidad 11, en donde (ii) es un fragmento Fab.

15 Modalidad 16: La proteína procoagulante de acuerdo con una cualquiera de las modalidades 13-15, en donde el epítipo de (ii) comprende uno o más residuos seleccionados del grupo que consiste en V17, Q18, C19, H20, Y21, R22, L23, Q24, D25, V26, K27, A28, L63, G64, G65, G66, L67, L68, G89, A90, R91, G92, P93, Q94, I95 y L96 de la SEQ ID NO: 5.

20 Modalidad 17: La proteína procoagulante de acuerdo con una cualquiera de las modalidades 13-15, en donde (ii) es un anticuerpo, o un fragmento de este, que es capaz de unirse al mismo epítipo que el mAb0023.

Modalidad 18: Una proteína procoagulante de acuerdo con cualquiera de las modalidades 16-17, en donde la cadena pesada de (ii) comprende:

25 • una secuencia CDR1 de los aminoácidos 50 a 54 (DYFMY) de la SEQ ID NO: 34, en donde uno de estos aminoácidos puede sustituirse por un aminoácido diferente; y/o

• una secuencia CDR2 de los aminoácidos 69 a 85 (YISNGGDSSSYPTVKG) de la SEQ ID NO: 34, en donde uno, dos, tres o cuatro de estos aminoácidos pueden sustituirse por un aminoácido diferente; y/o

30 • una secuencia CDR3 de los aminoácidos 118 a 129 (NKNWDDYIDMDY) de la SEQ ID NO: 34, en donde uno, dos o tres de estos aminoácidos pueden sustituirse por un aminoácido diferente.

Modalidad 19: Una proteína procoagulante de acuerdo con cualquiera de las modalidades 16-18, en donde la cadena ligera de (ii) comprende:

35 • una secuencia CDR1 de los aminoácidos 44 a 60 (KSSQSLLSRTRKNYLA) de la SEQ ID NO: 35, en donde uno, dos, tres o cuatro de estos aminoácidos pueden sustituirse con un aminoácido diferente; y/o

40 • una secuencia CDR2 de los aminoácidos 76 a 82 (WASTRES) de la SEQ ID NO: 35, en donde uno o dos de estos aminoácidos pueden sustituirse con un aminoácido diferente; y/o

• una secuencia CDR3 de los aminoácidos 115 a 122 (KQSYNLLT) de la SEQ ID NO: 35, en donde uno o dos de estos aminoácidos pueden sustituirse con un aminoácido diferente.

45 Modalidad 20: Una proteína procoagulante de acuerdo con cualquiera de las modalidades 16-17, en donde la cadena pesada de (ii) comprende:

50 • una secuencia CDR1 de los aminoácidos 50 a 54 (DYFMY) de la SEQ ID NO: 34, en donde uno de estos aminoácidos puede sustituirse por un aminoácido diferente; y/o

• una secuencia CDR2 de los aminoácidos 69 a 85 (YISNGGDSSSYPTVKG) de la SEQ ID NO: 34, en donde uno, dos, tres o cuatro de estos aminoácidos pueden sustituirse por un aminoácido diferente; y/o

55 • una secuencia CDR3 de los aminoácidos 118 a 129 (NKNWDDYIDMDY) de la SEQ ID NO: 34, en donde uno, dos o tres de estos aminoácidos pueden sustituirse por un aminoácido diferente.

y en donde la cadena ligera de (ii) comprende:

60 • una secuencia CDR1 de los aminoácidos 44 a 60 (KSSQSLLSRTRKNYLA) de la SEQ ID NO: 35, en donde uno, dos, tres o cuatro de estos aminoácidos pueden sustituirse con un aminoácido diferente; y/o

• una secuencia CDR2 de los aminoácidos 76 a 82 (WASTRES) de la SEQ ID NO: 35, en donde uno o dos de estos aminoácidos pueden sustituirse con un aminoácido diferente; y/o

ES 2 757 930 T3

- una secuencia CDR3 de los aminoácidos 115 a 122 (KQSYNLLT) de la SEQ ID NO: 35, en donde uno o dos de estos aminoácidos pueden sustituirse con un aminoácido diferente.

5 Modalidad 21: Una proteína procoagulante de acuerdo con la modalidad 20, en donde la cadena pesada de (ii) comprende:

- una secuencia CDR1 de los aminoácidos 50 a 54 (DYFMY) de la SEQ ID NO: 34; y
- una secuencia CDR2 de los aminoácidos 69 a 85 (YISNGGDSSSYPTVKG) de la SEQ ID NO: 34; y
- una secuencia CDR3 de los aminoácidos 118 a 129 (NKNWDDYYDMDY) de la SEQ ID NO: 34,

10 y en donde la cadena ligera de (ii) comprende:

- una secuencia CDR1 de los aminoácidos 44 a 60 (KSSQSLNSRTRKNYLA) de la SEQ ID NO: 35; y
- una secuencia CDR2 de los aminoácidos 76 a 82 (WASTRES) de la SEQ ID NO: 35; y
- una secuencia CDR3 de los aminoácidos 115 a 122 (KQSYNLLT) de la SEQ ID NO: 35.

15 Modalidad 22: La proteína procoagulante de acuerdo con una cualquiera de las modalidades 13-15, en donde el epítipo de (ii) comprende uno o más residuos seleccionados del grupo que consiste en L36, P37, E38, G39, C40, Q41, P42, L43, V44, S45, S46, A47, V73, T74, L75, Q76, E77, E78, D79, A80, G81, E82, Y83, G84, C85, M86, R91, G92, P93, Q94, I95, L96, H97, R98, V99, S100 y L101 de la SEQ ID NO: 5.

20 Modalidad 23: La proteína procoagulante de acuerdo con una cualquiera de las modalidades 13-15, en donde (ii) es un anticuerpo, o un fragmento de este, que es capaz de unirse al mismo epítipo que el mAb0051.

25 Modalidad 24: Una proteína procoagulante de acuerdo con una cualquiera de las modalidades 22-23, en donde la cadena pesada de (ii) comprende:

- una secuencia CDR1 de los aminoácidos 50 a 54 (DYSMH) de la SEQ ID NO: 36, en donde uno de estos residuos de aminoácidos puede sustituirse por un aminoácido diferente; y/o
- una secuencia CDR2 de los aminoácidos 69 a 85 (VISTYYGDVRYNQKFKG) de la SEQ ID NO: 36, en donde uno, dos, tres o cuatro de estos aminoácidos pueden sustituirse por un aminoácido diferente; y/o
- una secuencia CDR3 de los aminoácidos 118 a 129 (APMITTGAWFAY) de la SEQ ID NO: 36, en donde uno, dos o tres de estos aminoácidos pueden sustituirse por un aminoácido diferente.

30 Modalidad 25: Una proteína procoagulante de acuerdo con cualquiera de las modalidades 22-24, en donde la cadena ligera de (ii) comprende:

- una secuencia CDR1 de los aminoácidos 44 a 54 (KASQSVSNDVA) de la SEQ ID NO: 37, en donde uno, dos o tres de estos aminoácidos pueden sustituirse con un aminoácido diferente; y/o
- una secuencia CDR2 de los aminoácidos 70 a 76 (YASSRYT) de la SEQ ID NO: 37, en donde uno o dos de estos aminoácidos pueden sustituirse con un aminoácido diferente; y/o
- una secuencia CDR3 de los aminoácidos 109 a 117 (QQDYSSPYT) de la SEQ ID NO: 37, en donde uno o dos de estos aminoácidos pueden sustituirse con un aminoácido diferente.

35 Modalidad 26: Una proteína procoagulante de acuerdo con una cualquiera de las modalidades 22-23, en donde la cadena pesada de (ii) comprende:

- una secuencia CDR1 de los aminoácidos 50 a 54 (DYSMH) de la SEQ ID NO: 36, en donde uno de estos residuos de aminoácidos puede sustituirse por un aminoácido diferente; y/o
- una secuencia CDR2 de los aminoácidos 69 a 85 (VISTYYGDVRYNQKFKG) de la SEQ ID NO: 36, en donde uno, dos, tres o cuatro de estos aminoácidos pueden sustituirse por un aminoácido diferente; y/o
- una secuencia CDR3 de los aminoácidos 118 a 129 (APMITTGAWFAY) de la SEQ ID NO: 36, en donde uno, dos o tres de estos aminoácidos pueden sustituirse por un aminoácido diferente.

40 y en donde la cadena ligera de (ii) comprende:

ES 2 757 930 T3

- una secuencia CDR1 de los aminoácidos 44 a 54 (KASQSVSNDVA) de la SEQ ID NO: 37, en donde uno, dos o tres de estos aminoácidos pueden sustituirse con un aminoácido diferente; y/o
 - una secuencia CDR2 de los aminoácidos 70 a 76 (YASSRYT) de la SEQ ID NO: 37, en donde uno o dos de estos aminoácidos pueden sustituirse con un aminoácido diferente; y/o
 - una secuencia CDR3 de los aminoácidos 109 a 117 (QQDYSSPYT) de la SEQ ID NO: 37, en donde uno o dos de estos aminoácidos pueden sustituirse con un aminoácido diferente.
- 10 Modalidad 27:Una proteína procoagulante de acuerdo con la modalidad 26, en donde la cadena pesada de (ii) comprende:
- una secuencia CDR1 de los aminoácidos 50 a 54 (DYSMH) de la SEQ ID NO: 36; y
 - una secuencia CDR2 de los aminoácidos 69 a 85 (VISTYYGDVRYNPKFKG) de la SEQ ID NO: 36; y
 - una secuencia CDR3 de los aminoácidos 118 a 129 (APMITTGAWFAY) de la SEQ ID NO: 36;
- 15 y en donde la cadena ligera de (ii) comprende:
- una secuencia CDR1 de los aminoácidos 44 a 54 (KASQSVSNDVA) de la SEQ ID NO: 37; y
 - una secuencia CDR2 de los aminoácidos 70 a 76 (YASSRYT) de la SEQ ID NO: 37; y
 - una secuencia CDR3 de los aminoácidos 109 a 117 (QQDISSPYT) de la SEQ ID NO: 37.
- 20
- 25 Modalidad 28:La proteína procoagulante de acuerdo con una cualquiera de las modalidades 13-15, en donde el epítipo de (ii) comprende uno o más residuos seleccionados del grupo que consiste en V17, Q18, C19, H20, Y21, R22, L23, Q24, D25, V26, K27, A28, R91, G92, P93, Q94, I95, L96, H97, R98, V99, S100 y L101 de la SEQ ID NO: 5.
- 30 Modalidad 29: La proteína procoagulante de acuerdo con una cualquiera de las modalidades 13-15, en donde (ii) es un anticuerpo, o un fragmento de este, que es capaz de unirse al mismo epítipo que el mAb0062.
- 35 Modalidad 30:Una proteína procoagulante de acuerdo con una cualquiera de las modalidades 28-29, en donde la cadena pesada de (ii) comprende:
- una secuencia CDR1 de los aminoácidos 50 a 54 (SHWIE) de la SEQ ID NO: 42, en donde uno de estos aminoácidos puede sustituirse por un aminoácido diferente; y/o
 - una secuencia CDR2 de los aminoácidos 69 a 85 (EILPGSGNTNYNEKFKG) de la SEQ ID NO: 42, en donde uno, dos, tres o cuatro de estos aminoácidos pueden sustituirse por un aminoácido diferente; y/o
 - una secuencia CDR3 de los aminoácidos 118 a 130 (GYYGLNYDWYFDV) de la SEQ ID NO: 42, en donde uno, dos o tres de estos aminoácidos pueden sustituirse por un aminoácido diferente.
- 40
- 45 Modalidad 31:Una proteína procoagulante de acuerdo con cualquiera de las modalidades 28-30, en donde la cadena ligera de (ii) comprende:
- una secuencia CDR1 de los aminoácidos 44 a 54 (RASQDISNYLN) de la SEQ ID NO: 39, en donde uno, dos o tres de estos aminoácidos pueden sustituirse con un aminoácido diferente; y/o
 - una secuencia CDR2 de los aminoácidos 70 a 76 (YTSRLHS) de la SEQ ID NO: 39, en donde uno o dos de estos aminoácidos pueden sustituirse con un aminoácido diferente; y/o
 - una secuencia CDR3 de los aminoácidos 109 a 117 (QQDTKLPYT) de la SEQ ID NO: 39, en donde uno o dos de estos aminoácidos pueden sustituirse con un aminoácido diferente.
- 50
- 55 Modalidad 32:Una proteína procoagulante de acuerdo con cualquiera de las modalidades 28-31, en donde la cadena pesada de (ii) comprende:
- una secuencia CDR1 de los aminoácidos 50 a 54 (SHWIE) de la SEQ ID NO: 42, en donde uno de estos aminoácidos puede sustituirse por un aminoácido diferente; y/o
 - una secuencia CDR2 de los aminoácidos 69 a 85 (EILPGSGNTNYNEKFKG) de la SEQ ID NO: 42, en donde uno, dos, tres o cuatro de estos aminoácidos pueden sustituirse por un aminoácido diferente; y/o
- 60
- 65

ES 2 757 930 T3

- una secuencia CDR3 de los aminoácidos 118 a 130 (GYGLNYDWYFDV) de la SEQ ID NO: 42, en donde uno, dos o tres de estos aminoácidos pueden sustituirse por un aminoácido diferente.

y en donde la cadena ligera de (ii) comprende:

- una secuencia CDR1 de los aminoácidos 44 a 54 (RASQDISNYLN) de la SEQ ID NO: 39, en donde uno, dos o tres de estos aminoácidos pueden sustituirse con un aminoácido diferente; y/o
- una secuencia CDR2 de los aminoácidos 70 a 76 (YTSRLHS) de la SEQ ID NO: 39, en donde uno o dos de estos aminoácidos pueden sustituirse con un aminoácido diferente; y/o
- una secuencia CDR3 de los aminoácidos 109 a 117 (QQDTKLPYT) de la SEQ ID NO: 39, en donde uno o dos de estos aminoácidos pueden sustituirse con un aminoácido diferente.

Modalidad 33: Una proteína procoagulante de acuerdo con la modalidad 32, en donde la cadena pesada de (ii) comprende:

- una secuencia CDR1 de los aminoácidos 50 a 54 (SHWIE) de la SEQ ID NO: 42; y
- una secuencia CDR2 de los aminoácidos 69 a 85 (EILPGSGNTNYNEKFKG) de la SEQ ID NO: 42; y
- una secuencia CDR3 de los aminoácidos 118 a 130 (GYGLNYDWYFDV) de la SEQ ID NO: 42;

y en donde la cadena ligera de (ii) comprende:

- una secuencia CDR1 de los aminoácidos 44 a 54 (RASQDISNYLN) de la SEQ ID NO: 39; y
- una secuencia CDR2 de los aminoácidos 70 a 76 (YTSRLHS) de la SEQ ID NO: 39; y
- una secuencia CDR3 de los aminoácidos 109 a 117 (QQDTKLPYT) de la SEQ ID NO: 39.

Modalidad 34: La proteína procoagulante de acuerdo con una cualquiera de las modalidades 13-15, en donde el epítipo de (ii) comprende uno o más residuos seleccionados del grupo que consiste en E5, T6, H7, K8, I9, G10, S11, L12, A13, E14, N15, A16, F17, S18, D19, P20 y A21 de la SEQ ID NO: 7.

Modalidad 35: La proteína procoagulante de acuerdo con la modalidad 34, en donde dichos residuos son K8, I9, G10, S11, L12, A13, N15, A16, F17, S18, D19, P20 y A21.

Modalidad 36: La proteína procoagulante de acuerdo con una cualquiera de las modalidades 13-15, en donde el epítipo de (ii) comprende uno o más residuos seleccionados del grupo que consiste en K118, I119, G120, S121, L122, A123, E124, N125, A126, F127 de la SEQ ID NO: 6.

Modalidad 37: La proteína procoagulante de acuerdo con una cualquiera de las modalidades 13-15, en donde (ii) es un anticuerpo, o un fragmento de este, que es capaz de unirse al mismo epítipo que el mAb0061 o el mAb0082.

Modalidad 38: Una proteína procoagulante de acuerdo con una cualquiera de las modalidades 34-37, en donde la cadena pesada de (ii) comprende:

- una secuencia CDR1 de los aminoácidos 49 a 53 (RYWMT) de la SEQ ID NO: 40, en donde uno de estos aminoácidos puede sustituirse por un aminoácido diferente; y/o
- una secuencia CDR2 de los aminoácidos 68 a 84 (EINPDSSTINYNP SLKD) de la SEQ ID NO: 40, en donde uno, dos, tres o cuatro de estos aminoácidos pueden sustituirse por un aminoácido diferente; y/o
- una secuencia CDR3 de los aminoácidos 117 a 121 (GVFTS) de la SEQ ID NO: 40, en donde uno, dos o tres de estos aminoácidos pueden sustituirse por un aminoácido diferente.

Modalidad 39: Una proteína procoagulante de acuerdo con cualquiera de las modalidades 34-38, en donde la cadena ligera de (ii) comprende:

- una secuencia CDR1 de los aminoácidos 43 a 58 (RSSQLVHRNGNTYFH) de la SEQ ID NO: 41, en donde uno, dos, tres o cuatro de estos aminoácidos pueden sustituirse con un aminoácido diferente; y/o
- una secuencia CDR2 de los aminoácidos 74 a 80 (KVS NRFS) de la SEQ ID NO: 41, en donde uno o dos de estos aminoácidos pueden sustituirse con un aminoácido diferente; y/o

- una secuencia CDR3 de los aminoácidos 113 a 121 (SQSTHVPYT) de la SEQ ID NO: 41, en donde uno o dos de estos aminoácidos pueden sustituirse con un aminoácido diferente.

Modalidad 40: Una proteína procoagulante de acuerdo con cualquiera de las modalidades 34-39, en donde la cadena pesada de (ii) comprende:

- una secuencia CDR1 de los aminoácidos 49 a 53 (RYWMT) de la SEQ ID NO: 40, en donde uno de estos aminoácidos puede sustituirse por un aminoácido diferente; y/o

- una secuencia CDR2 de los aminoácidos 68 a 84 (EINPDSSTINYNP SLKD) de la SEQ ID NO: 40, en donde uno, dos, tres o cuatro de estos aminoácidos pueden sustituirse por un aminoácido diferente; y/o

- una secuencia CDR3 de los aminoácidos 117 a 121 (GVFTS) de la SEQ ID NO: 40, en donde uno, dos o tres de estos aminoácidos pueden sustituirse por un aminoácido diferente.

y en donde la cadena ligera de (ii) comprende:

- una secuencia CDR1 de los aminoácidos 43 a 58 (RSSQLVHRNGNTYFH) de la SEQ ID NO: 41, en donde uno, dos, tres o cuatro de estos aminoácidos pueden sustituirse con un aminoácido diferente; y/o

- una secuencia CDR2 de los aminoácidos 74 a 80 (KVS NRFS) de la SEQ ID NO: 41, en donde uno o dos de estos aminoácidos pueden sustituirse con un aminoácido diferente; y/o

- una secuencia CDR3 de los aminoácidos 113 a 121 (SQSTHVPYT) de la SEQ ID NO: 41, en donde uno o dos de estos aminoácidos pueden sustituirse con un aminoácido diferente.

Modalidad 41: Una proteína procoagulante de acuerdo con la modalidad 40, en donde la cadena pesada de (ii) comprende:

- una secuencia CDR1 de los aminoácidos 49 a 53 (RYWMT) de la SEQ ID NO: 40; y

- una secuencia CDR2 de los aminoácidos 68 a 84 (EINPDSSTINYNP SLKD) de la SEQ ID NO: 40; y

- una secuencia CDR3 de los aminoácidos 117 a 121 (GVFTS) de la SEQ ID NO: 40;

y en donde la cadena ligera de (ii) comprende:

- una secuencia CDR1 de los aminoácidos 43 a 58 (RSSQLVHRNGNTYFH) de la SEQ ID NO: 41; y

- una secuencia CDR2 de los aminoácidos 74 a 80 (KVS NRFS) de la SEQ ID NO: 41; y

- una secuencia CDR3 de los aminoácidos 113 a 121 (SQSTHVPYT) de la SEQ ID NO: 41.

Modalidad 42: Una proteína procoagulante de acuerdo con cualquiera de las modalidades 34-37, en donde la cadena pesada de (ii) comprende:

- una secuencia CDR1 de los aminoácidos 49 a 53 (RYWMT) de la SEQ ID NO: 50, en donde uno de estos aminoácidos puede sustituirse por un aminoácido diferente; y/o

- una secuencia CDR2 de los aminoácidos 68 a 84 (EINPDSSTINYNP SLKD) de la SEQ ID NO: 50, en donde uno, dos, tres o cuatro de estos aminoácidos pueden sustituirse por un aminoácido diferente; y/o

- una secuencia CDR3 de los aminoácidos 117 a 121 (GVFTS) de la SEQ ID NO: 50, en donde uno de estos aminoácidos puede sustituirse por un aminoácido diferente;

y en donde la cadena ligera de (ii) comprende:

- una secuencia CDR1 de los aminoácidos 43 a 58 (RSSQLVHRNGNTYFH) de la SEQ ID NO: 41, en donde uno, dos, tres o cuatro de estos aminoácidos pueden sustituirse con un aminoácido diferente; y/o

- una secuencia CDR2 de los aminoácidos 74 a 80 (KVS NRFS) de la SEQ ID NO: 41, en donde uno o dos de estos aminoácidos pueden sustituirse con un aminoácido diferente; y/o

- una secuencia CDR3 de los aminoácidos 113 a 121 (SQSTHVPYT) de la SEQ ID NO: 41, en donde uno o dos de estos aminoácidos pueden sustituirse con un aminoácido diferente.

ES 2 757 930 T3

Modalidad 43: Una proteína procoagulante de acuerdo con la modalidad 42, en donde la cadena pesada de (ii) comprende:

- una secuencia CDR1 de los aminoácidos 49 a 53 (RYWMT) de la SEQ ID NO: 50; y

5 • una secuencia CDR2 de los aminoácidos 68 a 84 (EINPDSSTINYAPSLKD) de la SEQ ID NO: 50; y

- una secuencia CDR3 de los aminoácidos 117 a 121 (GVFTS) de la SEQ ID NO: 50;

y en donde la cadena ligera de (ii) comprende:

10 • una secuencia CDR1 de los aminoácidos 43 a 58 (RSSQSLVHRNGNTYFH) de la SEQ ID NO: 41; y

- una secuencia CDR2 de los aminoácidos 74 a 80 (KVSNRFS) de la SEQ ID NO: 41; y

15 • una secuencia CDR3 de los aminoácidos 113 a 121 (SQSTHVPYT) de la SEQ ID NO: 41.

Modalidad 44: La proteína procoagulante de acuerdo con una cualquiera de las modalidades 13-15, en donde el paratopo de (ii) comprende uno o más residuos seleccionados del grupo que consiste en H50, N52, Y56, H58, Y73, F79, S115, T116, V118 y Y120 de la cadena ligera (L) anti-TLT-1 (SEQ ID NO: 33), y residuos V20, F45, R49, Y50, W51, E68, T75, N77, S116, G117, V118 y T120 de la cadena pesada (H) anti-TLT-1 (SEQ ID NO: 32)

20

Modalidad 45: La proteína procoagulante de acuerdo con una cualquiera de las modalidades 13-15 y 44, en donde el epítipo de (ii) comprende uno o más residuos seleccionados del grupo que consiste en K133, I134, G135, S136, L137, A138, N140, A141, F142, S143, D144, P145 y A146 de la SEQ ID NO: 4.

25

Modalidad 46: La proteína procoagulante de acuerdo con una cualquiera de las modalidades 13-15, en donde (ii) es un anticuerpo, o un fragmento de este, que es capaz de unirse al mismo epítipo que el mAb0012.

Modalidad 47: Una proteína procoagulante de acuerdo con cualquiera de las modalidades 44-46, en donde la cadena pesada de (ii) comprende:

30

- una secuencia CDR1 de los aminoácidos 49 a 53 (RYWMT) de la SEQ ID NO: 32, en donde uno de estos aminoácidos puede sustituirse por un aminoácido diferente; y/o

35 • una secuencia CDR2 de los aminoácidos 68 a 84 (EINPDSSTINYTPSLKD) de la SEQ ID NO: 32, en donde uno, dos, tres o cuatro de estos aminoácidos pueden sustituirse por un aminoácido diferente; y/o

- una secuencia CDR3 de los aminoácidos 117 a 121 (GVFTS) de la SEQ ID NO: 32, en donde uno, dos o tres de estos aminoácidos pueden sustituirse por un aminoácido diferente.

40

Modalidad 48: Una proteína procoagulante de acuerdo con cualquiera de las modalidades 44-47, en donde la cadena ligera de (ii) comprende:

45

- una secuencia CDR1 de los aminoácidos 43 a 58 (RSSQSLVHRNGNTYFTH) de la SEQ ID NO: 33, en donde uno, dos, tres o cuatro de estos aminoácidos pueden sustituirse con un aminoácido diferente; y/o

- una secuencia CDR2 de los aminoácidos 74 a 80 (KVSNRFS) de la SEQ ID NO: 33, en donde uno o dos de estos aminoácidos pueden sustituirse con un aminoácido diferente; y/o

50 • una secuencia CDR3 de los aminoácidos 113 a 121 (SQSTHVPYT) de la SEQ ID NO: 33, en donde uno o dos de estos aminoácidos pueden sustituirse con un aminoácido diferente.

Modalidad 49: Una proteína procoagulante de acuerdo con cualquiera de las modalidades 44-48, en donde la cadena pesada de (ii) comprende:

55

- una secuencia CDR1 de los aminoácidos 49 a 53 (RYWMT) de la SEQ ID NO: 32, en donde uno de estos aminoácidos puede sustituirse por un aminoácido diferente; y/o

60 • una secuencia CDR2 de los aminoácidos 68 a 84 (EINPDSSTINYTPSLKD) de la SEQ ID NO: 32, en donde uno, dos, tres o cuatro de estos aminoácidos pueden sustituirse por un aminoácido diferente; y/o

- una secuencia CDR3 de los aminoácidos 117 a 121 (GVFTS) de la SEQ ID NO: 32, en donde uno, dos o tres de estos aminoácidos pueden sustituirse por un aminoácido diferente

65 y en donde la cadena ligera de (ii) comprende:

- una secuencia CDR1 de los aminoácidos 43 a 58 (RSSQSLVHRNGNTYFTH) de la SEQ ID NO: 33, en donde uno, dos, tres o cuatro de estos aminoácidos pueden sustituirse con un aminoácido diferente; y/o
 - una secuencia CDR2 de los aminoácidos 74 a 80 (KVSNRFS) de la SEQ ID NO: 33, en donde uno o dos de estos aminoácidos pueden sustituirse con un aminoácido diferente; y/o
 - una secuencia CDR3 de los aminoácidos 113 a 121 (SQSTHVPYT) de la SEQ ID NO: 33, en donde uno o dos de estos aminoácidos pueden sustituirse con un aminoácido diferente.
- 10 Modalidad 50: Una proteína procoagulante de acuerdo con la modalidad 49, en donde la cadena pesada de (ii) comprende:
- una secuencia CDR1 de los aminoácidos 49 a 53 (RYWMT) de la SEQ ID NO: 32; y
 - una secuencia CDR2 de los aminoácidos 68 a 84 (EINPDSSTINYTPSLKD) de la SEQ ID NO: 32; y
 - una secuencia CDR3 de los aminoácidos 117 a 121 (GVFTS) de la SEQ ID NO: 32;
- y en donde la cadena ligera de (ii) comprende:
- una secuencia CDR1 de los aminoácidos 43 a 58 (RSSQSLVHRNGNTYFTH) de la SEQ ID NO: 33; y
 - una secuencia CDR2 de los aminoácidos 74 a 80 (KVSNRFS) de la SEQ ID NO: 33; y
 - una secuencia CDR3 de los aminoácidos 113 a 121 (SQSTHVPYT) de la SEQ ID NO: 33.
- Modalidad 51: La proteína procoagulante de acuerdo con una cualquiera de las modalidades 1-50, en donde (ii) es un anticuerpo monoclonal humano o un fragmento de este.
- 30 Modalidad 52: La proteína procoagulante de acuerdo con una cualquiera de las modalidades 1-50, en donde (ii) es un anticuerpo quimérico o un fragmento de este.
- Modalidad 53: La proteína procoagulante de acuerdo con una cualquiera de las modalidades 1-50, en donde (ii) es un anticuerpo humanizado o un fragmento de este.
- 35 Modalidad 54: La proteína procoagulante de acuerdo con una cualquiera de las modalidades 51-53, en donde el isotipo de (ii) es IgG.
- Modalidad 55: La proteína procoagulante de acuerdo con la modalidad 54, en donde el isotipo es IgG1, IgG2 o IgG4.
- 40 Modalidad 56: La proteína procoagulante de acuerdo con la modalidad 55, en donde el isotipo es IgG4.
- Modalidad 57: La proteína procoagulante de acuerdo con una cualquiera de las modalidades 1-56, que comprende, además, un enlazador entre (i) e (ii).
- 45 Modalidad 58: La proteína procoagulante de acuerdo con una cualquiera de las modalidades 1-57, que es una proteína de fusión.
- Modalidad 59: La proteína procoagulante de acuerdo con una cualquiera de las modalidades 1-57, que es un conjugado de (i) e (ii).
- 50 Modalidad 60: El conjugado de acuerdo con la modalidad 59, en donde (i) y (ii) se unen covalentemente mediante un enlazador que comprende polietilenglicol (PEG).
- 55 Modalidad 61: El conjugado de acuerdo con una cualquiera de las modalidades 59-60, en donde (i) y (ii) se conjugan covalentemente mediante un glicano de al menos una de dichas proteínas.
- Modalidad 62: Un proceso para preparar una composición que comprende al menos un conjugado de acuerdo con una cualquiera de las modalidades 59-61, que comprende conjugar químicamente (i) el anticuerpo para TLT-1 o fragmento de este con un grupo reactivo (RS1) de un enlazador y hacer reaccionar (ii) el factor de coagulación con otro grupo reactivo (RS2) de dicho enlazador.
- 60 Modalidad 63: El proceso como se definió en la modalidad 62, en donde (i) es un anticuerpo monoclonal.

ES 2 757 930 T3

- Modalidad 64:El proceso como se definió en la modalidad 62, en donde (i) es un fragmento de un anticuerpo monoclonal.
- 5 Modalidad 65:El proceso como se definió en la modalidad 64, en donde (i) es un fragmento Fab.
- Modalidad 66: El proceso como se definió en la modalidad 65, en donde dicho fragmento Fab contiene una mutación de Cys en la región constante.
- 10 Modalidad 67:El proceso como se definió en la modalidad 62, en donde (i) es un fragmento sc-Fab.
- Modalidad 68:El proceso como se definió en una cualquiera de las modalidades 62-67, en donde (ii) es un polipéptido de FV.
- 15 Modalidad 69:El proceso como se definió en una cualquiera de las modalidades 62-67, en donde (ii) es un polipéptido de FVIIa.
- Modalidad 70:El proceso como se definió en una cualquiera de las modalidades 62-67, en donde (ii) es un polipéptido de FVIII.
- 20 Modalidad 71:El proceso como se definió en una cualquiera de las modalidades 62-67, en donde (ii) es un polipéptido de FIX.
- Modalidad 72:El proceso como se definió en una cualquiera de las modalidades 62-67, en donde (ii) es un polipéptido de FX.
- 25 Modalidad 73:El proceso como se definió en una cualquiera de las modalidades 62-67, en donde (ii) es un polipéptido de FXI.
- Modalidad 74:El proceso como se definió en una cualquiera de las modalidades 62-73, en donde dicho enlazador es uno soluble en agua.
- 30 Modalidad 75:El proceso como se definió en una cualquiera de las modalidades 62-74, en donde dicho enlazador es un polímero.
- 35 Modalidad 76:El proceso como se definió en una cualquiera de las modalidades 74-75, en donde (ii) es polietilenglicol (PEG).
- Modalidad 77:El proceso como se definió en una cualquiera de las modalidades 74-75, en donde (ii) es ácido polisialico.
- 40 Modalidad 78:El proceso como se definió en una cualquiera de las modalidades 74-75, en donde (ii) es almidón de hidroxietilo.
- 45 Modalidad 79:El proceso como se definió en una cualquiera de las modalidades 62-78, en donde RS1 es un aldehído.
- Modalidad 80:El proceso como se definió en una cualquiera de las modalidades 62-78, en donde RS1 es un grupo maleimida.
- 50 Modalidad 81:El proceso como se definió en una cualquiera de las modalidades 62-78, en donde RS1 es un derivado de carbohidrato activado capaz de reaccionar en una reacción catalizada por enzima.
- Modalidad 82:El proceso como se definió en la modalidad 81, en donde RS1 es un derivado de ácido siálico activado capaz de reaccionar en una reacción catalizada por enzima.
- 55 Modalidad 83:El proceso como se definió en la modalidad 82, en donde RS1 es ácido O²-[5']citidilil-ξ-neuramínico.
- Modalidad 84:El proceso como se definió en una cualquiera de las modalidades 62-83, en donde RS2 es un aldehído.
- 60 Modalidad 85:El proceso como se definió en una cualquiera de las modalidades 62-83, en donde RS2 es un grupo maleimida.
- Modalidad 86:El proceso como se definió en una cualquiera de las modalidades 62-83, en donde RS2 es un derivado de carbohidrato activado capaz de reaccionar en una reacción catalizada por enzima.
- 65 Modalidad 87:El proceso como se definió en una cualquiera de las modalidades 62-83, en donde RS2 es un derivado de ácido siálico.

Modalidad 88: La proteína procoagulante de acuerdo con una cualquiera de las modalidades 1-61, en la que (ii) tiene una K_D inferior a 100 nM, tal como inferior a 10 nM.

5 Modalidad 89: Un método para dirigir un factor de coagulación, o un fragmento funcional de este, a la superficie de plaquetas activadas, dicho método comprende el contacto de las plaquetas activadas con una proteína procoagulante de acuerdo con una cualquiera de las modalidades 1-61.

10 Modalidad 90: Una proteína procoagulante de acuerdo con una cualquiera de las modalidades 1-61 para su uso como un medicamento.

Modalidad 91: La proteína procoagulante de la modalidad 87 para su uso como un procoagulante.

15 Modalidad 92: Una formulación farmacéutica que comprende la proteína procoagulante de acuerdo con una cualquiera de las modalidades 1-61.

Modalidad 93: La proteína procoagulante de acuerdo con una cualquiera de las modalidades 1-61 o la formulación farmacéutica de acuerdo con la modalidad 92 para su uso en el tratamiento de una coagulopatía.

20 Modalidad 94: El uso de la proteína procoagulante de acuerdo con una cualquiera de las modalidades 1-61 para la fabricación de un medicamento para el tratamiento de una coagulopatía.

Modalidad 95: El uso de acuerdo con una cualquiera de las modalidades 93 o 94, en donde dicha coagulopatía es la hemofilia A, con o sin inhibidores, o la hemofilia B, con o sin inhibidores.

25 Modalidad 96: Un método para tratar la coagulopatía, que comprende administrar una cantidad eficaz de la proteína procoagulante de acuerdo con una cualquiera de las modalidades 1-61 o la formulación de la modalidad 93 a un individuo que lo necesita.

30 Modalidad 97: El método de acuerdo con la modalidad 95, en donde dicha coagulopatía es la hemofilia A, con o sin inhibidores, y la hemofilia B, con o sin inhibidores.

Modalidad 98: Un polinucleótido que codifica la proteína procoagulante de acuerdo con una cualquiera de las modalidades 1-61.

35 Modalidad 99: Una célula aislada que comprende la proteína de fusión de acuerdo con una cualquiera de las modalidades 1-61 y/o el polinucleótido de acuerdo con la modalidad 97.

40 Modalidad 100: Una proteína procoagulante de una cualquiera de las modalidades 1-61, en donde (ii) se une al TLT-1 sin competir con la unión del fibrinógeno al TLT-1.

Modalidad 101: Una proteína procoagulante de una cualquiera de las modalidades 1-61, en donde (ii) no inhibe la agregación plaquetaria.

45 La presente invención se ilustra adicionalmente mediante los ejemplos siguientes que no deben interpretarse como limitantes adicionales.

EJEMPLOS

50 En los ejemplos, los anticuerpos anti-TLT-1 y fragmentos de estos, por ejemplo, fragmentos Fab, se usaron para dirigir los factores de coagulación a las plaquetas activadas. Para facilitar la interpretación de los datos presentados en los ejemplos, la Tabla 3a resume la información con respecto a algunos de los anticuerpos anti-TLT-1 y fragmentos de estos que se describen en más detalle más abajo. En la Tabla 3A, los anticuerpos parentales, variantes, fragmentos, fusiones y conjugados de estos se enumeran con referencia al mAb parental y el tipo de proteína. Nombre se refiere al nombre de la proteína, Parental se refiere al anticuerpo a partir del cual se deriva el mAb, Fab o fusión/conjugado anti-TLT-1 y Tipo define si la proteína es un mAb, un Fab, una fusión por ADN (fusión) con un factor de coagulación o un conjugado químico con un factor de coagulación (conjugado).

Tabla 3A: Visión general de anticuerpos (mAb), fragmentos de anticuerpos (Fab) y proteínas de fusión

Nombre	Parental	Tipo
mAb0012	mAb0012	mAb
mAb0023	mAb0023	mAb
mAb0051	mAb0051	mAb
mAb0052	mAb0052	mAb
mAb0061	mAb0012	mAb

	mAb0062	mAb0052	mAb
	mAb0082	mAb0012	mAb
5	Fab0003	mAb0052	Fab
	Fab0004	mAb0023	Fab
	Fab0012	mAb0012	Fab
	Fab0023	mAb0023	Fab
10	Fab0051	mAb0051	Fab
	Fab0052	mAb0052	Fab
	Fab0061	mAb0012	Fab
	Fab0074	mAb0051	Fab
	Fab0082	mAb0012	Fab
15	Fab0084	mAb0012	Fab
	FVIIa-Fab1001	mAb0012	Conjugado (FVIIa)
	FVIIa-Fab1029	mAb0012	Conjugado (FVIIa)
	FVII-Fab5001	mAb0052	Fusión (FVII)
20	FVIIa-Fab9015	mAb0012	Conjugado (FVIIa)
	FIX-Fab0135	mAb0012	Fusión (FIX)
	FIX-mAb0145	mAb0012	Conjugado (FIX)
25	FIX-Fab0155	mAb0012	Conjugado (FIX)

Ejemplo 1: Clonación y expresión del antígeno hTLT-1 ECD-His.

Las secuencias nucleotídicas que codifican el dominio extracelular del TLT-1 humano (hTLT-1) (Figura 1) junto con una etiqueta His-6 en el C-terminal se amplificaron por PCR con un cebador directo que contiene un sitio de reconocimiento HindIII junto con una secuencia de kozak, y un cebador inverso que contiene un codón de parada y un sitio de reconocimiento EcoRI (Figura 2). El fragmento PCR digerido con HindIII y EcoRI se insertó en los sitios HindIII y EcoRI de un vector de expresión basado en pTT. El vector pTT se describe esencialmente en Durocher, Y. y otros, (2002) Nucleic Acid Res, 30: E9. El plásmido de expresión resultante se designó pTT-hTLT-1 ECD-His. Las secuencias de nucleótidos y aminoácidos para hTLT-1 ECD-His se muestran en las SEQ ID NO: 3 y 4. El pTT-hTLT-1 ECD-His se transfirió en células en suspensión HEK293-6E para expresar transitoriamente el hTLT-1 ECD-His. Las células HEK293-6E se cultivaron en medio Freestyle HEK293 (GIBCO, núm. de cat. 12338-018) suplementado con P/S al 1 % (GIBCO, núm. de cat. 15140-122), plurónico al 0,1 % (GIBCO, núm. de cat. 24040-032) y Geneticin 25 ug/ml (GIBCO, núm. de cat. 10131-019) y las células se transfectaron a una densidad celular de 1 mill/ml mediante el uso de 293fectin (Invitrogen, núm. de cat. 12347-019). Para cada litro de células HEK293-6E, la transfección se realizó mediante la dilución de 1 mg de ADN de pTT-hTLT-1 ECD-His en 30 ml de Optimem (dilución A) y mediante la dilución de 1 ml de 293fectina en 30 ml de Optimem (GIBCO, núm. de cat. 51985-026, dilución B). Las diluciones A y B se mezclaron y se incubaron a temperatura ambiente durante 30 minutos. La mezcla de transfección se añadió posteriormente a las células HEK293-6E y las células se incubaron a 37°C en una incubadora humidificada con rotación orbital (125 rpm). Cinco a siete días después de la transfección, las células se eliminaron mediante centrifugación y los sobrenadantes resultantes que contenían el hTLT-1 ECD-His se esterilizaron por filtración antes de la purificación.

Ejemplo 2: Purificación y caracterización de la proteína hTLT-1 ECD-His.

La purificación de la proteína hTLT-1 ECD-His se llevó a cabo como un proceso en 2 etapas compuesto de 1) cromatografía de afinidad a His mediante el uso de la resina cargada con cobalto TALON (Clontech, núm. de cat. 635506) y 2) cromatografía de intercambio aniónico mediante el uso de la resina de partículas finas Source 15Q (GE Healthcare, núm. de cat. 17-0947). Las purificaciones se llevaron a cabo mediante el uso de un sistema de cromatografía ÄktaExplorer (GE Healthcare, núm. de cat. 18-1112-41). Los sistemas tampón usados para la primera etapa de purificación fueron un tampón de equilibrado compuesto de Hepes 20 mM, pH 7,0, NaCl 150 mM, un tampón de lavado compuesto de Hepes 20 mM, pH 7,0, NaCl 0,5 M y un tampón de elución compuesto de Hepes 20 mM, pH 7,0, imidazol 150 mM. El sobrenadante celular se aplicó directamente sin ningún ajuste en una columna TALON equilibrada previamente. La columna se lavó con 20 volúmenes de columna de tampón de equilibrado, 20 volúmenes de columna de tampón de lavado y por último con 20 volúmenes de columna de tampón de equilibrado. La proteína se eluyó isocráticamente en aproximadamente 5 volúmenes de columna de tampón de elución. La masa molecular de la proteína eluida se analizó mediante el uso de SDS-PAGE/Coomassie NuPage 4–12 % de geles Bis-Tris (Invitrogen, núm. de cat. NP0321BOX) y la configuración de espectroscopía de masas de desorción/ionización láser asistida por matriz con analizador de tiempo de vuelo (MALDI-TOF MS) en un sistema Micro-flex (Bruker Daltonics). Aquí, se observaron dos masas de proteínas distintas de aproximadamente 16,7 y 33,4 kDa de cantidades casi iguales. Las masas observadas correspondieron a formas de monómero y dímero del hTLT-1 ECD-His. La reducción de la proteína resultó en la eliminación completa de la proteína de 33,4 kDa, a la vez que se intensificó la proteína de 16,7 kDa según

lo juzgado a partir de un análisis de SDS-PAGE/Coomassie. Por lo tanto, la proteína hTLT-1 ECD-His contenía un dímero de C-C interligado. Para separar el monómero del dímero, se empleó una segunda etapa de purificación. Los sistemas tampón usados para esta etapa de purificación fueron un tampón de equilibrado compuesto de Hepes 50 mM, pH 8,0 y un tampón de elución compuesto de Hepes 50 mM, pH 8,0, NaCl 1 M. La muestra se ajustó a un pH de 8,0 mediante el uso de NaOH 1 M y después se diluyó hasta una conductividad de aproximadamente 10 mS/cm. La proteína se aplicó a una columna Source 15Q equilibrada previamente, se lavó con 5 volúmenes de columna de equilibrado y se eluyó mediante el uso de 0 – 100 % de tampón de elución sobre 20 volúmenes de columna. En base al monitoreo UV280, se evidenciaron dos picos con casi separación de la línea base. El análisis de las fracciones sobre los dos picos mediante el uso de análisis de SDS-PAGE/Coomassie, MS MALDI-TOF y Dynamic Light-Dispersion (DLS) mediante el uso de un instrumento Dynapro (Wyatt Technology) mostró la presencia del monómero proteína hTLT-1 ECD-His en el pico que eluyó primero y Cys-Cys en el pico que eluyó segundo. Se preparó un agrupamiento que contiene la proteína monómero hTLT-1 ECD-His solamente. La integridad de la proteína final se analizó basado en una configuración del método de cromatografía líquida de alta resolución de exclusión por tamaño (SEC-HPLC) en un sistema Agilent LC 1100/1200 y mediante el uso de una columna BIOsep-SEC-S3000 de 300x7,8 mm (Phenomenex, núm. de cat. 00H-2146-KO) y un tampón de corrida compuesto de NaFosfato 200 mM pH 6,9, NaCl 300 mM e isopropanol al 10 %. La proteína eluyó como un pico simétrico único a un tiempo de retención de aproximadamente 9,9 min a una tasa de flujo de 1 ml/min.

Se preparó un lote del hTLT-1 ECD-His para un estudio de inmunización para la producción de anticuerpos monoclonales anti-TLT-1. De esta forma, la proteína se dializó en un tampón de PBS isotónico mediante el uso de un casete de diálisis Slide-A-Lyzer de 10 kDa MWCO (Pierce, núm. de cat. 66453). Para medir la concentración de proteína final, se usó un espectrofotómetro NanoDrop (Thermo Scientific) junto con un coeficiente de extinción de 0,55.

Ejemplo 3: Preparación de anticuerpos monoclonales para TLT-1.

Ratones RBF se inmunizaron mediante la inyección de 50 µg del hTLT-1 ECD-His. FCA por vía subcutánea seguido de dos inyecciones con 20 µg del hTLT-1 ECD-His en FIA. Los ratones con respuesta alta se reforzaron por vía intravenosa con 25 µg de hTLT-1 ECD-His y los bazos se cosecharon después de 3 días. Las células del bazo se fusionaron con la línea celular Fox de mieloma. Los sobrenadantes se tamizaron para la producción de anticuerpos específicos para hTLT-1 en un ELISA específico y en un ensayo FACS mediante el uso de células CHO transfectadas con hTLT-1 o falsamente transfectadas como células objetivo positivas y negativas, respectivamente. Se realizó un tamizaje secundario en plaquetas en reposo frente a plaquetas activadas con agonistas dobles de origen humano, de monos cynomolgus, de perros, de conejos o de ratón.

Ejemplo 4: Clonación y secuenciación de ADNc de LC y HC de mAb anti-TLT-1 a partir de hibridoma.

El ARN total se extrajo a partir de cuatro hibridomas diferentes que expresan mAb anti-TLT-1 denominados: 0012Hyb, 0023Hyb, 0051Hyb y 0052Hyb. El ARN se extrajo a partir de células de hibridomas mediante el uso del mini kit RNeasy (Qiagen, núm. de cat. 74106) y una alícuota del ARN resultante se usó como plantilla para la síntesis de la primera cadena de ADNc mediante el uso del kit de amplificación SMART RACE cDNA (Clontech, núm. de cat. 634914) según las instrucciones del fabricante para 5' RACE y mediante el uso del cebador A 5' RACE CDS junto con un oligonucleótido de ARN SMART II A. Los ADNc de región de codificación de cadena ligera (LC) y cadena pesada (HC) de cada uno de los cuatro hibridomas anti-TLT-1 se amplificaron posteriormente por PCR mediante el uso de una mezcla de cebador directo de UPM junto con o bien un cebador inverso específico de LC, kappa de ratón (número de cebador inverso 339, 348 o 610) o junto con un cebador inverso que reconoce las secuencias de IgG1, IgG2a, IgG2b o IgG3 de ratón (número de cebador inverso 341, 347, 613, 614, 615 o 616, las secuencias de los cebadores se muestran en la Tabla 4 y las SEQ ID NO 60-145). Las reacciones de PCR se realizaron mediante el uso de Phusion PCR mix (FinnZymes, cat núm.: F-531L). Los fragmentos de PCR resultantes se clonaron mediante el uso del kit de clonación Zero Blunt TOPO PCR para secuenciación (Invitrogen, núm. de cat. K287540) y se secuenciaron. Las secuencias de dominio variable para 0012LC y HC se muestran en la Figura 3.

Ejemplo 5: Desarrollo de constructos de expresión pTT-0012HC, pTT-0023HC, pTT-0051HC y pTT-0052HC.

Las secuencias de ADN que codifican el dominio variable de la HC (V_H) aisladas a partir de cada uno de los cuatro hibridomas anti-TLT-1 diferentes se amplificaron por PCR con cebadores directos que contienen un sitio de enzima de restricción HindIII y cebadores inversos que contienen un sitio de enzima de restricción NheI para propósitos de clonación. Las secuencias de ADN 0012V_H, 0023V_H, 0051V_H y 0052V_H se amplificaron por PCR mediante el uso de Phusion PCR mix (FinnZymes, cat núm. F-531L) con los siguientes pares de números de cebadores: 490 (directo) + 491 (inverso), 546 (directo) + 547 (inverso), 627 (directo) + 628 (inverso) y 617 (directo) + 618 (inverso), las secuencias de cebadores se muestran en la Tabla 4 y las SEQ ID NO 60-145), respectivamente, y se insertaron en los sitios de enzimas de restricción HindIII y NheI de un vector basado en pTT denominado pTT-hlgG4, que contiene las secuencias que codifican la región constante para la HC de IgG4 (es decir, CH1-bisagra-CH2-CH3). El vector pTT se describe esencialmente en Durocher, Y. y otros, (2002) Nucleic Acid Res, 30: E9 (Figura 22). Los vectores resultantes se denominaron pTT-0012HC (Figura 5), pTT-0023HC, pTT-0051HC y pTT-0052HC. Las secuencias de aminoácidos de HC anti-TLT-1 codificadas por los vectores de expresión se muestran en (SEQ ID NO: 0012HC: 32, 0023HC: 34, 0051HC: 36, 0052HC: 38).

Ejemplo 6: Desarrollo de constructos de expresión pTT-0012LC, pTT-0023LC, pTT-0051LC y pTT-0052LC.

Las secuencias de ADN que codifican el dominio variable de la LC (V_L) aisladas a partir de cada uno de los cuatro hibridomas anti-TLT-1 diferentes se amplificaron por PCR con cebadores directos que contienen un sitio de enzima de restricción HindIII y cebadores inversos que contienen un sitio de enzima de restricción BsiWI para propósitos de clonación. Las secuencias de ADN 0012 V_L , 0023 V_L , 0051 V_L y 0052 V_L se amplificaron por PCR con los siguientes pares de números de cebadores: 493 (directo) + 495 (inverso), 548 (directo) + 549 (inverso), 492 (directo) + 494 (inverso) y 619 (directo) + 620 (inverso), las secuencias de cebadores se muestran en la Tabla 4 y las SEQ ID NO 60-145), respectivamente, y se insertaron en los sitios de enzimas de restricción HindIII y BsiWI de un vector basado en pTT denominado pTT-hLC Kappa, que contiene las secuencias que codifican la región constante para LC kappa humana. Los vectores resultantes se denominaron pTT-0012LC, pTT-0023LC, pTT-0051LC y pTT-0052LC. La secuencia de aminoácidos de LC anti-TLT-1 codificada por los vectores de expresión se muestra en (SEQ ID NO: 0012LC: 33, 0023LC: 35, 0051LC: 37, 0052LC: 39).

Ejemplo 7: Desarrollo de pTT-0012HC.T60N, pTT-0012HC.T60A, pTT-0012LC.C36A y pTT-0052HC.C91Y.

La secuencia de aminoácidos 0012 V_H contiene un sitio de glicosilación ligado a N potencial (T60, numeración de kabat) y las secuencias de aminoácidos 0012 V_L y 0052 V_H contienen cada una, una Cys no pareada (C36 y C91, respectivamente, numeración de kabat). Los vectores de expresión que codifican 0012HC.T60N o 0012HC.T60A o 0012LC.C36A o 0052HC.C91Y se desarrollaron mediante el uso de mutagénesis dirigida al sitio (Quickchange II, Stratagene, número de catálogo 20523-5) según las instrucciones del fabricante. Las reacciones de mutagénesis dirigida al sitio se realizaron mediante el uso de a) ADN de pTT-0012HC como plantilla y números de cebadores 682 (directo) + 683 (inverso) para pTT-0012HC.T60N, b) ADN de pTT-0012HC como plantilla y los números de cebadores 688 (directo) + 689 (inverso) para pTT-0012HC.T60A, c) ADN de pTT-0012LC como plantilla y los números de cebadores 598 (directo) + 599 (inverso) para pTT-0012LC.C36A, d) ADN de pTT-0052HC como plantilla y los números de cebadores siguientes 684 (directo) + 685 (inverso), las secuencias de cebadores se muestran en la Tabla 4 y las SEQ ID NO 60-145 para pTT-0052HC.C91Y. Los vectores de expresión resultantes se secuenciaron para verificar las secuencias de ADN. Las secuencias de aminoácidos de HC y LC anti-TLT-1 codificadas por los vectores de expresión pTT-0012HC.T60N, pTT-0012HC.T60A y pTT-0012LC.C36A se muestran en (SEQ ID NO: 0012HC.T60N (también denominada 0061HC): 40, 0012HC.T60A (también denominada 0082HC): 43, 0012LC.C36A (también denominada 0061LC): 41). La secuencia de aminoácidos 0012LC.C36A se muestra además sin la secuencia del péptido señal N terminal en la SEQ ID NO: 153.

Ejemplo 8: Desarrollo de constructos de expresión pTT-0012LC-HPC4, pTT-0012LC.C36A-HPC4, pTT-0023LC-HPC4, pTT-0051LC-HPC4 y pTT-0052LC-HPC4.

Las secuencias de ADN que codifican el V_L aisladas a partir de cada uno de los cuatro hibridomas anti-TLT-1 diferentes se amplificaron por PCR con cebadores directos que contienen un sitio de enzima de restricción HindIII y cebadores inversos que contienen un sitio de enzima de restricción BsiWI para propósitos de clonación. Las secuencias de ADN 0012 V_L , 0012 V_L .C36A, 0023 V_L , 0051 V_L y 0052 V_L se amplificaron por PCR con los números de cebadores siguientes: 493 (directo) + 495 (inverso), 493 (directo) + 495 (inverso), 548 (directo) + 549 (inverso), 492 (directo) + 494 (inverso), y 619 (directo) + 620 (inverso), las secuencias de cebadores se muestran en la Tabla 4 y las SEQ ID NO: 60-145, respectivamente, mediante el uso de Phusion PCR mix (FinnZymes, núm. de cat. F-531L). La secuencia que codifica la C_L kappa humana se amplificó por PCR con el número de cebador directo 486 y el número de cebador inverso 485. El número de cebador directo 486 contiene un sitio de enzima de restricción BsiWI y el cebador inverso 485 codifica una etiqueta HPC4 seguida de un codón de parada y contiene un sitio EcoRI flanqueante 3' para propósitos de clonación. La reacción PCR se realizó mediante el uso de Phusion PCR mix (FinnZymes, cat núm. F-531L). El fragmento de PCR de 0012 V_L digerido por HindIII+BsiWI se mezcló con el fragmento de PCR de C_L kappa-HPC4 humana digerido por BsiWI+EcoRI e insertado en los sitios HindIII + EcoRI de un vector de expresión basado en pTT que resulta en pTT-0012LC-HPC4 (Figura 4). Para desarrollar vectores de expresión correspondientes que codifican la versión LC-HPC4 de las cuatro secuencias LC anti-TLT-1 restantes, la secuencia 0012 V_L en pTT-0012LC-HPC4 se escindió con HindIII+ BsiWI y se reemplazó con fragmentos de PCR 0023 V_L , 0051 V_L , 0052 V_L y 0012 V_L .C36A digeridos con HindIII+BsiWI. Los cuatro vectores de expresión resultantes se denominaron: pTT-0023LC-HPC4, pTT-0051LC-HPC4, pTT-0052LC-HPC4 y pTT-0012LC.C36A.HPC4 (Figura 4B). Las secuencias de aminoácidos codificadas por pTT-0012LC.C36A-HPC4, pTT-0023LC-HPC4, pTT-0051LC-HPC4 y pTT-0052LC-HPC4 se muestran en la SEQ ID NO: 0012LC.C36A-HPC4 (también denominada 0061LC-HPC4): 167, 0023LC-HPC4: 179, 0051LC-HPC4: 177, 0052LC-HPC4 (también denominada 0062LC-HPC4): 174.

Ejemplo 9: Desarrollo de los constructos de expresión pTT-0012 V_H .T60N-CH1-YGPPC, pTT-0023 V_H -CH1-YGPPC, pTT-0051 V_H -CH1-YGPPC, y pTT-0052 V_H .C91Y-CH1-YGPPC.

Las secuencias de 0012 V_H .T60N-CH1-YGPPC, 0023 V_H -CH1-YGPPC, 0051 V_H -CH1-YGPPC y 0052 V_H .C91Y-CH1-YGPPC (YGPPC es una secuencia de aminoácidos bisagra de IgG4 humana parcial) se amplificaron por PCR a partir de pTT-0012HC.T60N, pTT-0023HC, pTT-0051HC y pTT-0052HC.C91Y, respectivamente, mediante el uso de pares de cebadores directos e inversos: 572 (directo) + 698 (inverso), 576 (directo) + 698 (inverso), 627 (directo)+698 (inverso) y 617 (directo)+698 (inverso), respectivamente. Los cebadores directos contienen un sitio de enzima de

restricción HindIII y el cebador inverso 698 contiene un codón de parada y un sitio EcoRI para propósitos de clonación. El fragmento de PCR resultante se digirió con HindIII+EcoRI y se insertó en los sitios HindIII+EcoRI de un vector basado en pTT. Los vectores de expresión resultantes se denominaron pTT-0012V_H.T60N-CH1-YGPPC (Figura 4A), pTT-0023V_H-CH1-YGPPC, pTT-0051V_H-CH1-YGPPC y pTT-0052V_H.C91Y-CH1-YGPPC. El secuencias de aminoácidos codificadas por pTT-0012V_H.T60N-CH1-YGPPC (Figura 4A), pTT-0023V_H-CH1-YGPPC, pTT-0051V_H-CH1-YGPPC y pTT-0052V_H.C91Y-CH1-YGPPC se muestran en la SEQ ID NO: 0012V_H.T60N-CH1-YGPPC (también denominada 0061VH-CH1-YGPPC): 171, 0023V_H-CH1-YGPPC: 178, 0051V_H-CH1-YGPPC 176, 0052V_H.C91Y-CH1-YGPPC (también denominada 0062VH-CH1-YGPPC): 175.

5 Ejemplo 10: Desarrollo de los constructos de expresión pTT-0012V_H-CH1, pTT-0012V_H-CH1-HPC4, pTT-0023V_H-CH1, pTT-0023V_H-CH1-HPC4, pTT-0051V_H-CH1, pTT-0051V_H-CH1-HPC4, pTT-0052V_H-CH1 y pTT-0052V_H-CH1-HPC4.

Las secuencias 0012V_H, 0023V_H, 0051V_H y 0052V_H aisladas a partir de 0012Hyb, 0023Hyb, 0051Hyb, 0052Hyb se amplificaron por PCR con los números de cebadores: 490 (directo) + 491 (inverso), 546 (directo) + 547 (inverso), 627 (directo) + 628 (inverso), 617 (directo) + 618 (inverso), las secuencias de cebadores se muestran en la Tabla 4 y las SEQ ID NO 60-145, respectivamente, mediante el uso de Phusion PCR mix (FinnZymes, núm. de cat. F-531L). Todos los cebadores directos (490, 546, 627 y 617) contenían un sitio HindIII y todos los cebadores inversos (491, 547, 628 y 618) contenían un sitio NheI para propósitos de clonación. La región CH1 de IgG₄ humana se amplificó por PCR con los números de cebadores: 489 (directo) + 488 (inverso), o los números de cebadores 489 (directo) + 487 (inverso). El número de cebador directo 489 contenía un sitio NheI, el número de cebador inverso 488 contenía un codón de parada y un sitio EcoRI, y el número de cebador inverso 487 contenía una secuencia de codificación de la etiqueta HPC4, un codón de parada seguido por un sitio EcoRI para propósitos de clonación. El fragmento de PCR 0012V_H digerido por HindIII+NheI, se combinó con el fragmento de PCR CH1 de IgG₄ humana digerida por NheI+EcoRI o con el fragmento de PCR CH1-HPC4 de IgG₄ humana digerida por NheI+EcoRI y se clonó en los sitios HindIII+EcoRI para un vector basado en pTT. Los vectores resultantes se denominaron pTT-0012V_H-CH1 y pTT-0012V_H-CH1-HPC4, respectivamente. El vector pTT-0012V_H-CH1-HPC4 se muestra en la Figura 5B. Las secuencias de aminoácidos y de ADN de 0012V_H-CH1-HPC4 se muestran en las SEQ ID NO 168-169. Los dominios V_H de pTT-0012V_H-CH1 y pTT-0012V_H-CH1-HPC4 se escindieron por digestión con HindIII+NheI y se insertaron los fragmentos de PCR 0197-0000-0023V_H, 0197-0000-0051V_H y 0197-0000-0052V_H digeridos por HindIII+NheI. Los vectores de expresión resultantes se denominaron: pTT-0023V_H-CH1, pTT-0023V_H-CH1-HPC4, pTT-0051V_H-CH1, pTT-0051V_H-CH1-HPC4, pTT-0052V_H-CH1 y pTT-0052V_H-CH1-HPC4.

35 Ejemplo 11: Desarrollo de los constructos de expresión pTT-0012V_H.T60N-CH1, pTT-0012V_H.T60N-CH1-HPC4, pTT-0052V_H.C91Y-CH1 y pTT-0052V_H.C91Y-CH1-HPC4.

Las secuencias 0012V_H.T60N-CH1 y 0052V_H.C91Y-CH1 (lo que incluye la secuencia que codifica el péptido señal) se amplificaron por PCR a partir de pTT-0012HC.T60N y pTT-0052HC.C91Y, respectivamente, mediante el uso de mezcla de Phusion PCR mix (FinnZymes, núm. de cat. F-531L). Para el fragmento de PCR 0012V_H.T60N-CH1, se emplearon el número de cebador directo 572 que contiene un sitio de enzima de restricción HindIII y el número de cebador inverso 488 que contiene un sitio EcoRI para propósitos de clonación o un cebador inverso 487 que contiene una secuencia que codifica una etiqueta HPC4 junto con un sitio EcoRI para propósitos de clonación. Para el fragmento de PCR 0052V_H.C91Y-CH1 se emplearon el número de cebador directo 617 junto con el número de cebador inverso 488 o 487 (las secuencias de cebadores se muestran en la Tabla 4 y las SEQ ID NO 60-145). Los fragmentos de PCR resultantes se digirieron con HindIII+ EcoRI y se insertaron en los sitios HindIII + EcoRI de un vector basado en pTT. Los vectores de expresión resultantes se denominaron pTT-0012V_H.T60N-CH1, pTT-0012V_H.T60N-CH1-HPC4, pTT-0052V_H.C91Y-CH1 y pTT-0052V_H.C91Y-CH1-HPC4. La secuencia de aminoácidos codificada por pTT-0012V_H.T60N-CH1 se muestra en la SEQ ID NO: 0012V_H.T60N-CH1 (también denominada 0061VH-CH1): 146 mientras que la secuencia de aminoácidos correspondiente sin la secuencia del péptido señal N terminal se muestra en la SEQ ID NO: 152.

50 Ejemplo 12: Desarrollo de los constructos de expresión pTT-FIX-L4b-0012LC y pTT-FIX-L4b-0012LC.C36A.

La secuencia de ADN del FIX (lo que incluye la secuencia que codifica el péptido señal) se amplificó por PCR a partir de secuencias de ADN de FIX humano mediante el uso del cebador directo 753 y el cebador inverso 754. El cebador directo 753 inserta un sitio de enzima de restricción HindIII de extremo 5' y el cebador inverso 754 inserta un enlazador de glicina-serina de 17 aminoácidos de longitud (L4b: GGGSGGGSGGGSGGS) que contiene un sitio de enzima de restricción BamHI de extremo 3' para propósitos de clonación. El fragmento de PCR FIX-L4b se insertó en los sitios HindIII + BamHI de pTT-hTF.1-219-L4b-0012LC, es decir, se reemplazó la secuencia de ADN de hTF.1-219 y resultó en el constructo de expresión FIX-L4b-0012LC denominado pTT-FIX-L4b-0012LC (Figura 5A). Las secuencias de aminoácidos y ADN de FIX-L4b-0012LC se muestran en la SEQ ID NO: 172-173.

65 Para desarrollar un plásmido de expresión que codifica pTT-FIX-L4b-0012LC.C36A la región de codificación 0012LC.C36A, con exclusión de la secuencia de péptido señal, se amplificó por PCR mediante el uso de pTT-0012LC.C36A como plantilla y mediante el uso del cebador directo 1055 que contiene un sitio BamHI de extremo 5' y el cebador inverso 1056 que contiene un codón de parada y un sitio EcoRI para propósitos de clonación (Tabla 4). El fragmento de PCR resultante se insertó en los sitios BamHI y EcoRI de pTT-FIX-L4b-0012LC, es decir, se reemplazó

la secuencia de ADN 0012LC con la secuencia de ADN 0012LC.C36A. El vector de expresión resultante se denominó pTT-FIX-L4b-0012LC.C36A y codifica las secuencias de aminoácidos que se muestran en la SEQ ID NO: FIX-L4b-0012LC.C36A (también denominada FIX-L4b-0061LC): 182.

5 Ejemplo 13: Desarrollo del constructo de expresión pTT-FVII-L4b-0052V_H.C91Y-CH1-HPC4.

La secuencia de ADN del FVII humano (lo que incluye la secuencia que codifica el péptido señal) se amplificó por PCR a partir de secuencias de ADN de FVII humano mediante el uso del cebador directo 751 y el cebador inverso 752. El cebador directo 751 inserta un sitio de enzima de restricción HindIII de extremo 5' y el cebador inverso 752 inserta un enlazador de glicina-serina de 17 aminoácidos de longitud (L4b: GGGGSGGGGSGGGGSGS) que contiene un sitio de enzima de restricción BamHI de extremo 3' para propósitos de clonación. El fragmento de PCR FVII-L4b se insertó en los sitios HindIII + BamHI de pTT-hTF.1-219-L4b-0012LC, es decir, se sustituyeron las secuencias de ADN de hTF.1-219 y resultó en el constructo de expresión de FVII-L4b-0012LC denominado pTT-FVII-L4b-0012LC. La secuencia de ADN que codifica el 0052V_H C91Y-CH1-HPC4 se amplificó por PCR mediante el uso del vector pTT-0052V_H.C91Y-CH1-HPC4 como plantilla y mediante el uso del cebador directo 1236 que contiene un sitio de enzima de restricción BamHI de extremo 5' y mediante el uso del cebador inverso 1095 que contiene un codón de parada y un sitio EcoRI para propósitos de clonación. El fragmento de PCR resultante se insertó en el sitio BamHI + EcoRI de pTT-FVII-L4b-0012LC, es decir, se reemplazó la secuencia 0012LC y resultó en el vector de expresión denominado pTT-FVII-L4b-0052V_H.C91Y-CH1-HPC4. El aminoácido FVII-L4b-0052V_H.C91Y-CH1-HPC4 se muestra en la SEQ ID NO: FVII-L4b-0052V_H.C91Y-CH1-HPC4 (también denominada FVII-L4b-0062V_H-CH1-HPC4): 180.

Ejemplo 14: Transfección transitoria de células HEK293-6E.

Todos los mAb, Fab y proteínas de fusión se expresaron en células en suspensión HEK293-6E mediante la transfección transitoria de plásmidos de expresión en las células. Las combinaciones de plásmidos individuales subyacentes a los compuestos proteicos específicos resultantes se muestran en la Tabla 5. Las células HEK293-6E se cultivaron en medio Freestyle HEK293 (GIBCO, núm. de cat. 12338-018) suplementado con P/S al 1 % (GIBCO núm. de cat. 15140-122), plurónico al 0,1 % (GIBCO, núm. de cat. 24040-032) y Geneticina (GIBCO, núm. de cat. 10131-019) y las células se transfectaron a una densidad celular de aproximadamente 1 mill/ml mediante el uso de 293fectin (GIBCO, núm. de cat. 10040-019) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. En resumen, para cada litro de células HEK293-6E, la transfección se realizó mediante la dilución de un total de 1 mg de ADN en 30 ml de Optimem (dilución A) y mediante la dilución de 1 ml de 293fectin en 30 ml de Optimem (GIBCO, núm. de cat. 51985-026, dilución B). Las diluciones A y B se mezclaron y se incubaron a temperatura ambiente durante 30 minutos. La mezcla de transfección se añadió posteriormente a las células HEK293-6E y las células se incubaron a 37°C en una incubadora humidificada con rotación orbital (125 rpm). Cinco a siete días después de la transfección, las células se eliminaron por centrifugación y los sobrenadantes resultantes del cultivo celular se esterilizaron por filtración antes de la purificación. Para todos los experimentos de transfección transitoria mediante el uso de cotransfección de 2 plásmidos de expresión, los plásmidos se cotransfectaron en una relación de plásmido 1:1 (ug:ug) mediante el uso de una cantidad de ADN total de 1 mg por cada litro de células HEK293-6E que se transfectaron.

Tabla 4: Números y secuencias de los cebadores.

Núm. de cebador	Secuencia de cebador (5' a 3')
339	act gga tgg tgg gaa gat gga tac agt
341	aga tcc agg ggc tag cgg ata gac aga
347	cct gta gga cca gag ggc tcc aag gac act
348	gga gct ggt ggt ggc atc tca gga cct ttg
448	ttt aaa aag ctt gcc gcc acc atg gag acc cct gcc tgg ccc cgg gtc
467	gga acc tcc ccc gcc tga tcc ccc gcc acc aga ccc gcc acc tcc ttc tct aaa ttc ccc ttt ctc ctg gcc cat
484	gaa ttt agc ggc cgc gaa ttc gga tcc gga acc tcc ccc gcc tga tcc
485	aaa ttt gaa ttc tta ctt gcc gtc gat cag tct ggg gtc cac ctg gtc ctc aca ctc tcc cct gtt gaa gct ctt tgt gac
486	a cgg atc tct agc aag ctt cgt acg gtg gc
487	aaa ttt gaa ttc tta ctt gcc gtc gat cag tct ggg gtc cac ctg gtc ctc ttt gga ctc aac tct ctt gtc cac ctt ggt
488	aaa ttt gaa ttc tta ttt gga ctc aac tct ctt gtc cac ctt ggt
489	acg gat ctc tag c aag ctt gct agc ac caa
490	aaa ttt aag ctt gcc gcc acc atg gat ttt ggg ctg att ttt ttt att gtt gct
491	aaa ttt gct agc tgc aga gac agt gac cag agt ccc ttg gcc cca
492	aaa ttt aag ctt gcc gcc acc atg aag tca cag acc cag gtc ttc gta ttt

ES 2 757 930 T3

	493	aaa ttt aag ctt gcc gcc acc atg aag ttg cct gtt ggg ctg ttg gtg ctg
	494	aaa ttt cgt acg ttc tat ttc cag ctt ggt ccc ccc tc
5	495	aaa ttt cgt acg ttt tat ttc cag ctt ggt ccc ccc tcc gaa
	546	aaa ttt aag ctt gcc gcc acc atg aac ttg ggg ctc agc ttg att ttc ctt gtc
	547	aaa ttt gct agc tga gga gac ggt gac tga ggt tcc ttg acc
	548	aaa ttt aag ctt gcc gcc acc atg gat tca cag gcc cag gtt ctt ata ttg ctg
10	549	aaa ttt cgt acg ttt cag ctc cag ctt ggt ccc agc acc gaa
	551	aaa ttt aaa ttt gga tcc gat gtt gtg atg acc caa act cca ctc tcc
	572	aaa ttt aag ctt gcc gcc acc atg gat ttt ggg ctg att ttt ttt att gtt gct
	576	aaa ttt aag ctt gcc gcc acc atg aac ttg ggg ctc agc ttg att ttc ctt
15	598	gga aac acc tat ttt cat tgg gcc ctg cag aaa cca ggc cag tct
	599	aga ctg gcc tgg ttt ctg cag ggc cca atg aaa ata ggt gtt tcc
	610	gctctaga cta aca ctc att cct gtt gaa gct ctt g
20	613	aaaaa tctagaata gac aga tgg ggg tgt cgt ttt ggc
	614	aaaaa tctaga ctt gac cag gca tcc tag agt ca
	615	aaaaa tctaga agg ggc cag tgg ata gac tga tgg
	616	aaaaa tctaga agg gac caa ggg ata gac aga tgg
25	617	aaa ttt aag ctt gcc gcc acc atg gaa tgg acc tgg gtc ttt ctc ttc ct
	618	aaa ttt gct agc tga gga gac ggt gac cgt ggt ccc tgc
	619	aaa ttt aag ctt gcc gcc acc atg atg tcc tct gct cag ttc ctt ggt
	620	aaa ttt cgt acg ttt cat ctc cag ttt ggt ccc ccc tcc
30	627	aaa ttt aag ctt gcc gcc acc atg ggt tgg agc tgt atc atc ttc ttt ct
	628	aaa ttt gct agc tgc aga gac agt gac cag agt ccc ttg
	682	gat agc agt acg ata aac tat aac cca tct cta aag gat aaa ttc
	683	gaa ttt atc ctt tag aga tgg gtt ata gtt tat cgt act gct atc
35	684	tct gag gac tct gcc gtc tat tac tgt gca aga ggg tac tac ggt
	685	acc gta gta ccc tct tgc aca gta ata gac ggc aga gtc ctc aga
	688	gat agc agt acg ata aac tat gcg cca tct cta aag gat aaa ttc
	689	gaa ttt atc ctt tag aga tgg cgc ata gtt tat cgt act gct atc
40	698	ttt aaa gaa ttc tca gca tgg ggg acc ata ttt gga ctc aac tct ctt
	751	ttt aaa aag ctt gcc gcc acc atg gtc tcc cag gcc ctc agg ctc ctc
	752	ttt aaa gga tcc gga acc tcc ccc gcc tga tcc ccc gcc acc aga ccc gcc acc tcc ggg aaa tgg ggc tgg
45	753	ttt aaa aag ctt gcc gcc acc atg cag cgc gtg aac atg atc atg gca g
	754	ttt aaa gga tcc gga acc tcc ccc gcc tga tcc ccc gcc acc aga ccc gcc acc tcc agt gag ctt tgt ttt ttc ctt
	1055	aaa ttt gga tcc gat gtt gtg atg acc caa act cca ctc tcc
50	1056	aaa ttt gaa ttc cta aca ctc tcc cct gtt gaa gct ctt tgt
	1095	Aaatgattgccctcccatatgctcctc
	1236	aaa ttt ggatcc cag gtc cag ctg cag cag tct gga gct

55 Tabla 5: Resumen de la combinación de plásmidos subyacente a la expresión de la proteína ID 0061 (SEQ40+41), 0023 (SEQ34+35), 0051 (SEQ36+37), 0062 (SEQ42+39), 0084 (SEQ171+SEQ167), 0074 (SEQ176+177), 0003 (SEQ175+174), 0004 (SEQ178+179), 0135 (SEQ169+SEQ173), 0145 (SEQ32+173) y la proteína ID 5001 (SEQ180+39).

ID de proteína	Plásmido de LC	Plásmido de HC	Nombre de la proteína
0061	pTT-0012LC.C36A	pTT-0012HC.T60N	0061mAb anti-TLT-1: (0012HC.T60N) ₂ ;(0012LC.C36A) ₂
0023	pTT-0023LC	pTT-0023HC	0023mAb anti-TLT-1: (0023HC) ₂ ;(0023LC) ₂

	0051	pTT-0051LC	pTT-0051HC	0051mAb anti-TLT-1: (0051HC) ₂ ;(0051LC) ₂	
5		0062	pTT-0052LC	pTT-0052HC.C91Y	0062mAb anti-TLT-1: (0052HC.C91Y) ₂ ;(0052LC) ₂
		0084	pTT-0012LC.C36A-HPC4	pTT-0012VH.T60N-YGPPC	0084Fab-YGPPC antiTLT-1: (0012VH.T60N-CH1-YGPPC);(0012LC.C36A-HPC4)
10		0074	pTT-0051LC-HPC4	pTT-0051VH-CH1-YGPPC	0074Fab-YGPPC antiTLT-1: (0051LC-HPC4);(0051VH-CH1-YGPPC)
		0003	pTT-0052LC-HPC4	pTT-0052VH.C91Y-CH1-YGPPC	0003Fab-YGPPC antiTLT-1 (0052LC-HPC4);(0052VH.C91Y-CH1-YGPPC)
15		0004	pTT-0023LC-HPC4	pTT-0023VH-CH1-YGPPC	0004Fab-YGPPC antiTLT-1 (0023LC-HPC4);(0023VH-CH1-YGPPC)
		0135	pTT-FIX-L4b-0012LC	pTT-0012VH-CH1-HPC4	Fab FIX-anti-TLT-1: (FIX-L4b-0012LC);(0012VH-CH1-HPC4)
20		0145	pTT-FIX-L4b-0012LC	pTT-0012HC	mAb FIX-anti-TLT-1: (FIX-L4b-0012LC) ₂ ;(0012HC) ₂
		5001	pTT-0052LC	pTT-FVII-L4b-0052VH.C91Y-CH1-HPC4	Fab FVII-anti-TLT-1: (0052LC);(FVII-L4b-0052VH.C91Y-CH1-HPC4)

25 Ejemplo 15: Purificación y caracterización de los Fab anti-TLT-1 expresados de manera recombinante (Fab0084, Fab0074, Fab0003 y Fab0004).

30 La purificación de los Fab anti-TLT-1 (0084, 0074, 0003 y 0004) se realizó mediante el uso de cromatografía de afinidad basada en la resina KappaSelect (GE Healthcare, núm. de cat. 17-5458-01). Los cuatro Fab contienen un único residuo de cisteína libre, cada uno incluido en la secuencia. La purificación se realizó mediante el uso de un sistema de cromatografía ÄktaExplorer (GE Healthcare, núm. de cat. 18-1112-41). Los sistemas tampón usados para la etapa de purificación fueron un tampón de equilibrado/lavado compuesto de Nafosfato 10 mM, pH 7,5, NaCl 150 mM y un tampón de elución compuesto de ácido fórmico 20 mM, pH 3,0. No se realizaron ajustes del sobrenadante celular clarificado antes de la aplicación en una columna equilibrada previamente empacada con la resina Kappaselect. La columna se lavó con 5 volúmenes de columna de tampón de equilibrado/lavado. La proteína se eluyó isocráticamente en aproximadamente 4 volúmenes de columna de tampón de elución. El eluato se ajustó a pH 7 mediante el uso de NaFosfato 0,5 M, pH 9,0. La masa molecular de la proteína eluida se analizó mediante el uso de geles Bis-Tris al 4–12 % para SDS-PAGE/Coomassie NuPage (Invitrogen, núm. de cat. NP0321BOX) y cromatografía líquida de ionización electropulverización con analizador de tiempo de vuelo en un instrumento Agilent 6210 y una columna de desalinización MassPREP (Waters, núm. de cat. USRM10008656). Se observó una proteína pura y homogénea con una masa molecular esperada. Se realizó además una configuración de análisis de cromatografía líquida de alto resolución de exclusión por tamaño (SEC-HPLC) en un sistema Agilent LC 1100/1200 y mediante el uso de una columna BIOsep-SEC-S3000 300x7,8 mm (Phenomenex, núm. de cat. 00H-2146-K0) y un tampón de corrida compuesto de NaFosfato 200 mM, pH 6,9, NaCl 300 mM e isopropanol al 10 %. Aquí, la proteína eluyó como un único pico simétrico a un tiempo de retención de aproximadamente 9,1 min a una tasa de flujo de 1 ml/min. Para medir la concentración de proteína final, se usó un espectrofotómetro NanoDrop (Thermo Scientific) junto con un coeficiente de extinción de 1,29.

50 Ejemplo 16: Purificación y caracterización de la proteína de fusión Fab FIX-anti-TLT-1 expresada de manera recombinante (FIX-Fab0135).

55 La purificación de FIX-Fab0135 se realizó mediante el uso de un método de cromatografía de afinidad basado en una resina anti-HPC4 (Roche, núm. de cat. 11815024001). La purificación se realizó mediante el uso de un sistema de cromatografía ÄktaExplorer (GE Healthcare, núm. de cat. 18-1112-41). Los sistemas tampón usados para la etapa de purificación fueron un tampón de equilibrado compuesto de Hepes 20 mM, pH 7,5, CaCl₂ 1,0 mM, NaCl 100 mM y Tween-80 al 0,005 % (v/v), un tampón de lavado compuesto de Hepes 20 mM, pH 7,5, CaCl₂ 1,0 mM, NaCl 1,0 M y Tween-80 al 0,005 % (v/v) y un tampón de elución compuesto de Hepes 20 mM, pH 7,5, EDTA 5,0 mM y NaCl 100 mM. Los sobrenadantes celulares se ajustaron con CaCl₂ 1 mM de concentración final y un pH de 7,5 y se aplicaron sobre una columna anti-HPC4 equilibrada previamente. La columna se lavó con 5 volúmenes de columna de tampón de equilibrado, 5 volúmenes de columna de tampón de lavado y por último con 5 volúmenes de columna de tampón de equilibrado. La proteína se eluyó isocráticamente en aproximadamente 4 volúmenes de columna de tampón de elución. La proteína se analizó mediante el uso de SDS-PAGE/Coomassie y configuración de espectrometría de masa de desorción ionización por láser asistida por matriz con analizador de tiempo de vuelo (MALDI-TOF MS) en un sistema Micro-flex (Bruker Daltonics), lo que muestra que se obtuvo una proteína pura y homogénea con una masa molecular de 106 kDa. Debido a que la masa teórica de la secuencia de aminoácidos para el constructo FIX-Fab0135 fue de 95,9 kDa, la proteína expresada contenía modificaciones postraduccionales. Para medir las concentraciones de

proteína finales, se usó un espectrofotómetro NanoDrop (Thermo Scientific) junto con un coeficiente de extinción de 1,29.

Ejemplo 17: Plásmidos mutantes pcDNA3.1(+)-hTLT-1 ECD-HPC4 ala.

5 Cuarenta constructos de expresión mutantes hTLT-1 ECD-HPC4 Ala se diseñaron de acuerdo con la Tabla 6. Los constructos de expresión se desarrollaron por el contratista externo GENEART AG (Im Gewerbepark B35, 93059 Regensburg, Alemania) y todos los 40 constructos de expresión se fabricaron en base al vector de expresión denominado pcDNA3.1(+). Las alícuotas de ADN para cada uno de los 40 constructos de expresión hTLT-1 ECD-HPC4 pcDNA3.1(+) se transfectaron en células en suspensión HEK293-6E para expresar transitoriamente cada proteína mutante del hTLT-1 ECD-HPC4 Ala (Tabla 6). La transfección transitoria y el cultivo de las células HEK293-6E se realizaron como se describió en el ejemplo 14.

Tabla 6

	wt	Tipo silvestre
15	1	L22A
	2	V25A
	3	Q27A
20	4	V30A
	5	L35A
	6	H39A
	7	R41A
25	8	L42A
	9	Q43A
	10	K46A
	11	Q48A
30	12	F54A
	13	L55A
	14	P56A
	15	E57A
35	16	Q60A
	17	D68A
	18	R69A
	19	R70A
40	20	R75A
	21	L82A
	22	L86A
	23	E90A
45	24	M91A
	25	T93A
	26	Q95A
	27	E96A
50	28	E97A
	29	D107A
	30	R110A
	31	H116A
55	32	R117A
	33	S119A
	34	P125A
	35	E126A
60	36	E128A
	37	E130A
	38	S136A
	39	N140A
65	40	K159A

Ejemplo 18: Purificación y caracterización de anticuerpos monoclonales anti-TLT-1 (mAb0012, mAb0023, mAb0051, mAb0061, mAb0062).

5 La purificación de los anticuerpos monoclonales anti-TLT-1 monoclonales expresados de manera recombinante descritos en la Tabla 5 se realizó mediante un proceso en 2 etapas compuesto por cromatografía de afinidad mediante el uso de una resina MabSelect SuRe de proteína A (GE Healthcare, núm. de cat. 17-5438-01) y cromatografía de filtración en gel mediante el uso de una columna Superdex 200 PrepGrade 26/60 (GE Healthcare, núm. de cat. 17-1071-01). Las purificaciones se realizaron mediante el uso de un sistema de cromatografía ÄktaExplorer (GE Healthcare, núm. de cat. 18-1112-41). Los sistemas tampón usados para la etapa de purificación por afinidad fueron un tampón de equilibrado compuesto de NaFosfato 20 mM pH 7,2, NaCl 150 mM, un tampón de elución compuesto de ácido fórmico 10 mM pH 3,5 y un tampón de ajuste del pH compuesto de NaFosfato 0,5 M pH 9,0. Los sobrenadantes celulares se aplicaron directamente sin ningún ajuste sobre una columna MabSelect SuRe equilibrada previamente. La columna se lavó con 15 volúmenes de columna de tampón de equilibrado y los anticuerpos monoclonales se eluyeron isocráticamente en aproximadamente 2-5 volúmenes de columna de tampón de elución. 15 Las fracciones agrupadas se ajustaron a pH neutro mediante el uso del tampón de ajuste del pH descrito, inmediatamente después de la elución. La proteína se purificó posteriormente y el tampón se intercambió mediante el uso de dicha columna de filtración en gel. El tampón de corrida usado para la cromatografía de exclusión por tamaño fue His 25 mM pH 6,5, NaCl 135 mM. La tasa de flujo usada fue 2,5 ml/min y los anticuerpos monoclonales anti-TLT-1 eluyeron como picos únicos en aproximadamente 0,4 volúmenes de columna. Basado en el análisis de fracciones en todo el pico mediante el uso del método de SEC-HPLC descrito anteriormente (como se describió en el ejemplo 2), se prepararon agrupaciones que contenían una proteína del anticuerpo puro que eluye como picos simétricos a aproximadamente 8,5 min y con un contenido mínimo de proteína de alto peso molecular de elución temprana.

25 Los anticuerpos purificados se caracterizaron mediante el uso de los métodos de SDS-PAGE/Coomassie descritos anteriormente (como se describió en el ejemplo 2) y los métodos de SEC-HPLC, lo que muestra que todas las preparaciones de proteínas del anticuerpo producidas fueron altamente homogéneas. Todos los anticuerpos mostraron los componentes de cadena pesada de aproximadamente 50 kDa y componentes de cadena ligera de aproximadamente 25 kDa esperados cuando se usaron condiciones de reducción antes de ejecutar los análisis de SDS-PAGE/Coomassie. Las determinaciones de masa molecular intacta se realizaron mediante el uso de una configuración del método de espectrometría de masa de electropulverización ionización con análisis de tiempo de vuelo cromatografía líquida en un instrumento Agilent 6210 y una columna de desalinización MassPREP (Waters, núm. de cat. USRM10008656). El sistema tampón usado fue un tampón de equilibrado compuesto de ácido fórmico al 0,1 % en H₂O grado LC-MS y un tampón de elución compuesto de ácido fórmico al 0,1 % en ACN de grado LC-MS. Todos los anticuerpos mostraron masas moleculares intactas de 147,2 – 148,6 kDa, que es aproximadamente 2,7 – 3,1 kDa por encima de las masas teóricas de las secuencias de aminoácidos para cada uno de los anticuerpos. Por lo tanto, todos los anticuerpos anti-TLT-1 expresados de manera recombinante mostraron modificaciones postraduccionales correspondientes a las N-glicosilaciones esperadas de HC. Se obtuvieron para los seis anticuerpos puridades finales del 95 – 99 %. Para verificar la secuencia N terminal de los anticuerpos anti-TLT-1 clonados y purificados, se realizaron degradaciones EDMAN mediante el uso de un sistema secuenciador automatizado (Secuenciador de Proteínas 494 de Applied Biosystems). Se realizaron 10–20 ciclos de degradación para cada anticuerpo. Aquí, las secuencias de cadena ligera y pesada esperadas se confirmaron para los seis anticuerpos anti-TLT-1 clonados. Para medir las concentraciones de proteína finales, se usó un espectrofotómetro NanoDrop (Thermo Scientific) junto con coeficientes de extinción específicos para cada uno de los seis anticuerpos que variaron de 1,34–1,51.

45 Ejemplo 19: Unión al mAb y competencia de diferentes mAb para la unión al TLT-1.

Materiales:

50 Tabla 7: Reactivos

Reactivo	Fuente
TLT-1-His	Ejemplo 1
mAb0061	Ejemplo 18
mAb0023	Ejemplo 18
mAb0051	Ejemplo 18
mAb0062	Ejemplo 18
Fab0074	Ejemplo 15
Fab0084	Ejemplo 15
Fab0003	Ejemplo 15
Fab0004	Ejemplo 15
Todos los demás reactivos	Biacore Kit de Captura de Anticuerpos Humanos (BR-1008-39) mAb anti-His (I+D núm. MAB050)

65

Método: Los mAb de interés se inmovilizaron ya sea directamente a un chip CM5 o mediante captura a través de un mAb de captura de Fc humano inmovilizado a un chip CM5, mientras que TLT-1-His se inmovilizó mediante captura a través de un chip CM5 de mAb anti-His para el análisis de Fab. Los reactivos que se usaron se muestran en la Tabla 7.

Captura directa del mAb: Los mAb para TLT-1 se inmovilizaron a un nivel de aprox. 500-1000 RU en un chip CM5 (50 µg/ml diluido en Na-acetato, pH 4,0) mediante el uso del procedimiento estándar recomendado por el proveedor. Se analizaron diluciones de dos veces del TLT-1 desde 200 nM hasta 0,2 nM por su unión a los mAb. Tampón de corrida y de dilución: HEPES 10 mM, 150 mM, p20 al 0,005 %, pH 7,4. La regeneración se obtuvo mediante glicina 10 mM, pH 1,7.

Captura del mAb a través del mAb Fc humano: El mAb Fc humano se inmovilizó a aprox. 10 000 RU. Se añadió el mAb de interés (aprox. 100 nM). Se analizaron diluciones de dos veces del TLT-1 desde 200 nM hasta 0,2 nM. Tampón de corrida y de dilución: HEPES 10 mM, 150 mM, p20 al 0,005 %, pH 7,4. La regeneración se obtuvo en MgCl₂ 3 M.

Captura del TLT-1-His mediante el mAb anti-His (I+D núm. MAB050): El mAb anti-His se inmovilizó a aprox. 9000 RU. El TLT-1-His se añadió a un nivel de aprox. 30-40 RU (10 µg/ml diluido en Hepes 10 mM, NaCl 150 mM, EDTA 3 mM, Tween-20 al 0,005 %) mediante el uso del procedimiento estándar recomendado por el proveedor. Se evaluaron diluciones de 8 veces de Fab desde 3 hasta 0,047 µg/ml por su unión al TLT-1-His. Tampón de corrida y de dilución: Hepes 10 mM, NaCl 150 mM, EDTA 3 mM, Tween-20 al 0,005 %. La regeneración se obtuvo mediante MgCl₂ 3 M.

La determinación de constantes cinéticas y de unión (K_{on} , K_{off} , K_D) se obtuvo al asumir una interacción 1:1 del TLT-1 y fibrinógeno mediante el uso del programa informático de evaluación Biacore T100.

Competencia: El análisis de interacción de unión por competencia se obtuvo por Resonancia de Plasmón de Superficie en un Biacore T-100 que analizó la unión de diversos mAb para TLT-1 al TLT-1 cuando se une al mAb0012 inmovilizado (o un mAb alternativo). Se logró la inmovilización directa a un chip CM5 de los mAb a un nivel de 5000-10 000 RU en acetato de sodio 10 mM pH 4,5-5,0. Esto se siguió por la unión del TLT-1 50 nM y después de 2 min de disociación seguido por la unión de otros tres mAb a evaluar en cuanto a la competencia. Tampón de corrida y de dilución: HEPES 10 mM, 150 mM, p20 al 0,005 %, pH 7,4. La regeneración se obtuvo mediante glicina 10 mM, pH 1,7.

Resultados:

Tabla 8

Unión al TLT-1	k_a (1/M)	k_d (1/s)	K_D (M) TLT-1	Técnica de Biacore
mAb0061	9,32E+05	0,003499	3,75E-09	captura
mAb0023	2,87E+05	0,00125	4,36E-09	directa
mAb0051	2,45E+05	0,00472	19,3E-09	directa
mAb0062	3,26E+05	0,00134	4,12E-09	directa
Fab0074	3,35E+06	0,00798	2,38E-09	captura
Fab0084	5,31E+06	0,00524	0,99E-09	captura
Fab0003	5,36E+05	0,00279	5,20E-09	captura
Fab0004	1,15E+06	0,00195	1,70E-09	captura

Tabla 9: Análisis de SPR. Constante de unión para la unión al TLT-1. Competencia con mAb0012

ID del mAb	Competencia con mAb0012	Competencia con mAb0023	Competencia con mAb0051	Competencia con mAb0062
mAb0061	Sí	No	no	no
mAb0023		Sí	no	sí
mAb0051			sí	no

Conclusión: Las constantes de unión para mAb0061, mAb0023, mAb0051 y mAb0062 y Fab0074, Fab0084, Fab0003 y Fab0004 se estimaron mediante análisis de Biacore (ver la Tabla 8). El mAb0061 y el mAb0051 no compiten con ninguno de los otros mAb por la unión (ver la Tabla 9). El mAb0023 y el mAb0062 compiten entre sí (ver la Tabla 9).

Ejemplo 20: Preparación de vesículas PS:PC 20:80 y clonación, expresión, replegamiento y relipidación de TLT-1.

El TLT-1 relipidado en vesículas PS:PC 20:80 se preparó mediante el uso de Triton X-100 como detergente como se describe en Smith y Morrissey (2005) J. Thromb. Haemost., 2, 1155-1162 excepto que se usó TLT-1 en lugar de TF.

Materiales

Medio LB con Kanamicina (50 mg/ml). Kanamicina Sigma K-0254

IPTG 1000 mM (IPTG Sigma I-6758)

5 Tampón de lisis: Bugbuster 1x (Novagen) en Tris-HCl 50 mM, NaCl 100 mM, EDTA 2 mM, pH 8,0. Añadir lisozima 0,5 mg/ml + DNaseI. Añadir Coctel Inhibidor Completo 1x (Roche)

Tampón de lavado-IB 1: bugbuster en tampón-IB 1:10. Añadir lisozima 50 µg/ml + Coctel Inhibidor Completo 0,5x (Roche)

10

Tampón de lavado-IB 2: Bugbuster en tampón-IB 1:10

Tampón-IB: Tris-HCl 50 mM, NaCl 100 mM, EDTA 2 mM, pH 8,0

15 Tampón GndHCl: Guanidinio HCl 6 M, Tris-HCl 50 mM, NaCl 50 mM, Triton X-100 red. al 0,1 %, pH 8,0

Tampón de replegado: Tris-HCl 50 mM, Arginina 800 mM, Triton X-100 al 0,1 %, glutatión reducido 5 mM, glutatión oxidado 0,5 mM pH 8,5

20 Tampón de diálisis: Tris-HCl 20 mM, Triton X-100 al 0,1 %, pH 8,0

DTT:Glutatión reducido (Sigma G4251) Glutatión oxidado Sigma G4376

25 PC: 10 mg/ml de L-α-fosfatidilcolina (Huevo, pollo) en cloroformo (Avanti Polar Lipids Inc.) Núm. Cat. 840051C. Mw 760,09

PS: 10 mg/ml de sal sódica de L-α-fosfatidilserina (cerebro, porcino) en cloroformo. (Avanti Polar Lipids Inc.) Núm. Cat. 840032C. Mw 812,05

30 Triton X-100: Triton X-100 al 10 %, hidrogenado, detergente de grado proteico, filtrado estéril. Calbiochem. Núm. Cat. 648464 Concentración 159 mM (PM 628)

Tampón HBS: HEPES 50 mM, NaCl 100 mM, pH 7,4

35 Bioperlas: Bio-Beads SM2 Adsorbent, malla 20-50 BioRad Laboratories, Núm. Cat. 152-3920.

Método

40 Expresión: El TLT-1 (hTLT-1.18-188; SEQ ID NO: 149), lo que incluye dominio extracelular, enlazador y dominio transmembrana, se clonó en pET24a mediante el uso de los cebadores 1004 (SEQ ID NO: 150) y 1005 (SEQ ID NO: 151) y pTT-hTLT-1 como plantilla. Se emplearon técnicas estándar para la preparación del ADN. La transformación se realizó en BL21 (DE3). Cultivo durante toda la noche: se mezclaron 1 x 50 ml de medio LB en matraces de 250 ml (plásticos) y 50 µl de Kanamicina 50 mg/ml + 1 colonia (transformación) a partir de la placa de BL21. El cultivo se incubó ON a 37 °C, 220 rpm. Cultivo iniciador: se añadieron 2 x 500 ml de medio LB en matraces de 2 l (plásticos) con 300 µl de Kanamicina 50 mg/ml. Se añadieron 10 ml del cultivo ON del TLT-1/Pet24a en BL21 (DE3) y se siguió a OD600. Se incubó a 37 °C, 220 rpm.

50 Inducción: 2 x 500 ml con TLT-1 lip/pET24a ~ BL21 (DE3) en LB. Se añadió ~ 0,2 mM de IPTG (100 µl de 1 M) a 25 °C al cultivo celular cuando la OD₆₀₀ alcanzó entre 0,6 - 0,8. Esto se incubó durante 3 h a 25 °C, 220 rpm. El cultivo se cosechó después de 3 h y se centrifugó durante 30 min a 4600 rpm. El sobrenadante se desechó. El sedimento se almacenó a -20 °C. Lisis de cuerpos de inclusión: El sedimento de *E. coli* se resuspendió en 5 ml de tampón de lisis/g de sedimento. Se añadió MgSO₄ hasta 5 mM para respaldar la actividad DNaseI. La suspensión celular se incubó en plataforma de agitación durante 20 min a temperatura ambiente. El lisado se aclaró mediante centrifugación a 20.000 g (8500 rpm) durante 20 min a 4 °C. El sedimento se resuspendió en 100 ml de tampón de lavado IB. La suspensión se mezcló mediante agitación en vórtice suave y se incubó a temperatura ambiente durante 5 min. La suspensión se centrifugó a 20 000 g durante 20 min a 4 °C para coleccionar los cuerpos de inclusión. Los cuerpos de inclusión se resuspendieron en 100 ml de tampón de lavado-IB 2. La muestra se centrifugó a 20 000 g durante 20 min a 4 °C para coleccionar los cuerpos de inclusión. El sedimento se resuspendió en 100 ml de agua y se centrifugó a 20 000 g durante 20 min a 4 °C para coleccionar los cuerpos de inclusión. Replegado:El sedimento se solubilizó nuevamente en x ml de tampón GdnHCl (20 ml). La concentración final del TLT-1 (se midió A280) fue de 1-2 mg/ml. Se añadió DTT (400 µl) hasta una concentración final de 20 mM. La solubilización completa se aseguró mediante agitación magnética durante ~ 1-2,5 hr (1,5 h) a temperatura ambiente. El material insoluble se eliminó mediante centrifugación a 20 000 g durante 20 min. Se usó una bomba peristáltica lentamente (durante toda la noche) para transferir la solución de GdnHCl/proteína (20 ml) al tampón de replegado >20x (400 ml) a 4 °C. El tampón de replegado se agitó rápidamente para asegurar la dilución rápida. La corrida de la bomba se obtuvo a la tasa de flujo 1x, velocidad 2,5, 4 °C y se dejó durante toda la noche a 4 °C. La proteína precipitada se eliminó mediante centrifugación a 20 000 g (8500 rpm) en

65

tubos de 50 ml durante 30 min. El lip de TLT-1 se concentró desde 400 ml hasta 120 ml en un filtro Amico de 76 mm de diámetro, 10 000 MWCO a 4,5 bar. La proteína se analizó en un SDS-Page mediante precipitación con EtOH debido al GdnHCl en la muestra. Se concentraron 2x 500 µl y 2x 25 µl en tubos de 0,5 ml con 10 000 MWCO. Se mezcló 50 µl de la muestra + 9 vol. de EtOH helado al 99 % (450 µl) y se colocó a -20 °C durante 10 min. La muestra se centrifugó a una velocidad total de 13 000 rpm durante 5 min. El sedimento se lavó con 450 µl de EtOH frío al 96 % + 50 µl de MQ. Centrifugar nuevamente. Dejar secar (el EtOH debe eliminarse antes del SDS-PAGE). Se resuspendieron 100 µl con tampón de muestra 1x

Preparación de PS:PC y relipidación: Se siguió el protocolo exacto descrito en Smith SA y Morrissey JH (2004) "Rapid and efficient incorporación of tissue factor into liposomes". *J. Thromb. Haemost.* 2:1155-1162 para la relipidación del TLT-1.

Ejemplo 21: Análisis de la unión de fibrinógeno al TLT-1 y competencia de unión entre los mAb para TLT-1 y el fibrinógeno.

El TLT-1 se une al fibrinógeno mediante análisis de SPR. Además, se analizó la unión simultánea de fibrinógeno y cada uno de los cuatro mAb: mAb0012, mAb0023, mAb0051 y mAb0062 mediante análisis de SPR en un instrumento Biacore T100.

Los materiales usados se muestran en la Tabla 10.

Tabla 10

Reactivo	Fuente
TLT-1	Ejemplo 2
mAb0012	Ejemplo 18
mAb0023	Ejemplo 18
mAb0051	Ejemplo 18
mAb0062	Ejemplo 18
Fibrinógeno	HCI-0150R Haematologic technologies
Todos los demás reactivos	Biacore GE Healthcare

Método:

El TLT-1 humano se inmovilizó a un nivel de aprox. 1000 RU en un chip CM5 (50 µg/ml diluido en acetato de Na, pH 4,0) mediante el uso del procedimiento estándar recomendado por el proveedor. Se analizaron diluciones de cuatro veces del fibrinógeno humano desde 200 nM a 0,2 nM para la unión al TLT-1 inmovilizado. Tampón de corrida y de dilución: HEPES 10 mM, 150 mM, p20 al 0,005 %, pH 7,4. La regeneración se obtuvo mediante glicina 10 mM, pH 1,7. La determinación de las constantes cinéticas y de unión (k_{on} , k_{off} , K_D) se obtuvo al asumir una interacción 1:1 del TLT-1 y fibrinógeno mediante el uso del programa informático de evaluación Biacore T100 (Tabla 11).

La competencia de los diferentes mAb por la unión al TLT-1 y a fibrinógeno simultáneamente se analizó mediante la inmovilización de cada uno de los mAb a aproximadamente 10 000-15 000 RU en un chip CM5 seguido de la unión del TLT-1 50 nM seguido de una disociación de 2-3 min mediante la variación de las concentraciones de los mAb a analizar para la competencia. La regeneración del chip se obtuvo mediante glicina 10 mM, pH 1,7.(Tabla 12).

Resultados:

Tabla 11: Unión del TLT-1 al fibrinógeno

	k_a (1/M)	k_d (1/s)	K_D (M)
TLT-1- fibrinógeno Unión	4171	$3,92 \times 10^{-4}$	9,40E-08

Tabla 12: Competencia con fibrinógeno.El mAb de interés se inmovilizó en un chip. La adición del TLT-1 se siguió de fibrinógeno (un emparejado).

ID del mAb	Competencia con fibrinógeno
mAb0012	no
mAb0023	sí
mAb0051	no
mAb0062	sí

Conclusión:

El TLT-1 (HCI-0150R) se une el fibrinógeno. mAb0023 y mAb0062 compiten con este sitio de unión. mAb0012 y mAb0051 no compiten.

Ejemplo 22: Mapeo de epítomos por espectrometría de masa de intercambio de hidrógeno (HX-MS).

La técnica HX-MS se ha empleado para identificar los epítomos de unión al TLT-1 cubiertos por los cuatro anticuerpos monoclonales mAb0023, mAb0051, mAb0062 y mAb0061.

Para los experimentos de mapeo se usaron hTLT-1.20-125, hTLT-1.16-162 y hTLT-1.126-162 correspondientes a las SEQ ID NO 5, 6 y 7, respectivamente. Todas las proteínas se intercambiaron en tampón a PBS pH 7,4 antes de los experimentos.

Método: Experimentos HX-MS.

Instrumentación y registro de datos. Los experimentos HX se automatizaron mediante un robot Leap (H/D-x PAL; Leap Technologies Inc.) operado por el programa informático LeapShell (Leap Technologies Inc.), que realizó la iniciación de la reacción de intercambio de deuterio, control del tiempo de reacción, reacción de inactivación, inyección en el sistema UPLC y control del tiempo de digestión. El robot Leap se equipó con dos estantes con temperatura controlada mantenidos a 20 °C para el almacenamiento del tampón y reacciones de HX y mantenidas a 2 °C para el almacenamiento de la proteína y la solución de inactivación, respectivamente. El robot Leap contenía además una unidad Trio VS enfriada (Leap Technologies Inc.) que contenía las columnas analítica, preparativa y de pepsina, y la tubería de LC y las válvulas de conmutación a 1 °C. Las válvulas de conmutación se han mejorado de HPLC a válvulas de conmutación UHPLC Microbore (Cheminert, VICI AG). Para la digestión en pepsina en línea, 100 µl de la muestra inactivada que contiene 200 pmol del TLT-1 se cargó y pasó sobre un Cartucho de Pepsina Inmovilizada Poroszyme® (2,1 × 30 mm (Applied Biosystems)) mediante el uso de una tasa de flujo isocrático de 200 µl/min (ácido fórmico 0,1 %:CH₃CN 95:5). Los péptidos resultantes se atraparon y se desalinizaron en una precolumna VanGuard BEH C18 1,7 µm (2,1 × 5 mm (Waters Inc.)). Subsecuentemente, las válvulas se conmutaron para colocar la precolumna en línea con la columna analítica, UPLC-BEH C18 1,7 µm (2,1 × 100 mm (Waters Inc.)), y los péptidos se separaron mediante el uso de un gradiente de 9 min de 15–40 % B suministrado a 150 µl/min de un sistema AQUITY UPLC (Waters Inc.). Las fases móviles consisten en A: ácido fórmico al 0,1 % y B: ácido fórmico al 0,1 % en CH₃CN. Los datos de ESI MS, y las adquisiciones de MS/MS dependientes de datos separadas (CID) y experimentos de energía elevada (MS^E) se adquirieron en modo ion positivo mediante el uso de MS Q-ToF Premier (Waters Inc.). La leucina-encefalina se usó como la masa de bloqueo (iones [M+H]⁺ a *m/z* 556.2771) y los datos se colectaron en modo continuo.

Análisis de datos. Los péptidos pépticos se identificaron en experimentos separados mediante el uso de los métodos estándar CID MS/MS o MS^E (Waters Inc.). Los datos de MS^E se procesaron mediante el uso de BiopharmaLynx 1.2 (versión 017). La adquisición de MS/MS dependiente de datos CID se analizó mediante el uso del programa informático MassLynx y la base de datos MASCOT producida internamente.

Los archivos de datos primarios de HX-MS se sometieron a corrección continua mediante estándar. El análisis de datos, es decir, la determinación de los centroides de péptidos deuterados y la graficación de las curvas de intercambio, se realizó mediante el uso de HX-Express ((Versión Beta); Weis y otros, J. Am. Soc. Mass Spectrom. 17, 1700 (2006)).

Mapeo de epítomos de mAb0023: El intercambio de hidrógeno/deuterio (HX) de amida se inició mediante una dilución de 30 veces del hTLT-1.20-125 en presencia o ausencia del mAb0023 en el tampón deuterado correspondiente (es decir. PBS preparado en D₂O, 96 % de D₂O final, pH 7,4 (valor no corregido)). Todas las reacciones HX se llevaron a cabo a 20 °C y contenían hTLT-1.20-125 4 µM en ausencia o presencia de mAb0023 2,4 µM lo que proporcionó de esta forma un exceso molar de 1,2 veces de sitios de unión a mAb. En intervalos de tiempo adecuados que varían de 10 seg a 8 horas, las alícuotas de la reacción HX se inactivaron por un volumen igual de tampón de inactivación helado (TCEP 1,35 M) lo que resulta en un pH final de 2,6 (valor no corregido).

Mapeo de epítomos de los mAb 0051 y 0062: El mapeo de epítomos de mAb0051 y mAb0062 se realizó en un experimento separado mediante el uso del hTLT-1.20-125 y se llevó a cabo de manera similar al mapeo de mAb0023 como se describió anteriormente.

Mapeo de epítomos de mAb0061: El mapeo de epítomos de mAb0061 se realizó en dos experimentos separados mediante el uso ya sea de la proteína hTLT-1.16-162 o el péptido hTLT-1.126-162.

Los experimentos se realizaron de manera similar como se describió anteriormente para el mAb0023. No obstante, la columna de pepsina se colocó a temperatura ambiente para los experimentos mediante el uso del hTLT-1.126-162. Esto resulta en un aumento de la eficacia de digestión de pepsina con una pérdida de intercambio adicional mínima.

Resultados

Mapeo de epítomos de mAb0023

El curso de tiempo de HX de 20 péptidos, que cubre 100 % de la secuencia primaria del TLT-1, se monitoreó en presencia y ausencia de mAb0023 durante 10 segundos hasta 8 horas.

5 El patrón de intercambio observado en presencia o ausencia de mAb0023 puede dividirse en dos grupos diferentes: Un grupo de péptidos TLT-1 muestra un patrón de intercambio que no se afecta por la unión de mAb0023 y otro grupo de péptidos TLT-1 que muestra protección a partir del intercambio tras la unión a mAb0023. Las regiones que muestran protección tras la unión a mAb0023 abarcan péptidos que cubren los residuos del TLT-1 36-51, 79-91 y 105-120. Al comparar las cantidades relativas de protección de intercambio dentro de cada péptido el epítipo para mAb0023 puede estrecharse para los residuos 36-47, VQCHYRLQDVKA (50 %), 82-87, LGGGLL (30 %), 108-115, GARGPQIL (20 %) con la protección de intercambio relativo para cada segmento señalado en paréntesis. Una visión general del mapa del péptido para el epítipo 0023 se muestra en la Figura 6.

Mapeo de epítipos de mAb0051

15 El curso de tiempo de HX de 22 péptidos, que cubre 100 % de la secuencia primaria del TLT-1, se monitoreó en presencia y ausencia de mAb0051 durante 10 segundos hasta 1000 segundos.

20 El patrón de intercambio observado en presencia o ausencia de mAb0051 puede dividirse en dos grupos diferentes: un grupo de péptidos TLT-1 muestra un patrón de intercambio que no se afecta por la unión de mAb0051 y un grupo que se afecta. Las regiones que muestran protección después de la unión a mAb0051 abarcan péptidos que cubren los residuos 52-66, 92-120. Al comparar las cantidades relativas de protección de intercambio dentro de cada péptido el epítipo para mAb0051 puede estrecharse para los residuos 55-66, LPEGCQPLVSSA (75 %) y 110-120, RGPQILHRVSL (25 %), así como también, una interacción débil en el tramo 92-105. Una visión general del mapa del péptido para el epítipo 0051 se muestra en la Figura 7.

25 Mapeo de epítipos de mAb0062

30 El curso de tiempo de HX de 22 péptidos, que cubre 100 % de la secuencia primaria del TLT-1, se monitoreó en presencia y ausencia de mAb0062 durante 10 segundos hasta 1000 segundos.

35 El patrón de intercambio observado en presencia o ausencia de mAb0062 puede dividirse en dos grupos diferentes: Un grupo de péptidos TLT-1 muestra un patrón de intercambio que no se afecta por la unión de mAb0062 y otro grupo de péptidos TLT-1 que muestran protección. Las regiones que muestran protección después de la unión a mAb0062 abarcan péptidos que cubren los residuos 36-51 y 105-120. Al comparar las cantidades relativas de protección de intercambio dentro de cada péptido el epítipo para mAb0062 puede estrecharse para 36-47, VQCHYRLQDVKA (60 %) y 110-120, RGPQILHRVSL (40 %). Una visión general del mapa del péptido para el epítipo 0062 se muestra en la Figura 8.

40 Mapeo de epítipos de mAb0061

El epítipo para mAb0061 se mapeó en dos experimentos separados mediante el uso de la proteína hTLT-1.16-162 o el hTLT-1.126-162.

45 Para hTLT-1.16-162 los transcurso del tiempo de HX de 19 péptidos, que cubre el 85 % de la secuencia primaria del TLT-1, se monitorearon en presencia y ausencia de mAb0061 durante 10 segundos hasta 8 horas. Debido a una O-glicosilación en el residuo S148, no pudo registrarse la información más allá del residuo 141.

50 El patrón de intercambio observado en presencia o ausencia de mAb0061 puede dividirse en dos grupos diferentes: Un grupo de péptidos TLT-1 muestra un patrón de intercambio que no se afecta por la unión de mAb0061 y otro grupo de péptidos TLT-1 que muestra protección a partir del intercambio tras la unión a mAb0061. Las regiones que muestran protección después de la unión a mAb0061 abarcan los péptidos que cubren los residuos 121-141. Sin embargo, es importante observar que no se proporciona información en este experimento para el residuo 142 y más allá. Al comparar las cantidades relativas de protección de intercambio dentro de cada péptido el epítipo para mAb0061 puede estrecharse para comenzar en el residuo 130.

55 Para obtener información completa sobre el epítipo mAb0061, el experimento de mapeo se repitió mediante el uso del péptido hTLT-1.126-162. Este péptido se une al mAb0061 con alta afinidad y no se modifica por glicosilación. Por lo tanto, debería ser capaz de proporcionar información de HX-MS para toda la región.

60 Los transcurso de tiempo de HX de 12 péptidos, que cubren toda la región 126-162 del TLT-1 se monitorearon en presencia y ausencia de mAb0061 durante 10 seg hasta 3000 seg.

65 Todos los péptidos en esta región 126-162 desarrollaron protección para el intercambio a partir de la unión a mAb0061. Al comparar las cantidades relativas de protección de intercambio dentro de cada péptido el epítipo para mAb0061 puede estrecharse para estar dentro de los residuos 130-145, ETHKIGSLAENAFSDP. Una visión general del mapa del péptido para el epítipo 0061 se muestra en la Figura 9 y la 10.

Ejemplo 23: Análisis de la producción, caracterización y unión de mutantes de hTLT-1 ECD-HPC4 Ala.

Los constructos mutantes del hTLT-1 ECD-HPC4 Alanina se diseñaron de acuerdo con la Tabla 6. Los constructos de expresión se desarrollaron por el contratista externo GENEART AG (Im Gewerbepark B35, 93059 Regensburg, Alemania) y todos los constructos de expresión se realizaron en base al vector de expresión denominado pcDNA3.1(+). Las alicuotas de ADN para cada uno de los 40 constructos de expresión del hTLT-1 ECD-HPC4 pcDNA3.1(+) se transfirieron en células en suspensión HEK293-6E con el fin de expresar transitoriamente cada proteína mutante hTLT-1 ECD-HPC4 Ala (Tabla 6). La transfección transitoria y el cultivo de células HEK293 6e se realizaron como se describió en el Ejemplo A.

Siete días después de la transfección, las células se eliminaron mediante centrifugación y la proteína mutante hTLT-1 ECD-HPC4 A la resultante que contiene sobrenadantes se esterilizó por filtración antes de los análisis. La concentración de proteína mutante con hTLT-1 ECD-HPC4 A la expresada en el sobrenadante de células clarificado se determinó mediante el uso de una combinación de RP-HPLC y análisis de SDS-PAGE/Coomassie. Estos variaron de 4 – 40 µg/ml y contienen un grado variable de formación de dímeros. Como se describió anteriormente para la producción de la proteína hTLT usada para los experimentos de inmunización, se observaron formas de monómero/dímero de la proteína expresada para todos los constructos de mutantes hTLT ECD-HPC4 Ala. La concentración relativa de la proteína monómero/dímero hTLT-1 ECD-HPC4 se estimó mediante SDS-PAGE/Coomassie y se calculó un Mw promedio para cada preparación del mutante.

Todos los estudios de unión se corrieron a 25 °C, y las muestras se almacenaron a 15 °C en el compartimento de muestras en un analizador ProteOn (Biorad) que mide las interacciones moleculares en tiempo real mediante resonancia de plasmón de superficie. La señal (RU, unidades de respuesta) informada por el ProteOn se correlaciona directamente con la masa en los puntos de la superficie del chip del sensor individual.

El anticuerpo policlonal anti-hFc se inmovilizó en células de flujo separadas de un chip sensor GLM mediante el uso de una mezcla 1:1 de EDAC 0,4 M [hidrocloruro de 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida] y Sulfo-NHS [N-hidroxisulfosuccinimida] 0,1 M. Cada anticuerpo se diluyó en acetato de sodio 10 mM pH 5,0 a una concentración de 50 µg/ml, y se inmovilizó en una célula de flujo individual a 30 µl/min durante 240 s. Los anticuerpos se inmovilizaron en células de flujo A1-A6 (dirección horizontal). Después de la inmovilización, los sitios activos en la célula de flujo se bloquearon con etanolamina 1 M. El nivel de inmovilización final del anticuerpo de captura varió típicamente de aproximadamente 9000 a 10 000 RU en un experimento. La captura de los anticuerpos anti-TLT-1 mAb0023, mAb0051, mAb0061 y mAb0062 se realizó mediante la dilución hasta 0,5 µg/ml en tampón HBS-EP (HEPES 10 mM, NaCl 150 mM, EDTA 3 mM, tensoactivo P20 al 0,05 %, pH 7,4) e inyectado a 30 µl/min durante 60 s en dirección vertical, lo que crea puntos de referencia interbandas con sólo anticuerpos anti-Fc humano. El nivel de captura final de los anticuerpos de análisis varió típicamente de aproximadamente 200 a 300 RU en un experimento. La unión de la proteína hTLT-1 ECD-HPC4 wt o mutante Ala se realizó mediante la inyección sobre las células de flujo paralelas en dirección horizontal para permitir el análisis comparativo de la unión a diferentes anticuerpos anti-TLT-1 capturados con relación a la unión a las referencias de interbanda. Cada proteína hTLT-1 ECD-HPC4 se diluyó hasta 100 nM, basado en el Mw promedio calculado, en tampón HBS-EP y se inyecta a 30 µl/min durante 240 s. El chip GLM se regeneró después de cada ciclo de inyección de analito a través de una inyección de 18 s de ácido fórmico 1 M seguido por una inyección de 18 s de NaOH 50 mM a 100 µl/min. Esta etapa de regeneración eliminó el anticuerpo anti-TLT-1 y cualquier TLT-1 unido a partir de la superficie de anticuerpo de captura inmovilizado, y permitió la unión posterior del siguiente par de muestras de análisis. El procedimiento de regeneración no eliminó el anticuerpo de captura anti-Fc humano inmovilizado directamente de la superficie del chip.

El análisis de datos se realizó mediante el uso del programa informático ProteOn Manager™. No se observó una unión no específica significativa a las superficies de control interbandas. Las curvas de unión se procesaron mediante referenciación doble (sustracción de señales de superficie de control de intersección, así como también, inyecciones de tampón blanco sobre los anticuerpos capturados anti-TLT-1). Esto permitió corregir el ruido de instrumentos, el cambio de volumen y la deriva durante las inyecciones de muestra. La señal de unión a los 10 s después de la detención de la inyección del analito se normalizó al nivel del anticuerpo anti-TLT-1 capturado y se presentó como unión con relación a la proteína hTLT-1 ECD-HPC4 wt.

Las mutaciones de Ala siguientes mostraron una disminución significativa de la unión a los respectivos anti-TLT-1 en comparación con la proteína hTLT-1 ECD-HPC4 wt. mAb0051: F54A < 0,4 wt; M91A < 0,2 wt; R117A < 0,2 wt; S119A < 0,6 wt. mAb0062: R41A < 0,2 wt; L42A < 0,6 wt; Q43A < 0,4 wt; F54A < 0,6 wt; M91A < 0,4 wt; R110A < 0,2 wt; H116A < 0,6 wt. mAb0023: L42A < 0,2 wt; Q43A < 0,2 wt; K46A < 0,2 wt; M91A < 0,4 wt; R110A < 0,2 wt. Dado que se pudo observar una disminución de la unión para el mutante M91A de HPC4 con hTLT-1 para los 4 anticuerpos anti-TLT-1, el residuo probablemente tiene una influencia importante sobre la estabilidad de las proteínas en lugar de ser parte de un epítipo real. mAb0061 no mostró una disminución de la unión a cualquiera de las variantes del TLT-1 mutadas analizadas, lo que indica que el epítipo no está cubierto por los mutantes introducidos en el estudio de unión.

Ejemplo 24: Complejos de estructura cristalina entre péptidos de tallo de TLT-1 y el Fab anti-TLT-1.

Expresión del Fab anti-TLT-1, Fab0100 (idéntico a Fab0061), para la cristalización: El fragmento Fab anti-TLT-1, Fab0100, que comprende la cadena pesada que corresponde a la SEQ ID NO: 152 y la cadena ligera que corresponde a la SEQ ID NO: 153, se expresó transitoriamente en células HEK293 de acuerdo con el procedimiento generalizado.

5 Purificación del Fab anti-TLT-1, Fab0100, para la cristalización: La purificación de dicho Fab se realizó mediante un proceso en dos etapas compuesto por cromatografía de afinidad mediante el uso de la resina kappaSelect (GE Healthcare, núm. de cat. 17-5458-01) y cromatografía de exclusión por tamaño. La purificación se realizó mediante el uso de un sistema de cromatografía ÄktaExplorer (GE Healthcare, núm. de cat. 18-1112-41). Los sistemas tampón usados para la etapa de purificación fueron un tampón de equilibrado compuesto de NaFosfato 10 mM, pH 7,5 y NaCl
10 150 mM y un tampón de elución compuesto de ácido fórmico 20 mM, pH 3,0. El sobrenadante se ajustó con NaOH 1 M a un pH de 7,5 y se aplicó sobre una columna kappaSelect equilibrada previamente. La columna se lavó con 5 volúmenes de columna de tampón de equilibrado y la proteína Fab se eluyó isocráticamente mediante el uso de aproximadamente 5 volúmenes de columna de tampón de elución. La proteína Fab se analizó mediante el uso de análisis de SDS-PAGE/Coomassie y LC-MS, lo que muestra que se obtuvo una proteína pura y homogénea con un peso molecular esperado de 46,9 kDa. Para medir la concentración de proteína, se usó un espectrofotómetro NanoDrop (Thermo Scientific) junto con un coeficiente de extinción de 1,31. El acabado final de la proteína Fab se llevó a cabo mediante el uso de una columna de exclusión por tamaño (Superdex200).

20 Preparación de péptidos para la cristalización: El péptido del tallo de TLT-1 hTLT-1.126-162 (SEQ ID NO: 7) se preparó mediante síntesis de péptido de fase sólida. Igualmente, se preparó una versión más corta hTLT-1.129-142 del péptido del tallo que corresponde a la SEQ ID NO: 8.

25 Preparación, cristalización y determinación de la estructura de los complejos Fab0100:TLT-1: Preparación de Fab0100:hTLT-1.126-162: El complejo entre Fab0100 y hTLT-1.126-162 se preparó por adición de dos veces de exceso molar del hTLT-1.126-162 a una solución de Fab0100 seguido por aislamiento del complejo mediante la separación del exceso del hTLT-1.126-162 mediante el uso de cromatografía de exclusión por tamaño preparativa. Por lo tanto, el complejo Fab0100: hTLT-1.126-162 se preparó mediante la mezcla de Fab (1100 ml, 98 mM) y hTLT-1.126-162 (155 ml, 1391 mM), ambos en tampón PBS (pH 7,4). El complejo se sometió a filtración en gel mediante el uso de una columna Superdex 200 HighLoad 26/60 (GE Healthcare) eluida con tampón PBS (pH 7,4) a una tasa de flujo de 1 ml/min. Se colectaron fracciones correspondientes a un volumen de 3 ml. Las fracciones que contenían el complejo Fab0100: hTLT-1.126-162 deseado se agruparon y después se concentraron mediante el uso de un dispositivo de filtro de centrifuga (Amicon, valor límite de 10 kDa) hasta una concentración de proteína de 8,6 mg/ml. Esta preparación se usó para la cristalización del complejo Fab0100:hTLT-1.126-162.

35 Preparación de Fab0100:hTLT-1.129-142: El complejo entre Fab0100 y el péptido del tallo más corto (hTLT-1.129-142) se preparó de manera similar con las excepciones de que la relación molar entre hTLT-1.129-142 y Fab fue 1,5:1 y que el tope de filtración en gel se omitió debido a la unión más débil del hTLT-1.129-142 en comparación con la del péptido del tallo más largo (hTLT-1.126-162).

40 Cristalización y recogida de datos de los complejos Fab0100:hTLT-1.129-142 y Fab0100:hTLT-1.126-162: Los complejos Fab0100:hTLT-1.129-142 y Fab0100:hTLT-1.126-162 a temperatura ambiente se cristalizaron a temperatura ambiente por el método de gota sentada. El Fab0100:hTLT-1.129-142 se cristalizó mediante la adición a la solución de proteína, en una relación de volumen de 1:2 (precipitante:proteína), de una solución de precipitación que contiene dihidrógeno fosfato de potasio 0,04 M, PEG 8000 al 16 % p/v y glicerol al 20 %, mientras que el complejo
45 Fab0100:hTLT-1.126-162 se cristalizó mediante la adición a la solución de proteína, en una relación de volumen de 1:1 (precipitante:proteína), de una solución de precipitación que contiene PEG 10 000 al 20 % p/v y Hepes 0,10 M pH 7,5. Un cristal del complejo Fab0100:hTLT-1.129-142 se congeló inmediatamente en N₂ líquido y durante la recogida de datos se mantuvo a 100 K mediante una corriente de gas N₂ criogénica. Los datos cristalográficos se recogieron posteriormente a una resolución de 2,14 Å mediante el uso de un ánodo giratorio Rigaku MicroMax-007 HF y un detector de rayos X marCCD 165. La determinación del grupo separador, la integración y el escalado de los datos se realizaron mediante el paquete del programa informático XDS (Kabsch,W. (1993) *J. Appl. Crystallogr.* 26, 795-800). Los parámetros de celda del cristal se determinaron ser 82,10, 64,99, 107,73 Å, 90°, 95,12° y 90° para a, b, c, α , β y γ y respectivamente, y el grupo separador se determinó ser C2. El R_{sym} para las intensidades del conjunto de datos se calculó ser 6,5 %. Las coordenadas de un modelo del Fab de la estructura del 1NGZ (Yin,J. y otros *PNAS EE.UU.*
50 100, 856-861) depositada en la PDB (Berman, H.M. y otros (2000) *Nucleic Acids Res.* 28, 235-242) se usó para la determinación de la estructura de la molécula Fab anti-TLT-1. El modelo Fab 1NGZ se dividió en dos dominios, los dominios variable y constante, que después se usaron como modelos de búsqueda independientes en un reemplazo molecular ejecutado por el programa informático PHASER (McCoy,A.J. y otros *Acta Crystallographica Sección D Biological Crystallography* 61, 458-464; McCoy,A.J. y otros *J. Appl. Crystallogr.* 40, 658-674) de la suite CCP4 (Bailey,S. (1994) *Acta Crystallogr. Sect. D-Biol. Crystallogr.* 50, 760-763). El paquete de programa informático ARP-wARP (Evvard,G.X. y otros *Acta Crystallographica Sección D* 63, 108-117) se usó posteriormente para la construcción y sincronización de modelos automatizados. Se aplicaron refinamientos cristalográficos adicionales, mediante el uso del programa informático REFMAC5 (Murshudov,G.N. y otros *Acta Crystallogr. Sect. D-Biol. Crystallogr.* 53, 240-255), seguido por inspección gráfica computarizada de los mapas de densidad electrónica, corrección y construcción de modelos, mediante el uso del programa informático COOT (Emsley,P. y otros *Acta Crystallogr. Sect. D-Biol. Crystallogr.*
55 60, 2126-2132). El procedimiento se sometió a un ciclo hasta que no se pudieran hacer más mejoras significativas al

modelo. Los resultados finales de R y R libre calculados después de 3 ciclos de intervención manual y después de los refinamientos fueron 0,185 y 0,245, respectivamente, y el modelo mostró una desviación cuadrática media (RMSD) de las longitudes de unión ideales de 0,022 Å.

5 Un cristal del complejo Fab0100:hTLT-1.126-162 se transfirió a una criosolución que contenía 75 % de la solución precipitante y 25 % de glicerol. El cristal se dejó en remojo durante unos 15 segundos, se congeló inmediatamente en N₂ líquido y durante la recogida de datos se mantuvo a una temperatura de 100 K mediante una corriente de gas N₂ criogénico. Los datos cristalográficos se recogieron posteriormente a una resolución de 1,85 Å en la línea de haz BL911-3 (Ursby, T. y otros (2004) AIP Conference Proceedings 705, 1241-1246) en MAX-lab, Lund, Suecia. La
10 determinación del grupo separador, la integración y el escalado de los datos se realizaron en el paquete del programa informático xds. Los parámetros de celda para los datos del sincrotrón se determinaron ser 82,54, 65,32, 108,05 Å, 90°, 95,15° y 90° para a, b, c, α, β y γ respectivamente, y el grupo separador se determinó ser C2. El R_{sym} para las intensidades del conjunto de datos se calculó ser 6,7 %. El cristal fue isomórfico con los cristales de Fab0100:hTLT-1.129-142 y, por lo tanto, el refinamiento corporal rígido del complejo Fab0100:hTLT-1.129-142 se usó para la sincronización original del Fab0100:hTLT-1.126-162 seguido por la construcción y sincronización de modelos automatizados mediante el uso del paquete del programa informático ARP-wARP. Se aplicaron refinamientos cristalográficos adicionales, mediante el uso del programa informático REFMAC5, seguido por inspección gráfica computarizada de los mapas de densidad electrónica, corrección y construcción de modelos, mediante el uso del programa informático COOT. El procedimiento se sometió a un ciclo hasta que no se pudieran hacer más mejoras
15 significativas al modelo. Los resultados finales de R y R libre calculados después de 13 ciclos de intervención manual y los refinamientos siguientes fueron 0,171 y 0,223, respectivamente, y el modelo mostró una RMSD de longitudes de unión ideales de 0,027 Å (Tabla 11).

Resultados

25 Como se muestra en las Tablas 14 y 15, el anti-TLT-1 se une eficazmente al tallo del TLT-1. Mediante el uso del programa informático AREAIMOL, del paquete de programas CCP4, el área promedio excluida en una interacción por pares entre Fab0100 y TLT-1 se calculó ser 764 Å². Las áreas promedio excluidas en interacciones por pares para el complejo Fab0100:hTLT-1.126-162, dieron 656 y 871 Å², para anti-TLT-1 y TLT-1, respectivamente.

30 Los residuos en el péptido TLT-1 (hTLT-1.126-162) que hacen contactos directos con el Fab anti-TLT-1 en el complejo Fab0100: hTLT-1.126-162 se definen como el epítipo y los residuos en Fab0100 que realizan contactos directos con el hTLT-1.126-162 en el complejo Fab0100: hTLT-1.126-162 se definen como paratopo. Los residuos de epítipos y paratopos se identificaron al ejecutar el programa informático CONTACTS del conjunto de programas CCP4 mediante el uso de una distancia límite de 4,0 Å entre el Fab anti-TLT-1 y la molécula TLT-1. Los resultados de los cálculos de contacto para el complejo Fab0100:hTLT-1.126-162 de las estructuras cristalinas se muestran en las Tablas 14 y 15. Se encontró que el epítipo TLT-1 resultante para Fab0100 comprende los siguientes residuos de la SEQ ID NO: 7): Lys 8 (133), Ile 9 (134), Gly 10 (135), Ser 11 (136), Leu 12 (137), Ala 13 (138), Asn 15 (140), Ala 16 (141), Phe 17 (142), Ser 18 (143), Asp 19 (144), Pro 20 (145), Ala 21 (146) donde los números entre paréntesis se refieren a los
35 residuos correspondientes en la SEQ ID NO: 2 (Tablas 12 y 13).

40 El paratopo resultante incluyó los residuos His 31, Asn 33, Tyr 37, His 39, Tyr 54, Phe 60, Ser 96, Thr 97, Val 99 y Tyr 101 de la cadena ligera de Fab0100 que corresponden a la SEQ ID NO: 153 (Tabla 12), y los residuos Val 2, Phe 27, Arg 31, Tyr 32, Trp 33, Glu 50, Thr 57, Asn 59, Ser 98, Gly 99, Val 100 y Thr 102 de la cadena pesada Fab0100 correspondiente a la SEQ ID NO: 152 (Tabla 13). Los residuos de epítipos del TLT-1 implicados en la unión al hidrógeno también se indican en las Tablas 12 y 13.

Tabla 13: Resultados del refinamiento del modelo de rayos X de los datos observados del complejo Fab0100:hTLT-1.126-162 mediante el programa informático refmac5.

50	OBSERVACIÓN	3 REFINAMIENTO.	
	OBSERVACIÓN	3 PROGRAMA: REFMAC	5.5.0109
	OBSERVACIÓN	3 AUTORES:	MURSHUDOV,VAGIN,DODSON
55	OBSERVACIÓN	3	
	OBSERVACIÓN	3 OBJETIVO DEL REFINAMIENTO:	PROBABILIDAD MÁXIMA
	OBSERVACIÓN	3	
	OBSERVACIÓN	3 DATOS USADOS EN EL REFINAMIENTO.	
60	OBSERVACIÓN	3 INTERVALO DE RESOLUCIÓN ALTO (ANGSTROMS):	1,85
	OBSERVACIÓN	3 INTERVALO DE RESOLUCIÓN BAJO (ANGSTROMS):	34,18
	OBSERVACIÓN	3 VALOR LÍMITE DE DATOS (SIGMA(F)):	NINGUNO
65	OBSERVACIÓN	3 COMPLETAMIENTO PARA EL INTERVALO (%):	99,89

ES 2 757 930 T3

	OBSERVACIÓN	3 NÚMERO DE REFLEXIONES:	46512
	OBSERVACIÓN	3	
	OBSERVACIÓN	3 AJUSTE A LOS DATOS USADOS EN EL REFINAMIENTO.	
	OBSERVACIÓN	3 MÉTODO DE VALIDACIÓN CRUZADA:	A TODO LO LARGO
5	OBSERVACIÓN	3 SELECCIÓN DE CONJUNTO DE PRUEBA DE VALOR DE R LIBRE:	ALEATORIO
	OBSERVACIÓN	3 VALOR DE R (DE TRABAJO + CONJUNTO DE PRUEBA):	0,17330
	OBSERVACIÓN	3 VALOR DE R (CONJUNTO DE TRABAJO):	0,17070
	OBSERVACIÓN	3 VALOR DE R LIBRE:	0,22260
	OBSERVACIÓN	3 TAMAÑO DE CONJUNTO DE PRUEBA DE VALOR DE R LIBRE (%):	5,0
10	OBSERVACIÓN	3 CONTEO DE CONJUNTO DE PRUEBA DE VALOR DE R LIBRE:	2463
	OBSERVACIÓN	3	
	OBSERVACIÓN	3 AJUSTE EN EL RANGO DE NÚMEROS DE MAYOR RESOLUCIÓN.	
	OBSERVACIÓN	3 NÚMERO TOTAL DE RANGOS DE NÚMEROS USADOS:	20
	OBSERVACIÓN	3 INTERVALO DE RESOLUCIÓN DE RANGOS DE NÚMEROS ALTO:	1,850
15	OBSERVACIÓN	3 INTERVALO DE RESOLUCIÓN DE RANGOS DE NÚMEROS BAJO:	1,898
	OBSERVACIÓN	3 REFLECCIÓN EN RANGOS DE NÚMEROS (CONJUNTO DE TRABAJO):	3409
	OBSERVACIÓN	3 COMPLETAMIENTO DEL RANGOS DE NÚMEROS (TRABAJO+PRUEBA) (%):	99,81
20	OBSERVACIÓN	3 VALOR DE R DEL RANGOS DE NÚMEROS (CONJUNTO DE TRABAJO):	0,266
	OBSERVACIÓN	3 CONTEO DE CONJUNTO DE VALOR DE R LIBRE DEL RANGOS DE NÚMEROS:	195
	OBSERVACIÓN	3 VALOR DE R LIBRE DEL RANGOS DE NÚMEROS:	0,309
25	OBSERVACIÓN	3	
	OBSERVACIÓN	3 NÚMERO DE ÁTOMOS DISTINTOS DE HIDRÓGENO USADOS EN EL REFINAMIENTO.	
	OBSERVACIÓN	3 TODOS LOS ÁTOMOS:	3993
	OBSERVACIÓN	3	
	OBSERVACIÓN	3 VALORES DE B.	
30	OBSERVACIÓN	3 DEL GRÁFICO DE WILSON (A**2): NULO	
	OBSERVACIÓN	3 VALOR DE B MEDIO (TOTAL, A**2):	14,967
	OBSERVACIÓN	3 VALOR DE B ANISOTRÓPICO TOTAL.	
	OBSERVACIÓN	3 B11 (A**2):	-0,06
35	OBSERVACIÓN	3 B22 (A**2):	0,23
	OBSERVACIÓN	3 B33 (A**2):	-0,24
	OBSERVACIÓN	3 B12 (A**2):	0,00
	OBSERVACIÓN	3 B13 (A**2):	-0,36
	OBSERVACIÓN	3 B23 (A**2):	0,00
40	OBSERVACIÓN	3	
	OBSERVACIÓN	3 ERROR DE COORDENADA TOTAL ESTIMADO.	
	OBSERVACIÓN	3 ESU BASADO EN VALOR DE R (A):	0,116
	OBSERVACIÓN	3 ESU BASADO EN VALOR DE R LIBRE (A):	0,123
45	OBSERVACIÓN	3 ESU BASADO EN LA PROBABILIDAD MÁXIMA (A):	0,084
	OBSERVACIÓN	3 ESU PARA VALORES DE B BASADO EN LA PROBABILIDAD MÁXIMA (A**2):	6,165
	OBSERVACIÓN	3 COEFICIENTES DE CORRELACIÓN.	
	OBSERVACIÓN	3 COEFICIENTE DE CORRELACIÓN FO-FC:	0,963
50	OBSERVACIÓN	3 COEFFICIENT DE CORRELACIÓN FO-FC FREE:	0,939
	OBSERVACIÓN	3	
	OBSERVACIÓN	3 DESVIACIONES DE RMS A PARTIR DE VALORES IDEALES CONTEO DEL PESO RMS	
	OBSERVACIÓN	3 LONGITUDES DE UNIÓN DE ÁTOMOS REFINADOS (A):	3538 ; 0,027 ; 0,022
	OBSERVACIÓN	3 ÁNGULOS DE UNIÓN DE ÁTOMOS REFINADOS (GRADOS):	4833 ; 2,132 ; 1,958
55	OBSERVACIÓN	3 ÁNGULOS DE TORSIÓN, PERÍODO 1 (GRADOS):	473 ; 6,972 ; 5,000
	OBSERVACIÓN	3 ÁNGULOS DE TORSIÓN, PERÍODO 2 (GRADOS):	137 ; 35,607 ; 24,453
	OBSERVACIÓN	3 ÁNGULOS DE TORSIÓN, PERÍODO3 (GRADOS):	583 ; 14,216 ; 15,000
	OBSERVACIÓN	3 ÁNGULOS DE TORSIÓN, PERÍODO 4 (GRADOS):	14 ; 23,096 ; 15,000
	OBSERVACIÓN	3 RESTRICCIONES DE CENTROS QUIRALES (A**3):	552 ; 0,180 ; 0,200
60	OBSERVACIÓN	3 PLANOS GENERALES REFINADOS DE ÁTOMOS (A):	2664 ; 0,013 ; 0,021
	OBSERVACIÓN	3 RESTRICCIONES DE FACTOR TÉRMICO ISOTRÓPICO. CONTEO PESO RMS	
	OBSERVACIÓN	3 ÁTOMOS REFINADOS UNIDOS A CADENA PRINCIPAL (A**2):	2262 ; 1,399 ; 1,500
65	OBSERVACIÓN	3 ÁTOMOS REFINADOS DE ÁNGULO DE CADENA PRINCIPAL (A**2):	3679 ; 2,333 ; 2,000
	OBSERVACIÓN	3 ÁTOMOS REFINADOS UNIDOS A CADENA LATERAL (A**2):	1276 ; 3,462 ; 3,000

ES 2 757 930 T3

	OBSERVACIÓN	3 ÁTOMOS REFINADOS DE ÁNGULO DE CADENA LATERAL (A**2):	1139 ; 5,231 ; 4,500	
	OBSERVACIÓN	3		
5	OBSERVACIÓN	3 ESTADÍSTICAS DE RESTRICCIÓN DE NCS		
	OBSERVACIÓN	3 NÚMEROS DE GRUPOS NCS: NULO		
	OBSERVACIÓN	3		
	OBSERVACIÓN	3 DETALLES GEMELOS		
10	OBSERVACIÓN	3 NÚMERO DE DOMINIOS GEMELOS: NULO		
	OBSERVACIÓN	3		
	OBSERVACIÓN	3		
15	OBSERVACIÓN	3 DETALLES DE TLS		
	OBSERVACIÓN	3 NÚMERO DE GRUPOS TLS:	2	
	OBSERVACIÓN	3 REGISTRO DEL ATOMO QUE CONTIENE SOLO LOS FACTORES RESIDUALES B		
	OBSERVACIÓN	3		
20	OBSERVACIÓN	3 GRUPO TLS:	1	
	OBSERVACIÓN	3 NÚMERO DEL GRUPO DE COMPONENTES:	3	
	OBSERVACIÓN	3 COMPONENTES C SSSEQI A C SSSEQI		
	OBSERVACIÓN	3 INTERVALO DE RESIDUO:	L 1	L 109
25	OBSERVACIÓN	3 INTERVALO DE RESIDUO:	H 1	H 113
	OBSERVACIÓN	3 INTERVALO DE RESIDUO:	P 7	P 21
	OBSERVACIÓN	3 ORIGEN PARA EL GRUPO (A): -4,1790	48,4400	34,3450
30	OBSERVACIÓN	3 TENSOR T		
	OBSERVACIÓN	3 T11: 0,1731	T22: 0,1937	
	OBSERVACIÓN	3 T33: 0,1093	T12: -0,0155	
	OBSERVACIÓN	3 T13: -0,0164	T23: -0,0192	
35	OBSERVACIÓN	3 TENSOR L		
	OBSERVACIÓN	3 L11: 1,9367	L22: 0,4840	
	OBSERVACIÓN	3 L33: 3,8383	L12: -0,1522	
	OBSERVACIÓN	3 L13: -1,2215	L23: -0,1172	
40	OBSERVACIÓN	3 TENSOR S		
	OBSERVACIÓN	3 S11: 0,0447	S12: -0,2657	S13: 0,0758
	OBSERVACIÓN	3 S21: 0,0958	S22: -0,0414	S23: -0,0674
45	OBSERVACIÓN	3 S31: 0,0036	S32: 0,0098	S33: -0,0032
	OBSERVACIÓN	3		
	OBSERVACIÓN	3 GRUPO TLS: 2		
	OBSERVACIÓN	3 NÚMERO DEL GRUPO DE COMPONENTES: 2		
50	OBSERVACIÓN	3 COMPONENTES C SSSEQI A C SSSEQI		
	OBSERVACIÓN	3 INTERVALO DE RESIDUO:	L 114	L
	OBSERVACIÓN	3 INTERVALO DE RESIDUO:	H 116	H
	OBSERVACIÓN	3 ORIGEN PARA EL GRUPO (A): -24,4360	51,7710	ε
55	OBSERVACIÓN	3 TENSOR T		
	OBSERVACIÓN	3 T11: 0,0252	T22: 0,0170	
	OBSERVACIÓN	3 T33: 0,0735	T12: 0,0161	
60	OBSERVACIÓN	3 T13: 0,0018	T23: 0,0048	
	OBSERVACIÓN	3 TENSOR L		
		3 L11: 2,0324	L22: 1,6905	
	OBSERVACIÓN	3 L33: 0,8461	L12: 0,7328	
65	OBSERVACIÓN	3 L13: 0,0695	L23: 0,3337	

ES 2 757 930 T3

	OBSERVACIÓN	3 TENSOR S		
	OBSERVACIÓN	3 S11: -0,0068 S12:	0,0156 S13:	0,0515
5	OBSERVACIÓN	3 S21: -0,0127 S22:	-0,0101 S23:	0,1316
	OBSERVACIÓN	3 S31: -0,0077 S32:	-0,0763 S33:	0,0168
	OBSERVACIÓN	3		
	OBSERVACIÓN	3		
10	OBSERVACIÓN	3 MODELADO DE SOLVENTE VOLUMÉTRICO.		
	OBSERVACIÓN	3 MÉTODO USADO:	MÁSCARA	
	OBSERVACIÓN	3 PARÁMETROS PARA EL CÁLCULO DE LA MÁSCARA		
	OBSERVACIÓN	3 RADIO DE Sonda VDW:	1,40	
15	OBSERVACIÓN	3 RADIO DE Sonda DE ION:	0,80	
	OBSERVACIÓN	3 RADIO DE CONTRACCIÓN:	0,80	
	OBSERVACIÓN	3		
	OBSERVACIÓN	3 OTRAS OBSERVACIONES DE REFINAMIENTO:		
20	OBSERVACIÓN	3 HIDRÓGENOS QUE SE HAN AÑADIDO EN LAS POSICIONES DE MONTAJE		
	OBSERVACIÓN	3 VALORES DE U	:SOLO RESIDUAL	
	OBSERVACIÓN	3		
25	LINKR	SG CYS L 139	SG ACYS L 199	SS
	LINKR	SG CYS H 22	SG ACYS H 96	SS
	LINKR	SG ACYS H 141	SG ACYS H 197	SS
30	CISPEP	1 THR L 7	PRO L 8	0,00
	CISPEP	2 VAL L 99	PRO L 100	0,00
	CISPEP	3 TYR L 145	PRO L 146	0,00
	CISPEP	4 PHE H 147	PRO H 148	0,00
35	CISPEP	5 GLU H 149	PRO H 150	0,00

Tabla 14

40 Interacciones del hTLT-1.126-162 "P" (SEQ ID NO: 7) con la cadena ligera de Fab0100 (SEQ ID NO: 163). Se usó un valor límite de 4,0 Å. Los contactos se identificaron mediante el programa informático CONTACT del conjunto de programas CCP4. En la última columna "****" indica una posibilidad fuerte para un enlace de hidrógeno a este contacto (distancia < 3,3 Å) como se calculó mediante CONTACT, "***" indica una posibilidad débil (distancia > 3,3 Å). En blanco indica que el programa consideró que no existe posibilidad de un enlace de hidrógeno. Los enlaces de hidrógeno son específicos entre un donante y un aceptor, son típicamente fuertes, y se identifican fácilmente.

45

hTLT-1.126-162			Anti-TLT-1			Distancia [Å]	Posiblemente enlace de H
Tipo de Res.	Núm. de Res. y Cadena	Nombre del átomo	Tipo de Res.	Núm. de Res. y Cadena	Nombre del átomo		
Ile	9P	CB	Tyr	101L	OH	3,76	
Ile	9P	CD1	Ser	96L	O	3,58	
			Thr	97L	O	3,68	
Ile	9P	CG2	Val	99L	CG2	3,51	
Ile	9P	C	Tyr	101L	OH	3,95	
Gly	10P	N	Tyr	101L	OH	3,06	***
Gly	10P	CA	Tyr	101L	OH	3,48	
Gly	10P	C	Tyr	101L	OH	3,67	
Ser	11P	N	Tyr	101L	OH	3,09	***
Ser	11P	CB	Ser	96L	OG	3,89	
			Tyr	37L	CD1	3,94	
			Ser	96L	O	3,37	
Ser	11P	OG	Ser	96L	OG	2,88	***
			Ser	96L	CA	3,76	
65			Ser	96L	CB	3,05	

ES 2 757 930 T3

			Ser	96L	C	3,33	
			Ser	96L	O	2,45	***
			Tyr	101L	CE1	3,94	
5			Tyr	101L	CZ	3,59	
			Tyr	101L	OH	3,37	*
	Ser	11P	O	Tyr	37L	CE1	3,39
				Tyr	37L	CZ	3,66
				Tyr	37L	OH	3,55
10	Leu	12P	CG	Asn	33L	ND2	3,41
				Tyr	37L	OH	3,86
	Leu	12P	CD1	His	31L	CE1	3,73
				His	31L	NE2	3,38
15				His	31L	CD2	3,63
				Tyr	37L	CE2	3,65
				Asn	33L	ND2	3,68
				Tyr	37L	CZ	3,84
				Tyr	37L	OH	3,51
20	Leu	12P	CD2	His	31L	CE1	3,57
				His	31L	NE2	3,91
				Asn	33L	ND2	3,39
	Phe	17P	CB	Tyr	54L	CG	3,79
				Tyr	54L	CE1	3,70
25				Tyr	54L	CD1	3,45
	Phe	17P	CG	Tyr	54L	CG	3,98
				Tyr	54L	CD1	3,63
	Phe	17P	CD1	Tyr	54L	CB	3,74
30	Phe	17P	CE1	His	39L	ND1	3,88
				His	39L	CE1	3,32
				His	39L	NE2	3,60
	Phe	17P	CZ	His	39L	CE1	3,36
				His	39L	NE2	3,66
35				Tyr	37L	CD1	3,98
	Phe	17P	CE2	Tyr	37L	CD1	3,79
				Tyr	37L	CE1	3,84
	Phe	17P	O	Phe	60L	CD1	3,84
				Phe	60L	CE1	3,31
40	Asp	19P	N	Phe	60L	CE1	3,88
	Asp	19P	CA	Phe	60L	CZ	3,80
	Asp	19P	CB	Phe	60L	CZ	3,85

Tabla 15

45 Interacciones del hTLT-1.126-162 "P" (SEQ ID NO: 7) con la cadena pesada de Fab0100 (SEQ ID NO: 162). Se usó un valor límite de 4,0 Å. Los contactos se identificaron mediante el programa informático CONTACT del conjunto de programas CCP4. En la última columna "****" indica una posibilidad fuerte para un enlace de hidrógeno a este contacto (distancia < 3,3 Å) como se calculó mediante CONTACT, "*" indica una posibilidad débil (distancia > 3,3 Å). En blanco indica que el programa consideró que no existe posibilidad de un enlace de hidrógeno. Los enlaces de hidrógeno son específicos entre un donante y un aceptor, son típicamente fuertes, y se identifican fácilmente.

<i>hTLT-1.126-162</i>				<i>Anti-TLT-1</i>			Distancia [Å]	Posiblemente enlace de H
Tipo de Res.	Núm. de Cadena	de y Nombre del átomo	Tipo de Res.	Núm. de Cadena	de y Nombre del átomo			
Lys	8P	C	Asn	59H	OD1	3,95		
Lys	8P	O	Asn	59H	CG	3,69		
			Asn	59H	ND2	3,78	*	
60			Trp	33H	CH2	3,86		
			Asn	59H	OD1	2,85	***	
			Thr	57H	CG2	3,45		
	Ile	9P	CA	Trp	33H	CH2	3,91	
				Glu	50H	OE2	3,52	
65				Asn	59H	OD1	3,79	

ES 2 757 930 T3

	Ile	9P	CB	Glu	50H	OE2	3,81	
	Ile	9P	C	Trp	33H	CZ3	4,00	
5				Trp	33H	CH2	3,65	
				Glu	50H	OE2	3,62	
				Trp	33H	CZ2	3,87	
	Ile	9P	O	Trp	33H	CZ2	3,92	
	Gly	10P	N	Glu	50H	CD	3,40	
10				Glu	50H	OE1	3,38	*
				Trp	33H	CZ3	3,55	
				Trp	33H	CH2	3,68	
				Glu	50H	OE2	2,77	***
				Trp	33H	CE3	3,85	
15				Trp	33H	CZ2	3,99	
	Gly	10P	CA	Glu	50H	CD	3,79	
				Glu	50H	OE1	3,40	
				Trp	33H	CZ3	3,80	
				Glu	50H	OE2	3,61	
20				Trp	33H	CE2	3,75	
				Trp	33H	CD2	3,55	
				Trp	33H	CE3	3,58	
				Trp	33H	CZ2	3,99	
25	Gly	10P	C	Val	100H	CG2	3,82	
	Gly	10P	O	Val	100H	CG2	3,86	
	Ser	11P	N	Val	100H	CG2	3,78	
	Ser	11P	CA	Val	100H	CG2	3,78	
	Ala	13P	CB	Trp	33H	CD1	3,60	
30				Trp	33H	NE1	3,52	
	Asn	15P	CG	Tyr	32H	CD1	3,88	
				Tyr	32H	CE1	3,83	
	Asn	15P	ND2	Arg	31H	C	3,94	
				Arg	31H	O	3,09	***
35				Tyr	32H	CG	3,98	
				Tyr	32H	CD1	3,76	
				Tyr	32H	CE1	3,70	
				Tyr	32H	CZ	3,88	
				Arg	31H	NH1	3,93	*
40	Ala	16P	O	Val	100H	CB	3,86	
				Val	100H	CA	3,80	
				Val	100H	N	2,91	***
				Thr	102H	CG2	3,46	
45				Gly	99H	CA	3,74	
				Gly	99H	C	3,78	
	Phe	17P	CA	Thr	102H	CG2	3,64	
	Phe	17P	CD1	Val	100H	O	3,93	
	Phe	17P	CE1	Val	100H	CB	3,46	
50				Val	100H	CG1	3,52	
				Val	100H	O	3,86	
	Phe	17P	CZ	Val	100H	CB	3,81	
				Val	100H	CG1	3,89	
	Phe	17P	C	Thr	102H	CG2	3,59	
55	Phe	17P	O	Thr	102H	CG2	3,79	
	Ser	18P	C	Thr	102H	CG2	3,94	
	Ser	18P	O	Thr	102H	CB	3,48	
				Thr	102H	OG1	3,64	*
				Thr	102H	CG2	3,26	
60	Pro	20P	CA	Tyr	32H	OH	3,47	
				Tyr	32H	CZ	3,90	
	Pro	20P	CB	Val	2H	CG2	3,92	
				Phe	27H	CB	3,93	
				Phe	27H	CD1	3,86	

65

ES 2 757 930 T3

			Phe	27H	CG	3,78	
	Pro	20P	CG	Thr	102H	OG1	3,88
				Ser	98H	OG	3,54
5	Pro	20P	CD	Thr	102H	CB	3,95
				Thr	102H	OG1	3,83
	Pro	20P	C	Val	2H	CG2	3,98
	Pro	20P	O	Phe	27H	CB	3,52
10	Ala	21P	N	Val	2H	CG2	3,51
	Ala	21P	CA	Val	2H	CG2	3,97
	Ala	21P	CB	Val	2H	CG2	3,77

Ejemplo 25: Mapeo de epítomos mediante recorrido del péptido.

El ELISA de recorrido del péptido define la región de unión mínima del péptido. Esto se estableció mediante el recubrimiento de péptidos biotinilados con el desplazamiento en marco de un residuo en la región del tallo del TLT-1 en placas de estreptavidina seguido por la unión del anticuerpo de interés (mAb0061). Se añadió un anticuerpo secundario para la detección y se midió la unión a 450 nm. Control positivo: unión al TLT-1 biotinilado.

Materiales

	PBS 10X:	GPBS 10X Gibco 14200
25	Tween20:	Aldrich núm. de cat. 27,434-8, núm. lote S30950-315
	Placa:	Placa recubierta con estreptavidina de 96 pocillos Nunc núm. 466014
	BSA:	A7030-100 g núm. lote 057K0737
30	Tampón de bloqueo/dilución:	PBS 1X pH=7,4 BSA al 2 %
		Tween20 al 0,5 %
35	Tampón de lavado:	PBS 1x + Tween20 al 0,5 %
	Estándar:	TLT-1 biotinilado 1 mg/ml 04/09-08
	mAb:	0197-0000-0061-4A - 0,55 mg/ml
40	Detección del Ab:	Anti-IgG humana de cabra marcada con HRP 1 mg/ml Prod. núm. NEF802001EA
	Sustrato de TMB:	Listo para usar núm. de cat. 4390L núm. lote 70904
45	Solución de parada:	H ₃ PO ₄ 2 M

Dilución del TLT-1 biotinilado

1 mg/ml -> 6,3 ng/ml (Dilución 158500x)

Concentración en pocillo: 0,63 ng

Dilución de péptidos biotinilados

55 Conc approx 2-5 mg/ml (2,5 mg/ml)

2,5 mg/ml -> Dilución 10 000x (25 ng/pocillo): 100 µl de cada péptido en cada pocillo.

Dilución de mAb0061

60 0,55 mg/ml ->100 ng/ml (Dilución 5500x)

Concentración en pocillo: 10 ng

65 Dilución de mAb anti-IgG humana de cabra

1 mg/ml -> 0.2 µg/ml (Dilución 5000x)

Síntesis de péptidos biotinilados en formato de 96 pocillos

5 Los péptidos biotinilados se sintetizaron mediante el uso de síntesis estándar de péptidos en fase sólida. Las soluciones de aminoácidos protegidos con Fmoc 0,3 M en 1-hidroxibenzotriazol (HOBt) 0,3 M en N-metilpirrolidinona (NMP) se acoplaron mediante el uso de diisopropilcarbodiimida (DIC) durante 1-4 horas. Como soporte sólido se usó la resina Rink amida LL (Merck) en una placa de filtro de microtitulación de 96 pocillos (Nunc) y se usó aproximadamente 20 mg de resina por pocillo. La síntesis se realizó mediante el uso del sintetizador de péptidos
 10 Multipep RS de Intavis, Alemania, y se usó el protocolo de fabricación. La eliminación de Fmoc se realizó mediante el uso de piperidina al 25 % en NMP. Todos los péptidos se acoplaron con biotina en el extremo N-terminal y el ácido 8-amino-3,6-dioxaoctanoico se usó como un separador entre la biotina y los péptidos. Este separador también se acopló como un bloque de construcción protegido por Fmoc de acuerdo con el protocolo de síntesis (IRIS biotech, Alemania)

15 Desprotección y tratamiento final

La desprotección final se realizó mediante el uso de 90 % de ácido trifluoroacético (TFA), 5 % de triisopropilsilano y 5 % de H₂O durante 3 horas. Se usó un total de 1 ml de TFA por pocillo. El TFA se filtró a 96 pocillos profundos (Nunc) y el TFA se redujo en volumen mediante evaporación hasta aproximadamente 100- 200 ul por pocillo y se añadió dietiléter a todos los pocillos para precipitar los péptidos. La suspensión del péptido en dietiléter se transfirió a una
 20 placa de filtro de 96 pocillos Solvintert (0,47 µm, Millipore) y los péptidos se lavaron dos veces con dietiléter y se secaron. Los péptidos se redisolviéron en 80 % de DMSO y 20 % de agua para dar una solución madre de aproximadamente 1-3 mg/ml.

25 Péptidos biotinilados de 20 mer a partir de la región del tallo del TLT-1 (SEQ ID NO 6)

2-5 mg/ml en DMSO/H₂O al 75 % (biotinilado en N terminal):

El número del péptido se muestra a la izquierda:

30	2	A 2	2619.8	bio-Oeg-L-N-I-L-P-P-E-E-E-E-T-H-K-I-G-S-L-A-E
	3	A 3	2620.7	bio-Oeg-N-I-L-P-P-E-E-E-E-T-H-K-I-G-S-L-A-E-N
	4	A 4	2577.7	bio-Oeg-I-L-P-P-E-E-E-E-T-H-K-I-G-S-L-A-E-N-A
	5	A 5	2611.7	bio-Oeg-L-P-P-E-E-E-E-T-H-K-I-G-S-L-A-E-N-A-F
35	6	A 6	2585.6	bio-Oeg-P-P-E-E-E-E-T-H-K-I-G-S-L-A-E-N-A-F-S
	7	A 7	2603.6	bio-Oeg-P-E-E-E-E-T-H-K-I-G-S-L-A-E-N-A-F-S-D
	8	A 8	2603.6	bio-Oeg-E-E-E-E-T-H-K-I-G-S-L-A-E-N-A-F-S-D-P
	9	A 9	2545.6	bio-Oeg-E-E-E-E-T-H-K-I-G-S-L-A-E-N-A-F-S-D-P-A
	10	A10	2473.6	bio-Oeg-E-E-E-T-H-K-I-G-S-L-A-E-N-A-F-S-D-P-A-G
40	11	A11	2431.6	bio-Oeg-E-E-T-H-K-I-G-S-L-A-E-N-A-F-S-D-P-A-G-S
	12	A12	2373.6	bio-Oeg-E-T-H-K-I-G-S-L-A-E-N-A-F-S-D-P-A-G-S-A
	13	B 1	2358.6	bio-Oeg-T-H-K-I-G-S-L-A-E-N-A-F-S-D-P-A-G-S-A-N
	14	B 2	2354.6	bio-Oeg-H-K-I-G-S-L-A-E-N-A-F-S-D-P-A-G-S-A-N-P
	15	B 3	2330.7	bio-Oeg-K-I-G-S-L-A-E-N-A-F-S-D-P-A-G-S-A-N-P-L
45	16	B 4	2331.6	bio-Oeg-I-G-S-L-A-E-N-A-F-S-D-P-A-G-S-A-N-P-L-E
	17	B 5	2315.5	bio-Oeg-G-S-L-A-E-N-A-F-S-D-P-A-G-S-A-N-P-L-E-P
	18	B 6	2345.5	bio-Oeg-S-L-A-E-N-A-F-S-D-P-A-G-S-A-N-P-L-E-P-S
	19	B 7	2386.5	bio-Oeg-L-A-E-N-A-F-S-D-P-A-G-S-A-N-P-L-E-P-S-Q
	20	B 8	2388.4	bio-Oeg-A-E-N-A-F-S-D-P-A-G-S-A-N-P-L-E-P-S-Q-D
50	21	B 9	2446.4	bio-Oeg-E-N-A-F-S-D-P-A-G-S-A-N-P-L-E-P-S-Q-D-E
	22	B10	2445.5	bio-Oeg-N-A-F-S-D-P-A-G-S-A-N-P-L-E-P-S-Q-D-E-K
	23	B11	2418.5	bio-Oeg-A-F-S-D-P-A-G-S-A-N-P-L-E-P-S-Q-D-E-K-S
	24	B12	2460.6	bio-Oeg-F-S-D-P-A-G-S-A-N-P-L-E-P-S-Q-D-E-K-S-I
	25	C 1	2410.5	bio-Oeg-S-D-P-A-G-S-A-N-P-L-E-P-S-Q-D-E-K-S-I-P
55	26	C 2	2436.6	bio-Oeg-D-P-A-G-S-A-N-P-L-E-P-S-Q-D-E-K-S-I-P-L
	27	C 3	2434.7	bio-Oeg-P-A-G-S-A-N-P-L-E-P-S-Q-D-E-K-S-I-P-L-I

Péptidos biotinilados de 16 mer de la región del tallo del hTLT-1 (SEQ ID NO 6)

60 2-5 mg/ml en DMSO/H₂O al 75 %:

	29	C 5	2219.3	bio-Oeg-L-N-I-L-P-P-E-E-E-E-T-H-K-I-G
	30	C 6	2193.2	bio-Oeg-N-I-L-P-P-E-E-E-E-T-H-K-I-G-S
	31	C 7	2192.3	bio-Oeg-I-L-P-P-E-E-E-E-T-H-K-I-G-S-L
65	32	C 8	2150.2	bio-Oeg-L-P-P-E-E-E-E-T-H-K-I-G-S-L-A
	33	C 9	2166.1	bio-Oeg-P-P-E-E-E-E-T-H-K-I-G-S-L-A-E

ES 2 757 930 T3

	34	C10	2183.1	bio-Oeg-P-E-E-E-E-E-T-H-K-I-G-S-L-A-E-N
	35	C11	2157.1	bio-Oeg-E-E-E-E-E-T-H-K-I-G-S-L-A-E-N-A
	36	C12	2175.2	bio-Oeg-E-E-E-E-T-H-K-I-G-S-L-A-E-N-A-F
5	37	D 1	2133.2	bio-Oeg-E-E-E-T-H-K-I-G-S-L-A-E-N-A-F-S
	38	D 2	2119.2	bio-Oeg-E-E-T-H-K-I-G-S-L-A-E-N-A-F-S-D
	39	D 3	2087.2	bio-Oeg-E-T-H-K-I-G-S-L-A-E-N-A-F-S-D-P
	40	D 4	2029.2	bio-Oeg-T-H-K-I-G-S-L-A-E-N-A-F-S-D-P-A
	41	D 5	1985.2	bio-Oeg-H-K-I-G-S-L-A-E-N-A-F-S-D-P-A-G
10	42	D 6	1935.2	bio-Oeg-K-I-G-S-L-A-E-N-A-F-S-D-P-A-G-S
	43	D 7	1878.1	bio-Oeg-I-G-S-L-A-E-N-A-F-S-D-P-A-G-S-A
	44	D 8	1879	bio-Oeg-G-S-L-A-E-N-A-F-S-D-P-A-G-S-A-N
	45	D 9	1919	bio-Oeg-S-L-A-E-N-A-F-S-D-P-A-G-S-A-N-P
	46	D10	1945.1	bio-Oeg-L-A-E-N-A-F-S-D-P-A-G-S-A-N-P-L
15	47	D11	1961	bio-Oeg-A-E-N-A-F-S-D-P-A-G-S-A-N-P-L-E
	48	D12	1987	bio-Oeg-E-N-A-F-S-D-P-A-G-S-A-N-P-L-E-P
	49	E 1	1945	bio-Oeg-N-A-F-S-D-P-A-G-S-A-N-P-L-E-P-S
	50	E 2	1959	bio-Oeg-A-F-S-D-P-A-G-S-A-N-P-L-E-P-S-Q
	51	E 3	2003	bio-Oeg-F-S-D-P-A-G-S-A-N-P-L-E-P-S-Q-D
20	52	E 4	1984.9	bio-Oeg-S-D-P-A-G-S-A-N-P-L-E-P-S-Q-D-E
	53	E 5	2026	bio-Oeg-D-P-A-G-S-A-N-P-L-E-P-S-Q-D-E-K
	54	E 6	1998	bio-Oeg-P-A-G-S-A-N-P-L-E-P-S-Q-D-E-K-S
	55	E 7	2014.1	bio-Oeg-A-G-S-A-N-P-L-E-P-S-Q-D-E-K-S-I
	56	E 8	2040.1	bio-Oeg-G-S-A-N-P-L-E-P-S-Q-D-E-K-S-I-P
25	57	E 9	2096.2	bio-Oeg-S-A-N-P-L-E-P-S-Q-D-E-K-S-I-P-L
	58	E10	2122.3	bio-Oeg-A-N-P-L-E-P-S-Q-D-E-K-S-I-P-L-I

Método

30 El mapeo de epítomos implicó la unión del mAb0061 a dos series de péptidos biotinilados de la región del tallo del TLT-1. Los péptidos biotinilados se unieron a placas de estreptavidina.

Péptido del tallo:

35 LNILPPEEEEEETHKIGSLAENAFSDPAGSANPLEPSQDEKSIPL

1) mapeo de péptido de 20 mer con un desplazamiento en marco de un residuo (20,1) (ver materiales)

2) mapeo de péptido de 16 mer con un desplazamiento en marco de un residuo (16,1) (ver materiales)

- 40 1. La placa se lavó previamente 3 veces con 250 µl de tampón de lavado
2. Se añadieron 100 µl de solución de péptido biotinilado (de Masterplate diluido X 10 000, un péptido por pocillo)
3. Se incubó a temperatura ambiente durante 1 hora o a +5 °C durante toda la noche
- 45 4. Se lavó 3 veces con tampón de lavado
5. Se añadieron 100 µl de anticuerpo primario (ver dilución anteriormente)
- 50 6. Se incubó a temperatura ambiente durante 1 hora
7. Se lavó 3 veces con tampón de lavado
8. Se añadieron 100 µl de anticuerpo secundario (ver dilución anteriormente)
- 55 9. Se incubó a temperatura ambiente durante 1 hora
10. Se lavó 3 veces con tampón de lavado
- 60 11. Se añadieron 100 µl de tampón de sustrato/desarrollo (tiempo de reacción 3 min)
12. Se añadieron 100 µl de H₃PO₄ 2 M
- 65 13. El punto final se leyó a 450 nm

La unión al péptido biotinilado en un pocillo se registró como "unión" cuando la absorción a 450 nm estuvo por encima de 3. Se registró "sin unión" cuando la señal estuvo más abajo de 1. Una señal intermedia se registró como "unión débil".

5 Resultados

Los péptidos biotinilados se colocaron en pocillos de la manera siguiente:

Fila A: péptido 2-12 (20 mer)

10

Fila B: péptido 13-24 (20 mer)

Fila C: péptido 25-27 (20 mer)

15 Fila C: péptido 29-36 (16 mer)

Fila D: péptido 37-48 (16 mer)

Fila E: péptido 49-58 (16 mer)

20

Resultado de la determinación triple:

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
25	A	<0,1	<0,1	<0,1	>3	>3	>3	>3	>3	>3	>3	>3
	B	>3	>3	>3	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1
	C	<0,1	<0,1	<0,1		<0,1	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1	>3
	D	>3	>3	>3	>3	>3	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1
	E	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1		
	F											
30	G											
	H											

En resumen, los péptidos de 20 mer (5-16) dan lugar a señales positivas fuertes (<3) que corresponden a los aminoácidos: IGSLAENAF. Los péptidos de 16 mer 36-42 dan lugar a señales positivas fuertes (<3) que corresponden a KIGSLAENAF.

35

Conclusión

El ELISA de recorrido de péptidos ha definido el área de unión mínima del epítipo para unirse al mAb0061 como el tramo siguiente de residuos de aminoácidos: KIGSLAENAF.

40

Este tramo es parte de hecho del epítipo definido anteriormente por la estructura cristalina: KIGSLA-NAFSDPA.

Ejemplo 26: Ensayo de hidrólisis *in vitro* del polipéptido del Factor VIIa.

45

El Factor VIIa natural (de tipo silvestre) y la variante del Factor VIIa (ambos denominados, de aquí en adelante, como "Factor VIIa") se analizan en paralelo para comparar directamente sus actividades específicas. El ensayo se lleva a cabo en una placa de microtitulación (Maxisorp, Nunc, Dinamarca). El sustrato cromogénico D-Ile-Pro-Arg-*p*-nitroanilida (S-2288, Cromogenix, Suecia), concentración final 1 mM, se añade al Factor VIIa (concentración final 100 nM) en Hepes 50 mM, pH 7,4, que contiene NaCl 0,1 M, CaCl₂ 5 mM y albúmina de suero bovino 1 mg/ml. Se mide continuamente la absorbancia a 405 nm en un lector de placas SpectraMax™ 340 (Molecular Devices, EE.UU.). La absorbancia desarrollada durante una incubación de 20 minutos, después de la sustracción de la absorbancia en un pocillo blanco que no contiene enzima, se usa para calcular la relación entre las actividades de la variante y del Factor VIIa de tipo silvestre:

50

$$\text{Relación} = (A_{405 \text{ nm}} \text{ Variante del Factor VIIa}) / (A_{405 \text{ nm}} \text{ Factor VIIa de tipo silvestre}).$$

Ejemplo 27: Ensayo de proteólisis *in vitro* del polipéptido del Factor VIIa.

60

El Factor VIIa natural (de tipo silvestre) y la variante del Factor VIIa (ambos denominados, de aquí en adelante, como "Factor VIIa") se analizan en paralelo para comparar directamente sus actividades específicas. El ensayo se lleva a cabo en una placa de microtitulación (MaxiSorp, Nunc, Dinamarca). El Factor VIIa (10 nM) y el Factor X (0,8 microM) se incuban durante 15 min en 100 µl de Hepes 50 mM, pH 7,4, que contiene NaCl 0,1 M, CaCl₂ 5 mM y albúmina de suero bovino 1 mg/ml. La escisión del Factor X se detiene después mediante la adición de 50 µl de Hepes 50 mM, pH 7,4, que contiene NaCl 0,1 M, EDTA 20 mM y albúmina de suero bovino 1 mg/ml. La cantidad de Factor Xa generado se mide mediante la adición del sustrato cromogénico Z-D-Arg-Gly-Arg-*p*-nitroanilida (S-2765, Cromogenix, Suecia),

65

concentración final 0,5 mM. Se mide continuamente la absorbancia a 405 nm en un lector de placas SpectraMax™ 340 (Molecular Devices, EE.UU.). La absorbancia desarrollada durante 10 minutos, después de la sustracción de la absorbancia en un pocillo blanco que no contiene FVIIa, se usa para calcular la relación entre las actividades proteolíticas de la variante y del Factor VIIa de tipo silvestre:

5

Relación = $(A_{405\text{ nm}} \text{ Variante del Factor VIIa}) / (A_{405\text{ nm}} \text{ Factor VIIa de tipo silvestre})$.

Ejemplo 28: Ensayo de actividad del Factor VIIIa: ensayo cromogénico.

10 La actividad del FVIII (FVIII:C) del compuesto rFVIII se evalúa en un ensayo cromogénico del FVIII mediante el uso de reactivos de Coatest SP (Cromogenix) de la manera siguiente: las muestras de rFVIII y un estándar de FVIII (por ejemplo, rFVIII de tipo silvestre purificado calibrado frente al estándar internacional 7mo de FVIII de NIBSC) se diluyen en tampón de ensayo Coatest (Tris 50 mM, NaCl 150 mM, BSA al 1 %, pH 7,3, con conservante). Se añaden por duplicado cincuenta μl de las muestras, estándares y control negativo del tampón a placas de microtitulación de 96 pocillos (Nunc). El reactivo del Factor IXa/Factor X, el reactivo fosfolípido y CaCl_2 del kit Coatest SP se mezclan 5:1:3 (vol:vol:vol) y 75 μl de esto se añade a los pocillos. Después de 15 min de incubación a temperatura ambiente, se añaden 50 μl de la mezcla sustrato del Factor Xa S-2765/inhibidor de trombina I-2581 y los reactivos se incuban durante 10 minutos a temperatura ambiente antes de que se añadan 25 μl de ácido cítrico 1 M, pH 3. La absorbancia a 415 nm se mide en un lector de placas de microtitulación SpectraMax (Molecular Devices) con absorbancia a 620 nm usada como longitud de onda de referencia. El valor para el control negativo se sustrae de todas las muestras y se prepara una curva de calibración mediante regresión lineal de los valores de absorbancia graficados frente a la concentración de FVIII. La actividad específica se calcula al dividir la actividad de las muestras con la concentración de proteína determinada por HPLC. La concentración de la muestra se determina mediante la integración del área bajo el pico en el cromatograma correspondiente a la cadena ligera y mediante comparación con el área del mismo pico en un análisis paralelo de un rFVIII no modificado de tipo silvestre, donde la concentración se determina mediante análisis de aminoácidos.

15

20

25

Ejemplo 29: Ensayo de actividad del Factor VIIIa: ensayo de coágulos en una etapa.

30 La actividad del FVIII (FVIII:C) de los compuestos rFVIII se evalúa adicionalmente en un ensayo de coágulos de FVIII en una etapa de la manera siguiente: las muestras del rFVIII y un estándar del FVIII (por ejemplo, rFVIII de tipo silvestre purificado calibrado contra el 7mo estándar internacional del FVIII de NIBSC) se diluyen en tampón de HBS/BSA (hepes 20 mM, NaCl 150 mM, pH 7,4 con BSA al 1 %) a aproximadamente 10 U/ml, seguido de dilución de 10 veces en plasma deficiente de FVIII que contiene VWF (Dade Behring). Las muestras se diluyen posteriormente en tampón HBS/BSA. El tiempo del coágulo APTT se mide mediante el uso de un instrumento ACL300R o ACL5000 (Instrumentation Laboratory) mediante el uso del programa de factor único. El plasma deficiente de FVIII con VWF (Dade Behring) se usa como plasma de ensayo y SynthAsil, (HemosIL™, Instrumentation Laboratory) como reactivo aPTT. En el instrumento de coágulo, la muestra o estándar diluido se mezcla con plasma deficiente en FVIII y los reactivos aPTT a 37 °C. Se añade cloruro de calcio y se determina el tiempo hasta la formación de coágulos mediante la medición de la turbidez. El FVIII:C en la muestra se calcula basado en una curva estándar de los tiempos de formación de coágulos de las diluciones del estándar del FVIII.

35

40

Ejemplo 30: Ensayo de proteólisis in vitro del polipéptido del Factor Xa.

45 El Factor Xa natural (de tipo silvestre) preactivado y la variante del Factor Xa preactivado (ambos denominados, de aquí en adelante, como "Factor Xa") se analizan en paralelo para comparar directamente sus actividades específicas. El ensayo se lleva a cabo en una placa de microtitulación (MaxiSorp, Nunc, Dinamarca). El Factor Xa (10 nM) y la Protrombina (0,8 microM) se incuban durante 15 min en 100 μl de Hepes 50 mM, pH 7,4, que contiene NaCl 0,1 M, CaCl_2 5 mM y albúmina de suero bovino 1 mg/ml. La escisión de la protrombina se detiene después mediante la adición de 50 μl de Hepes 50 mM, pH 7,4, que contiene NaCl 0,1 M, EDTA 20 mM y albúmina de suero bovino 1 mg/ml. La cantidad de Trombina generada se mide mediante la adición del sustrato cromogénico H-D-fenilalanil-L-pipecolil-L-Arg-p-nitroanilida (S-2738, Cromogenix, Suecia), concentración final 0,5 mM. Se mide continuamente la absorbancia a 405 nm en un lector de placas SpectraMax™ 340 (Molecular Devices, EE.UU.). La absorbancia desarrollada durante 10 minutos, después de la sustracción de la absorbancia en un pocillo blanco que no contiene FXa, se usa para calcular la relación entre las actividades proteolíticas de la variante y del Factor FXa de tipo silvestre:

50

55

Relación = $(A_{405\text{ nm}} \text{ Variante de Factor Xa}) / (A_{405\text{ nm}} \text{ Factor Xa de tipo silvestre})$.

Ejemplo 31: Conjugación química de un anticuerpo anti-TLT-1 (fragmento) con un factor de coagulación.

60

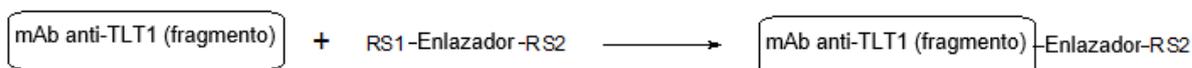
Un compuesto de la fórmula general

65

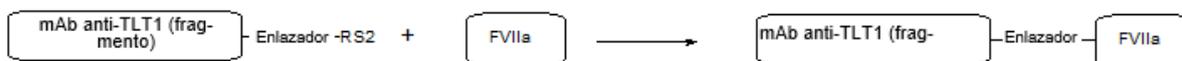


en donde "mAb anti-TLT-1 (fragmento)" puede ser un mAb de tamaño completo contra TLT-1 o un fragmento o un análogo derivado intelectualmente de este, tal como un fragmento FAB o un sc-FAB con ninguna, una o más mutaciones puntuales; el enlazador puede ser un polímero soluble en agua, tal como PEG, ácido polisiálico o almidón de hidroxietilo; y FVIIa es cualquier molécula con una similitud de secuencias >50 % con respecto al FVIIa natural con cualquier actividad retenida de FVIIa que puede, por ejemplo, prepararse en un procedimiento en dos etapas.

15 Durante la primera etapa, un enlazador, con dos grupos reactivos diferentes RS1 y RS2, puede unirse al mAb anti-TLT-1 (fragmento). La reacción puede ejecutarse con selectividad de sitio baja o de forma selectiva, de manera que RS1 solo reacciona en una o pocas posiciones del mAb anti-TLT-1 (fragmento). Como un ejemplo no exclusivo, RS1 podría ser un aldehído y reaccionar por aminación reductora solamente con el N-terminal del mAb anti-TLT-1 (fragmento) mediante aminación reductora, conocida por un experto en la técnica. En otro ejemplo no exclusivo, RS1 podría ser un grupo maleimida, que puede reaccionar con un tiol libre en el mAb anti-TLT-1 (fragmento).

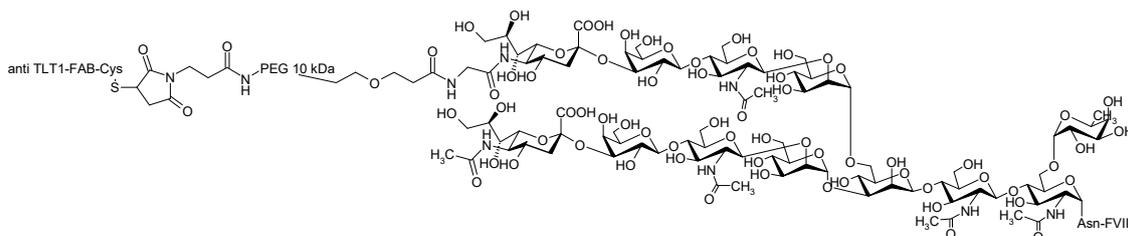


25 Durante la segunda etapa, el grupo reactivo RS2 puede hacerse reaccionar con baja selectividad de sitio o selectividad de sitio con una molécula FVIIa. Como un ejemplo no exclusivo, una reacción selectiva de sitio en FVIIa puede obtenerse cuando RS2 es un derivado de ácido siálico, que puede reaccionar en presencia de una enzima adecuada, tal como ST3Gal-III con glicanos unidos a N, que no terminan exclusivamente con ácidos siálicos.

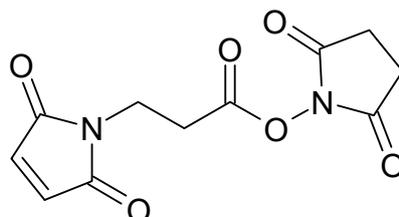


35 El orden de unión del enlazador a las dos proteínas, específicamente el mAb anti-TLT-1 (fragmento) y la molécula FVIIa puede cambiarse, lo que une de esta manera la molécula RS1-Enlazador-RS2 primero a la molécula FVIIa y después al mAb anti-TLT-1 (fragmento).

Ejemplo 32: Conjugación del fragmento anti TLT-1-FAB (Fab0084) al FVIIa para la producción de FVIIa-Fab1029.



50 Etapa 1: Éster 2,5-dioxopirrolidin-1-ilo del ácido 3-(2,5-Dioxo-2,5-dihidropirrol-1-il)propiónico.



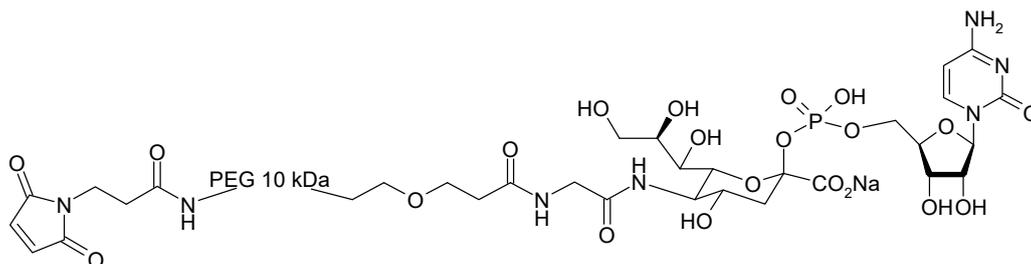
65 Se disolvió ácido 3-maleimidopropiónico (1,0 g, 5,9 mmol) en tetrahidrofurano (20 ml). Se añadió posteriormente 2-succinimido-1,1,3,3-tetrametiluronio tetrafluoroborato (TSTU, 2,14 g, 7,1 mmol) y etildisopropilamina (1,24 ml, 7,1 mmol). Se añadió *N,N*-Dimetilformamida (5 ml). La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente, mientras se volvía inerte. La mezcla se agitó durante 2 min. Se añadió *N,N*-Dimetilformamida (5 ml). La mezcla se agitó durante 2,5 h a temperatura ambiente. Se diluyó con diclorometano (150 ml) y se lavó posteriormente con una solución acuosa

al 10 % de hidrógenosulfato de sodio (150 ml), una solución acuosa saturada de hidrógenocarbonato de sodio (150 ml) y agua (150 ml). Se secó sobre sulfato de magnesio. El solvente se eliminó al vacío. El producto crudo se recristalizó a partir de acetato de etilo para dar 1,20 g de éster 2,5-dioxopirrolidin-1-ilo del ácido 3-(2,5-dioxo-2,5-dihidropirrol-1-il)propiónico.

MS: m/z = 289, requerido para [M+Na]⁺: 289

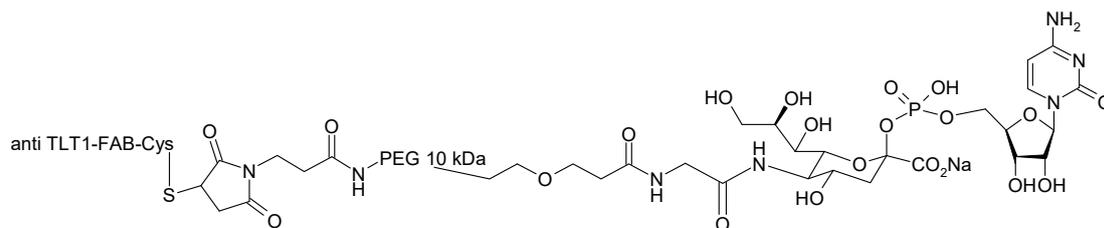
¹H-NMR (CDCl₃) δ 2,82 (m, 4 H); 3,02 (t, 2 H); 3,94 (t, 2 H), 6,73 (s, 2 H).

Etapa 2: Ácido N-((3-(ω-(3-(2,5-dioxo-2,5-dihidropirrol-1-il)propionilamino)PEGil 10 kDa)propionilamino)acetil)-O²-[5']citidilil-ξ-neuramínico (NNC 0129-0000-3259).



Se disolvió el ácido N-((3-(ω -Amino PEGil 10kDa)propionilamino)acetil)-O²-[5']citidilil- ξ -neuramínico (100 mg, 0,009 mmol) en una mezcla de tetrahidrofurano (2 ml) y diclorometano (10 ml). Se añadió una solución del éster 2,5-dioxopirrolidin-1-ilo del ácido 3-(2,5-dioxo-2,5-dihidropirrol-1-il)propiónico (50 mg, 0,18 mmol) en diclorometano (3 ml). Se añadió etildiisopropilamina (0,005 ml, 0,028 mmol). La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 16 h. Se añadieron diclorometano (2 ml) y etildiisopropilamina (0,5 ml). Se añadió resina de poliestireno amionometilado (disponible comercialmente en, por ejemplo, Novabiochem, carga 0,85 mmol/g, 438 mg, 0,372 mmol). La mezcla se agitó lentamente a temperatura ambiente durante 1 h. La resina se eliminó por filtración. El solvente se eliminó al vacío con una temperatura del baño de 25°C. El residuo se disolvió en diclorometano (4 ml). Se añadió éter (200 ml). La mezcla se dejó a temperatura ambiente durante 2 h para dejar que la precipitación formada envejeciera. La precipitación se aisló mediante filtración y se secó al vacío para obtener 38 mg del compuesto del título. El espectro ¹H-NMR en DMSO-d₆ mostró la presencia de un grupo maleimida.

Etapa 3: Unión del ácido N-((3-(ω-(3-(2,5-dioxo-2,5-dihidropirrol-1-il)propionilamino)PEGil 10 kDa)propionilamino)acetil)-O²-[5']citidilil-ξ-neuramínico a un FAB anti-TLT-1.



Un análisis de LC-MS de un fragmento FAB anti-TLT-1 con partes de la región de bisagra en donde se incorporó una Cys no pareada indicó que la Cys no pareada estaba tapada con una cisteína. Por lo tanto, antes de la reacción con el ácido N-((3-(ω -(3-(2,5-dioxo-2,5-dihidropirrol-1-il)propionilamino)PEGil 10 kDa)propionilamino)acetil)-O²-[5']citidilil-ξ -neuramínico tiene que realizarse el destapado de la Cys no pareada mediante reacción con clorhidrato de tris(2-carboxietil)fosfina.

Una solución de un fragmento de FAB anti-TLT-1 con partes de la región de bisagra en donde se incorporó una Cys no pareada (1 mg) en un tampón de HEPES 20 mM, EDTA 5,0 mM, NaCl 100 mM, que se había ajustado a pH 7,5, se colocó en un dispositivo de ultrafiltración amicon con un valor límite de 10 kDa. El tampón se cambió a un tampón compuesto de imidazol 20 mM, CaCl₂ 10 mM, Tween 80 al 0,02 %, glicerol 1 M, que se había ajustado a pH 7,35 mediante ultracentrifugación repetida a 4000 rpm. Después que se cambió el tampón, se obtuvo una solución de la proteína en el tampón compuesto de imidazol 20 mM, CaCl₂ 10 mM, Tween 80 al 0,02 %, glicerol 1 M, que se había ajustado a pH 7,35 (4 ml). Se añadió una solución de clorhidrato de tris(2-carboxietil)fosfina 1 mg/ml (0,40 ml). La mezcla de reacción se agitó a 300 rpm a 20°C durante 1 h. La mezcla de reacción se colocó en un dispositivo de ultracentrifugación con un valor límite de 10 kDa y se concentró por ultracentrifugación a 4000 rpm durante 7 min, lo que deja una solución de 0,700 ml detrás. Esto se aplicó a una columna PD-10 (Amersham Bioscience), que se había equilibrado con un tampón de HEPES 25 mM, que se había ajustado a pH 7,00. La proteína se eluyó de la columna mediante el uso de un tampón de HEPES 25 mM, que se había ajustado a pH 7,00 (3,2 ml). Esta solución se concentró

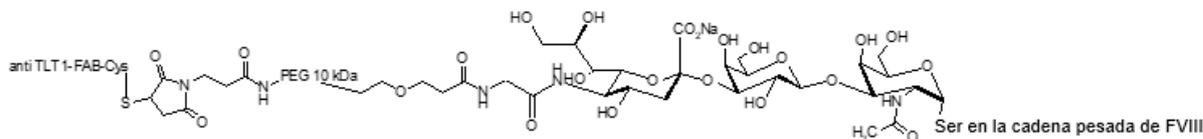
mediante ultracentrifugación a 4000 rpm en un dispositivo de ultracentrifugación Amicon con un valor límite de 10 kDa durante 7 min para rendir una solución de 0,750 ml. La solución se colocó en un vial y se añadió tampón de HEPES 25 mM, que se había ajustado a pH 7,00 (0,360 ml). Se añadió una solución de 1 mg/ml del ácido *N*-((3-(ω -(3-(2,5-dioxo-2,5-dihidropirrol-1-il)propionilamino)PEGil 10 kDa)propionilamino)acetil)-*O*²-[5']citidilil- ξ -neuramínico (0,89 ml). La mezcla de reacción se agitó suavemente a 300 rpm a 20 °C durante 3,5 h. Se colocó en un dispositivo de ultracentrifugación Amicon con un valor límite de 10 kDa y se concentró por ultracentrifugación a 4000 rpm durante 10 min a un volumen de 0,120 ml. La solución se sometió a una cromatografía de exclusión por tamaño en una columna Superose 75 10/300 GL (GE Healthcare) a un flujo de 0,50 ml/min, mediante el uso de un tampón compuesto de TRIS 25 mM, NaCl 150 mM, que se había ajustado a pH 8,00 como eluyente. Las fracciones se agruparon sobre la base del trazo UV a 280 nm del cromatograma. El agrupamiento (0,148 mg, 1,4 ml), que contiene el compuesto deseado según lo juzgado por SDS-PAGE y que carecía del reactivo de PEG libre según lo juzgado por SDS-PAGE mediante el uso de un método de tinción específico de PEG (descrito en Kurfürst, M. M. *Analyt. Biochem.* 1992, 200, 244-248) se usó en la etapa siguiente.

Etapa 4: Sialidasa inmovilizada. (*C. Perfringens* tipo VI-A inmovilizado en agarosa, Sigma: N-5254, gel 0,6-1,8 U/ml, 0,180 ml) se lavó con agua (2 x 0,50 ml) y posteriormente con un tampón de MES 25 mM, CaCl₂ 20 mM, NaCl 100 mM, que se había ajustado a pH 6,1 (3 x 0,50 ml). Se añadió a la sialidasa inmovilizada una solución del FVIIa (0,50 mg) en un tampón compuesto de Gly-Gly 25 mM, CaCl₂, 10 mM que se ajustó a pH 6,0. La mezcla de reacción se dejó a temperatura ambiente, a la vez que se mezcló cuidadosamente cada 20 min. Después de 3 h, la resina inmovilizada se eliminó por filtración a través de una columna de centrífuga Pierce mediante centrifugación a 2000 rpm durante 2 min.

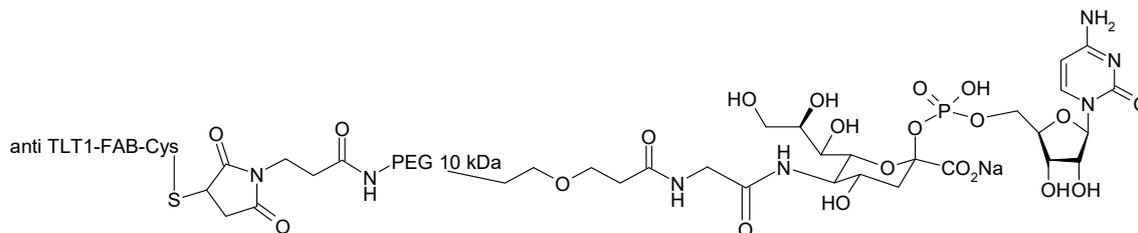
La mezcla de productos de la unión del ácido *N*-((3-(ω -(3-(2,5-dioxo-2,5-dihidropirrol-1-il)propionilamino)PEGil 10 kDa)propionilamino)acetil)-*O*²-[5']citidilil- ξ -neuramínico con un FAB anti-TLT-1 como se describió en una etapa anterior se colocó en un dispositivo de ultracentrifugación Amicon con un valor límite de 10 kDa. El tampón se cambió mediante ultracentrifugación repetida a un tampón compuesto de MES 25 mM, CaCl₂ 20 mM, NaCl 100 mM, que se había ajustado a pH 6,1.

A esta solución, se añadió una parte de la solución del derivado de FVIIa (0,092 ml). El tampón se cambió en un tampón compuesto de MES 25 mM, CaCl₂ 20 mM, NaCl 100 mM, que se había ajustado a pH 6,1 y un volumen total de (0,20 ml). Se añadió una solución de ST3-Gal-III (0,015 ml). La mezcla de reacción se agita suavemente a 32 °C durante 25 min y después de eso se deja a 32 °C durante 16 h. Se añadió una solución de 10 mg/ml de ácido CMP-*N*-acetilneuramínico (CMP NeuNAc, 0,70 mg, 0,070 ml) en un tampón de MES 25 mM, CaCl₂ 20 mM, NaCl 100 mM, que se había ajustado a pH 6,1. La mezcla de reacción se agitó suavemente a 32 °C durante 15 min y después de eso se dejó a 32 °C durante 1 h. La mezcla de reacción se sometió a una cromatografía de exclusión por tamaño en una columna Superdex 200 10/300 GL (GE Healthcare) con un flujo de 0,5 ml/min mediante el uso de un tampón de Histidina 10 mM, CaCl₂ 20 mM, NaCl 150 mM que se había ajustado a pH 6,1 como eluyente. Se agruparon las fracciones que contenían el producto deseado según lo juzgado por SDS-PAGE en un gel de TRIS-Acetato. Mediante el uso de una absorción molar de 11,22 a 280 nm en un aparato Nandrop®, se encontró un rendimiento de 0,022 mg. El resultado de un análisis de SDS-PAGE estuvo de acuerdo con la expectativa del producto deseado. El producto se denominó FVIIa-Fab1029.

Ejemplo 33: Conjugación de un fragmento anti-TLT-1-FAB (Fab0084) al FVIII, FVIII-Fab3002.



Etapa 1: Unión del ácido *N*-((3-(ω -(3-(2,5-dioxo-2,5-dihidropirrol-1-il)propionilamino)PEGil 10 kDa)propionilamino)acetil)-*O*²-[5']citidilil- ξ -neuramínico a un fragmento FAB anti-TLT-1



Un análisis de LC-MS de un fragmento FAB anti-TLT-1 con partes de la región de bisagra en donde se incorporó una Cys no pareada indicó que la Cys no pareada puede estar tapada con una cisteína. Por lo tanto, antes de la reacción con el ácido *N*-((3-(ω -(3-(2,5-dioxo-2,5-dihidropirrol-1-il)propionilamino)PEGil 10 kDa)propionilamino)acetil)-*O*²-

[5']citidilil- ξ -neuramínico, debe realizarse el destapado de la Cys no pareada mediante reacción con clorhidrato de tris(2-carboxietil)fosfina (TCEP).

5 Dicho fragmento TLT-1-FAB (1,35 mg, 27,4 nmol) en una solución de 0,27 mg/ml en un tampón compuesto de HEPES 20 mM, EDTA 5 mM, NaCl 100 mM que se había ajustado a pH 7,5 se colocó en un dispositivo de ultracentrifugación Amicon con un valor límite de 10 kDa. Se sometió a ultracentrifugación a 4000 rpm a 20 °C durante 10 min. Se añadió un tampón compuesto de imidazol 20 mM, CaCl₂ 10 mM, Tween 80 al 0,02 %, glicerol 1 M que se había ajustado a pH 7,35 (4 ml). La mezcla se sometió a ultracentrifugación a 4000 rpm a 20 °C durante 8 min. Se añadió un tampón compuesto de imidazol 20 mM, CaCl₂ 10 mM, Tween 80 al 0,02 %, glicerol 1 M que se había ajustado a pH 7,35 (4 ml). La mezcla se sometió a ultracentrifugación a 4000 rpm a 20 °C durante 8 min. Se añadió un tampón compuesto de imidazol 20 mM, CaCl₂ 10 mM, Tween 80 al 0,02 %, glicerol 1 M que se había ajustado a pH 7,35 (3 ml). La mezcla se sometió a ultracentrifugación a 4000 rpm a 20 °C durante 10 min. La mezcla se colocó en un frasco de reacción. Se añadió un tampón compuesto de imidazol 20 mM, CaCl₂ 10 mM, Tween 80 al 0,02 %, glicerol 1 M que se había ajustado a pH 7,35 (4 ml), de manera que el volumen total de la mezcla de reacción en este momento fue de 4,7 ml. Se añadió una solución de TCEP 1 M (0,54 ml) en un tampón de imidazol, CaCl₂ 10 mM, Tween 80 al 0,02 %, glicerol 1 M que se había ajustado a pH 7,35. La mezcla de reacción se agitó a 300 rpm durante 1 h. La mezcla se dividió en dos partes, cada una de las cuales se aplicó a una columna PD-10 (GE Healthtech) que se había equilibrado con un tampón de HEPES 25 mM con un pH de 7,0. Los eluatos se combinaron (7 ml en total) y se concentraron a 1 ml mediante ultracentrifugación a 4000 rpm a 20 °C durante 6-8 min en un dispositivo de ultracentrifugación Amicon con un valor límite de 10 kDa.

La solución se colocó en un frasco de reacción. Se añadió un tampón de HEPES 25 mM que se había ajustado a pH 7,0 (0,50 ml) para obtener un volumen total de 1,5 ml. Se añadió una solución de 1 mg/ml preparada recientemente de ácido N-((3-(ω -(3-(2,5-dioxo-2,5-dihidropirrol-1-il)propionilamino)PEGil 10 kDa)propionilamino)acetil)-O²-[5']citidilil- ξ -neuramínico (1,2 ml, 1,2 mg, 109 nmol) en un tampón de HEPES 25 mM que se había ajustado a pH 7,0. La mezcla de reacción se agitó suavemente a 300 rpm a 20 °C durante 3,2 h. Se concentró hasta un volumen de 0,30 ml por ultracentrifugación a 4000 rpm a 19 °C durante 11 min en un dispositivo de ultracentrifugación Amicon con un valor límite de 10 kDa. Se aplicó a una cromatografía de exclusión por tamaño en una columna Superdex 75 10/300 GL (GE Healthtech) a un flujo de 0,50 ml/min mediante el uso de un tampón de TRIS 25 mM, NaCl 150 mM que se había ajustado a pH 8,0 como eluyente. La fracción que contiene el producto deseado en una pureza aceptable según lo juzgado por análisis de SDS-PAGE en presencia de N-metilmaleimida (NEM) y que carecía del ácido N-((3-(ω -(3-(2,5-dioxo-2,5-dihidropirrol-1-il)propionilamino)PEGil 10 kDa)propionilamino)acetil)-O²-[5']citidilil- ξ -neuramínico sin reaccionar según lo juzgado por SDS-PAGE en combinación con una tinción sensible a PEG ((descrita en Kurfürst, M. M. *Analyt. Biochem.* 1992, 200, 244-248)) se usó en la etapa siguiente. El análisis de SDS-PAGE bajo condiciones de reducción estuvo en concordancia con el resultado esperado para el producto deseado. El análisis de SDS-PAGE bajo condiciones no reductoras mostró algún material, en el que una cadena del fragmento anti-TLT-1-FAB se había perdido. Sin embargo, se mantiene sin resolver, si este hallazgo se debía a problemas en el análisis o si una cadena se había perdido realmente durante la reacción descrita o incluso antes. Mediante el uso de una absorbancia molar de 10,44 a 280 nm en un aparato Nanodrop®, se encontró una concentración de 0,1 mg/ml lo que da un rendimiento de 0,287 mg.

Etapa 2: La solución del producto de la unión del ácido N-((3-(ω -(3-(2,5-dioxo-2,5-dihidropirrol-1-il)propionilamino)PEGil 10 kDa)propionilamino)acetil)-O²-[5']citidilil- ξ -neuramínico a un fragmento FAB anti-TLT-1 como se describió en el ejemplo anterior y una solución del FVIII con dominio B eliminado que tenía una secuencia de dominio B residual de SFSQNSRHPSQNPPVLRHQQR en el C terminal de la cadena pesada (0,780 mg, 5,64 mmol) en un tampón compuesto de imidazol 20 mM, CaCl₂ 10 mM, NaCl 150 mM, Tween80 al 0,02 % y glicerol 1 M que se había ajustado a pH 7,35 (0,018 ml) se mezclaron y se colocaron en un dispositivo de ultracentrifugación Amicon con un valor límite de 10 kDa. La solución se sometió a un cambio de tampón a histidina 20 mM, CaCl₂ 10 mM, glicerol al 20 %, Tween 80 al 0,02 %, NaCl 500 mM que se había ajustado a pH 6,05 mediante la repetición de la ultracentrifugación y la adición del tampón. Se obtuvo un volumen total de 0,40 ml. Posteriormente se añadieron una solución de 0,4 mg/ml (242 U/mg, 98 U/ml, 0,0055 ml) de sialidasa a partir de A. Urifaciens y una solución de ST3Gal-III (0,033 ml) a 2,5 mg/ml. La mezcla de reacción se agitó suavemente durante 15 min a 300 rpm a 32 °C, se dejó durante 2 h a 32 °C durante las cuales se agitó cuidadosamente de manera ocasional, y finalmente se dejó a 32 °C durante 18 h. La mezcla de reacción se diluyó con agua (0,030 ml). Esta se sometió a cromatografía de exclusión por tamaño mediante el uso de una columna Superose 6 10/300 GL (GE Healthcare) y mediante el uso de un tampón de Histidina 10 mM, CaCl₂ 1,7 mM, Tween80 al 0,01 %, NaCl 0,3 M, sacarosa 8,8 mM que se había ajustado a pH 7 a un flujo de 0,50 ml/min. Las fracciones que contienen el producto deseado según lo juzgado por análisis de SDS-PAGE se agruparon. La mezcla se sometió a un cambio de tampón mediante el uso de un dispositivo de ultracentrifugación Amicon con un valor límite de 10 kDa a un tampón compuesto de histidina 20 mM, CaCl₂ 10 mM, glicerol 1 M, Tween 80 al 0,02 %, NaCl 500 mM que se había ajustado a pH 6,07. Se obtuvo un volumen total de 0,250 ml. Mediante el uso de una absorción molar de 14,6 a 280 nm en un aparato Nanodrop, se encontró una concentración de 0,59 mg/ml, lo que corresponde a un rendimiento de 0,148 mg. Se añadió una solución de 10 mg/ml del ácido CMP-N-acetilneuramínico (CMP NeuNAc, 0,26 mg, 0,026 ml) en un tampón de histidina 20 mM, CaCl₂ 10 mM, glicerol al 20 %, Tween 80 al 0,02 %, NaCl 500 mM que se había ajustado a pH 6,05 y una solución de ST3Gal-III (0,015 ml). La mezcla de reacción se agitó suavemente a 300 rpm a 32 °C durante 15 min y después se dejó a 32 °C durante otros 45 min. La mezcla de reacción se diluyó con agua (0,10 ml). Esta se sometió a cromatografía de exclusión por tamaño

mediante el uso de columna Superose 6 10/300 GL (GE Healthcare) y mediante el uso de un tampón de Histidina 10 mM, CaCl₂ 1,7 mM, Tween80 al 0,01 %, NaCl 0,3 M, sacarosa 8,8 mM que se había ajustado a pH 7 a un flujo de 0,50 ml/min. Las fracciones que contenían el producto deseado según lo juzgado por análisis de SDS-PAGE se mezclaron y concentraron mediante ultracentrifugación en un dispositivo de ultracentrifugación Amicon para dar un volumen total de aproximadamente 0,275 ml. Mediante el uso de una absorción molar a 280 nm de 14,6 en un aparato Nanodrop®, se encontró una concentración de 0,180 ml/ml, lo que corresponde a un rendimiento de 0,0495 mg. El análisis de SDS-PAGE del producto bajo condiciones reducidas está de acuerdo con la expectativa para el producto deseado. El análisis de SDS-PAGE bajo condiciones no reducidas muestra cantidades cambiantes de una banda que corresponde a un producto donde el fragmento FAB ha perdido una cadena. La apariencia de una banda que corresponde a puede deberse a la presencia de dicho compuesto en el producto o puede deberse a la descomposición durante la desnaturalización anterior al análisis de SDS-PAGE.

Ejemplo 34: Unión al TLT-1.

Tabla 16: Reactivos

Reactivo	Fuente
TLT-1	Ejemplo 2
FVIIa-Fab1029	Ejemplo 32
FIX-Fab0135	Ejemplo 16
Todos los demás reactivos	Biacore

Método:

El TLT-1 se inmovilizó directamente a un chip CM5 a un nivel de aprox. 2000 RU (50 ug/ml diluido en Na-acetato, pH 4,0) mediante el uso del procedimiento estándar recomendado por el proveedor y los reactivos proporcionados en la Tabla 16. Se analizaron diluciones de dos veces de FVIIa-Fab1029 y FIX-Fab0135 desde 20 nM hasta 0,3 nM para la unión al TLT-1. Tampón de corrida y de dilución: HEPES 10 mM, 150 mM, p20 al 0,005 %, pH 7,4. La regeneración se obtuvo mediante glicina 10 mM, pH 1,7. La determinación de constantes cinéticas y de unión (k_{on} , k_{off} , K_D) se obtuvo al asumir una interacción 1:1 del TLT-1 y FVIIa-Fab1029 o FIX-Fab0135 mediante el uso del programa informático de evaluación Biacore T100.

Resultado:

Tabla 17

Unión al TLT-1	k_a (1/M)	k_d (1/s)	K_D (M) TLT-1
FVIIa-Fab1029	3,97E+05	0,007259	1,83E-08
FIX-Fab0135	4,28E+05	8,71E-04	2,04E-09

Conclusión:

Se estimaron las constantes de unión para la unión de FVIIa-Fab1029 y FIX-Fab0135 al TLT-1 mediante análisis de biacore y se confirmó la unión al TLT-1 (Tabla 17).

Ejemplo 35: El FVIIa-Fab1029 promueve la formación de coágulos de fibrina en sangre total similar a hemofilia.

Los trazos de TEG obtenidos con HWB normal (NWB), sangre de "hemofilia", y sangre de "hemofilia" suplementada con (0; 0,25; 0,5; 1,0 nM) de FVIIa-Fab1029 o rFVIIa se muestran en la Figura 11A. En la Figura 11B se muestran los valores de tiempo R obtenidos para los trazos de TEG representados. La Figura 11B, además de los valores de tiempo R para la proteína FVIIa-Fab1029 o rFVIIa, incluye, además, los valores de tiempo R para las concentraciones equivalentes de rFVIIa. Todos los datos se obtienen a partir de un donante representativo. Se observó que el FVIIa-Fab1029 normaliza eficientemente la coagulación de HWB similar a hemofilia. Además, los resultados muestran que el efecto procoagulante conocido del rFVIIa se potenció adicionalmente por conjugación del rFVIIa a un fragmento FAB de un anticuerpo contra TLT-1. Por lo tanto, el ejemplo con la proteína FVIIa-Fab1029 demuestra que el direccionamiento del rFVIIa al TLT-1 en plaquetas potencia adicionalmente la actividad de puenteo de FVIII del rFVIIa.

Ejemplo 36: El FIX-Fab0135 tiene actividad de puenteo de FVIII y promueve la formación de coágulos de fibrina en la sangre total similar a hemofilia A.

La sangre total humana estabilizada con citrato (HWB) se extrae a partir de donantes normales. La formación de coágulos se mide mediante tromboelastografía (analyzer TEG serie 5000, Haemoscope Corporation, Niles, IL, EE.UU.). Las condiciones similares a hemofilia A se obtienen mediante incubación de sangre total humana normal estabilizada con citrato (HWB) con anticuerpo anti-FVIII 10 µg/ml (anti-Factor VIII humano de oveja; Hematologic

Technologies Inc) durante 30 min a temperatura ambiente. Se añaden diversas concentraciones (0,1; 0,2; 1,0; 5,0; 10 nM) de FIX-Fab0135 a HWB con citrato similar a hemofilia A. La coagulación se inicia cuando 340 µl de HWB normal o premezclada se transfieren a un recipiente del tromboelastógrafo que contiene 20 µl de CaCl₂ 0,2 M con TF lipidado 0,03 pM (Innovin[®], Dade Behring GmbH (Marburg, Alemania). El trazo de TEG se sigue continuamente por hasta 120 min. Los trazos de TEG obtenidos con sangre normal HWB (HWB), sangre "hemofílica" y sangre "hemofílica" suplementada con (0,1; 0,2; 1,0; 5,0; 10 nM) de FIX-Fab0135 se muestran en la Figura 12. Además, se muestran para la comparación los trazos de TEG obtenidos cuando FIX-Fab0135 se reemplaza por rFVIIa 1 nM o rFIX 10 nM. Todos los datos se obtienen a partir de un donante representativo.

Sorprendentemente, los resultados muestran que la fusión de FIX a un fragmento FAb de un anticuerpo contra TLT-1 produce una proteína con actividad de puenteo del FVIII. Se observó que el FIX-Fab0135 normaliza eficientemente el coágulo de HWB similar a hemofilia A. La propagación dependiente de FIX de la coagulación requiere el ensamblaje de un complejo FIXa/FVIIIa en la superficie de plaquetas activadas, y la actividad de activación del FX (tenasa) resultante se impide por anticuerpos inhibidores del FVIII. El presente ejemplo con FIX-Fab0135 demuestra que el direccionamiento de FIX hacia TLT-1 en la superficie de plaquetas genera un complejo que contiene FIX con actividad procoagulante aún cuando el FVIII se bloquea por un anticuerpo inhibidor.

Ejemplo 37: La proteína de fusión FIX-Fab0135 dirigida a las vesículas fosfolipídicas enriquecidas con TLT-1 promueve notablemente la activación del FX inducida por el FVIIa en ausencia del FVIII.

Métodos: Las vesículas fosfolipídicas enriquecidas con TLT-1, preparadas como se describió en el Ejemplo 20, se aplican en el experimento mostrado en la Figura 13 para imitar al TLT-1 en la superficie de plaquetas activadas. Diversas concentraciones (0,05 – 100 nM) del rFVIIa se incubaron a temperatura ambiente durante 15 min i) en tampón Hepes (Hepes 50 mM, NaCl 0,1 M, CaCl₂ 5 mM, BSA 1 mg/ml pH 7,4) o en tampón Hepes con ii) FIX 10 nM, iii) FIXa 10 nM o iv) FIX-Fab0135 10 nM. Esto se mezcla después con FX 100 nM (Enzyme Research Laboratories, Reino Unido) y vesículas fosfolipídicas enriquecidas con TLT-1 a una dilución de 1:4000 en ausencia o en presencia de FVIII 5 nM y se incuban durante 3 min. La reacción se detiene por adición de un tampón de parada de volumen igual (Hepes 50 mM, NaCl 0,1 M, EDTA 20 mM, BSA 1 mg/ml pH 7,5). La cantidad de FXa generada en las muestras se determina a continuación en un ensayo cromogénico mediante la transferencia de 50 µl de la mezcla a un pocillo de placa de microtitulación y mediante la adición de 25 µl de Cromozima X (0,42 mg/ml final) al pocillo. Se mide continuamente la absorbancia a 405 nm en un fotómetro SpectraMax de microplaca (Molecular Devices, Sunnyvale CA, EE.UU.).

El FVIIa es capaz de activar el FIX (Østerud y Rappaport, 1977) y el FIXa resultante se designa entonces para combinarse con FVIIIa y formar el componente proteolítico del denominado complejo de tenasa. La formación de este complejo tiene lugar en la superficie de plaquetas activadas. El complejo de tenasa es responsable de una activación masiva de FX que desempeña un papel clave en la fase de propagación del proceso de coagulación. La incapacidad para formar un complejo de tenasa activo es la diátesis central en pacientes con hemofilia A y B.

En el presente ejemplo, se aplican vesículas fosfolipídicas enriquecidas con TLT-1 para imitar la superficie de plaquetas activadas. Este sistema se usa para analizar si el direccionamiento del FIX al TLT-1 en dichas vesículas por medio del FIX-Fab0135 puede promover la activación de FX en analogía con el complejo de tenasa en plaquetas activadas. Además, es de interés examinar si la presencia del FVIII es obligatoria o no para esta actividad.

La Figura 13 muestra: 1) que se genera muy poco FXa en todas las concentraciones del FVIIa analizadas en ausencia y en presencia del FVIII 5 nM en las condiciones del experimento sin añadir derivados del FIX (○); 2) que este es el caso también cuando el FIX 10 nM se presenta en la mezcla de reacción (□); 3) que se observa una marcada activación del FX cuando se reemplaza el FIX 10 nM por FIXa 10 nM, aunque, solo en presencia del FVIII (■); 4) que el direccionamiento del FIX hacia vesículas fosfolipídicas enriquecidas con TLT-1 por medio del FIX-Fab0135 proporciona un complejo que se activa mediante el FVIIa en una forma dependiente de la concentración; 5) que el complejo similar a tenasa activado resultante promueve de manera significativa la activación del FX tanto en presencia como en ausencia del FVIII.

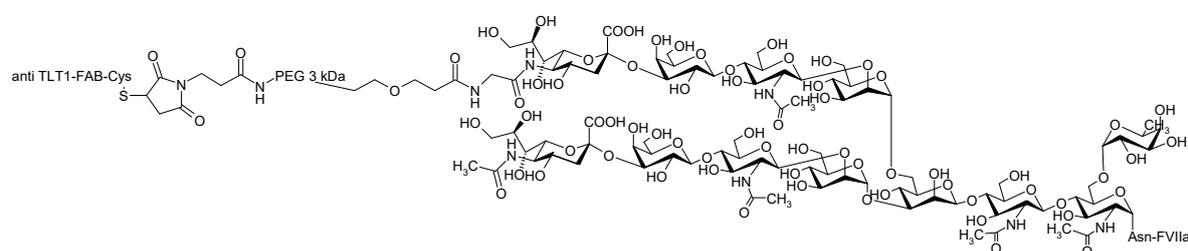
Estos resultados, así como también los del ejemplo 36, sugieren que la proteína de fusión FIX-Fab0135 FIX proporciona un agente de puenteo del FVIII que promueve notablemente la activación del FXa mediada por FVIIa mediante un mecanismo que implica la activación del FVIIa del FIX dirigida al TLT-1 y la formación de un complejo con una actividad similar a tenasa considerable independiente del FVIII.

Ejemplo 38: Expresión del TLT-1 en plaquetas humanas.

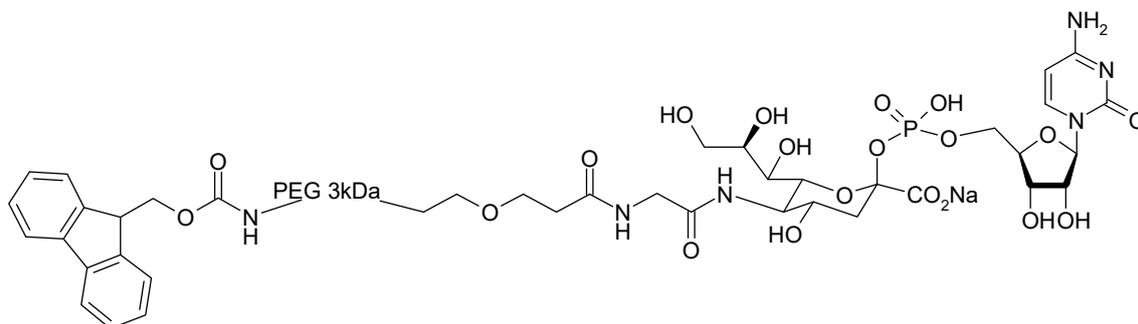
Se ha informado que el TLT-1 solo se expresa en plaquetas activadas (Washington y otros (2004) Blood. 2004 Agosto 15;104(4):1042-7). Para verificar esto y estimar la cantidad de copias específicas del TLT-1 en la superficie de plaquetas se usó el "Platelet calibrator kit" de Biocytex (Marsella, Francia) en el que las plaquetas se tiñen mediante inmunofluorescencia indirecta sin lavado con anticuerpos monoclonales específicos y se analizan mediante citometría de flujo cuantitativa. El nivel de expresión del antígeno analizado se determina mediante el uso de perlas de calibración con un número definido de sitios de unión para el anticuerpo de detección. De acuerdo con las instrucciones del fabricante, las plaquetas en sangre total humana con citrato se activaron por diferentes concentraciones (0,3-30 µM)

de péptido activador del receptor activado por proteasa (PAR)-1 con secuencia de aminoácidos SFLLRN. Las muestras se diluyeron 1:4 en un tampón de solución salina proporcionado en el kit antes de etiquetarse con anticuerpos de unión al TLT-1. Los anticuerpos de unión al TLT-1 usados fueron mAb0123 (subtipo IgG1 del anticuerpo mAb0023) o mAb0136 (subtipo IgG1 del anticuerpo mAb0012). Después de 15 min de incubación con cualquiera de los anticuerpos TLT-1 (10 µg/ml) seguido de 15 min de incubación con anticuerpo de detección marcado con FITC (proporcionado por el fabricante) las muestras se diluyeron 1:50 inmediatamente antes del análisis de citometría de flujo. El número absoluto del TLT-1 en la superficie de plaquetas se obtuvo mediante el uso de la curva estándar derivada de perlas. Las plaquetas no activadas no muestran expresión del TLT-1 con ninguno de los dos anticuerpos usados. Sin embargo, cuando las plaquetas se activaron con SFLLRN se observó una mayor expresión del TLT-1 con una expresión máxima de 9685 ± 1696 y $12\,981 \pm 2083$ moléculas de superficie detectadas por mAb0123 y mAb0136, respectivamente (Figura 14). La expresión máxima del TLT-1 en plaquetas se logró mediante la estimulación doble por SFLLRN (30 µm) y Convulxina (100 ng/ml).

Ejemplo 39: Conjugación del fragmento anti TLT-1-FAB (Fab0084) al FVIIa a través de un enlazador de PEG de 3 kDa, FVIIa-Fab1001.

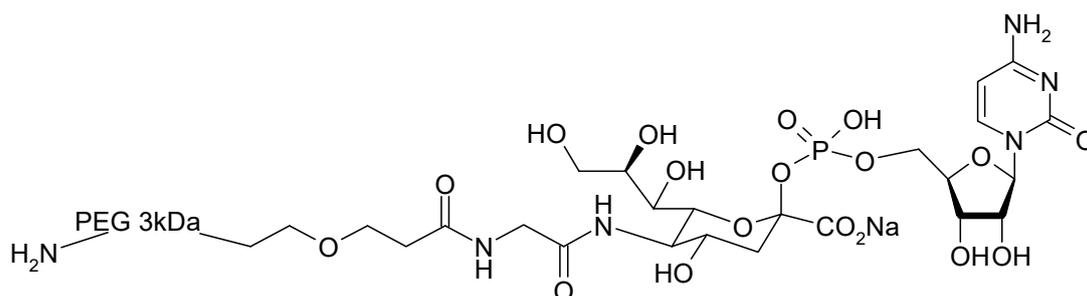


Etapas 1: Ácido *N*-((3-(ω-(Fluorenilmetoxicarbonilamino)PEGil 3 kDa)propionilamino)acetil)-*O*²-[5']citidilil-ξ-neuramínico



Se disolvió el éster pirrolidin-2,5-dion-1-ilo del ácido 3-(ω-(Fluorenilmetoxicarbonilamino)PEGil 3 kDa)propiónico (comprado en Rapp Polymere GmbH, 1 g, 0,292 mmol) en tetrahidrofurano (80 ml). Se añadió una solución de sal disódica de ácido citidin-5'-monofosfo-*N*-glicilneuramínico (0,276 g, 0,438 mmol) en un tampón (20 ml) compuesto de TRIS 50 mM, que se había ajustado a pH 8,9. La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 16 h. El THF se eliminó al vacío, con una temperatura del baño de 25 °C. La mezcla restante se diluyó con agua hasta 60 ml y se filtró a través de un filtro de 0,45 µm. La solución se dividió en tres partes cada una de las cuales se sometió a cromatografía por HPLC en una columna C4, mediante el uso de un flujo de 20 ml/min y un gradiente de 0-60 % de acetonitrilo en un tampón acuoso de hidrógenocarbonato de amonio 50 mM durante 50 min después de lavarse con un tampón acuoso de hidrógenocarbonato de amonio 50 mM durante 10 min. Se combinaron las fracciones, que no tenían ácido citidin-5'-monofosfo-*N*-glicilneuramínico y tenían una absorción a 214 nm mayor que 15-20 % de la absorción máxima. Las fracciones combinadas se secaron por congelación para dar 532 mg del ácido *N*-((3-(ω-(fluorenilmetoxicarbonilamino)PEGil 3 kDa)propionilamino)acetil)-*O*²-[5']citidilil-ξ-neuramínico. El espectro de ¹H-NMR estuvo de acuerdo con la expectativa.

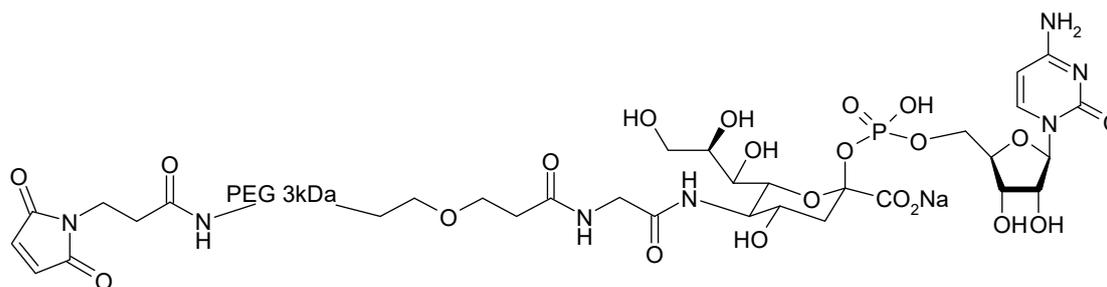
Etapas 2: Ácido *N*-((3-(ω-AminoPEGil 3 kDa)propionilamino)acetil)-*O*²-[5']citidilil-ξ-neuramínico

5
1015
20

Se disolvió ácido *N*-((3-(ω -(fluorenylmetoxycarbonylamino)PEGil 3 kDa)propionilamino)acetil)- O^2 -[5']citidilil- ξ -neuramínico (532 mg, 0,135 mmol) en *N,N*-dimetilformamida (9 ml). Se añadió piperidina (2,25 ml). La mezcla de reacción se agitó durante 20 min a temperatura ambiente. Se añadió éter (150 ml). La mezcla se dejó a temperatura ambiente durante 1 h. El precipitado formado se aisló mediante decantación y centrifugación. Este se disolvió en diclorometano (10 ml). Se añadió etildiisopropilamina (2,4 ml). La mezcla se agitó durante 2 min. Se añadió éter (150 ml). La mezcla se dejó durante 1,5 h para dejar que el precipitado envejeciera. El precipitado se aisló por decantación y filtración. Este se secó al vacío con una temperatura del baño de 25 °C para dar 343 mg del ácido *N*-((3-(ω -aminoPEGil 3 kDa)propionilamino)acetil)- O^2 -[5']citidilil- ξ -neuramínico. El $^1\text{H-NMR}$ estuvo de acuerdo con la expectativa.

25

Etapa 3: Ácido *N*-((3-(ω -(3-(2,5-dioxo-2,5-dihidropirrol-1-il)propionilamino)PEGil 3 kDa)propionilamino)acetil)- O^2 -[5']citidilil- ξ -neuramínico (NNC 0129-0000-3259)

30
3540
45

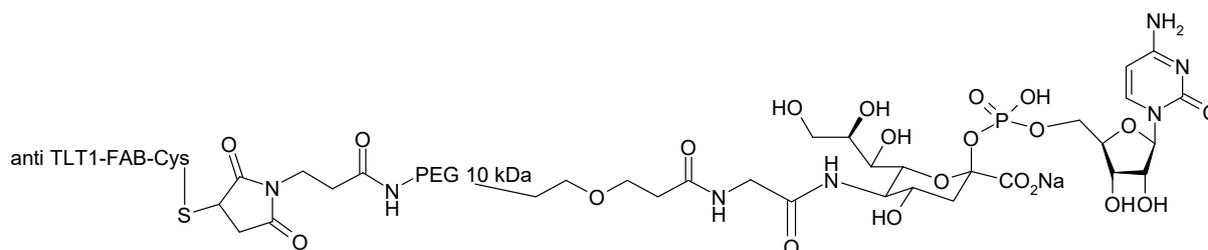
Se disolvió el ácido *N*-((3-(ω -AminoPEGil 3 kDa)propionilamino)acetil)- O^2 -[5']citidilil- ξ -neuramínico (343 mg, 0,009 mmol) en una mezcla de diclorometano (15 ml). Se añadió etildiisopropilamina (0,05 ml, 0,028 mmol). Se añadió éster 2,5-dioxopirrolidin-1-ilo del ácido 3-(2,5-Dioxo-2,5-dihidropirrol-1-il)propiónico (492 mg, 1,85 mmol) como un sólido. La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 16 h. Se añadió diclorometano (140 ml). Se añadió resina de poliestireno amionometilado (disponible comercialmente en, por ejemplo, Novabiochem, carga 0,85 mmol/g, 4,3 g, 3,69 mmol). La mezcla se agitó lentamente a temperatura ambiente durante 1 h. La resina se eliminó por filtración. El solvente se eliminó al vacío con una temperatura del baño de 25 °C. Se añadió resina Amberlyst 15 (2 g). La mezcla de reacción se agitó lentamente durante 20 min. La resina se eliminó por filtración. El solvente se eliminó al vacío con una temperatura del baño de 25 °C. El residuo se disolvió en diclorometano (10 ml). Se añadió éter (200 ml). La mezcla se dejó a temperatura ambiente durante 6 h para dejar que el precipitado formado envejeciera. El precipitado se aisló mediante decantación y centrifugación. Este se secó al vacío para obtener 180 mg del compuesto del título. El espectro $^1\text{H-NMR}$ en $\text{DMSO-}d_6$ mostró la presencia de un grupo maleimida.

50

Etapa 4: Unión del ácido *N*-((3-(ω -(3-(2,5-dioxo-2,5-dihidropirrol-1-il)propionilamino)PEGil 3 kDa)propionilamino)acetil)- O^2 -[5']citidilil- ξ -neuramínico a un FAB anti-TLT-1

55

60



65

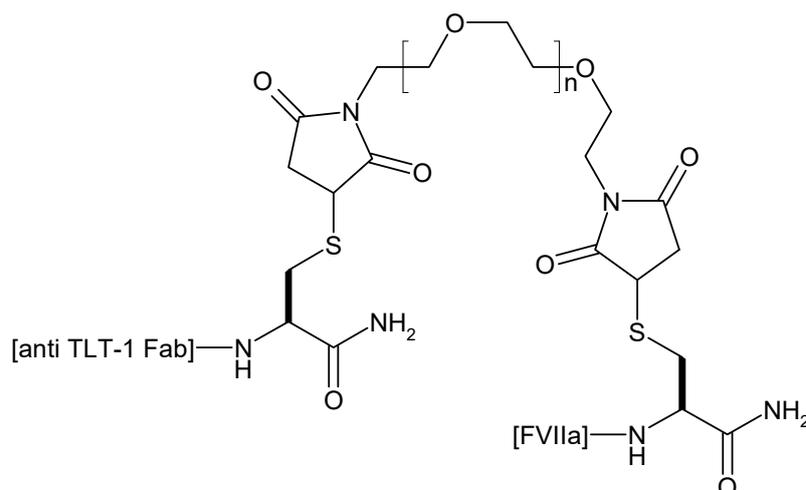
Se colocó una solución de un fragmento FAB anti-TLT-1 con partes de la región de bisagra, en donde una Cys no pareada (10 mg) se incorporó en un tampón fosfato, en un dispositivo de ultracentrifugación con un valor límite de 10 kDa. El tampón se cambió a un tampón compuesto de HEPES 100 mM que se había ajustado a pH 7,3, mediante

ultracentrifugación repetida a 4000 rpm. Después de cambiar el tampón, se obtuvo una solución de la proteína (36 ml) en el tampón compuesto de HEPES 100 mM que se había ajustado a pH 7,3. Se añadió una solución de 1 mg/ml de clorhidrato de tris(2-carboxietil)fosfina (4 ml). La mezcla de reacción se agitó a 300 rpm a 20 °C durante 15 min y se dejó a 20 °C durante 45 min. La mezcla de reacción se colocó en un dispositivo de ultracentrifugación con un valor límite de 10 kDa. El tampón se cambió a un tampón compuesto de HEPES 25 mM que se había ajustado a pH 7,0 mediante ultracentrifugación repetida a 4000 rpm para obtener una solución de 13,2 ml. Se añadió una solución de 1 mg/ml del ácido *N*-((3-(ω-(3-(2,5-dioxo-2,5-dihidropirrol-1-il)propionilamino)PEGil 3 kDa)propionilamino)acetil)-O²-[5³]citidilil-ξ-neuramínico (6,4 ml). La mezcla de reacción se agitó suavemente a 300 rpm a 20 °C durante 15 min y se dejó a 20 °C durante 16 h. Esta se colocó en un dispositivo de ultracentrifugación Amicon con un valor límite de 10 kDa y se concentró por ultracentrifugación a 4000 rpm durante 10 min hasta un volumen < 5 ml. La solución se sometió a cromatografía de exclusión por tamaño en una columna Superose 75 16/60 GL (GE Healthcare) a un flujo de 1 ml/min, mediante el uso de un tampón compuesto de TRIS 25 mM, NaCl 150 mM, que se había ajustado a pH 8,00 como eluyente. Las fracciones se agruparon sobre la base del trazo UV a 280 nm del cromatograma. El agrupamiento (9,9 mg, 13,7 ml), que contiene el compuesto deseado según lo juzgado por SDS-PAGE y que carecía del reactivo de PEG libre, según lo juzgado por SDS-PAGE, mediante el uso de un método de tinción específico de PEG (descrito en Kurfürst, M. M. *Analyt. Biochem.* 1992, 200, 244-248) se usó en la etapa siguiente.

Etapa 5: Sialidasa inmovilizada. (*C. Perfringens* tipo VI-A inmovilizado en agarosa, Sigma: N-5254, gel 0,6-1,8 U/ml, 1,52 ml) se lavó con agua (3 x 9 ml) y posteriormente con un tampón de HEPES 20 mM, CaCl₂ 10 mM, Tween80 al 0,005 %, NaCl 100 mM, que se había ajustado a pH 7,5 (3 x 9 ml). Una solución del FVIIa (8,9 mg) en un tampón (6,59 ml) compuesto de Gly-Gly 25 mM, CaCl₂ 10 mM que se había ajustado a pH 6,0 se colocó en un dispositivo de ultracentrifugación Amicon con un valor límite de 10 kDa. El tampón se cambió a un tampón de HEPES 20 mM, CaCl₂ 10 mM, Tween80 al 0,005 %, NaCl 100 mM, que se había ajustado a pH 7,5, por centrifugación repetida a 4000 rpm para dar un volumen final de 6,5 ml. Esta solución se añadió a la sialidasa inmovilizada. La mezcla de reacción se hizo rotar a temperatura ambiente durante 3,5 h.

El producto de la unión del ácido *N*-((3-(ω-(3-(2,5-dioxo-2,5-dihidropirrol-1-il)propionilamino)PEGil 3 kDa)propionilamino)acetil)-O²-[5³]citidilil-ξ-neuramínico a un FAB anti-TLT-1 (10 mg) obtenido como se describió en una etapa anterior en un tampón (13,5 ml) que consiste en TRIS 25 mM, NaCl 150 mM, que se había ajustado a pH 8,00, se colocó en un dispositivo de ultracentrifugación Amicon con un valor límite de 10 kDa. Se añadió tampón compuesto de histidina 20 mM, CaCl₂ 10 mM, glicerol al 20 %, Tween 80 al 0,02 %, NaCl 500 mM que se había ajustado a pH 6,0. Se aplicó una ultracentrifugación a 4000 rpm durante 2 min. Se añadió otra porción de tampón compuesto de histidina 20 mM, CaCl₂ 10 mM, glicerol al 20 %, Tween 80 al 0,02 %, NaCl 500 mM que se había ajustado a pH 6,0. Se aplicó una ultracentrifugación a 4000 rpm durante 10 min. El producto de reacción de la reacción con la sialidasa inmovilizada se añadió mediante filtración para eliminar la sialidasa inmovilizada. Se añadió otra porción de tampón compuesto de histidina 20 mM, CaCl₂ 10 mM, glicerol al 20 %, Tween 80 al 0,02 %, NaCl 500 mM que se había ajustado a pH 6,0. Se aplicó una ultracentrifugación a 4000 rpm durante 10 min para obtener un volumen total de 9 ml. Se añadió una solución de ST3Gal-III (500 □I). La mezcla de reacción se agita suavemente a 32 °C durante 15 min y después de eso se dejó a 32 °C durante 16 h. Se añadió una solución de 10 mg/ml del ácido CMP-*N*-acetilneuramínico (CMP NeuNAc, 0,70 mg, 0,89 ml) en un tampón de histidina 20 mM, CaCl₂ 10 mM, glicerol al 20 %, Tween 80 al 0,02 %, NaCl 500 mM que se había ajustado a pH 6,0. La mezcla de reacción se agitó suavemente a 32 °C durante 15 min y después de eso se dejó a 32 °C durante 1 h. La mezcla de reacción se sometió a una cromatografía de exclusión por tamaño en una columna Superdex 200 26/60 GL (GE Healthcare) con un flujo de 2 ml/min mediante el uso de un tampón de Histidina 10 mM, CaCl₂ 10 mM, Tween 80 al 0,01 %, NaCl 200 mM que se había ajustado a pH 6 como eluyente. Se agruparon las fracciones que contenían el producto deseado según lo juzgado por SDS-PAGE en un gel de TRIS-Acetato. Mediante el uso de una absorción molar de 12,86 a 280 nm en un aparato Nandrop®, se encontró un rendimiento de 3,2 mg. El resultado de un análisis de SDS-PAGE estuvo de acuerdo con la expectativa del producto deseado.

Ejemplo 40: Conjugación del fragmento anti-TLT-1-FAB (Fab0084) al FVIIa 407C a través de un enlazador de PEG de 3 kDa, FVIIa-Fab9015.



El FVIIa 407C (5 mg, 0,55 mg/ml, 9 ml) en HEPES 20 mM, NaCl 100 mM, CaCl₂ 10 mM, pH 7.0 se mezcló con soluciones de glutatión (reducido, 40 mM, 125 microlitros, en tampón HEPES), glutatión (oxidado, 1,6 mM, 125 microlitros, en tampón HEPES), *para*-aminobenzamidina (0,5 M, 500 microlitros, en tampón HEPES), y glutarredoxina (Grx2, EC 1.20.4.1, 96 micromolar, 200 microlitros). El volumen se ajustó a 10,0 ml, el pH fue de 7,0.

La mezcla resultante se incubó a 32 grados Celsius durante 5 h.

Se añadió EDTA en agua (800 microlitros, 0,25 M, pH 7,0). La solución se diluyó con agua desalinizada hasta que la conductividad se redujo a 8,3 mS/cm (20 ml).

La solución se inyectó en una columna HiTrap Q FF preconditionada (preacondicionada en Tampón A, volumen de columna de 5 ml).

Tampón A: HEPES 50 mM, NaCl 100 mM, EDTA 1 mM, Tween-80 al 0,01 %, pH 7,0

Tampón B: HEPES 50 mM, NaCl 100 mM, CaCl₂ 10 mM, Tween-80 al 0,01 %, pH 7,0

La proteína inmovilizada se lavó con Tampón A (5 VC) mediante el uso de una estación de cromatografía Äkta purifier 100. La proteína se eluyó con Tampón B (10 VC) a 2 ml/min. La elución de la proteína de interés se realizó mediante el monitoreo de la absorbancia a 280 nm.

Se agruparon siete fracciones. Se estimó que la concentración de proteína en el grupo combinado era 0,49 mg/ml (abs. 280 nm), volumen 7,5 ml, 3,8 mg del FVIIa (77,6 nmol).

Se añadió una solución del enlazador de polietilenglicol bis-maleimida (3 kDa, Rapp Polymere GmbH, Tübingen, Alemania, núm. prod. 11300-45, núm. lote 1210.764, 70 mg, 23 micromol) en HEPES 20 mM, NaCl 100 mM, CaCl₂ 10 mM, pH 7,0 (3,5 ml). La mezcla resultante se incubó a temperatura ambiente durante 1 h.

Se añadió una solución de EDTA en agua (250 mM, 900 microlitros) a la mezcla. El pH se ajustó a 7,0. La mezcla resultante se diluyó con agua hasta que la conductividad fue de 8,3 mS/cm y alcanzó un volumen de 17 ml.

La solución se inyectó en una columna HiTrap Q FF preconditionada (preacondicionada en Tampón A, volumen de columna de 5 ml).

Tampón A: HEPES 50 mM, NaCl 100 mM, EDTA 1 mM, Tween-80 al 0,01 %, pH 7,0

Tampón B: HEPES 50 mM, NaCl 100 mM, CaCl₂ 10 mM, Tween-80 al 0,01 %, pH 7,0

La proteína inmovilizada se lavó con Tampón A (5 VC) mediante el uso de una estación de cromatografía Äkta purifier 100. La proteína se eluyó con Tampón B (10 VC) a 2 ml/min. La elución de la proteína de interés se realizó mediante el monitoreo de la absorbancia a 280 nm.

Las fracciones de interés se agruparon y resultaron en un volumen total de 12 ml. Se midió la concentración de proteína (Abs. a 280 nm) a 0,30 mg/ml, 3,6 mg de proteína en total.

Una solución de fragmento de anticuerpo, proteína Fab ID 0084 (6,7 mg, 3,21 mg/ml) en tampón HEPES (HEPES 20

mM, CaCl₂ 1,0 mM, NaCl 100 mM, Tween-80 al 0,005 % (v/v), pH 7,5) se mezcló con una solución de sal sódica de tris(3-sulfonatofenil)fosfina hidrato (grado técnico 85 % puro, 10 mg/ml, 5 ml, mismo tampón). La mezcla resultante se incubó durante 2 h a temperatura ambiente. La mezcla se colocó en un dispositivo de filtro de ultracentrifuga Amicon (Millipore corp., MWCO 10 kDa) y el tampón se intercambió mediante adiciones repetitivas de tampón (HEPES 20 mM, CaCl₂ 1,0 mM, NaCl 100 mM, Tween-80 al 0,005 % (v/v), pH 7,5) seguido de centrifugación.

La muestra con tampón intercambiado del fragmento de anticuerpo se mezcló con la muestra del FVIIa conjugado con el enlazador y la solución resultante se intercambió de tampón (HEPES 50 mM, NaCl 100 mM, CaCl₂ 35 mM, 50 mM de benzamidina, 0.01 % de Tween-80, pH 7.5) y posteriormente se concentró hasta 7 ml. La mezcla se incubó a temperatura ambiente durante toda la noche. La mezcla resultante se analizó mediante el uso de electroforesis en gel SDS-PAGE.

Se añadió agua (8,5 ml), solución de EDTA (5,5 ml, 0,25 M) e hidróxido de sodio (1 M) a la mezcla hasta que el pH fue 7,2 y la conductividad se midió a 11,0 mS/cm, volumen total: 21 ml

La solución se inyectó en una columna HiTrap Q FF preacondicionada (preacondicionada en Tampón A, volumen de columna de 5 ml).

Tampón A: HEPES 50 mM, NaCl 100 mM, EDTA 1 mM, Tween-80 al 0,01 %, pH 7,0

Tampón B: HEPES 50 mM, NaCl 100 mM, CaCl₂ 10 mM, Tween-80 al 0,01 %, pH 7,0

La proteína inmovilizada se lavó con Tampón A (5 VC) mediante el uso de una estación de cromatografía Äkta purifier 100. La proteína se eluyó con Tampón B (10 VC) a 2 ml/min. Las fracciones seleccionadas se concentraron en un dispositivo de filtro de ultracentrifuga Amicon (Millipore corp., MWCO 10 kDa) y el tampón se intercambió mediante adiciones repetitivas de tampón (HEPES 20 mM, CaCl₂ 1,0 mM, NaCl 100 mM, Tween-80 al 0,005 % (v/v), pH 7,5) seguido de centrifugación. La muestra concentrada (5 ml) se inyectó en una columna Superdex Hiload 16/60 preacondicionada (GE Healthcare, preacondicionada en el tampón aplicado).

Tampón: L-Histidina 10 mM, CaCl₂ 10 mM, NaCl 100 mM, Tween80 al 0,01 %, pH 6,0

La proteína se purificó mediante elución a un flujo de 0,8 ml/min por 2 VC.

Las fracciones se seleccionaron en base al análisis por electroforesis en gel SDS PAGE (acetato Bis-Tris de 4-12 %, tampón de corrida MES).

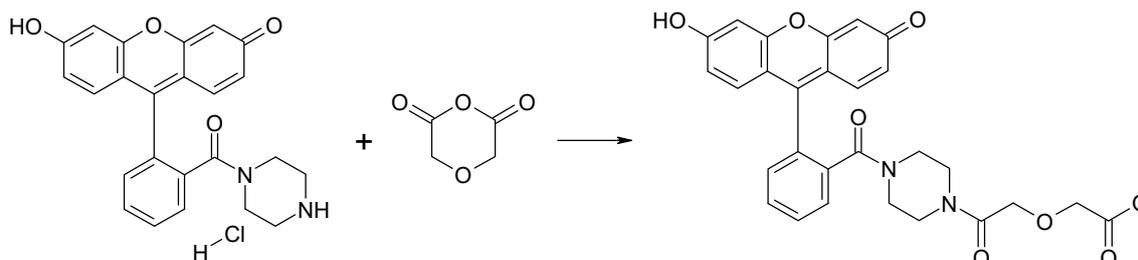
El grupo de fracciones seleccionadas se concentró mediante el uso de un dispositivo de filtro de ultracentrifuga Amicon (Millipore corp., MWCO 10 kDa) hasta un volumen total: 2,25 ml. La cantidad de proteína se midió (abs. 280 nm) ser 1,2 mg (conjugado de proteína).

Análisis por electroforesis en gel SDS PAGE (acetato Bis-Tris de 4-12 %) y transferencia de Western (HPC4) contra

1. Primario - Anticuerpo con etiqueta de Proteína C (HPC4), pAb, Conejo, núm. de cat.: A00637 (40 ug). Se disolvió en 80 ul de agua milliQ hasta una concentración de 0,5 mg/ml. Se diluyó 1:1000 durante la transferencia.

2. Secundario - Anticuerpo anti-IgG de conejo de cabra (Hyl) (HRP), pAb, núm. cat. A00098, Núm. Lote 11B000259. Se diluyó 1:1000 durante la transferencia.

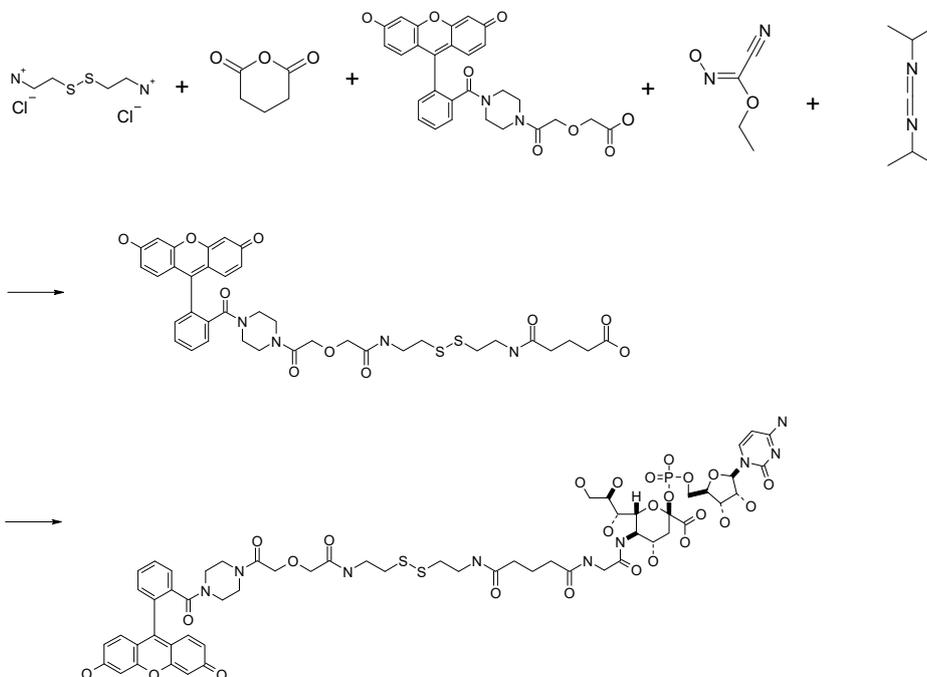
Ejemplo 41: Síntesis del ácido 2-[2-[4-[2-(3-hidroxi-6-oxo-xanten-9-il)benzoil]piperazin-1-il]-2-oxo-etoxi]acético.



Nombre	Dens	Mw	Mol	N	W	V
	[g/ml]	[g/mol]	Relación	[mmol]	[g]	[ml]
1		436,899	1	121,31	53	
2		116,074	1	121,31	14,081	
Producto: C28H24N2O8		516,512				

Se suspendió 6-hidroxi-9-[2-(piperazin-4-ium-1-carbonil)fenil]xanten-3-ona (preparado como se describe en Chang y otros, *J. Am. Chem. Soc.*, 2007, 129, 8400) en una mezcla de bicarbonato de sodio saturado acuoso (50 ml) y tetrahidrofurano (50 ml). La mezcla se agitó durante 10 minutos. Se añade anhídrido diglicólico. Después de 3 h, se añadió anhídrido diglicólico adicional (500 mg). La mezcla se agitó durante 20 h. La mezcla se acidificó con ácido clorhídrico fumante a pH 1. Se añadieron diclorometano (100 ml) y ácido clorhídrico (1 M, 100 ml). Se añadió salmuera (100 ml) y cloruro de sodio sólido. Se observó una cantidad masiva de sólido. El sólido se aisló mediante filtración, se lavó con agua, y se secó al vacío durante varios días. LC-MS: 517,1641 [M+H]⁺.

Ejemplo 42: Síntesis del derivado del ácido citidil monofosfato neuramínico fluorescente, ácido (2R, 5R, 6R)-2-[[[(2R, 3S, 4R, 5R)-5-(4-amino-2-oxo-pirimidin-1-il)-3, 4-dihidroxi-tetrahidrofuran-2-il]metoxi-hidroxi-fosforil]oxi-4-hidroxi-5-[[[2-[[5-[2-[2-[[2-[4-[2-(3-hidroxi-6-oxo-xanten-9-il)benzoi]piperazin-1-il]-2-oxo-etoxi]acetil]amino]etil]disulfanil]etilamino]-5-oxo-pentanoil]amino]acetil]amino]-6-[(2R)-1,2,3-trihidroxipropil]tetrahidropiran-2-carboxílico.



Nombre	Dens	Mw	Mol	n	W	V
	[g/ml]	[g/mol]	Relación	[mmol]	[g]	[ml]
Dihidrocloreto de cisteamina		225,204	1	8,881	2	
Anhídrido glutárico		114,102	1	8,881	1,013	
Fluorescente		516,512	0,218	1,936	1	
Oxima Pura		114,105	0,3	2,664	0,304	
diisopropilcarbodiimida	0,815	126,203	0,5	4,44	0,56	0,688
Producto: C37H40N4O10S2		764,88				
Producto: C57H70N9O25PS2		1376,341				

El dihidrocloreto de cistamina se disolvió en NaOH 1 M (ac.), 50 ml. La solución se extrajo con DCM (5x30 ml). Se secaron las fases org. combinadas (Na₂SO₄), se filtraron y se concentraron al vacío.

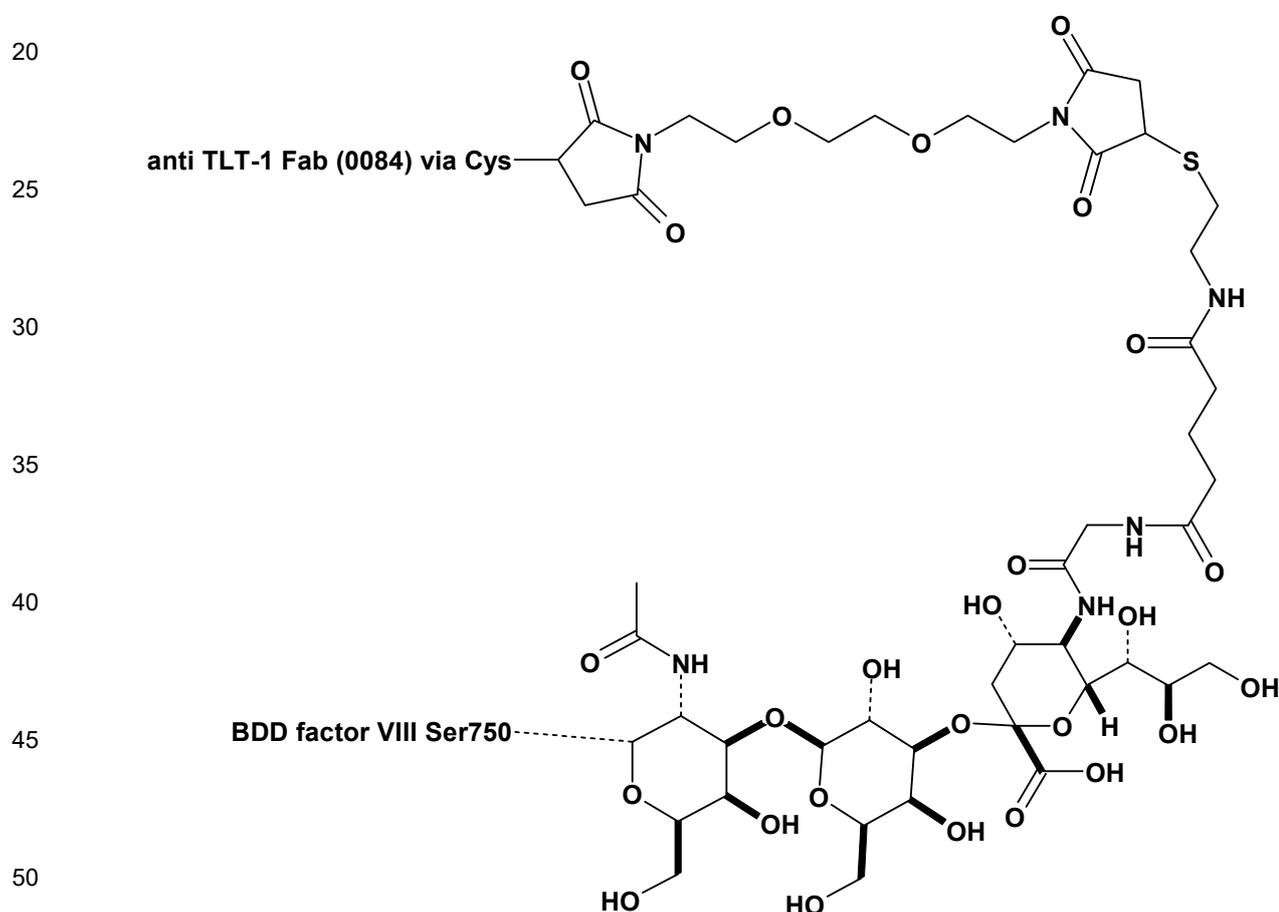
La diamina se disolvió en acetonitrilo (30 ml). Se añadió una solución gota a gota de anhídrido en acetonitrilo (30 ml) a la solución. La mezcla resultante se agitó durante 15 minutos. El sólido formado se dejó sedimentar durante 1 h. El solvente se decantó.

Se mezcló ácido 2-[2-[4-[2-(3-hidroxi-6-oxo-xanten-9-il)benzoil]piperazin-1-il]-2-oxo-etoxi]acético, Oxima y DIC en DMF (25 ml). La mezcla se agitó durante 1 h.

5 El aminoácido formado se disolvió en bicarbonato de sodio saturado acuoso (25 ml). La mezcla resultante se agitó durante toda la noche. Se añadió DCM (50 ml) e hidróxido de sodio acuoso (50 ml). Las fases se separaron. La fase orgánica se extrajo con hidróxido de sodio acuoso (3x50 ml). Los extractos acuosos combinados se acidificaron mediante la adición de ácido clorhídrico (fumante), lo que causó una precipitación extensa. La mezcla se filtró. La suspensión aislada se redisolvió en DMF y se concentró al vacío.

10 El compuesto aislado crudo y la Oxima se disolvieron en DMF (20 ml). Se añadió DIC (1,5 ml). La mezcla se agitó durante 2 h. Se añadió una solución de GSC en bicarbonato de sodio saturado acuoso (10 ml). La mezcla se agitó a temperatura ambiente durante toda la noche. Se añadió DCM (50 ml). Las fases se separaron. La fase orgánica se extrajo con bicarbonato de sodio saturado acuoso (2x5 ml). Las fases acuosas combinadas se purificaron mediante el uso de HPLC de fase inversa (MeCN de 0-50 % en agua, NH_4HCO_3 50 mM, columna 5 cm). LC-MS: 688,6752 [M+H]²⁺. La HPLC analítica y la LC-MS indicaron que el compuesto no era puro. Sin embargo, se usó como tal.

15 Ejemplo 43: Conjugación del fragmento anti-TLT-1-FAB (Fab0084) al FVIII, FVIII-Fab0247 (0084)



55 El Factor VIII con dominio B eliminado (turoctocoq alfa, Novo Nordisk A/S, 1,92 ml, 4,2 mg/ml) en tampón imidazol (Imidazol 20 mM, CaCl_2 10 mM, Tween 80 al 0,02 %, NaCl 150 mM, glicerol 1 M, pH 7,3) y sialidasa (sialidasa recombinante, *Arthrobacter Ureafaciens*, 3,2 U) se mezclaron y se dejaron durante 1 hora a temperatura ambiente. La muestra se diluyó a 25 ml con tampón.

60 La solución se inyectó en una columna monoQ preacondicionada (preacondicionada en Tampón A, volumen de columna de 5 ml).

Tampón A: Imidazol 20 mM, CaCl_2 10 mM, Tween 80 al 0,02 %, NaCl 25 mM, glicerol 1 M, pH 7,3

Tampón B: Imidazol 20 mM, CaCl_2 10 mM, Tween 80 al 0,02 %, NaCl 1 M, glicerol 1 M, pH 7,3.

65 La proteína inmovilizada se lavó con Tampón A (5 VC) mediante el uso de una estación de cromatografía Äkta purifier 100. La proteína se eluyó con un gradiente del tampón B (2 VC eq + 5 lavados de la muestra no unida + 2 VC de B de

ES 2 757 930 T3

0-20 % + 10 VC de B al 20 % + 10 VC de B al 100 %) a 1 ml/min. La elución de la proteína de interés se realizó mediante el monitoreo de la absorbancia a 280 nm.

5 El N,O-asialo BDD-FVIII aislado (0,98 mg/ml, 5 mg) se mezcló con derivado del ácido citidil monofosfato neuramínico fluorescente y sialiltransferasa recombinante (His-ST3Gal1). La mezcla resultante se incubó durante toda la noche a temperatura ambiente.

10 La muestra se diluyó hasta 40 ml con tampón A: Imidazol 20 mM, CaCl₂ 10 mM, Tween 80 al 0,02 %, NaCl 25 mM, glicerol 1 M, pH 7,3.

La solución se inyectó en una columna monoQ preconditionada (preacondicionada en Tampón A, volumen de columna de 5 ml).

15 Tampón A: Imidazol 20 mM, CaCl₂ 10 mM, Tween 80 al 0,02 %, NaCl 25 mM, glicerol 1 M, pH 7,3.

Tampón B: Imidazol 20 mM, CaCl₂ 10 mM, Tween 80 al 0,02 %, NaCl 1 M, glicerol 1 M, pH 7,3.

20 La proteína inmovilizada se lavó con Tampón A (5 VC) mediante el uso de una estación de cromatografía Äkta purifier 100. La proteína se eluyó con un gradiente del tampón B (2 VC eq + 5 lavados de la muestra no unida + 2 VC de B de 0-20 % + 10 VC de B al 20 % + 10 VC de B al 100 %) a 1 ml/min. La elución de la proteína de interés se realizó mediante el monitoreo de la absorbancia a 280 nm.

25 Las fracciones seleccionadas se agruparon y se incubaron con ácido citidilmonofosfato N-acetilneuramínico y sialiltransferasa (ST3GalIII) durante 30 minutos. La mezcla se diluyó hasta 35 ml con tampón A.

La solución se inyectó en una columna monoQ preconditionada (preacondicionada en Tampón A, volumen de columna de 5 ml).

30 Tampón A: Imidazol 20 mM, CaCl₂ 10 mM, Tween 80 al 0,02 %, NaCl 25 mM, glicerol 1 M, pH 7,3.

Tampón B: Imidazol 20 mM, CaCl₂ 10 mM, Tween 80 al 0,02 %, NaCl 1 M, glicerol 1 M, pH 7,3.

35 La proteína inmovilizada se lavó con Tampón A (5 VC) mediante el uso de una estación de cromatografía Äkta purifier 100. La proteína se eluyó con un gradiente del tampón B (2 VC eq + 5 lavados de la muestra no unida + 2 VC de B de 0-20 % + 10 VC de B al 20 % + 10 VC de B al 100 %) a 1 ml/min. La elución de la proteína de interés se realizó mediante el monitoreo de la absorbancia a 280 nm.

40 Las fracciones seleccionadas se agruparon y se evaluaron por electroforesis en gel SDS PAGE (acetato de Bis-Tris de 4-12 %, reducido y no reducido).

45 Las fracciones aisladas se mezclaron con tampón (15 ml) que contiene *tris*(carboxietil)fosfina, TCEP (Imidazol 20 mM, CaCl₂ 10 mM, Tween 80 al 0,02 %, NaCl 25 mM, glicerol 1 M, pH 7,3, TCEP 0,7 mM). La mezcla resultante se incubó durante 20 minutos. La solución se inyectó en una columna monoQ preconditionada (5/50 GL, preconditionada en Tampón A con TCEP).

Tampón A1: Imidazol 20 mM, CaCl₂ 10 mM, Tween 80 al 0,02 %, NaCl 25 mM, glicerol 1 M, pH 7,3, TCEP 0,7 mM).

Tampón A2: Imidazol 20 mM, CaCl₂ 10 mM, Tween 80 al 0,02 %, NaCl 25 mM, glicerol 1 M, pH 7,3).

50 Tampón B1: Imidazol 20 mM, CaCl₂ 10 mM, Tween 80 al 0,02 %, NaCl 1 M, glicerol 1 M, pH 7,3).

10 VC eq i A1, 5 lavados de la muestra no unida i A1, 30 VC en A1 al 100 %, 10 VC de A2 al 100 %, 15 VC de B1 al 100 %

55 La proteína inmovilizada se lavó con Tampón A1 (45 VC) seguido por Tampón A2 (10 VC) mediante el uso de una estación de cromatografía Äkta purifier 100. La proteína se eluyó con tampón B (15 VC de B al 100 %) a 1 ml/min. La elución de la proteína de interés se realizó mediante el monitoreo de la absorbancia a 280 nm.

60 Las fracciones seleccionadas se agruparon y se analizaron por SDS-PAGE (Tris-acetato).

El compuesto del Factor VIII aislado se diluyó con Tampón A y se inyectó en una columna monoQ preconditionada (5/50 GL, preconditionada en Tampón A).

65 Se mantuvo un flujo del Tampón A que contenía BM(PEG)2 4,8 mM (1,8-Bismaleimidodietilenglicol, Pierce/Thermo Scientific) durante 100 minutos. La proteína se lavó y se eluyó mediante el uso del protocolo siguiente: 10 VC de A1, 25 VC en tampón A2 (bismaleimida) a 0,25 ml/min (100 min), 10 VC de tampón A1, 10 VC de B1 al 100 %.

El fragmento de anticuerpo anti-TLT-1, 0084, se intercambió de tampón mediante el uso de un dispositivo de filtro de ultracentrífuga Amicon con MWCO 30 kDa en tampón HEPES (HEPES 20 mM + CaCl₂ 1 mM, NaCl 100 mM + Tween80 al 0,005 %, pH: 7,50). Concentración medida: 3,44 mg/ml, 2 mg): Se añadió sal sódica de hidrato de *Tris*(3-sulfonatofenil)fosfina (Alfa Aesar, grado técnico 85 %) a una concentración resultante de 12,5 mM. La mezcla resultante se incubó a temperatura ambiente durante 2 h. El fragmento de anticuerpo se intercambió de tampón mediante el uso de un dispositivo de filtro de ultracentrifugación Amicon con MWCO 30 kDa en tampón imidazol (Imidazol 20 mM, CaCl₂ 10 mM, Tween 80 al 0,02 %, NaCl 25 mM, glicerol 1 M, pH 7,3).

Las soluciones del Factor VIII y el fragmento de anticuerpo se mezclaron y concentraron hasta 2 ml. La solución resultante se incubó durante toda la noche a temperatura ambiente.

La solución se inyectó en una columna monoQ preacondicionada (preacondicionada en Tampón A, volumen de columna de 5 ml).

Tampón A: Imidazol 20 mM, CaCl₂ 10 mM, Tween 80 al 0,02 %, NaCl 25 mM, glicerol 1 M, pH 7,3.

Tampón B: Imidazol 20 mM, CaCl₂ 10 mM, Tween 80 al 0,02 %, NaCl 1 M, glicerol 1 M, pH 7,3.

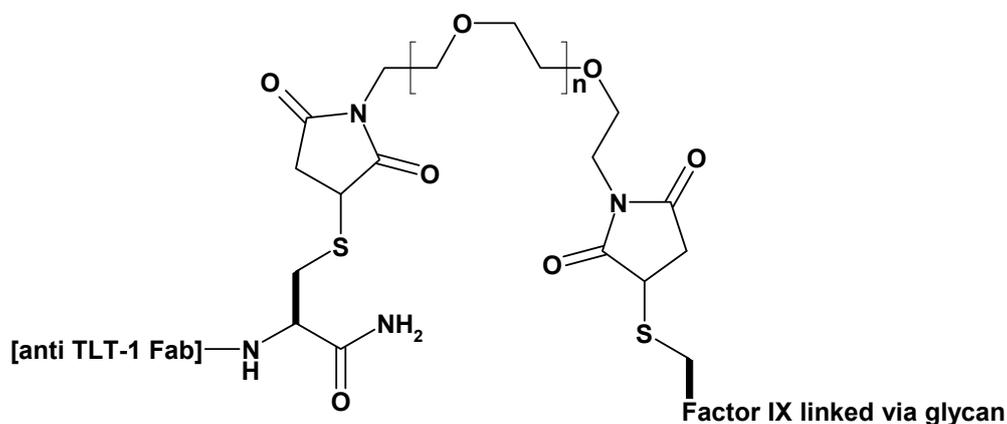
La proteína inmovilizada se lavó con Tampón A (5 VC) mediante el uso de una estación de cromatografía Äkta purifier 100. La proteína se eluyó con un gradiente del tampón B (2 VC eq + 5 lavados de la muestra no unida + 2 VC de B de 0-20 % + 10 VC de B al 20 % + 10 VC de B al 100 %) a 1 ml/min. La elución de la proteína de interés se realizó mediante el monitoreo de la absorbancia a 280 nm.

Las fracciones seleccionadas se agruparon y se concentraron. La proteína se inyectó en una columna preacondicionada Superdex 200 16/60 PG (preacondicionada en Tampón A).

Tampón A: Histidina (1,5 g, 1,5 mg/ml), CaCl₂ * H₂O (376 mg, 0,37 mg/ml), NaCl (18 g, 18 mg/ml), Sacarosa (3 g, 3 mg/ml), Tween 80 (100 mg, 0,1 mg/ml), diluido a 1000 ml con MQ, ajustado a pH 7,0.

Las fracciones se seleccionaron en base al análisis por SDS-PAGE y transferencia Western anti-HPC4.

Ejemplo 44: Conjugación del fragmento anti TLT-1-FAB (Fab0084) al FIX.



Se mezclan el Factor IX (50 microlitros), Sialiltransferasa3 (10 microlitros), y derivado del ácido citidil monofosfato neuramínico fluorescente; punta de una espátula). La mezcla se incubó a 32 grados Celsius durante 24 horas.

Las concentraciones finales son: Factor IX: 0,33 mg/ml, ST3Gal3: 0,08 mg/ml

Analizado por SDS-PAGE (respuesta de fluorescencia y tinción con azul de coomassie).

El Factor IX y un fragmento de anticuerpo se conjugan mediante el uso de los métodos descritos en la presente descripción, es decir, reducción mediada por una fosfina o glutatión, acoplamiento a una entidad enlazadora, y conjugación seguida de purificación y análisis.

Ejemplo 45: El FVIIa-Fab9015 es superior a rFVIIa en la reducción del sangrado de la cola en ratones hemofílicos transitorios.

Los ratones knock-out/knock-in (KOKI) TLT-1 humanizados se convirtieron en hemofílicos transitorios mediante la administración de un anticuerpo monoclonal de FVIII. Cinco minutos antes de la inducción del sangrado de cola, los

ratones se trataron previamente con 20, 5 o 0,8 nmol/kg de FVIIa-Fab9015 (3,625 ml/kg), 20 nmol/kg de rFVIIa o vehículo. El sangrado de la cola se indujo por transección de 4 mm a partir de la punta de cola, y se observó el sangrado resultante durante 30 minutos. Los conteos de plaquetas se obtuvieron inicialmente y 30, 60 y 120 minutos después de la inducción del sangrado de la cola.

5 Para poder mostrar la superioridad del FVIIa-Fab9015, se usó una dosis del rFVIIa (20 nmol/kg ~ 1 mg/kg) que no se esperaba tuviera un efecto significativo sobre el sangrado.

10 La pérdida de sangre y el tiempo de sangrado se reducen en dependencia de la dosis del TLT-1-FAB-FVIIa, que alcanzó significación estadística a 20 y 5 nmol/kg. Además, 20 nmol/kg del FVIIa-Fab9015 fue significativamente más eficaz en comparación con 20 nmol/kg de rFVIIa (Figura 15).

15 No se observaron cambios significativos en el conteo de plaquetas dentro de las 2 horas de tratamiento en ninguno de los grupos de tratamiento (Figura 16).

En conclusión, el FVIIa-Fab9015 fue superior al rFVIIa en la reducción del sangrado de la cola en ratones KOKI TLT-1. No se observaron signos de efectos adversos, por ejemplo, disminución de los conteos de plaquetas.

20 Ejemplo 46: Aumento de la generación de trombina por localización del rFVIIa en la superficie de plaquetas activadas mediante la unión al TLT-1 expresado en la superficie en condiciones similares a hemofilia A.

25 El FVIIa-Fab9015 se analizó en un ensayo de generación de trombina. En resumen, el plasma rico en plaquetas humanas (PRP) se obtiene mediante centrifugación de sangre total humana con citrato a 220 g durante 20 min. Se recogió la fase superior que contiene plaquetas y la muestra restante se centrifugó a 2500 g durante 10 min para obtener el plasma pobre de plaquetas (PPP) usado para ajustar la concentración de plaquetas que se usa en una concentración final de 150 000 plt/ μ l. El PRP se hizo hemofílico mediante incubación durante 30 min con un anticuerpo policlonal anti-FVIII humano de cabra (0,1 mg/ml) (HTI núm. Z0429). Las plaquetas se activaron con péptido de activación del receptor-1 activado por proteasa (SFLLRN; Bachem núm. H-2936) o una combinación del péptido y el veneno de serpiente activador de GPVI Convulxina (Pentapharm núm. 119-02). La trombina generada se midió mediante el uso de un método fluorogénico de Thrombinoscope®. El PRP, el reactivo FluCa y el compuesto se mezclaron y se añadieron a placas de pocillos de fondo redondo Nunc Microwell de 96 pocillos. La reacción se inició por la adición del activador de plaquetas y la señal fluorescente del sustrato se detectó en un lector de placas ThermoFisher Fluoroskan (Fisher Scientific). La concentración de trombina se calculó mediante el uso de un calibrador de trombina proporcionado por Thrombinoscope de acuerdo con sus instrucciones.

35 Los resultados mostraron una potencia aumentada del FVIIa-Fab9015 en comparación con rFVIIa (Figura 17A). Además los resultados revelaron que este aumento en la potencia dependió del estadio de activación de las plaquetas. La Figura 18 muestra la mayor capacidad generadora de la trombina cuando las plaquetas se activaron con SFLLRN (10 μ M) y se alcanzó el potencial total cuando las plaquetas se activaron con una combinación de SFLLRN (30 μ M) y Convulxina (100 ng/ml). Cuando se activan las plaquetas con esta combinación de activadores, FVIIa-Fab9015 mostró una potencia de aproximadamente cuatro veces mayor, medida como generación del pico de trombina, en comparación con rFVIIa en las dos concentraciones analizadas (5 y 25 nM) (Figura 17A y 17B, respectivamente). Este aumento en la capacidad generadora de la trombina dependió completamente de la unión del FVIIa-Fab9015 al TLT-1 en la superficie de la plaqueta activada ya que la incubación previa con TLT-1 soluble revertió completamente la potenciación (Figura 19).

Ejemplo 47: Aumento de la generación de trombina por localización del rFIX en la superficie de plaquetas activadas mediante la unión del TLT-1 expresado en la superficie en condiciones similares a hemofilia B.

50 Se analizó el FIX-Fab0155 en un ensayo de generación de trombina y se comparó con rFIX (Benefix®). Las plaquetas humanas se aislaron a partir de sangre total fresca estabilizada con citrato. Una parte de la solución de ACD (citrato trisódico al 2,5 %, ácido cítrico al 1,5 % y D-glucosa al 2 %) se añadió a cinco partes de sangre antes de la centrifugación a 220 g durante 20 min para obtener plasma rico en plaquetas. La fase superior se recogió y transfirió a un nuevo tubo con forma de cono y se centrifugó a 500 g durante 15 min. El plasma se eliminó y el sedimento se disolvió en tampón Hepes (Hepes 10 mM, NaCl 137 mM, KCl 2,7 mM, MgCl₂ 1,7 mM, D-glucosa 5 mM, Na₂HPO₄ 0,4 mM; pH 6,5) suplementado con prostaglandina E1 (5 μ g/ml). Después de una segunda centrifugación a 500 g durante 15 min, el sobrenadante se desechó y las plaquetas lavadas se disolvieron en plasma deficiente del Factor IX (Geroge King Bio-medical, Inc.) y la concentración de plaquetas se ajustó a 300 000 plt/ μ l. En el ensayo de generación de trombina cuando se añadieron agonistas, variantes del Factor IX y reactivo FluCa (Thrombinoscope®) a placas de pocillo de fondo redondo Nunc Microwell de 96 pocillos junto con el plasma deficiente de Factor IX que contiene plaquetas, la concentración final de plaquetas fue de 150 000 plt/ μ l. Las plaquetas se activaron con una combinación de péptido de activación del receptor-1 activado por proteasa (SFLLRN; Bachem núm. H-2936) y el veneno de serpiente activador de GPVI Convulxina (Pentapharm núm. 119-02). La trombina generada se midió mediante un método fluorogénico de Thrombinoscope® en el cual la señal fluorescente del sustrato escindido de la trombina se detectó en un lector de placas ThermoFisher Fluoroskan (Fisher Scientific). La concentración de trombina se calculó mediante el uso de un calibrador de trombina proporcionado por Thrombinoscope® de acuerdo con sus instrucciones.

Los resultados mostraron una potencia aumentada a 1 nM del FIX-Fab0155 en comparación con rFIX (Figura 20) cuando las plaquetas se activaron con una combinación de SFLLRN (30 μ M) y Convulxina (100 ng/ml). Además, los resultados revelaron que este aumento en la potencia dependió de la expresión del TLT-1 en las plaquetas ya que el TLT-1 soluble (100 nM) antagonizó el efecto potenciado.

5 Ejemplo 48: Purificación y de corrida compuesto de Histidina 10 mM, pH 6,0, CaCl_2 10 mM, NaCl 100 mM y Tween 80 al 0,01 %. Las proteínas FVIIa se colectaron como picos simétricos en aprox. 0,02-0,08 volúmenes de columna.

10 Las activaciones de las preparaciones de FVIIa purificadas se llevaron a cabo mediante el uso de una resina compuesta de FXa derivada de plasma (de Enzyme Research Lab.) acoplada a perla CNBr-Sepharose 4 activada (de GE Healthcare).

15 Las proteínas FVIIa se analizaron mediante el uso de SDS-PAGE/Coomassie y las determinaciones de masa molecular intactas se realizaron mediante el uso de una configuración del método de cromatografía líquida espectrometría de masa de electropulverización ionización con analizador de tiempo de vuelo en un instrumento Agilent 6210 y una columna desalinizada MassPREP (de Waters) con un tampón de equilibrado compuesto de ácido fórmico al 0,1 % H₂O grado LC-MS y un tampón de elución compuesto de ácido fórmico al 0,1 % en ACN grado LC-MS. Todas las variantes del FVIIa y de tipo silvestre purificadas mostraron masas moleculares intactas de ~50 kDa. Basado en los análisis de SDS-PAGE/Coomassie y de LC-MS de masa intacta mediante el uso de condiciones reductoras, se llevaron a cabo las identificaciones de cadena de la fusión FVIIa-Fab5001.

20 Basado en los análisis de SEC-HPLC, todas las preparaciones del FVIIa mostraron una pureza de >90–99 % y parecieron altamente homogéneas.

25 Ejemplo 49: Autoactivación del FVII-Fab5001 mediante el uso de un ensayo proteolítico en presencia del Factor Tisular soluble.

30 La autoactivación se determinó como la capacidad de activar el FX en presencia del Factor Tisular soluble (sTF). La proteína se diluyó en HEPES 50 mM (pH 7,4), NaCl 100 mM, CaCl_2 10 mM, BSA 1 mg/ml y PEG8000 al 0,1 % (p/v). Los parámetros cinéticos para la activación de FX se determinaron mediante la incubación previa de FVII-Fab5001 5 pM (n=2) con sTF 100 nM y fosfolípidos PC:PS 25 μ M (Haematologic technologies) durante 10 min. Después se añadió FX 30 nM en un volumen de reacción total de 100 μ l en una placa de 96 pocillos y la reacción se dejó incubar durante 20 min a temperatura ambiente. Después de la incubación, la reacción se inactivó mediante la adición de 50 μ l de tampón de parada (HEPES 50 mM (pH 7,4), NaCl 100 mM, EDTA 80 mM) seguido por la adición de 50 μ l de S-2765 2 mM. Finalmente, el aumento de la absorbancia se midió continuamente a 405 nM en un lector de microplacas Spectramax 190. Los valores de K_{cat}/K_m se determinaron al ajustar los datos a una forma revisada de la ecuación de Michaelis Menten ($[S] < K_m$) mediante el uso de regresión lineal. La cantidad de FXa generada se estimó a partir de una curva estándar de FXa.

40 La proteína de fusión zimogénica FVII-Fab5001 mostró actividad proteolítica del 38 % con relación a la del wtFVIIa, que es un resultado de la autoactivación de la proteína en presencia de sTF, ver la Figura 21).

45 Ejemplo 50: Ausencia del efecto antiagregante de los anticuerpos anti-TLT-1, mAb0023, mAb0051, mAb0061 y mAb0062.

50 El efecto antiagregante de los anticuerpos anti-TLT-1 se analizó en plasma rico en plaquetas humanas (PRP). El PRP se obtuvo por centrifugación a 200 g durante 15 min de sangre total humana estabilizada con heparina. La fase superior que contiene plaquetas se colectó y la muestra restante se centrifugó en 1500 g durante 10 min para obtener plasma pobre de plaquetas (PPP) que se usó como una muestra de referencia en las mediciones de agregación. El PRP se incubó 3 min a 37 °C en el instrumento Platelet Aggregation Profiler (PAP-8) (Bio/Data Corporation, Horsham, PA). Se registró un valor de referencia estable antes de la adición de anticuerpos anti-TLT-1 (10 nM) o anticuerpo control irrelevante (10 nM) al PRP. Las plaquetas se activaron 3 min después de la adición de los anticuerpos con péptido activador del receptor-1 (PAR-1) activado por proteasa SFLLRN (1 o 10 μ M) (Bachem).

55 Los resultados no mostraron efecto inhibitorio de los anticuerpos (10 nM) (mAb0023, mAb0051, mAb0061 y mAb0062) en comparación con el anticuerpo control irrelevante. La agregación de plaquetas se inició con una concentración alta (10 μ M) o intermedia (1 μ M) de SFLLRN. Los datos muestran que los anticuerpos no inhibieron la agregación en ninguna de las concentraciones de SFLLRN. En conclusión, estos datos muestran que los anticuerpos no inducen ni inhiben la función de plaquetas medida como agregación.

60 Ejemplo 51. Efecto del FIX-mAb0145 sobre la formación de coágulos de fibrina inducida por TF en sangre total humana (HWP) a partir de un donante normal medida por tromboelastografía (TEG).

65 La sangre total humana estabilizada con citrato (HWP) se extrae a partir de donantes normales. Las condiciones similares a hemofilia se obtienen mediante la incubación de HWP con anticuerpo anti-FVIII 10 μ g/ml (anti-Factor VIII humano de oveja; Hematologic Technologies Inc) durante 30 min a temperatura ambiente. La formación de coágulos

se mide mediante tromboelastografía (anizador TEG serie 5000, Haemoscope Corporation, Niles, IL, EE.UU.). Se añadieron diversas concentraciones (0; 0,2; 1,0; 5,0 y 10 nM) de FIX-mAb0145 o (0; 0,2; 5,0 y 10 nM) de rFIX (Novo Nordisk A/S) a HWB con citrato "similar a hemofilia". La coagulación se inicia cuando se transfieren 340 µl de HWB normal o "similar a hemofilia" a un recipiente del tromboelastógrafo que contiene 20 µl de CaCl₂ 0,2 M con TF lipidado 0,03 pM (Innovin®, Dade Behring GmbH (Marburg, Alemania). El trazo de TEG se sigue continuamente por hasta 120 min. Se registran las variables de TEG siguientes: Tiempo R (tiempo de coagulación, es decir, el tiempo desde el inicio de la coagulación hasta que se obtuvo una amplitud de 2 mm), ángulo α (desarrollo de coágulos medido como el ángulo entre el valor de R y el punto de inflexión del trazo de TEG), K (velocidad de la cinética del coágulo para alcanzar un cierto nivel de resistencia del coágulo, amplitud = 20 mm), y MA (amplitud máxima del trazo de TEG que refleja la resistencia mecánica máxima del coágulo). La Figura 23 muestra los valores de tiempo R determinados a partir de trazos de TEG individuales.

El tiempo R obtenido a partir de trazos de TEG con HWB normal y sangre "hemofílica" suplementada con diversas concentraciones de FIX-mAb0145 o rFIX se muestra en la Figura 23. La HWB de un donante normal mostró un tiempo R de 980 seg que se prolongó hasta 5475 seg cuando la sangre se preparó "similar a hemofilia" mediante la adición de un anticuerpo de neutralización del FVIII. El FIX-mAb0145 acorta el tiempo R del coágulo en una manera dependiente de la concentración, por el contrario al rFIX, que no tuvo un efecto significativo cuando se añadió como un control a concentraciones equivalentes. Todos los datos se obtienen a partir de un donante representativo.

Se observa que el FIX-mAb0145 normaliza el coágulo de "HWB similar a hemofilia" en una manera dependiente de la concentración. Por lo tanto, sorprendentemente, los resultados muestran que la conjugación del rFIX con un anticuerpo contra TLT-1, que dirige al rFIX a la superficie de plaquetas activadas, proporciona una actividad de puenteo independiente del FVIII que resulta en una actividad procoagulante mejorada.

Ejemplo 52. Aumento de la generación de trombina por localización del rFVIIa en la superficie de plaquetas activadas mediante la unión al TLT-1 expresado en la superficie en condiciones similares a hemofilia A.

El FVIIa-Fab9015, FVIIa-Fab1029 y FVIIa-Fab1001 a 25 nM se analizaron en un ensayo de generación de trombina. En resumen, se obtuvo plasma rico en plaquetas humano (PRP) mediante centrifugación de sangre total humana con citrato a 220 g durante 20 min. Se recogió la fase superior que contiene plaquetas y la muestra restante se centrifugó a 2500 g durante 10 min para obtener el plasma pobre en plaquetas (PPP) usado para ajustar la concentración de plaquetas hasta una concentración final de 150 000 plit/µl. El PRP se hizo hemofílico mediante incubación durante 30 min con un anticuerpo policlonal anti-FVIII humano de cabra (0,1 mg/ml) (HTI núm. Z0429). Las plaquetas se activaron con una combinación del péptido de activación del receptor-1 (PAR-1) activado por proteasa (SFLLRN; Bachem núm. H-2936) (30 µM) y el veneno de serpiente activador de GPVI Convulxina (100 ng/ml) (Pentapharm núm. 119-02). La trombina generada se midió mediante el uso de un método fluorogénico de Thrombinoscope® en el cual el PRP, el reactivo de FluCa y el compuesto de prueba se mezclaron y añadieron a placas de pocillo de fondo redondo Nunc Microwell de 96 pocillos (Nunc núm. 268152). La reacción se inició por la adición de activadores de plaquetas y la señal fluorescente del sustrato se detectó en un lector de placas ThermoFisher Fluoroskan (Fisher Scientific). La concentración de trombina se calculó mediante el uso de un calibrador de trombina proporcionado por Thrombinoscope® de acuerdo con sus instrucciones.

Los resultados mostraron una potencia aumentada de las tres proteínas, FVIIa-Fab9015, FVIIa-Fab1029 y FVIIa-Fab1001, en comparación con rFVIIa. El FVIIa-Fab9015 y FVIIa-Fab1001 (25 nM) mostraron una potencia de aproximadamente cuatro veces mayor mientras que FVIIa-Fab1029 (25 nM) tenía una potencia aproximadamente dos veces mayor medida como pico de generación de trombina, en comparación con rFVIIa (25 nM) (Figura 24).

Ejemplo 53. Purificación y caracterización de las proteínas de fusión FIX expresadas recombinantemente (SEQ ID NO 161), Mab y Fab FIX-anti-TLT-1 (FIX-Fab0155 y FIX-mAb0145).

La purificación de dichas proteínas FIX se realizó mediante el uso de un método de cromatografía de afinidad de captura basado en la resina anti-FIX A3B6-Sepharose 4 FF, que es una resina (gel de afinidad base de GE Healthcare) con un anticuerpo acoplado, desarrollada en Novo Nordisk, que se une específicamente al dominio FIX Gla (ver referencia Østergaard y otros (2011), Blood 118: 2333-41). La purificación se realizó mediante el uso de un sistema de cromatografía ÄktaExplorer (GE Healthcare, núm. de cat. 18-1112-41). Los sistemas también usados para la etapa de purificación fueron un tampón de equilibrado compuesto de Tris 20 mM, CaCl₂ 1 mM, NaCl 100 mM, Tween 80 al 0,01 % (v/v) pH 7,5, un tampón de lavado compuesto de Tris 20 mM, CaCl₂ 1 mM, NaCl 2,0 M, Tween 80 al 0,01 % (v/v) pH 7,5 y un tampón de elución compuesto de Tris 20 mM, EDTA 20 mM, NaCl 50 mM, Tween 80 al 0,01 % (v/v) pH 7,5. Los sobrenadantes celulares se ajustaron a concentración final de CaCl₂ 5 mM y se aplicaron sobre una columna A3B6-Seph 4 FF equilibrada previamente. La columna se lavó con 5-10 volúmenes de columna de tampón de equilibrado, 5-10 volúmenes de columna de tampón de lavado y por último con 5-10 volúmenes de columna de tampón de equilibrado. Las proteínas de fusión FIX se eluyeron isocráticamente en aproximadamente 5 volúmenes de columna de tampón de elución.

Las proteínas FIX se analizaron mediante el uso de SDS-PAGE/Coomassie y las determinaciones de masa molecular intacta se realizaron mediante el uso de una configuración del método de cromatografía líquida espectrometría de

masa de electropulverización ionización con analizador de tiempo de vuelo en un instrumento Agilent 6210 y una columna desalinizada MassPREP (de Waters) con un tampón de equilibrado compuesto de ácido fórmico al 0,1 % en H₂O grado LC-MS y un tampón de elución compuesto de ácido fórmico al 0,1 % en ACN grado LC-MS. Basado en los análisis de SDS-PAGE/Coomassie y de LC-MS de masa intacta mediante el uso de condiciones reductoras, se llevaron a cabo las identificaciones de cadena de las proteínas FIX. Basado en los análisis de SEC-HPLC, todas las preparaciones de proteína de fusión FIX mostraron una pureza de >85–99 % y parecieron altamente homogéneas.

Ejemplo 54. Producción del FVIIa de tipo silvestre de expresión recombinante (SEQ ID NO: 157) y FVIIa-407C (SEQ ID NO:181).

Dicha variante y tipo silvestre de FVIIa se produjeron como se describe en la patente 02/077218 y Jurlander y otros (2001), Semin Thromb Hemost. 27:373-84. Más específicamente, las moléculas de FVIIa se expresaron en líneas celulares adherentes BHK. El medio de crecimiento empleado fue una variante del medio DMEM/F12 con vitamina K1 5 mg/l y suero bovino fetal al 10 % (2 % durante la producción). En resumen, las células se propagaron en matraces T-175 ventilados, de 2 capas y 10 capas de células incubadas a 37 °C y 5 % de CO₂. En confluencia, las células se disociaron mediante el uso de TryPle™ Express (GIBCO núm. de cat. 12604-013) antes de pasar a la etapa siguiente. La fase de producción se realizó como un cultivo de lote repetido en un biorreactor de 15 l con microportadores (5 g/l, Cytodex 3, GE Life Sciences). El pH se controló en un límite superior de 7,2 mediante la adición de CO₂ y en un límite inferior de 6,8 mediante la adición de Na₂CO₃. La concentración de oxígeno disuelto se mantuvo por encima del 50 % de la saturación en el aire mediante rociado con oxígeno. La temperatura se mantuvo a 36,5 °C. La agitación fue de 50-70 rpm. Se realizaron intercambios medio de cosecha/medio para mantener una concentración de glutamina superior a 1 mM. Una hora antes de un intercambio medio, la agitación se detuvo para permitir que los microportadores (con las células unidas) se asentaran en la parte inferior del reactor. Después, se cosechó aproximadamente el 80 % del volumen antes de llenarlo con medio fresco hasta un 100 % de volumen de trabajo. Las cosechas celulares se extrajeron y clarificaron mediante un tren de filtro que consiste de dos filtros de cápsulas desechables (Clarigard 3 µm, Opticap XL10, Millipore, núm. de cat. K030A10HH1; Durapore 0,22 µm, Opticap XL10, Millipore, núm. de cat. KVGLS10HH1) antes de la purificación.

Ejemplo 55. Aumento de la generación de trombina por localización del rFVIIa en la superficie de plaquetas activadas mediante la unión al TLT-1 expresado en la superficie en condiciones similares a hemofilia A.

Se analizó un FVIIa-Fab5001 en un ensayo de generación de trombina y se comparó con rFVIIa en plasma deficiente del factor VIII que contiene plaquetas humanas lavadas. Para aislar las plaquetas humanas, se añadió una parte de solución ACD (citrate trisódico al 2,5 %, ácido cítrico al 1,5 % y D-glucosa al 2 %) a cinco partes de sangre antes de la centrifugación a 220 g durante 20 min para obtener plasma rico en plaquetas. La fase superior se recogió y transfirió a un nuevo tubo con forma de cono y se centrifugó a 500 g durante 15 min. El plasma se eliminó y el sedimento se disolvió en tampón Hepes (Hepes 10 mM, NaCl 137 mM, KCl 2,7 mM, MgCl₂ 1,7 mM, D-glucosa 5 mM, NaH₂PO₄ 0,4 mM; pH 6,5) suplementado con prostaglandina E1 (5 µg/ml). Después de una segunda centrifugación a 500 g durante 15 min el sobrenadante se desechó y las plaquetas lavadas se disolvieron en plasma deficiente del factor VIII (Geroge King Bio-medical, Inc.) y la concentración de plaquetas se ajustó a 300 000 plt/µl. En el ensayo de generación de trombina cuando se añadieron agonistas, variantes del Factor IX y reactivo FluCa (Thrombinoscope®) a placas de pocillo de fondo redondo Nunc Microwell de 96 pocillos junto con el plasma deficiente de Factor IX que contiene plaquetas, la concentración final de plaquetas fue de 150 000 plt/µl. Las plaquetas se activaron con una combinación de péptido de activación del receptor-1 activado por proteasa (SFLLRN; Bachem núm. H-2936) y el veneno de serpiente activador de GPVI Convulxina (Pentapharm núm. 119-02). La trombina generada se midió mediante un método fluorogénico de Thrombinoscope® en el cual la señal fluorescente del sustrato escindido de la trombina se detectó en un lector de placas ThermoFisher Fluoroskan (Fisher Scientific). La concentración de trombina se calculó mediante el uso de un calibrador de trombina proporcionado por Thrombinoscope® de acuerdo con sus instrucciones.

Los resultados mostraron una potencia aumentada del FVIIa-Fab5001 en comparación con rFVIIa de tipo silvestre (Figura 25). Además, los resultados revelaron que este aumento en la potencia dependió de la activación de plaquetas. Al activar las plaquetas con una combinación de SFLLRN (30 µM) y Convulxina (100 ng/ml), el FVIIa-Fab5001 (25 nM) mostró una potencia aproximadamente cuatro veces mayor, medida como generación de máximo de trombina, en comparación con rFVIIa de tipo silvestre (25 nM).

Ejemplo 56. Análisis de SPR del FVIIa-Fab1001 y unión de FVIIa-Fab5001 al TLT1.

Análisis de SPR de la unión del FVIIa-Fab1001 al TLT1. El FVIIa-Fab1001 se une al TLT-1 como se analiza mediante análisis de SPR en un instrumento Biacore T200.

Los materiales usados se muestran en la Tabla 18.

Tabla 18

Reactivo	Fuente
TLT1 humano etiquetado con His	Ejemplo 1
FVIIa-Fab1001	Ejemplo 39
mAb anti 6X his	R&D núm. MAB050 0,5 mg/ml en PBS
Todos los demás reactivos	Biacore GE Healthcare

Método: Un anticuerpo anti 6Xhis se inmovilizó hasta un nivel de aprox. 9000 RU en un chip CM5 (0,5 mg/ml diluido en Na-acetato, pH 5,0) mediante el uso del procedimiento estándar recomendado por el proveedor. Se usó como ligando el TLT-1 etiquetado con his humano en una concentración de 100 ng/ml. Se usó como analito el FVIIa-Fab1001 en diluciones de dos veces de 29,29 nM a 0,45 nM. El tampón de corrida y de dilución se fabricó de: HEPES 10 mM, NaCl 150 mM, EDTA 3 mM, p20 al 0,005 %, pH 7,4. La regeneración se obtuvo mediante MgCl₂ 3 M. El experimento se corrió a 25 grados Celsius. La determinación de constantes cinéticas y de unión (k_{on} , k_{off} , K_D) se obtuvo al asumir una interacción 1:1 del TLT1 y FVIIa-Fab1001 mediante el uso del programa informático de evaluación Biacore T200 (Tabla 19).

Tabla 19: Unión del FVIIa-Fab1001 al TLT-1

	Ka (1/Ms)	kd (1/s)	KD (M)
Unión del FVIIa-Fab1001 al TLT-1	8,01E+05	3,19E-03	3,99E-09

Conclusión: Se estimaron las constantes de unión para la unión del FVIIa-Fab1001 al TLT-1 mediante análisis de SPR y se confirmó la unión al TLT-1.

Análisis de SPR de la unión del FVIIa-Fab5001 al TLT1. El FVIIa-Fab5001 se une al TLT-1 como se analiza mediante análisis de SPR en un instrumento Biacore T200.

Los materiales usados se muestran en la Tabla 20.

Tabla 20

Reactivo	Fuente
TLT1 humano etiquetado con His	Ejemplo 1
FVIIa-Fab5001	Ejemplo 48
mAb Anti 6X his	R&D núm. MAB050 0,5 mg/ml en PBS
Todos los demás reactivos	Biacore GE Healthcare

Método: Un anticuerpo anti 6Xhis se inmovilizó hasta un nivel de aprox. 9000 RU en un chip CM5 (0,5 mg/ml diluido en Na-acetato, pH 5,0) mediante el uso del procedimiento estándar recomendado por el proveedor. Se usó como ligando el TLT-1 etiquetado con his humano en una concentración de 100 ng/ml. Se usó como analito el FVIIa-Fab5001 en diluciones de dos veces de 15,77 nM a 0,49 nM. El tampón de corrida y de dilución se fabricó de: HEPES 10 mM, NaCl 150 mM, EDTA 3 mM, p20 al 0,005 %, pH 7,4. La regeneración se obtuvo mediante MgCl₂ 3 M. El experimento se corrió a 25 grados Celsius. La determinación de constantes cinéticas y de unión (k_{on} , k_{off} , K_D) se obtuvo al asumir una interacción 1:1 del TLT1 y FVII-fab mediante el uso del programa informático de evaluación Biacore T200 (Tabla 21).

Tabla 21: Unión del FVIIa-Fab5001 al TLT-1

	ka (1/Ms)	kd (1/s)	KD (M)
Unión del FVIIa-Fab5001 al TLT-1	2,384E+05	0,001696	7,11E-09

Conclusión: Se estimaron las constantes de unión para la unión del FVIIa-Fab5001 al TLT-1 mediante análisis de SPR y se confirmó la unión al TLT-1.

Ejemplo 57: Producción recombinante del FVIII humano.

La producción de las variantes del Factor VIII humano como se usa en la presente descripción se ha descrito en la patente número WO2009108806, ejemplo 1.

Resumen

5 La presente invención se refiere a: proteínas procoagulantes que pueden ser, por ejemplo, proteínas de fusión o conjugados químicos; métodos para producir dichas proteínas procoagulantes; polinucleótidos que codifican dichas proteínas de fusión y células que las expresan. Además, la presente invención se refiere a proteínas procoagulantes para su uso como un medicamento. Los individuos que tienen una coagulopatía, tal como la hemofilia A y B con o sin inhibidores, pueden ser tratadas con proteínas procoagulantes de la presente invención.

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Novo Nordisk A/S

5 <120> Direccinamiento de factores de coagulaci3n hacia plaquetas activadas

<130> 8314.204-WO

<160> 182

10 <170> PatentIn versi3n 3.5

<210> 1

<211> 933

15 <212> ADN

<213> homo Sapiens

<400> 1

20 atgggcctca ccctgctctt gctgctgctc ctgggactag aaggtcaggg catagttggc 60

agcctccctg agtgctgca ggcaccctg ggaagctcca tcttggtgca gtgccactac 120

aggctccagg atgtcaaagc tcagaaggtg tgggtccggg tcttgccgga ggggtgccag 180

25 ccctggtgt cctcagctgt ggatcgcaga gctccagcgg gcaggcgtac gtttctcaca 240

gacctgggtg ggggcctgct gcaggtgga atggttacc tgcaggaaga ggatgctggc 300

gagtatggct gcatggtgga tggggccagg gggcccaga tttgacag agtctctctg 360

30 aacatactgc cccagagga agaagaagag acccataaga ttggcagtct ggctgagaac 420

gcattctcag accctgcagg cagtgccaac cctttggaac ccagccagga tgagaagagc 480

35 atccccttga tctgggggtgc tgtgctctctg gtaggtctgc tgggtggcagc ggtggtgctg 540

tttctgtgga tggccaagag gaaacaaggg aacaggcttg gtgtctgtgg ccgattcctg 600

agcagcagag tttcaggcat gaatccctcc tcagtggtcc accacgtcag tgactctgga 660

40 ccggtgctg aattgccttt ggatgtacca cacattaggg ttgactcacc accttcattt 720

gacaatacca cctacaccag cctacctctt gattcccat caggaaaacc ttcactccca 780

45 gctccatcct cattgcccc tctacctct aaggtcctgg tctgctccaa gcctgtgaca 840

tatgccacag taatcttccc gggagggaa aaggtggag ggacctcgtg tgggccagcc 900

50 cagaatccac ctaacaatca gactccatcc agc 933

<210> 2

<211> 311

<212> PRT

55 <213> Homo sapiens

<400> 2

60 Met Gly Leu Thr Leu Leu Leu Leu Leu Leu Gly Leu Glu Gly Gln
1 5 10 15

Gly Ile Val Gly Ser Leu Pro Glu Val Leu Gln Ala Pro Val Gly Ser
20 25 30

65 Ser Ile Leu Val Gln Cys His Tyr Arg Leu Gln Asp Val Lys Ala Gln

ES 2 757 930 T3

			35				40					45				
5	Lys	Val	Trp	Cys	Arg	Phe	Leu	Pro	Glu	Gly	Cys	Gln	Pro	Leu	Val	Ser
	50						55					60				
10	Ser	Ala	Val	Asp	Arg	Arg	Ala	Pro	Ala	Gly	Arg	Arg	Thr	Phe	Leu	Thr
	65					70					75					80
15	Asp	Leu	Gly	Gly	Gly	Leu	Leu	Gln	Val	Glu	Met	Val	Thr	Leu	Gln	Glu
				85						90					95	
20	Glu	Asp	Ala	Gly	Glu	Tyr	Gly	Cys	Met	Val	Asp	Gly	Ala	Arg	Gly	Pro
			100						105					110		
25	Gln	Ile	Leu	His	Arg	Val	Ser	Leu	Asn	Ile	Leu	Pro	Pro	Glu	Glu	Glu
			115					120					125			
30	Glu	Glu	Thr	His	Lys	Ile	Gly	Ser	Leu	Ala	Glu	Asn	Ala	Phe	Ser	Asp
	130						135					140				
35	Pro	Ala	Gly	Ser	Ala	Asn	Pro	Leu	Glu	Pro	Ser	Gln	Asp	Glu	Lys	Ser
	145					150					155					160
40	Ile	Pro	Leu	Ile	Trp	Gly	Ala	Val	Leu	Leu	Val	Gly	Leu	Leu	Val	Ala
				165						170					175	
45	Ala	Val	Val	Leu	Phe	Ala	Val	Met	Ala	Lys	Arg	Lys	Gln	Gly	Asn	Arg
			180						185					190		
50	Leu	Gly	Val	Cys	Gly	Arg	Phe	Leu	Ser	Ser	Arg	Val	Ser	Gly	Met	Asn
			195					200					205			
55	Pro	Ser	Ser	Val	Val	His	His	Val	Ser	Asp	Ser	Gly	Pro	Ala	Ala	Glu
	210						215					220				
60	Leu	Pro	Leu	Asp	Val	Pro	His	Ile	Arg	Leu	Asp	Ser	Pro	Pro	Ser	Phe
	225					230					235					240
65	Asp	Asn	Thr	Thr	Tyr	Thr	Ser	Leu	Pro	Leu	Asp	Ser	Pro	Ser	Gly	Lys
				245						250					255	
70	Pro	Ser	Leu	Pro	Ala	Pro	Ser	Ser	Leu	Pro	Pro	Leu	Pro	Pro	Lys	Val
			260						265					270		
75	Leu	Val	Cys	Ser	Lys	Pro	Val	Thr	Tyr	Ala	Thr	Val	Ile	Phe	Pro	Gly
			275					280					285			
80	Gly	Asn	Lys	Gly	Gly	Gly	Thr	Ser	Cys	Gly	Pro	Ala	Gln	Asn	Pro	Pro
	290						295					300				

ES 2 757 930 T3

Asn Asn Gln Thr Pro Ser Ser
305 310

5 <210> 3
 <211> 528
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> /nota = "dominio extracelular del hTLT-1-His6"

<400> 3
 aagcttgccg ccaccatggg cctcaccctg ctcttgctgc tgctcctggg actagaaggt 60
 15 cagggcatag ttggcagcct cctgaggtg ctgcagggcac ccgtgggaag ctccattctg 120
 gtgcagtgcc actacaggct ccaggatgtc aaagctcaga aggtgtggtg ccggttcttg 180
 20 ccggaggggt gccagcccct ggtgtcctca gctgtggatc gcagagctcc ggcgggcagg 240
 cgtacgtttc tcacagacct ggggtggggc ctgctgcagg tggaaatggt taccctgcag 300
 gaagaggatg ctggcgagta tggctgcatg gtggatgggg ccagggggcc ccagattttg 360
 25 cacagagtct ctctgaacat actgccccca gaggaagaag aagagacca taagattggc 420
 agtctggctg agaacgcatt ctcagacct gcaggcagtg ccaacccttt ggaaccaccg 480
 30 caggatgaga agagcatccc ccaccatcac catcaccatt aagaattc 528

<210> 4
 <211> 168
 35 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> /nota = "dominio extracelular del hTLT-1-His6"

40 <400> 4

Met Gly Leu Thr Leu Leu Leu Leu Leu Leu Leu Gly Leu Glu Gly Gln
 1 5 10 15
 45

Gly Ile Val Gly Ser Leu Pro Glu Val Leu Gln Ala Pro Val Gly Ser
 20 25 30
 50

Ser Ile Leu Val Gln Cys His Tyr Arg Leu Gln Asp Val Lys Ala Gln
 35 40 45
 55

Lys Val Trp Cys Arg Phe Leu Pro Glu Gly Cys Gln Pro Leu Val Ser
 50 55 60
 60

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

Asp Leu Gly Gly Gly Leu Leu Gln Val Glu Met Val Thr Leu Gln Glu
 85 90 95
 65

Glu Asp Ala Gly Glu Tyr Gly Cys Met Val Asp Gly Ala Arg Gly Pro

ES 2 757 930 T3

```

          100              105              110
5      Gln Ile Leu His Arg Val Ser Leu Asn Ile Leu Pro Pro Glu Glu Glu
          115              120              125

      Glu Glu Thr His Lys Ile Gly Ser Leu Ala Glu Asn Ala Phe Ser Asp
          130              135              140
10

      Pro Ala Gly Ser Ala Asn Pro Leu Glu Pro Ser Gln Asp Glu Lys Ser
          145              150              155              160
15

      Ile Pro His His His His His His
          165

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

25      <220>
          <223> /nota = "hTLT-1.20-125"

          <400> 5

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

          Val Gln Cys His Tyr Arg Leu Gln Asp Val Lys Ala Gln Lys Val Trp
          20              25              30
35

          Cys Arg Phe Leu Pro Glu Gly Cys Gln Pro Leu Val Ser Ser Ala Val
          35              40              45
40

          Asp Arg Arg Ala Pro Ala Gly Arg Arg Thr Phe Leu Thr Asp Leu Gly
          50              55              60
45

          Gly Gly Leu Leu Gln Val Glu Met Val Thr Leu Gln Glu Glu Asp Ala
          65              70              75              80
50

          Gly Glu Tyr Gly Cys Met Val Asp Gly Ala Arg Gly Pro Gln Ile Leu
          85              90              95

          His Arg Val Ser Leu Asn Ile Leu Pro Pro
          100              105

          <210> 6
          <211> 147
          <212> PRT
          <213> Secuencia artificial

          <220>
          <223> /nota = "hTLT-1.16-162"
65      <400> 6

```

ES 2 757 930 T3

1 Gln Gly Ile Val Gly Ser Leu Pro Glu Val Leu Gln Ala Pro Val Gly
 5 Ser Ser Ile Leu Val Gln Cys His Tyr Arg Leu Gln Asp Val Lys Ala
 10 Gln Lys Val Trp Cys Arg Phe Leu Pro Glu Gly Cys Gln Pro Leu Val
 15 Ser Ser Ala Val Asp Arg Arg Ala Pro Ala Gly Arg Arg Thr Phe Leu
 20 Thr Asp Leu Gly Gly Gly Leu Leu Gln Val Glu Met Val Thr Leu Gln
 25 Glu Glu Asp Ala Gly Glu Tyr Gly Cys Met Val Asp Gly Ala Arg Gly
 30 Pro Gln Ile Leu His Arg Val Ser Leu Asn Ile Leu Pro Pro Glu Glu
 35 Asp Pro Ala Gly Ser Ala Asn Pro Leu Glu Pro Ser Gln Asp Glu Lys
 40 Ser Ile Pro
 <210> 7
 <211> 37
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 45 <220>
 <223> /nota = "hTLT-1.126-162"
 50 <400> 7
 55 Glu Glu Glu Glu Glu Thr His Lys Ile Gly Ser Leu Ala Glu Asn Ala
 60 Phe Ser Asp Pro Ala Gly Ser Ala Asn Pro Leu Glu Pro Ser Gln Asp
 Glu Lys Ser Ile Pro
 <210> 8
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

ES 2 757 930 T3

<220>
 <223> /nota = "hTLT-1.129-142"

<400> 8

5 Glu Glu Thr His Lys Ile Gly Ser Leu Ala Glu Asn Ala Phe
 1 5 10

10 <210> 9
 <211> 396
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

15 <400> 9
 atgaagttgc ctggtgggct gttggtgctg atgttctgga ttccagcttc cagcagtgat 60
 gttgtgatga cccaaactcc actctccctg cctgtcagtc ttggagatca agcctccatc 120
 20 tcttgcagat ctagtcagag ccttgtacac agaaatggaa acacctattt tcattggtgc 180
 ctgcagaaac caggccagtc tccaaagctc ctgatctaca aagtttccaa ccgattttct 240
 ggggtcccag acaggttcag tggcagtggg tcagggacag atttcacact caagatcagc 300
 25 agagtggagg ctgaggatct gggagtttat ttctgctctc aaagtacaca tgttccgtac 360
 acgttcggag gggggaccaa gctggaata aaacgt 396

30 <210> 10
 <211> 132
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

35 <400> 10
 Met Lys Leu Pro Val Gly Leu Leu Val Leu Met Phe Trp Ile Pro Ala
 1 5 10 15

40 Ser Ser Ser Asp Val Val Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Pro Val
 20 25 30

45 Ser Leu Gly Asp Gln Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu
 35 40 45

50 Val His Arg Asn Gly Asn Thr Tyr Phe His Trp Cys Leu Gln Lys Pro
 50 55 60

55 Gly Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser
 65 70 75 80

Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr
 85 90 95

60 Leu Lys Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Val Tyr Phe Cys
 100 105 110

65 Ser Gln Ser Thr His Val Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu
 115 120 125

ES 2 757 930 T3

Glu Ile Lys Arg
130

5

<210> 11
<211> 396
<212> ADN
10 <213> Homo sapiens

<400> 11
atggatcttg ggctgatttt ttttattggt gctcttttaa aaggggtcca gtgtgagggtg 60

15 aaacttctcg agtctggagg tggcctgggtg cagcctggag gatccctgaa actctcctgt 120

gcagcctcag gattcgattt tagtagatac tggatgactt gggtcctggca ggctccaggg 180

20 aaagggctag aatggattgg agaaattaat ccagatagca gtacgataaa ctatacgcca 240

65 tctctaaagg ataaattcat catctccaga gacaacgcca agaatacgt gtacctgcaa 300

atgagcgaag tgagatctga ggacacagcc ctttattact gtgcaagcgg ggtgtttact 360

25 tcctggggcc aagggactct ggtcactgtc tctgca 396

<210> 12
<211> 132
<212> PRT
30 <213> Homo sapiens

<400> 12

35 Met Asp Phe Gly Leu Ile Phe Phe Ile Val Ala Leu Leu Lys Gly Val
1 5 10 15

40 Gln Cys Glu Val Lys Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro
20 25 30

Gly Gly Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Asp Phe Ser
35 40 45

45 Arg Tyr Trp Met Thr Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu
50 55 60

50 Trp Ile Gly Glu Ile Asn Pro Asp Ser Ser Thr Ile Asn Tyr Thr Pro
65 70 75 80

55 Ser Leu Lys Asp Lys Phe Ile Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr
85 90 95

60 Leu Tyr Leu Gln Met Ser Glu Val Arg Ser Glu Asp Thr Ala Leu Tyr
100 105 110

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

65 Thr Val Ser Ala

ES 2 757 930 T3

130

```

5  <210> 13
   <211> 1377
   <212> ADN
   <213> Secuencia artificial

10 <220>
   <223> /nota = "HC del mAb 0012"

   <400> 13
   atggattttg ggctgatttt ttttattggt gctcttttaa aaggggtcca gtgtgaggtg      60
15 aaacttctcg agtctggagg tggcctgggtg cagcctggag gatccctgaa actctcctgt      120
   gcagcctcag gattcgattt tagtagatac tggatgactt gggtcgggca ggctccaggg      180
20 aaagggctag aatggattgg agaaattaat ccagatagca gtacgataaa ctatacgcca      240
   tctctaaagg ataaattcat catctccaga gacaacgcca agaatacgct gtacctgcaa      300
   atgagcgaag tgagatctga ggacacagcc ctttattact gtgcaagcgg ggtgtttact      360
25 tcctggggcc aagggactct ggtcactgtc tctgcagcta gcaccaaggg cccatccgtc      420
   ttccccctgg cgccctgctc caggagcacc tccgagagca cagccgccct gggctgcctg      480
   gtcaaggact acttccccga accggtgacg gtgtcgtgga actcaggcgc cctgaccagc      540
30 ggcgtgcaca ctttccccgc tgtcctacag tcctcaggac tctactccct cagcagcgtg      600
   gtgaccgtgc cctccagcag cttgggcacg aagacctaca cctgcaacgt agatcacaag      660
35 cccagcaaca ccaaggtgga caagagagtt gagtccaaat atggtcccc atgccacca      720
   tgcccagcac ctgagttcct ggggggacca tcagtcttcc tgttcccccc aaaacccaag      780
   gacactctca tgatctcccg gaccctgag gtcacgtgcg tggtggtgga cgtgagccag      840
40 gaagaccccg aggtccagtt caactggtag gtggatggcg tggaggtgca taatgccaa      900
   acaaagccgc gggaggagca gttcaacagc acgtaccgtg tggtcagcgt cctcacccgc      960
45 ctgcaccagg actggctgaa cggcaaggag tacaagtgca aggtctccaa caaaggcctc      1020
   ccgtcctcca tcgagaaaac catctccaaa gccaaagggc agccccgaga gccacaggtg      1080
   tacaccctgc cccatoccca ggaggagatg accaagaacc aggtcagcct gacctgcctg      1140
50 gtcaaaggct tctaccccag cgacatcgcc gtggagtggg agagcaatgg gcagccggag      1200
   aacaactaca agaccacgcc tcccgtgctg gactccgacg gtccttctt cctctacagc      1260
55 aggctaaccg tggacaagag caggtggcag gaggggaatg tcttctcatg ctccgtgatg      1320
   catgaggctc tgcacaacca ctacacacag aagagcctct ccctgtctct gggtaaa      1377

60 <210> 14
   <211> 714
   <212> ADN
   <213> Secuencia artificial

65 <220>
   <223> /nota = "LC del mAb 0012, LC del Fab 0012"

```

ES 2 757 930 T3

```

<400> 14
atgaagttgc ctgttgggct gttggtgctg atgttctgga ttccagcttc cagcagtgat      60
gttgtgatga cccaaactcc actctccctg cctgtcagtc ttggagatca agcctccatc      120
5 tcttgcagat ctagtccagag ccttgtacac agaaatggaa acacctattt tcattggtgc      180
ctgcagaaac caggccagtc tccaaagctc ctgatctaca aagtttccaa ccgattttct      240
10 ggggtcccag acaggttcag tggcagtgga tcagggacag atttcacact caagatcagc      300
agagtggagg ctgaggatct gggagtttat ttctgctctc aaagtacaca tgttccgtac      360
15 acgttcggag gggggaccaa gctggaaata aaacgtacgg tggctgcacc atctgtcttc      420
atcttcccgc catctgatga gcagttgaaa tctggaactg cctctgttgt gtgcctgctg      480
aataacttct atcccagaga ggccaaagta cagtggaagg tggataacgc cctccaatcg      540
20 ggtaactccc aggagagtgt cacagagcag gacagcaagg acagcaccta cagcctcagc      600
agcaccctga cgctgagcaa agcagactac gagaaacaca aagtctacgc ctgcgaagtc      660
25 acccatcagg gcctgagctc gcccgtcaca aagagcttca acaggggaga gtgt      714

<210> 15
<211> 1401
<212> ADN
30 <213> Secuencia artificial

<220>
<223> /nota = "HC del mAb 0023"

35 <400> 15
atgaacttgg ggctcagctt gattttcctt gtccttgttt taaaagggtg ccagtgtgaa      60
gtgaggctgg tggagtctgg gggaggctta gtgcagcctg gagggtccct gaaactctcc      120
40 tgtgcaacct ctggattcac tttcagtgac tatttcatgt attggattcg ccagactcca      180
gagaagaggc tggagtgggt cgcatacatt agtaatggtg gtgatagcag ctcttatcca      240
45 gacactgtaa agggccgatt caccatctcc agagacaatg ccaagaacac cctgtacctg      300
caaatgagcc gtctgaagtc tgaggacaca gccatgtatt attgtgcaac aaataaaaac      360
tgggacgatt actatgatat ggactactgg ggtcaaggaa cctcagtcac cgtctcctca      420
50 gctagcacca agggcccatc cgtcttcccc ctggcgccct gctccaggag cacctccgag      480
agcacagccg ccctgggctg cctggtcaag gactacttcc ccgaaccggt gacggtgtcg      540
55 tggaaactcag gcgccctgac cagcggcgtg cacaccttcc cggctgtcct acagtctca      600
ggactctact ccctcagcag cgtggtgacc gtgccctcca gcagcttggg cacgaagacc      660
tacacctgca acgtagatca caagcccagc aacaccaagg tggacaagag agttgagtcc      720
60 aaatatggtc cccatgccc accatgccc gcacctgagt tcctgggggg accatcagtc      780
ttctgttcc cccaaaacc caaggacact ctcatgatct cccggacccc tgaggtcacg      840
tgcgtggtgg tggacgtgag ccaggaagac cccgaggtcc agttcaactg gtacgtggat      900
65 ggcgtggagg tgcataatgc caagacaaag ccgcgggagg agcagttcaa cagcacgtac      960

```

ES 2 757 930 T3

```

cgtgtgggtca ggcctcctcac cgtcctgcac caggactggc tgaacggcaa ggagtacaag      1020
tgcaagggtct ccaacaaagg cctcccgtcc tccatcgaga aaaccatctc caaagccaaa      1080
5  gggcagcccc gagagccaca ggtgtacacc ctgcccccat cccaggagga gatgaccaag      1140
aaccagggtca gcctgacctg cctgggtcaaa ggcttctacc ccagcgacat cgccgtggag      1200
10  tgggagagca atgggcagcc ggagaacaac tacaagacca cgcctcccgt gctggactcc      1260
gacggctcct tcttctctca cagcaggcta accgtggaca agagcagggtg gcaggagggg      1320
aatgtcttct catgctccgt gatgcatgag gctctgcaca accactacac acagaagagc      1380
15  ctctccctgt ctctgggtaa a                                     1401

<210> 16
<211> 717
20  <212> ADN
    <213> Secuencia artificial

<220>
<223> /nota = "LC del mAb 0023"
25

<400> 16
atggattcac aggcccagg tcttatattg ctgctgctat gggtatctgg ttcctgtggg      60
gacattgtgg tgtcacagtc tccatcctcc ctggctgtgt cagcaggaga gaaggctact      120
30  atgagttgca aatccagtca gagtctgctc aacagtagaa cccgaaagaa ctacttggct      180
tggtagcagc agaaaccagg gcagtctcct aaactgctga tctactgggc atccactagg      240
35  gaatctgggg tcctgatcg cttcacaggg agtggatctg ggacagattt cactctcacc      300
atcagcagtg tgcaggctga agacctggca gtttattact gcaagcaatc ttataatctg      360
40  ctcacgttcg gtgctgggac caagctggag ctgaaacgta cggtagctgc accatctgtc      420
ttcatcttcc cgccatctga tgagcagttg aaatctggaa ctgcctctgt tgtgtgacct      480
ctgaataact tctatcccag agaggccaaa gtacagtgga aggtggataa cgcctccaa      540
45  tcgggtaact cccaggagag tgtcacagag caggacagca aggacagcac ctacagcctc      600
agcagcacc cagcagctgag caaagcagac tacgagaaac acaaagtcta cgctgcgaa      660
50  gtcacccatc agggcctgag ctgcccgtc acaaagagct tcaacagggg agagtgt 717

<210> 17
<211> 1401
55  <212> ADN
    <213> Secuencia artificial

<220>
<223> /nota = "HC del mAb 0051"
60

<400> 17
atgggttggg gctgtatcat cttctttctg gtagcaacag ctacaggtgt gcactcccag      60
gtccagctgg agcagtctgg ggctgagctg gtgaggcctg gggctctcagt gaagatttcc      120
65  tgcaagggtt ctggctacac attcactgat tattctatgc actgggtgaa gcagagtcac      180
gcaaagagtc tagagtggat tggagttatt agtacttact atggtgatgt taggtacaac      240

```

ES 2 757 930 T3

cagaagttca agggcaaggc cacaatgact gtagacaaat cctccagcac agcctatatg 300

5 gcacttgcca gactgacatc tgaggattct gccatctatt actgtgcaag agcccctatg 360

attacgacag gggcctggtt tgcttactgg ggccaagggg ctctggtcac tgtctctgca 420

gctagcacca agggcccatc cgtcttcccc ctggcgccct gctccaggag cacctccgag 480

10 agcacagccg ccctgggctg cctgggcaag gactacttcc ccgaaccggg gacgggtgctg 540

tggaactcag gcgccctgac cagcggcggtg cacaccttcc cggctgtcct acagtccctca 600

15 ggactctact ccctcagcag cgtggtgacc gtgccctcca gcagcttggg cacgaagacc 660

tacacctgca acgtagatca caagcccagc aacaccaagg tggacaagag agttgagtcc 720

aaatatggtc ccccatgccc accatgcccc gcacctgagt tcctgggggg accatcagtc 780

20 ttctgttcc ccccaaaacc caaggacact ctcatgatct cccggacccc tgaggtcacg 840

tgcgtgggtg tggacgtgag ccaggaagac cccgaggtcc agttcaactg gtacgtggat 900

25 ggcgtggagg tgcataatgc caagacaaag ccgcgggagg agcagttcaa cagcacgtac 960

cgtgtgggtca gcgtcctcac cgtcctgcac caggactggc tgaacggcaa ggagtacaag 1020

tgcaaggtct ccaacaaagg cctcccgtcc tccatcgaga aaaccatctc caaagccaaa 1080

30 gggcagcccc gagagccaca ggtgtacacc ctgcccccat ccaggagga gatgaccaag 1140

aaccaggtca gcctgacctg cctgggcaaa ggcttctacc ccagcgacat cgccgtggag 1200

35 tgggagagca atgggcagcc ggagaacaac tacaagacca cgcctcccgt gctggactcc 1260

gacggctcct tcttctcta cagcaggcta accgtggaca agagcaggtg gcaggagggg 1320

aatgtcttct catgctccgt gatgcatgag gctctgcaca accactacac acagaagagc 1380

40 ctctccctgt ctctgggtaa a 1401

<210> 18

45 <211> 702

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

50 <223> /nota = "LC del mAb 0051"

<400> 18

atgaagtcac agaccaggt cttcgtatct ctactgctct gtgtgtctgg tgctcatggg 60

55 agtattgtga tgaccagac tcccaaatc ctgcttgat cagcaggaga cagggttacc 120

ataacctgca aggccagtca gagtgtgagt aatgatgtag cttggtacca acagaagcca 180

gggcagtctc ctaaactgct gataaactat gcatccagtc gctacactgg aatccctgat 240

60 cgcttcaactg gcagtgagata tgggacggat ttcactttca ccatcagcac tgtgcaggct 300

gaagacctgg cagtttattt ctgtcagcag gattatagct ctccgtacac gttcggaggg 360

65 gggaccaagc tggaaataga acgtacgggtg gctgcacat ctgtcttcat cttcccgcc 420

tctgatgagc agttgaaatc tggaaactgcc tctgtgtgtg gctgtgtaa taacttctat 480

ES 2 757 930 T3

```

cccagagagg ccaaagtaca gtggaagggtg gataacgccc tccaatcggg taactcccag      540
gagagtgtca cagagcagga cagcaaggac agcacctaca gcctcagcag caccctgacg      600
5  ctgagcaaag cagactacga gaaacacaaa gtctacgcct gcgaagtcac ccatcagggc      660
ctgagctcgc ccgtcacaaa gagcttcaac aggggagagt gt                                702

10 <210> 19
    <211> 1404
    <212> ADN
    <213> Secuencia artificial

15 <220>
    <223> /nota = "HC del mAb 0052"

    <400> 19
20 atggaatgga cctgggtcct tctcttctc ctgtcagtaa ctgcagggtg ccattcccag      60
gtccagctgc agcagtctgg agctgagccg atgaagcctg gggcctcagt gaagatatcc      120
tgcaaggcta ctggctacac atttagtagt cactggatag agtggataaa acagaggcct      180
25 ggacatggcc ttgagtggat tggagagatt ttacctggaa gtggaaatac taattacaat      240
gagaaattca agggcaaggc cacattcact gcagatacat cctccaacac agcctacatg      300
caactcagca gcctgacatc tgaggactct gccgtctatt gctgtgcaag agggctactac      360
30 ggtcttaact acgactggta tttcgatgtc tggggcgag ggaccacggg caccgtctcc      420
tcagctagca ccaagggccc atccgtcttc ccctggcgc cctgctccag gagcacctcc      480
35 gagagcacag ccgccctggg ctgcctggtc aaggactact tccccgaacc ggtgacgggtg      540
tcgtggaact caggcgcctt gaccagcggc gtgcacacct tcccggctgt cctacagtcc      600
tcaggactct actccctcag cagcgtggtg accgtgcctt ccagcagctt gggcacgaag      660
40 acctacacct gcaacgtaga tcacaagccc agcaaaccca aggtggacaa gagagttgag      720
tccaaatatg gtccccatg cccaccatgc ccagcacctg agttcctggg gggaccatca      780
45 gtcttctgt tcccccaaa acccaaggac actctcatga tctcccggac ccctgaggtc      840
acgtgcgtgg tggaggactg gagccaggaa gaccccgagg tccagttcaa ctggtacgtg      900
gatggcgtgg aggtgcataa tgccaagaca aagccgcggg aggagcagtt caacagcacg      960
50 taccgtgtgg tcagcgtcct caccgtcctg caccaggact ggctgaacgg caaggagtac      1020
aagtgcaagg tctccaaca aggcctccc tctccatcg agaaaacat ctccaagcc      1080
55 aaagggcagc cccgagagcc acaggtgtac accctgcccc catcccagga ggagatgacc      1140
aagaaccagg tcagcctgac ctgcctggtc aaaggcttct accccagcga catcgccgtg      1200
gagtgggaga gcaatgggca gccggagaac aactacaaga ccacgcctcc cgtgctggac      1260
60 tccgacggct ccttcttct ctacagcagg ctaaccgtgg acaagagcag gtggcaggag      1320
gggaatgtct tctcatgctc cgtgatgcat gaggctctgc acaaccacta cacacagaag      1380
65 agcctctccc tgtctctggg taaa                                                1404

```

ES 2 757 930 T3

```

<210> 20
<211> 1404
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

5
<220>
<223> /nota = "HC del mAb 0062"

<400> 20
10 atggaatgga cctgggtcct tctcttctc ctgtcagtaa ctgcaggtgt ccattcccag 60
gtccagctgc agcagtctgg agctgagccg atgaagcctg gggcctcagt gaagatatcc 120
tgcaaggcta ctggctacac atttagtagt cactggatag agtggataaa acagaggcct 180
15 ggacatggcc ttgagtggat tggagagatt ttacctggaa gtggaaatac taattacaat 240
gagaaattca agggcaaggc cacattcact gcagatacat cctccaacac agcctacatg 300
20 caactcagca gcctgacatc tgaggactct gccgtctatt actgtgcaag aggttactac 360
ggctttaact acgactggta tttcgatgtc tggggcgcag ggaccaaggc caccgtctcc 420
25 tcagctagca ccaagggccc atccgtcttc ccctggcgc cctgctccag gagcacctcc 480
gagagcacag ccgccctggg ctgcctggtc aaggactact tccccgaacc ggtgacgggtg 540
tcgtggaact caggcgcctt gaccagcggc gtgcacacct tccccgctgt cctacagtcc 600
30 tcaggactct actccctcag cagcgtgggtg accgtgcctt ccagcagctt gggcacgaag 660
acctacacct gcaacgtaga tcacaagccc agcaacacca aggtggacaa gagagttgag 720
35 tccaaatatg gtccccatg cccaccatgc ccagcacctg agttcctggg gggaccatca 780
gtcttctgt tcccccaaa acccaaggac actctcatga tctcccgac ccctgaggtc 840
acgtgcgtgg tgggtggcgt gagccaggaa gaccccgagg tccagttcaa ctggtacgtg 900
40 gatggcgtgg aggtgcataa tgccaagaca aagccgcggg aggagcagtt caacagcacg 960
taccgtgtgg tcagctctc caccgtctc caccaggact ggctgaacgg caaggagtac 1020
45 aagtgcaagg tctccaacaa aggcctcccg tcttccatcg agaaaacat ctccaaagcc 1080
aaagggcagc cccgagagcc acaggtgtac accctgcccc catcccagga ggagatgacc 1140
aagaaccagg tcagcctgac ctgcctggtc aaaggcttct accccagcga catcgccgtg 1200
50 gagtgggaga gcaatgggca gccggagaac aactacaaga ccacgcctcc cgtgctggac 1260
tccgacggct ccttcttct ctacagcagg ctaaccgtgg acaagagcag gtggcaggag 1320
55 gggaatgtct tctcatgctc cgtgatgcat gaggtctctc acaaccacta cacacagaag 1380
agcctctccc tgtctctggg taaa 1404

<210> 21
60 <211> 702
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
65 <223> /nota = "LC del mAb 0052, LC del mAb 0062"

<400> 21

```

ES 2 757 930 T3

```

atgatgtcct ctgctcagtt ccttgggtctc ctgttgctct gttttcaagg taccagatgt      60
gatatccaga tgacacagac tacatcctcc ctgtctgctt ctctgggaga cagagtcacc      120
5  attagttgca gggcaagtca ggacattagc aattatntaa actggtatca gcagaaacca      180
gatggaactg ttaaactcct tatcttctac acatcaagat tacactcagg agtcccgtca      240
10  aggttcagtg gcagtgggtc tgggacagat tattctctca ccattagcaa cctggaaccg      300
gaagatattg ccacttacta ttgccaacag gataactaagc ttccgtacac gttcggaggg      360
gggaccaaac tggagatgaa acgtacggtg gctgcacat ctgtcttcat cttcccgcc      420
15  tctgatgagc agttgaaatc tggaaactgcc tctgttgtgt gcctgctgaa taacttctat      480
cccagagagg ccaaagtaca gtggaagggtg gataacgccc tccaatcggg taactcccag      540
gagagtgtca cagagcagga cagcaaggac agcacctaca gcctcagcag caccctgacg      600
20  ctgagcaaag cagactacga gaaacacaaa gtctacgctt gcgaagtcac ccatcagggc      660
ctgagctcgc ccgtcacaaa gagcttcaac aggggagagt gt                                702
25
<210> 22
<211> 1377
<212> ADN
<213> Secuencia artificial
30
<220>
<223> /nota = "HC del mAb 0061"
<400> 22
35  atggatcttg ggctgatttt ttttattggt gctcttttaa aaggggtcca gtgtgaggtg      60
aaacttctcg agtctggagg tggcctgggtg cagcctggag gatccctgaa actctcctgt      120
gcagcctcag gattcgattt tagtagatac tggatgactt gggtcgggca ggctccaggg      180
40  aaagggctag aatggattgg agaaattaat ccagatagca gtacgataaa ctataacca      240
tctctaaagg ataaattcat catctccaga gacaacgcca agaatacgtt gtacctgcaa      300
45  atgagcgaag tgagatctga ggacacagcc ctttattact gtgcaagcgg ggtgtttact      360
tcttggggcc aagggactct ggtcactgtc tctgcagcta gcaccaaggg cccatccgtc      420
ttcccctgg cgcctgctc caggagcacc tccgagagca cagccgccct gggctgctg      480
50  gtcaaggact acttccccga accggtgacg gtgtcgtgga actcaggcgc cctgaccagc      540
ggcgtgcaca ccttcccggc tgtcctacag tcctcaggac tctactcctt cagcagcgtg      600
55  gtgaccgtgc cctccagcag cttgggcacg aagacctaca cctgcaacgt agatcacaag      660
cccagcaaca ccaagggtga caagagagtt gagtccaaat atggtcccc atgccacca      720
tgcccagcac ctgagttcct ggggggacca tcagtcttcc tgttcccccc aaaacccaag      780
60  gacactctca tgatctccc gaccctgag gtcacgtgcg tgggtgggga cgtgagccag      840
gaagacccc aggtccagtt caactggtac gtggatggcg tggaggtgca taatgccaag      900
65  acaaagccgc gggaggagca gttcaacagc acgtaccgtg tggtcagcgt cctcaccgtc      960
ctgcaccagg actggctgaa cggcaaggag tacaagtgca aggtctccaa caaaggcctc     1020

```

ES 2 757 930 T3

ccgtcctcca tcgagaaaac catctccaaa gccaaagggc agccccgaga gccacaggtg 1080
 5 tacaccctgc ccccatocca ggaggagatg accaagaacc aggtcagcct gacctgcctg 1140
 gtcaaaggct tctaccccag cgacatcgcc gtggagtggg agagcaatgg gcagccggag 1200
 aacaactaca agaccacgcc tcccgtgctg gactccgacg gtcctttctt cctctacagc 1260
 10 aggctaaccg tggacaagag caggtggcag gaggggaatg tcttctcatg ctccgtgatg 1320
 catgaggctc tgcacaacca ctacacacag aagagcctct ccctgtctct gggtaaa 1377
 15 <210> 23
 <211> 1377
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 20 <220>
 <223> /nota = "HC del mAb 0082"
 <400> 23
 25 atggatTTTT ggctgatttt ttttattggt gctcttttaa aaggggtcca gtgtgaggtg 60
 aaacttctcg agtctggagg tggcctggtg cagcctggag gatccctgaa actctcctgt 120
 gcagcctcag gattcgattt tagtagatac tggatgactt gggtcgggca ggctccaggg 180
 30 aaagggctag aatggattgg agaaattaat ccagatagca gtacgataaa ctatgcgcca 240
 tctctaaagg ataaattcat catctccaga gacaacgcc aagaatacgt gtacctgcaa 300
 atgagcgaag tgagatctga ggacacagcc ctttattact gtgcaagcgg ggtgtttact 360
 35 tcctggggcc aagggactct ggtaactgtc tctgcagcta gcaccaaggg cccatccgtc 420
 ttccccctgg cggcctgctc caggagcacc tccgagagca cagccgcctt gggctgctg 480
 40 gtcaaggact acttccccga accggtgacg gtgtcgtgga actcaggcgc cctgaccagc 540
 ggcgtgcaca ccttccggc tgtcctacag tcctcaggac tctactcctt cagcagcgtg 600
 gtgaccgtgc cctccagcag cttgggcacg aagacctaca cctgcaacgt agatcacaag 660
 45 cccagcaaca ccaagggtga caagagagt gagtccaaat atgggtcccc atgcccacca 720
 tgcccagcac ctgagttcct ggggggacca tcagtcttcc tgttcccccc aaaacccaag 780
 50 gacactctca tgatctcccg gaccctgag gtcacgtgcg tggtggtgga cgtgagccag 840
 gaagaccccg aggtccagtt caactggtac gtggatggcg tggaggtgca taatgccaag 900
 acaaagccgc gggaggagca gttcaacagc acgtaccgtg tggtcagcgt cctcaccgtc 960
 55 ctgcaccagg actggctgaa cggcaaggag tacaagtgca aggtctccaa caaaggcctc 1020
 ccgtcctcca tcgagaaaac catctccaaa gccaaagggc agccccgaga gccacaggtg 1080
 60 tacaccctgc ccccatocca ggaggagatg accaagaacc aggtcagcct gacctgcctg 1140
 gtcaaaggct tctaccccag cgacatcgcc gtggagtggg agagcaatgg gcagccggag 1200
 aacaactaca agaccacgcc tcccgtgctg gactccgacg gtcctttctt cctctacagc 1260
 65 aggctaaccg tggacaagag caggtggcag gaggggaatg tcttctcatg ctccgtgatg 1320

ES 2 757 930 T3

catgaggctc tgcacaacca ctacacacag aagagcctct cctgtctctt gggtaaa 1377

5 <210> 24
 <211> 714
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> /nota = "LC del mAb 0061, LC del Fab 0061, LC del mAb 0082, LC del Fab 0082"

<400> 24
 atgaagttag ctgttgggct gttggtgctg atgttctgga ttccagcttc cagcagtgat 60

15 gttgtgatga cccaaactcc actctccctg cctgtcagtc ttggagatca agcctccatc 120
 tcttgcagat ctagtccagag cctgttacac agaaatggaa acacctatct tcattggggc 180
 ctgcagaaac caggccagtc tccaaagctc ctgatctaca aagtttcaa ccgattttct 240

20 ggggtcccag acaggttcag tggcagtgga tcagggacag atttcacact caagatcagc 300
 agagtggagg ctgaggatct gggagtttat ttctgctctc aaagtacaca tgttccgtac 360

25 acgttcggag gggggaccaa gctggaaata aacgtacgg tggctgcacc atctgtcttc 420
 atcttcccgc catctgatga gcagttgaaa tctggaactg cctctgttgt gtgcctgctg 480
 aataacttct atcccagaga ggccaaagta cagtggaagg tggataacgc cctccaatcg 540

30 ggtaactccc aggagagtgt cacagagcag gacagcaagg acagcaccta cagcctcagc 600
 agcaccctga cgctgagcaa agcagactac gagaaacaca aagtctacgc ctgcgaagtc 660

35 acccatcagg gcctgagctc gcccgtcaca aagagcttca acaggggaga gtgt 714

40 <210> 25
 <211> 699
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> /nota = "VH-CH1 del Fab 0012"

45 <400> 25
 atggatcttg ggctgatttt ttttattggt gctcttttaa aaggggtcca gtgtgaggtg 60
 aaacttctcg agtctggagg tggcctggtg cagcctggag gatccctgaa actctcctgt 120

50 gcagcctcag gattcgattt tagtagatac tggatgactt gggtcaggca ggctccaggg 180
 aaagggctag aatggattgg agaaattaat ccagatagca gtacgataaa ctatacgcca 240

55 tctctaaagg ataaattcat catctccaga gacaacgcca agaatacgtt gtacctgcaa 300
 atgagcgaag tgagatctga ggacacagcc ctttattact gtgcaagcgg ggtgtttact 360
 tcctggggcc aagggactct ggtcactgtc tctgcagcta gcaccaaggg cccatccgtc 420

60 tccccctgg cgcctgctc caggagcacc tccgagagca cagccgcctt gggctgctg 480
 gtcaaggact acttccccga accggtgacg gtgtcgtgga actcaggcgc cctgaccagc 540

65 ggcgtgcaca ccttccggc tgtcctacag tcctcaggac tctactcctt cagcagcgtg 600
 gtgaccgtgc cctccagcag cttgggcacg aagacctaca cctgcaacgt agatcacaag 660

ES 2 757 930 T3

cccagcaaca ccaaggtgga caagagagtt gagtccaaa 699

```

5  <210> 26
   <211> 723
   <212> ADN
   <213> Secuencia artificial

10 <220>
   <223> /nota = "VH-CH1 del Fab 0023"

   <400> 26
15 atgaacttgg ggctcagctt gattttcctt gtccttgttt taaaagggtg ccagtgtgaa      60
   gtgaggctgg tggagtctgg gggaggctta gtgcagcctg gagggtccct gaaactctcc      120
   tgtgcaacct ctggattcac tttcagtgac tatttcatgt attggattcg ccagactcca      180
20 gagaagagggc tggagtgggt cgcatacatt agtaatgggtg gtgatagcag ctcttatcca      240
   gacactgtaa agggccgatt caccatctcc agagacaatg ccaagaacac cctgtacctg      300
   caaatgagcc gtctgaagtc tgaggacaca gccatgtatt attgtgcaac aaataaaaac      360
25 tgggacgatt actatgatat ggactactgg ggtcaaggaa cctcagtcac cgtctcctca      420
   gctagcacca agggcccata cgtcttcccc ctggcgccct gctccaggag cacctccgag      480
30 agcacagccg ccctgggctg cctgggtaag gactacttcc ccgaaccggg gacggtgtcg      540
   tggaaactcag gcgccctgac cagcggcgtg cacaccttcc cggctgtcct acagtctca      600
   ggactctact ccctcagcag cgtggtgacc gtgccctcca gcagcttggg cacgaagacc      660
35 tacacctgca acgtagatca caagcccagc aacaccaagg tggacaagag agttgagtcc      720
   aaa                                                                                   723

40
   <210> 27
   <211> 723
   <212> ADN
   <213> Secuencia artificial

45 <220>
   <223> /nota = "VH-CH1 del Fab 0051"

   <400> 27
50 atgggttggg gctgtatcat cttctttctg gtagcaacag ctacagggtg gactcccag      60
   gtccagctgg agcagtctgg ggctgagctg gtgaggcctg gggctctcagt gaagatttcc      120
   tgcaagggtt ctggctacac attcactgat tattctatgc actgggtgaa gcagagtcat      180
55 gcaaagagtc tagagtggat tggagttatt agtacttact atggtgatgt taggtacaac      240
   cagaagttca agggcaaggc cacaatgact gtagacaaat cctccagcac agcctatatg      300
60 gcaacttgcca gactgacata tgaggattct gccatctatt actgtgcaag agcccctatg      360
   attacgacag gggcctgggt tgcttactgg ggccaagga ctctggtcac tgtctctgca      420
   gctagcacca agggcccata cgtcttcccc ctggcgccct gctccaggag cacctccgag      480
65 agcacagccg ccctgggctg cctgggtaag gactacttcc ccgaaccggg gacggtgtcg      540

```

ES 2 757 930 T3

```

tggaaactcag gcgccctgac cagcggcgtg cacaccttcc eggctgtcct acagtccctca      600
ggactctact ccctcagcag cgtggtgacc gtgccctcca gcagcttggg cacgaagacc      660
5  tacacctgca acgtagatca caagcccagc aacaccaagg tggacaagag agttgagtcc      720
aaa                                                                                          723

10 <210> 28
    <211> 726
    <212> ADN
    <213> Secuencia artificial

15 <220>
    <223> /nota = "VH-CH1 del Fab 0052"

    <400> 28
20 atggaatgga cctgggtcct tctcttctc ctgtcagtaa ctgcaggtgt ccattcccag      60
   gtccagctgc agcagtctgg agctgagccg atgaagcctg gggcctcagt gaagatatcc      120
   tgcaaggcta ctggctacac atttagtagt cactggatag agtggataaa acagaggcct      180
25 ggacatggcc ttgagtggat tggagagatt ttacctggaa gtggaaatac taattacaat      240
   gagaaattca agggcaaggc cacattcact gcagatacat cctccaacac agcctacatg      300
   caactcagca gcctgacatc tgaggactct gccgtctatt gctgtgcaag agggctactac      360
30 ggtcttaact acgactggta tttcgatgtc tggggcgcag ggaccacggg caccgtctcc      420
   tcagctagca ccaagggccc atccgtcttc ccctggcgc cctgctccag gagcacctcc      480
35 gagagcacag ccgccctggg ctgcctggtc aaggactact tccccgaacc ggtgacgggtg      540
   tcgtggaact caggcgcctt gaccagcggc gtgcacacct tcccggctgt cctacagtcc      600
   tcaggactct actccctcag cagcgtgggtg accgtgcctt ccagcagctt gggcacgaag      660
40 acctacacct gcaacgtaga tcacaagccc agcaacacca aggtggacaa gagagttgag      720
   tccaaa                                                                                          726

45 <210> 29
    <211> 699
    <212> ADN
    <213> Secuencia artificial

50 <220>
    <223> /nota = "VH-CH1 del Fab 0061"

    <400> 29
55 atggatdddg ggctgatttt ttttattggt gctcttttaa aaggggtcca gtgtgaggtg      60
   aaacttctcg agtctggagg tggcctgggt cagcctggag gatccctgaa actctcctgt      120
   gcagcctcag gattcgattt tagtagatac tggatgactt gggtcgggca ggctccaggg      180
60 aaagggctag aatggattgg agaaattaat ccagatagca gtacgataaa ctataaccca      240
   tctctaaagg ataaattcat catctccaga gacaacgcca agaatacgct gtacctgcaa      300
65 atgagcgaag tgagatctga ggacacagcc ctttattact gtgcaagcgg ggtgtttact      360
   tcctggggcc aagggactct ggctactgtc tctgcagcta gcaccaaggg cccatccgct      420

```

ES 2 757 930 T3

```

ttccccctgg cgcctgctc caggagcacc tccgagagca cagccgcctt gggctgctg      480
5  gtcaaggact acttccccga accggtgacg gtgtcgtgga actcaggcgc cctgaccagc      540
   ggcgtgcaca ccttcccggc tgtcctacag tcctcaggac tctactocct cagcagcgtg      600
   gtgaccgtgc cctccagcag cttgggcacg aagacctaca cctgcaacgt agatcacaag      660
10  cccagcaaca ccaaggtgga caagagagtt gagtccaaa                          699

<210> 30
<211> 699
15  <212> ADN
   <213> Secuencia artificial

<220>
20  <223> /nota = "VH-CH1 del Fab 0082"

<400> 30
   atggattttg ggctgatttt ttttattggt gctcttttaa aaggggtcca gtgtgaggtg      60
25  aaacttctcg agtctggagg tggcctggtg cagcctggag gatccctgaa actctcctgt      120
   gcagcctcag gattcgattt tagtagatac tggatgactt gggtcgggca ggctccaggg      180
   aaagggctag aatggattgg agaaattaat ccagatagca gtacgataaa ctatgcgcca      240
30  tctctaaagg ataaattcat catctccaga gacaacgcca agaatacgtt gtacctgcaa      300
   atgagcgaag tgagatctga ggacacagcc ctttattact gtgcaagcgg ggtgtttact      360
   tcctggggcc aagggactct ggtcactgtc tctgcagcta gcaccaaggg cccatccgtc      420
35  ttccccctgg cgcctgctc caggagcacc tccgagagca cagccgcctt gggctgctg      480
   gtcaaggact acttccccga accggtgacg gtgtcgtgga actcaggcgc cctgaccagc      540
40  ggcgtgcaca ccttcccggc tgtcctacag tcctcaggac tctactocct cagcagcgtg      600
   gtgaccgtgc cctccagcag cttgggcacg aagacctaca cctgcaacgt agatcacaag      660
45  cccagcaaca ccaaggtgga caagagagtt gagtccaaa                          699

<210> 31
<211> 741
50  <212> ADN
   <213> Secuencia artificial

<220>
55  <223> /nota = "bisagra-CH2-CH3 del hlgG4"

<400> 31
   atggattttg ggctgatttt ttttattggt gctcttttaa aaggggtcca gtgtgagtcc      60
   aaatatggtc ccccatgccc accatgccc aacactgagt tcctgggggg accatcagtc      120
60  ttctgtttcc ccccaaaacc caaggacact ctcatgatct cccggacccc tgaggtcacg      180
   tgcgtggtgg tggacgtgag ccaggaagac cccgaggtcc agttcaactg gtacgtggat      240
   ggcgtggagg tgcataatgc caagacaaag ccgcgggagg agcagttcaa cagcacgtac      300
65  cgtgtggtca gcgtcctcac cgtcctgcac caggactggc tgaacggcaa ggagtacaag      360

```

ES 2 757 930 T3

```

tgcaaggctct ccaacaaaagg cctcccgtcc tccatcgaga aaaccatctc caaagccaaa      420
gggcagcccc gagagccaca ggtgtacacc ctgccccat cccaggagga gatgaccaag      480
5 aaccaggctca gcttgacctg cctggtcaaa ggtttctacc ccagcgacat cgccgtggag      540
tgggagagca atgggcagcc ggagaacaac tacaagacca cgctcccgt gctggactcc      600
gacggctcct tcttcctcta cagcaggcta accgtggaca agagcagggtg gcaggagggg      660
10 aatgtcttct catgctccgt gatgcatgag gctctgcaca accactacac acagaagagc      720
ctctccctgt ctctgggtaa a                                                    741

15 <210> 32
    <211> 459
    <212> PRT
    <213> Secuencia artificial

20 <220>
    <223> /nota = "mAb 0012, HC (VH de ratón-CH1-CH2-CH3 de IgG4 humana)"

25 <400> 32
Met Asp Phe Gly Leu Ile Phe Phe Ile Val Ala Leu Leu Lys Gly Val
1          5          10          15

30 Gln Cys Glu Val Lys Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro
          20          25          30

35 Gly Gly Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Asp Phe Ser
          35          40          45

40 Arg Tyr Trp Met Thr Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu
          50          55          60

45 Trp Ile Gly Glu Ile Asn Pro Asp Ser Ser Thr Ile Asn Tyr Thr Pro
65          70          75          80

50 Ser Leu Lys Asp Lys Phe Ile Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr
          85          90          95

55 Leu Tyr Leu Gln Met Ser Glu Val Arg Ser Glu Asp Thr Ala Leu Tyr
          100          105          110

60 Tyr Cys Ala Ser Gly Val Phe Thr Ser Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val
          115          120          125

65 Thr Val Ser Ala Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala
          130          135          140

70 Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu
145          150          155          160

75 Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly
          165          170          175

```

ES 2 757 930 T3

5 Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser
180 185 190

10 Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu
195 200 205

15 Gly Thr Lys Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn Thr
210 215 220

20 Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro
225 230 235 240

25 Cys Pro Ala Pro Glu Phe Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro
245 250 255

30 Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr
260 265 270

35 Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn
275 280 285

40 Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg
290 295 300

45 Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val
305 310 315 320

50 Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser
325 330 335

55 Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys
340 345 350

60 Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu
355 360 365

65 Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe
370 375 380

70 Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu
385 390 395 400

75 Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe
405 410 415

80 Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly
420 425 430

85 Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr

ES 2 757 930 T3

435 440 445

5 Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys
450 455

10 <210> 33
<211> 238
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

15 <220>
<223> /nota = "mAb 0012, LC (VL de ratón - CL Kappa humana); Fab 0012, LC
(VL de ratón - CL Kappa humana)"

20 <400> 33

Met Lys Leu Pro Val Gly Leu Leu Val Leu Met Phe Trp Ile Pro Ala
1 5 10 15

25 Ser Ser Ser Asp Val Val Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Pro Val
20 25 30

30 Ser Leu Gly Asp Gln Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu
35 40 45

35 Val His Arg Asn Gly Asn Thr Tyr Phe His Trp Cys Leu Gln Lys Pro
50 55 60

40 Gly Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser
65 70 75 80

45 Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr
85 90 95

50 Leu Lys Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Val Tyr Phe Cys
100 105 110

55 Ser Gln Ser Thr His Val Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu
115 120 125

60 Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro
130 135 140

65 Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu
145 150 155 160

70 Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn
165 170 175

75 Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser
180 185 190

80 Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala

ES 2 757 930 T3

	195	200	205
5	Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly 210	215	220
10	Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys 225	230	235
15	<210> 34 <211> 467 <212> PRT <213> Secuencia artificial		
20	<220> <223> /nota = "mAb 0023, HC (VH de ratón-CH1-CH2-CH3 de IgG4 humana)" <400> 34		
25	Met Asn Leu Gly Leu Ser Leu Ile Phe Leu Val Leu Val Leu Lys Gly 1	5	10 15
30	Val Gln Cys Glu Val Arg Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln 20	25	30
35	Pro Gly Gly Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Thr Ser Gly Phe Thr Phe 35	40	45
40	Ser Asp Tyr Phe Met Tyr Trp Ile Arg Gln Thr Pro Glu Lys Arg Leu 50	55	60
45	Glu Trp Val Ala Tyr Ile Ser Asn Gly Gly Asp Ser Ser Ser Tyr Pro 65	70	75 80
50	Asp Thr Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn 85	90	95
55	Thr Leu Tyr Leu Gln Met Ser Arg Leu Lys Ser Glu Asp Thr Ala Met 100	105	110
60	Tyr Tyr Cys Ala Thr Asn Lys Asn Trp Asp Asp Tyr Tyr Asp Met Asp 115	120	125
65	Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys 130	135	140
70	Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu 145	150	155 160
75	Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro 165	170	175
80	Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr 180	185	190

ES 2 757 930 T3

5 Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val
 195 200 205
 Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr Tyr Thr Cys Asn
 210 215 220
 10 Val Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Ser
 225 230 235 240
 15 Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Phe Leu Gly
 245 250 255
 20 Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met
 260 265 270
 25 Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln
 275 280 285
 Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val
 290 295 300
 30 His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr
 305 310 315 320
 35 Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly
 325 330 335
 40 Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile
 340 345 350
 45 Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val
 355 360 365
 Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser
 370 375 380
 50 Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu
 385 390 395 400
 55 Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro
 405 410 415
 60 Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val
 420 425 430
 65 Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met
 435 440 445
 His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser

ES 2 757 930 T3

	195	200	205
5	Ala Asp Tyr Glu Lys His 210	Lys Val Tyr Ala Cys 215	Glu Val Thr His Gln 220
10	Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys 225	230	235
15	<210> 36 <211> 467 <212> PRT <213> Secuencia artificial <220> <223> /nota = "mAb 0051, HC (VH de ratón-CH1-CH2-CH3 de IgG4 humana)"		
20	<400> 36		
25	Met Gly Trp Ser Cys Ile Ile Phe Phe Leu Val Ala Thr Ala Thr Gly 1	5	10 15
30	Val His Ser Gln Val Gln Leu Glu Gln Ser Gly Ala Glu Leu Val Arg 20	25	30
35	Pro Gly Val Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Gly Ser Gly Tyr Thr Phe 35	40	45
40	Thr Asp Tyr Ser Met His Trp Val Lys Gln Ser His Ala Lys Ser Leu 50	55	60
45	Glu Trp Ile Gly Val Ile Ser Thr Tyr Tyr Gly Asp Val Arg Tyr Asn 65	70	75 80
50	Gln Lys Phe Lys Gly Lys Ala Thr Met Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser 85	90	95
55	Thr Ala Tyr Met Ala Leu Ala Arg Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Ile 100	105	110
60	Tyr Tyr Cys Ala Arg Ala Pro Met Ile Thr Thr Gly Ala Trp Phe Ala 115	120	125
65	Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ala Ala Ser Thr Lys 130	135	140
70	Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu 145	150	155 160
75	Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro 165	170	175
80	Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr 180	185	190

ES 2 757 930 T3

5 Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val
 195 200 205
 Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr Tyr Thr Cys Asn
 210 215 220
 10 Val Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Ser
 225 230 235 240
 15 Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Phe Leu Gly
 245 250 255
 20 Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met
 260 265 270
 25 Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln
 275 280 285
 Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val
 290 295 300
 30 His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr
 305 310 315 320
 35 Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly
 325 330 335
 40 Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile
 340 345 350
 45 Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val
 355 360 365
 Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser
 370 375 380
 50 Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu
 385 390 395 400
 55 Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro
 405 410 415
 60 Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val
 420 425 430
 65 Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met
 435 440 445
 His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser

ES 2 757 930 T3

	195	200	205
5	His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro 210 215 220		
10	Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys 225 230		
15	<210> 38 <211> 468 <212> PRT <213> Secuencia artificial		
20	<220> <223> /nota = "mAb 0052, HC (VH de ratón-CH1-CH2-CH3 de IgG4 humana)" <400> 38		
25	Met Glu Trp Thr Trp Val Phe Leu Phe Leu Leu Ser Val Thr Ala Gly 1 5 10 15		
30	Val His Ser Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Pro Met Lys 20 25 30		
35	Pro Gly Ala Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Thr Gly Tyr Thr Phe 35 40 45		
40	Ser Ser His Trp Ile Glu Trp Ile Lys Gln Arg Pro Gly His Gly Leu 50 55 60		
45	Glu Trp Ile Gly Glu Ile Leu Pro Gly Ser Gly Asn Thr Asn Tyr Asn 65 70 75 80		
50	Glu Lys Phe Lys Gly Lys Ala Thr Phe Thr Ala Asp Thr Ser Ser Asn 85 90 95		
55	Thr Ala Tyr Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val 100 105 110		
60	Tyr Cys Cys Ala Arg Gly Tyr Tyr Gly Leu Asn Tyr Asp Trp Tyr Phe 115 120 125		
65	Asp Val Trp Gly Ala Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr 130 135 140		
70	Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser 145 150 155 160		
75	Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu 165 170 175		
80	Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His 180 185 190		

ES 2 757 930 T3

5 Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser
 195 200 205
 Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr Tyr Thr Cys
 210 215 220
 10 Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu
 225 230 235 240
 15 Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Phe Leu
 245 250 255
 20 Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu
 260 265 270
 25 Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser
 275 280 285
 Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu
 290 295 300
 30 Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr
 305 310 315 320
 35 Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn
 325 330 335
 40 Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser
 340 345 350
 45 Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln
 355 360 365
 Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val
 370 375 380
 50 Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val
 385 390 395 400
 55 Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro
 405 410 415
 60 Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr
 420 425 430
 Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val
 435 440 445
 65 Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu

ES 2 757 930 T3

	195	200	205
5	His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro 210 215 220		
10	Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys 225 230		
15	<210> 40 <211> 459 <212> PRT <213> Secuencia artificial		
20	<220> <223> /nota = "mAb 0061, HC (VH de ratón-CH1-CH2-CH3 de IgG4 humana)" <400> 40		
25	Met Asp Phe Gly Leu Ile Phe Phe Ile Val Ala Leu Leu Lys Gly Val 1 5 10 15		
30	Gln Cys Glu Val Lys Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro 20 25 30		
35	Gly Gly Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Asp Phe Ser 35 40 45		
40	Arg Tyr Trp Met Thr Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu 50 55 60		
45	Trp Ile Gly Glu Ile Asn Pro Asp Ser Ser Thr Ile Asn Tyr Asn Pro 65 70 75 80		
50	Ser Leu Lys Asp Lys Phe Ile Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr 85 90 95		
55	Leu Tyr Leu Gln Met Ser Glu Val Arg Ser Glu Asp Thr Ala Leu Tyr 100 105 110		
60	Tyr Cys Ala Ser Gly Val Phe Thr Ser Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val 115 120 125		
65	Thr Val Ser Ala Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala 130 135 140		
70	Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu 145 150 155 160		
75	Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly 165 170 175		
80	Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser 180 185 190		

ES 2 757 930 T3

5 Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu
 195 200 205
 10 Gly Thr Lys Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn Thr
 210 215 220
 15 Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro
 225 230 235 240
 20 Cys Pro Ala Pro Glu Phe Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro
 245 250 255
 25 Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr
 260 265 270
 30 Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn
 275 280 285
 35 Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg
 290 295 300
 40 Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val
 305 310 315 320
 45 Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser
 325 330 335
 50 Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys
 340 345 350
 55 Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu
 355 360 365
 60 Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe
 370 375 380
 65 Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu
 385 390 395 400
 70 Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe
 405 410 415
 75 Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly
 420 425 430
 80 Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr
 435 440 445
 85 Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys

ES 2 757 930 T3

450

455

5 <210> 41
 <211> 238
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

 10 <220>
 <223> /nota = "mAb 0061, LC (VL de ratón - CL Kappa humana); Fab 0061, LC
 (VL de ratón - CL Kappa humana); mAb 0082, LC (VL de ratón - CL Kappa humana);
 Fab 0082, LC (VL de ratón - CL Kappa humana)"

 15 <400> 41
 Met Lys Leu Pro Val Gly Leu Leu Val Leu Met Phe Trp Ile Pro Ala
 1 5 10 15

 20 Ser Ser Ser Asp Val Val Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Pro Val
 20 25 30

 25 Ser Leu Gly Asp Gln Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu
 35 40 45

 30 Val His Arg Asn Gly Asn Thr Tyr Phe His Trp Ala Leu Gln Lys Pro
 50 55 60

 Gly Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser
 65 70 75 80

 35 Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr
 85 90 95

 40 Leu Lys Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Val Tyr Phe Cys
 100 105 110

 45 Ser Gln Ser Thr His Val Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu
 115 120 125

 50 Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro
 130 135 140

 Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu
 145 150 155 160

 55 Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn
 165 170 175

 60 Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser
 180 185 190

 65 Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala
 195 200 205

ES 2 757 930 T3

Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly
 210 215 220

5 Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 225 230 235

<210> 42
 <211> 468
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> /nota = "mAb 0062, HC (VH de ratón-CH1-CH2-CH3 de IgG4 humana)"

<400> 42

20 Met Glu Trp Thr Trp Val Phe Leu Phe Leu Leu Ser Val Thr Ala Gly
 1 5 10 15

25 Val His Ser Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Pro Met Lys
 20 25 30

30 Pro Gly Ala Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Thr Gly Tyr Thr Phe
 35 40 45

35 Ser Ser His Trp Ile Glu Trp Ile Lys Gln Arg Pro Gly His Gly Leu
 50 55 60

40 Glu Trp Ile Gly Glu Ile Leu Pro Gly Ser Gly Asn Thr Asn Tyr Asn
 65 70 75 80

45 Thr Ala Tyr Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val
 100 105 110

50 Tyr Tyr Cys Ala Arg Gly Tyr Tyr Gly Leu Asn Tyr Asp Trp Tyr Phe
 115 120 125

55 Asp Val Trp Gly Ala Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr
 130 135 140

60 Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser
 145 150 155 160

65 Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu
 165 170 175

70 Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His
 180 185 190

75 Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser

ES 2 757 930 T3

		195						200							205			
5	Val	Val	Thr	Val	Pro	Ser	Ser	Ser	Leu	Gly	Thr	Lys	Thr	Tyr	Thr	Cys		
		210					215					220						
10	Asn	Val	Asp	His	Lys	Pro	Ser	Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys	Arg	Val	Glu		
	225					230					235					240		
15	Ser	Lys	Tyr	Gly	Pro	Pro	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu	Phe	Leu		
					245					250					255			
20	Gly	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu		
				260					265					270				
25	Met	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser		
			275					280						285				
30	Gln	Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Gln	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu		
		290					295					300						
35	Val	His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Phe	Asn	Ser	Thr		
	305					310					315					320		
40	Tyr	Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu	His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn		
					325					330					335			
45	Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Gly	Leu	Pro	Ser	Ser		
				340					345					350				
50	Ile	Glu	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln		
			355					360						365				
55	Val	Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro	Ser	Gln	Glu	Glu	Met	Thr	Lys	Asn	Gln	Val		
		370					375					380						
60	Ser	Leu	Thr	Cys	Leu	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	Val		
	385					390					395					400		
65	Glu	Trp	Glu	Ser	Asn	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn	Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro		
					405					410					415			
70	Pro	Val	Leu	Asp	Ser	Asp	Gly	Ser	Phe	Phe	Leu	Tyr	Ser	Arg	Leu	Thr		
			420						425					430				
75	Val	Asp	Lys	Ser	Arg	Trp	Gln	Glu	Gly	Asn	Val	Phe	Ser	Cys	Ser	Val		
			435					440					445					
80	Met	His	Glu	Ala	Leu	His	Asn	His	Tyr	Thr	Gln	Lys	Ser	Leu	Ser	Leu		
		450					455					460						

ES 2 757 930 T3

Ser Leu Gly Lys
465

5 <210> 43
<211> 459
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

10 <220>
<223> /nota = "mAb 0082, HC (VH de ratón-CH1-CH2-CH3 de IgG4 humana)"
<400> 43

15 Met Asp Phe Gly Leu Ile Phe Phe Ile Val Ala Leu Leu Lys Gly Val
1 5 10 15

20 Gln Cys Glu Val Lys Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro
20 25 30

25 Gly Gly Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Asp Phe Ser
35 40 45

30 Arg Tyr Trp Met Thr Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu
50 55 60

35 Trp Ile Gly Glu Ile Asn Pro Asp Ser Ser Thr Ile Asn Tyr Ala Pro
65 70 75 80

40 Ser Leu Lys Asp Lys Phe Ile Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr
85 90 95

45 Leu Tyr Leu Gln Met Ser Glu Val Arg Ser Glu Asp Thr Ala Leu Tyr
100 105 110

50 Tyr Cys Ala Ser Gly Val Phe Thr Ser Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val
115 120 125

55 Thr Val Ser Ala Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala
130 135 140

60 Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu
145 150 155 160

65 Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly
165 170 175

70 Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser
180 185 190

75 Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu
195 200 205

80 Gly Thr Lys Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn Thr

ES 2 757 930 T3

	210		215		220														
5	Lys	Val	Asp	Lys	Arg	Val	Glu	Ser	Lys	Tyr	Gly	Pro	Pro	Cys	Pro	Pro			
	225					230					235					240			
10	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu	Phe	Leu	Gly	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro			
					245					250					255				
15	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr			
				260					265					270					
20	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	Gln	Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Gln	Phe	Asn			
		275						280					285						
25	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg			
		290					295					300							
30	Glu	Glu	Gln	Phe	Asn	Ser	Thr	Tyr	Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val			
	305					310					315					320			
35	Leu	His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser			
				325						330					335				
40	Asn	Lys	Gly	Leu	Pro	Ser	Ser	Ile	Glu	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys			
				340					345					350					
45	Gly	Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro	Ser	Gln	Glu			
			355					360					365						
50	Glu	Met	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser	Leu	Thr	Cys	Leu	Val	Lys	Gly	Phe			
		370					375					380							
55	Tyr	Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	Val	Glu	Trp	Glu	Ser	Asn	Gly	Gln	Pro	Glu			
	385					390				395						400			
60	Asn	Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro	Pro	Val	Leu	Asp	Ser	Asp	Gly	Ser	Phe			
					405					410					415				
65	Phe	Leu	Tyr	Ser	Arg	Leu	Thr	Val	Asp	Lys	Ser	Arg	Trp	Gln	Glu	Gly			
				420					425					430					
70	Asn	Val	Phe	Ser	Cys	Ser	Val	Met	His	Glu	Ala	Leu	His	Asn	His	Tyr			
			435					440					445						
75	Thr	Gln	Lys	Ser	Leu	Ser	Leu	Ser	Leu	Gly	Lys								
		450					455												
80	<210>	44																	
85	<211>	233																	
90	<212>	PRT																	
95	<213>	Secuencia artificial																	

ES 2 757 930 T3

<220>

<223> /nota = "Fab 0012, VH de ratón - CH1 de IgG4 humana"

5 <400> 44

Met Asp Phe Gly Leu Ile Phe Phe Ile Val Ala Leu Leu Lys Gly Val
1 5 10 15

10

Gln Cys Glu Val Lys Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro
20 25 30

15

Gly Gly Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Asp Phe Ser
35 40 45

20

Arg Tyr Trp Met Thr Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu
50 55 60

25

Trp Ile Gly Glu Ile Asn Pro Asp Ser Ser Thr Ile Asn Tyr Thr Pro
65 70 75 80

30

Ser Leu Lys Asp Lys Phe Ile Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr
85 90 95

35

Leu Tyr Leu Gln Met Ser Glu Val Arg Ser Glu Asp Thr Ala Leu Tyr
100 105 110

40

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

45

Thr Val Ser Ala Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala
130 135 140

50

Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu
145 150 155 160

55

Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly
165 170 175

60

Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser
180 185 190

65

Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu
195 200 205

Gly Thr Lys Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn Thr
210 215 220

Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Ser Lys
225 230

<210> 45

ES 2 757 930 T3

<211> 241
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

5 <220>
 <223> /nota = "Fab 0023, VH de ratón - CH1 de IgG4 humana"
 <400> 45

10 Met Asn Leu Gly Leu Ser Leu Ile Phe Leu Val Leu Val Leu Lys Gly
 1 5 10 15

15 Val Gln Cys Glu Val Arg Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln
 20 25 30

20 Pro Gly Gly Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Thr Ser Gly Phe Thr Phe
 35 40 45

25 Ser Asp Tyr Phe Met Tyr Trp Ile Arg Gln Thr Pro Glu Lys Arg Leu
 50 55 60

30 Glu Trp Val Ala Tyr Ile Ser Asn Gly Gly Asp Ser Ser Ser Tyr Pro
 65 70 75 80

35 Asp Thr Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn
 85 90 95

40 Thr Leu Tyr Leu Gln Met Ser Arg Leu Lys Ser Glu Asp Thr Ala Met
 100 105 110

45 Tyr Tyr Cys Ala Thr Asn Lys Asn Trp Asp Asp Tyr Tyr Asp Met Asp
 115 120 125

50 Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys
 130 135 140

55 Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu
 145 150 155 160

60 Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro
 165 170 175

65 Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr
 180 185 190

70 Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val
 195 200 205

75 Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr Tyr Thr Cys Asn
 210 215 220

80 Val Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Ser
 225 230 235 240

ES 2 757 930 T3

Lys

5

<210> 46
 <211> 241
 <212> PRT

10 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> /nota = "Fab 0051, VH de ratón - CH1 de IgG4 humana"

15 <400> 46

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

20

Val His Ser Gln Val Gln Leu Glu Gln Ser Gly Ala Glu Leu Val Arg
 20 25 30

25

Pro Gly Val Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Gly Ser Gly Tyr Thr Phe
 35 40 45

30

Thr Asp Tyr Ser Met His Trp Val Lys Gln Ser His Ala Lys Ser Leu
 50 55 60

35

Glu Trp Ile Gly Val Ile Ser Thr Tyr Tyr Gly Asp Val Arg Tyr Asn
 65 70 75 80

Gln Lys Phe Lys Gly Lys Ala Thr Met Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser
 85 90 95

40

Thr Ala Tyr Met Ala Leu Ala Arg Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Ile
 100 105 110

45

Tyr Tyr Cys Ala Arg Ala Pro Met Ile Thr Thr Gly Ala Trp Phe Ala
 115 120 125

50

Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ala Ala Ser Thr Lys
 130 135 140

55

Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu
 145 150 155 160

Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro
 165 170 175

60

Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr
 180 185 190

65

Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val
 195 200 205

ES 2 757 930 T3

Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr Tyr Thr Cys Asn
 210 215 220

5

Val Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Ser 225 230
 235 240 Lys

10

<210> 47
 <211> 242
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

15

<220>
 <223> /nota = "Fab 0052, VH de ratón - CH1 de IgG4 humana"
 <400> 47

20

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

25

Val His Ser Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Pro Met Lys
 20 25 30

30

Pro Gly Ala Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Thr Gly Tyr Thr Phe
 35 40 45

35

Ser Ser His Trp Ile Glu Trp Ile Lys Gln Arg Pro Gly His Gly Leu
 50 55 60

40

Glu Trp Ile Gly Glu Ile Leu Pro Gly Ser Gly Asn Thr Asn Tyr Asn
 65 70 75 80

45

Glu Lys Phe Lys Gly Lys Ala Thr Phe Thr Ala Asp Thr Ser Ser Asn
 85 90 95

50

Thr Ala Tyr Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val
 100 105 110

55

Tyr Cys Cys Ala Arg Gly Tyr Tyr Gly Leu Asn Tyr Asp Trp Tyr Phe
 115 120 125

60

Asp Val Trp Gly Ala Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr
 130 135 140

65

Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser
 145 150 155 160

Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu
 165 170 175

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

ES 2 757 930 T3

Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser
 195 200 205

5 Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr Tyr Thr Cys
 210 215 220

10 Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu
 225 230 235 240 Ser Lys

15 <210> 48
 <211> 233
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <223> /nota = "Fab 0082, VH de ratón - CH1 de IgG4 humana"
 <400> 48

25 Met Asp Phe Gly Leu Ile Phe Phe Ile Val Ala Leu Leu Lys Gly Val
 1 5 10 15

30 Gln Cys Glu Val Lys Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro
 20 25 30

35 Gly Gly Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Asp Phe Ser
 35 40 45

40 Arg Tyr Trp Met Thr Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu
 50 55 60

45 Trp Ile Gly Glu Ile Asn Pro Asp Ser Ser Thr Ile Asn Tyr Ala Pro
 65 70 75 80

50 Ser Leu Lys Asp Lys Phe Ile Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr
 85 90 95

55 Leu Tyr Leu Gln Met Ser Glu Val Arg Ser Glu Asp Thr Ala Leu Tyr
 100 105 110

60 Tyr Cys Ala Ser Gly Val Phe Thr Ser Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val
 115 120 125

65 Thr Val Ser Ala Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala
 130 135 140

70 Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu
 145 150 155 160

75 Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly
 165 170 175

ES 2 757 930 T3

Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser
180 185 190

5 Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu
195 200 205

10 Gly Thr Lys Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn Thr
210 215 220

Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Ser Lys
225 230

15

<210> 49
<211> 7
<212> PRT
20 <213> Secuencia artificial

<220>
<223> /nota = "enlazador, L2"

25 <400> 49

Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
1 5

30

<210> 50
<211> 12
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

35

<220>
<223> /nota = "enlazador, L3"

<400> 50

40

Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
1 5 10

45

<210> 51
<211> 17
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

50

<220>
<223> /nota = "enlazador, L4a"

<400> 51

55

Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly
1 5 10 15

Ser

60

<210> 52
<211> 17
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

65

<220>
<223> /nota = "enlazador, L4b"

ES 2 757 930 T3

<400> 52

5 Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
 1 5 10 15
 Ser

10 <210> 53
 <211> 22
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

15 <220>
 <223> /nota = "enlazador, L5"

<400> 53

20 Gly Gly Gly Gly Ser Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Gly
 1 5 10 15

25 Ser Gly Gly Gly Gly Ser
 20

30 <210> 54
 <211> 27
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> /nota = "enlazador, L6"

35 <400> 54

40 Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Gly Ser Gly Ser Gly Gly Gly Gly
 1 5 10 15

45 Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
 20 25

50 <210> 55
 <211> 32
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> /nota = "enlazador, L7"

<400> 55

55 Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
 1 5 10 15

60 Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
 20 25 30

65 <210> 56
 <211> 37
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

ES 2 757 930 T3

<220>
 <223> /nota = "enlazador, L8"

5 <400> 56

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
 1 5 10 15

10 Gly Gly Gly Ser Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
 20 25 30

15 Gly Gly Gly Gly Ser
 35

<210> 57
 <211> 42
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> /nota = "enlazador, L9"

<400> 57

20 Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
 1 5 10 15

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
 20 25 30

35 Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
 35 40

40 <210> 58
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

45 <220>
 <223> /nota = "enlazador, L10"

<400> 58

50 Tyr Gly Pro Pro Ser Pro Ser Ser Pro Ala Pro Glu Phe Leu Gly Gly
 1 5 10 15

55 <210> 59
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

60 <220>
 <223> /nota = "Etiqueta de purificación, etiqueta HPC4"

<400> 59

65 Glu Asp Gln Val Asp Pro Arg Leu Ile Asp Gly Lys
 1 5 10

ES 2 757 930 T3

```

5    <210> 60
    <211> 28
    <212> ADN
    <213> Secuencia artificial

    <220>
    <223> /nota = "cebador núm. 50"

10   <400> 60
    caacacttac ttgtcctggg tcctgcag                28

15   <210> 61
    <211> 28
    <212> ADN
    <213> Secuencia artificial

    <220>
20   <223> /nota = "cebador núm. 51"

    <400> 61
    ctgcaggaac caggacaagt aagtgttg                28

25   <210> 62
    <211> 36
    <212> ADN
    <213> Secuencia artificial

30   <220>
    <223> /nota = "cebador núm. 69"

    <400> 62
35   gctctagact aacctcatt cctgttgaag ctcttg                36

    <210> 63
    <211> 39
40   <212> ADN
    <213> Secuencia artificial

    <220>
    <223> /nota = "cebador núm. 98"

45   <400> 63
    tttaaagaat tcctaacct ctcccctggt gaagctctt                39

50   <210> 64
    <211> 39
    <212> ADN
    <213> Secuencia artificial

55   <220>
    <223> /nota = "cebador núm. 100"

    <400> 64
60   tttaaagaat tctcatttac ccagagacag ggagaggct                39

    <210> 65
    <211> 21
    <212> ADN
65   <213> Secuencia artificial

    <220>

```

ES 2 757 930 T3

<223> /nota = "cebador núm. 312"
 <400> 65
 gtctaccaca acacacgtga c 21
 5

<210> 66
 <211> 27
 <212> ADN
 10 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> /nota = "cebador núm. 339"
 15 <400> 66
 actggatggt ggaagatgg atacagt 27

<210> 67
 20 <211> 27
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 25 <223> /nota = "cebador núm. 341"
 <400> 67
 agatccaggg gctagcggat agacaga 27

30
 <210> 68
 <211> 30
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

35 <220>
 <223> /nota = "cebador núm. 348"
 <400> 68
 40 ggagctggtg gtggcatctc aggacctttg 30

<210> 69
 <211> 30
 45 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> /nota = "cebador núm. 347"
 50 <400> 69
 cctgtaggac cagagggctc caaggacact 30

55 <210> 70
 <211> 48
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

60 <220>
 <223> /nota = "cebador núm. 448"
 <400> 70
 65 tttaaaaagc ttgccgccac catggagacc cctgcctggc cccgggctc 48

<210> 71

ES 2 757 930 T3

```

<211> 48
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

5 <220>
  <223> /nota = "cebador núm. 449"

  <400> 71
10 tttaaagaat tcctattctc taaattcccc tttctcctgg cccataca 48

  <210> 72
  <211> 75
  <212> ADN
15 <213> Secuencia artificial

  <220>
  <223> /nota = "cebador núm. 466"

20 <400> 72
  ggaggtggcg ggtctggtgg cgggggatca ggcgggggag gttcctcagg cactacaaat 60
  actgtggcag catat 75

25
  <210> 73
  <211> 75
  <212> ADN
  <213> Secuencia artificial
30
  <220>
  <223> /nota = "cebador núm. 467"

  <400> 73
35 ggaacctccc cgcctgatc ccccgccacc agaccgcga cctccttctc taaattcccc 60
  tttctcctgg cccat 75

40
  <210> 74
  <211> 65
  <212> ADN
  <213> Secuencia artificial

45
  <220>
  <223> /nota = "cebador núm. 483"

  <400> 74
50 aaatttaagc ttactagtcc tgcaggttta aacgaatttg gatccggagg tggcgggtct 60
  ggtgg 65

  <210> 75
55 <211> 48
  <212> ADN
  <213> Secuencia artificial

  <220>
60 <223> /nota = "cebador núm. 484"

  <400> 75
  gaatttagcg gccggaatt cggatccgga acctccccg cctgatcc 48

65
  <210> 76
  <211> 81

```

ES 2 757 930 T3

```

<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
5 <223> /nota = "cebador núm. 485"

<400> 76
aaatttgaat tcttacttgc cgtcgatcag tctgggggtcc acctggctct cacactctcc      60
10 cctgttgaag ctctttgtga c                                             81

<210> 77
<211> 30
15 <212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
20 <223> /nota = "cebador núm. 486"

<400> 77
acggatctct agcaagcttc gtacgggtggc                                         30

25 <210> 78
<211> 81
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

30 <220>
<223> /nota = "cebador núm. 487"

<400> 78
35 aaatttgaat tcttacttgc cgtcgatcag tctgggggtcc acctggctct ctttggactc      60
aactctcttg tccaccttgg t                                             81

40 <210> 79
<211> 45
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

45 <220>
<223> /nota = "cebador núm. 488"

<400> 79
aaatttgaat tcttatttgg actcaactct cttgtccacc ttggt                         45

50 <210> 80
<211> 30
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

55 <220>
<223> /nota = "cebador núm. 489"

<400> 80
60 acggatctct agcaagcttg ctagcaccaa                                         30

<210> 81
<211> 54
65 <212> ADN
<213> Secuencia artificial

```

ES 2 757 930 T3

```

<220>
<223> /nota = "cebador núm. 490"

<400> 81
5 aaatttaagc ttgccgccac catggatttt gggetgattt tttttattgt tgct 54

<210> 82
<211> 45
10 <212> ADN
    <213> Secuencia artificial

<220>
<223> /nota = "cebador núm. 491"
15
<400> 82
    aaatttgcta gctgcagaga cagtgaccag agtcccttgg ccca 45

20 <210> 83
    <211> 51
    <212> ADN
    <213> Secuencia artificial

25 <220>
<223> /nota = "cebador núm. 492"

<400> 83
30 aaatttaagc ttgccgccac catgaagtca cagaccagg tcttcgtatt t 51

<210> 84
<211> 51
<212> ADN
35 <213> Secuencia artificial

<220>
<223> /nota = "cebador núm. 493"
40 <400> 84
    aaatttaagc ttgccgccac catgaagttg cctgttgggc tgttggtgct g 51

<210> 85
<211> 38
45 <212> ADN
    <213> Secuencia artificial

<220>
50 <223> /nota = "cebador núm. 494"

<400> 85
    aaatttcgta cgttctatth ccagcttggg cccccctc 38

55 <210> 86
    <211> 42
    <212> ADN
    <213> Secuencia artificial

60 <220>
<223> /nota = "cebador núm. 495"

<400> 86
65 aaatttcgta cgttttattt ccagcttggg cccccctccg aa 42

```

ES 2 757 930 T3

<210> 87
 <211> 69
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 5
 <220>
 <223> /nota = "cebador núm. 512"
 <400> 87
 10 aaatttgat ccgaggtgaa acttctogag tctggaggtg gcctggtgca gcctggaggt 60
 tccctgaaa 69
 15 <210> 88
 <211> 36
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 20 <220>
 <223> /nota = "cebador núm. 513"
 <400> 88
 25 tttaaaggat tctttaccca gagacagga gaggt 36
 <210> 89
 <211> 42
 <212> ADN
 30 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> /nota = "cebador núm. 514"
 35 <400> 89
 aaatttgat ccttgact caactctctt gtccacctg gt 42
 40 <210> 90
 <211> 54
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 45 <220>
 <223> /nota = "cebador núm. 546"
 <400> 90
 aaatttaagc ttgccgccac catgaacttg gggtcagct tgattttcct tgtc 54
 50 <210> 91
 <211> 42
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 55 <220>
 <223> /nota = "cebador núm. 547"
 <400> 91
 60 aaatttgcta gctgaggaga cggtgactga gggtccttga cc 42
 <210> 92
 <211> 54
 <212> ADN
 65 <213> Secuencia artificial

ES 2 757 930 T3

```

<220>
<223> /nota = "cebador núm. 548"

<400> 92
5 aaatttaagc ttgccgccac catggattca caggcccagg ttcttatatt gctg 54

<210> 93
<211> 42
10 <212> ADN
    <213> Secuencia artificial

<220>
<223> /nota = "cebador núm. 549"
15
<400> 93
    aaatttoga cgtttcagct ccagcttggc cccagcaccg aa 42

20 <210> 94
    <211> 48
    <212> ADN
    <213> Secuencia artificial

25 <220>
<223> /nota = "cebador núm. 551"

<400> 94
30 aaatttaaat ttggatccga tgttgtgatg acccaaactc cactctcc 48

<210> 95
<211> 42
<212> ADN
35 <213> Secuencia artificial

<220>
<223> /nota = "cebador núm. 552"
40 <400> 95
    aaatttaaat ttggatccac actctcccct gttgaagctc tt 42

<210> 96
<211> 54
45 <212> ADN
    <213> Secuencia artificial

<220>
50 <223> /nota = "cebador núm. 572"

<400> 96
    aaatttaagc ttgccgccac catggatttt gggctgattt tttttattgt tgct 54

55 <210> 97
    <211> 49
    <212> ADN
    <213> Secuencia artificial

60 <220>
<223> /nota = "cebador núm. 574"

<400> 97
65 aaatttaagc ttgccgccac catgaagttg cctgttgggc tgttgggtgc 49

```

ES 2 757 930 T3

```

<210> 98
<211> 84
<212> ADN
<213> Secuencia artificial
5
<220>
<223> /nota = "cebador núm. 583"

<400> 98
10 aaatttgat ccggaacctc cccgcctga tccccgccca ccagaccgc cacctccaca 60
ctctccctg ttgaagctct ttgt 84

15 <210> 99
<211> 99
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

20 <220>
<223> /nota = "cebador núm. 584"

<400> 99
25 aaatttgat ccagaccgc cacctccgga acctccccg cctgatccc cgccaccaga 60
cccgccact ccactctc cctgttgaa gctctttgt 99

30 <210> 100
<211> 69
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
35 <223> /nota = "cebador núm. 585"

<400> 100
aaatttgat cctgatccc cgccaccaga cccgccact ccactctc cctgttgaa 60
40 gctctttgt 69

<210> 101
<211> 69
45 <212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
50 <223> /nota = "cebador núm. 586"

<400> 101
aaatttgat ccggtggcgg gggatcaggc gggggaggtt cctcaggcac taaaatact 60
gtggcagca 69
55

<210> 102
<211> 87
<212> ADN
60 <213> Secuencia artificial

<220>
<223> /nota = "cebador núm. 587"

65 <400> 102
aaatttgat ccggaacctc cccgcctga tccccgccca ccagaccgc cacctcctt 60

```

ES 2 757 930 T3

accagagac agggagaggc tcttctg 87

5 <210> 103
 <211> 102
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> /nota = "cebador núm. 588"

<400> 103
 aaatttggat ccagaccgc cacctccgga acctccccg cctgatcccc cgccaccaga 60

15 cccgccact cctttacca gagacagga gaggctcttc tg 102

20 <210> 104
 <211> 72
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

25 <220>
 <223> /nota = "cebador núm. 589"

<400> 104
 aaatttggat cctgatcccc cgccaccaga cccgccact cctttacca gagacagga 60
 gaggctcttc tg 72

30

35 <210> 105
 <211> 54
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

40 <220>
 <223> /nota = "cebador núm. 590"

<400> 105
 aaatttggat ccagaccgc cacctccaca ctctcccctg ttgaagctct ttgt 54

45 <210> 106
 <211> 114
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

50 <220>
 <223> /nota = "cebador núm. 591"

<400> 106
 aaatttggat ccagaccgc cacctccaga cccgccact ccggaacctc cccgcctga 60

55 tccccgccca ccagaccgc cacctccaca ctctcccctg ttgaagctct ttgt 114

60 <210> 107
 <211> 57
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

65 <220>
 <223> /nota = "cebador núm. 592"

<400> 107
 aaatttggat cctgatcccc cgccacctt accagagac agggagaggc tcttctg 57

ES 2 757 930 T3

```

5   <210> 108
    <211> 117
    <212> ADN
    <213> Secuencia artificial

    <220>
    <223> /nota = "cebador núm. 593"

10  <400> 108
    aaatttggat ccagaccgcg cactccaga cccgccact ccggaacct ccccgctga      60

    tccccgccca ccagaccgcg cactccttt acccagagac agggagaggc tcttctg      117

15

    <210> 109
    <211> 45
    <212> ADN
    <213> Secuencia artificial

    <220>
    <223> /nota = "cebador núm. 598"

25  <400> 109
    ggaaacacct attttcattg ggcctgcag aaaccaggcc agtct                    45

30  <210> 110
    <211> 45
    <212> ADN
    <213> Secuencia artificial

    <220>
    <223> /nota = "cebador núm. 599"

35  <400> 110
    agactggcct ggtttctgca gggcccaatg aaaataggctg tttcc                45

40

    <210> 111
    <211> 36
    <212> ADN
    <213> Secuencia artificial

45  <220>
    <223> /nota = "cebador núm. 610"

    <400> 111
50  gctctagact aacctcatt cctggtgaag ctcttg                                36

    <210> 112
    <211> 38
55  <212> ADN
    <213> Secuencia artificial

    <220>
    <223> /nota = "cebador núm. 613"

60  <400> 112
    aaaaatctag aatagacaga tgggggtgct gttttggc                            38

65  <210> 113
    <211> 34
    <212> ADN

```

ES 2 757 930 T3

```

<213> Secuencia artificial

<220>
<223> /nota = "cebador núm. 614"
5
<400> 113
aaaaatctag acttgaccag gcatcctaga gtca 34

10
<210> 114
<211> 35
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

15
<220>
<223> /nota = "cebador núm. 615"

<400> 114
aaaaatctag aaggggccag tggatagact gatgg 35
20

<210> 115
<211> 35
<212> ADN
25
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> /nota = "cebador núm. 616"
30
<400> 115
aaaaatctag aagggaccaa gggatagaca gatgg 35

<210> 116
35
<211> 50
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
40
<223> /nota = "cebador núm. 617"

<400> 116
aaatttaagc ttgccgccac catggaatgg acctgggtct ttctcttct 50
45

<210> 117
<211> 39
<212> ADN
<213> Secuencia artificial
50

<220>
<223> /nota = "cebador núm. 618"

<400> 117
55
aaatttgcta gctgaggaga cggtgaccgt ggtccctgc 39

<210> 118
<211> 48
60
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> /nota = "cebador núm. 619"
65

<400> 118
aaatttaagc ttgccgccac catgatgtcc tetgctcagt tccttgg 48

```

ES 2 757 930 T3

```

5   <210> 119
    <211> 39
    <212> ADN
    <213> Secuencia artificial

    <220>
    <223> /nota = "cebador núm. 620"

10  <400> 119
    aaatttcgta cgtttcatct ccagtttggg cccccctcc 39

15  <210> 120
    <211> 50
    <212> ADN
    <213> Secuencia artificial

20  <220>
    <223> /nota = "cebador núm. 627"

    <400> 120
25  aaatttaagc ttgccgccac catgggttgg agctgtatca tcttctttct 50

    <210> 121
    <211> 39
    <212> ADN
30  <213> Secuencia artificial

    <220>
    <223> /nota = "cebador núm. 628"

35  <400> 121
    aaatttgcta gctgcagaga cagtgaccag agtcccttg 39

40  <210> 122
    <211> 45
    <212> ADN
    <213> Secuencia artificial

    <220>
45  <223> /nota = "cebador núm. 682"

    <400> 122
    gatagcagta cgataaacta taacccatct ctaaaggata aattc 45

50  <210> 123
    <211> 45
    <212> ADN
    <213> Secuencia artificial

55  <220>
    <223> /nota = "cebador núm. 683"

    <400> 123
60  gaatttatcc tttagagatg ggttatagtt tatcgactg ctatc 45

    <210> 124
    <211> 45
65  <212> ADN
    <213> Secuencia artificial

```

ES 2 757 930 T3

```

<220>
<223> /nota = "cebador núm. 684"

<400> 124
5 tctgaggact ctgccgtcta ttactgtgca agaggggtact acggt 45

<210> 125
<211> 45
10 <212> ADN
    <213> Secuencia artificial

<220>
<223> /nota = "cebador núm. 685"
15
<400> 125
    accgtagtag cctcttgac agtaatagac ggcagagtcc tcaga 45

20 <210> 126
    <211> 81
    <212> ADN
    <213> Secuencia artificial

25 <220>
<223> /nota = "cebador núm. 686"

<400> 126
30 tgctgccaca gtattttag tgctgatcc cccaggaac tcagtgctg gggatgatgg 60
    ggatggggga ccatatttg a 81

35 <210> 127
    <211> 51
    <212> ADN
    <213> Secuencia artificial

40 <220>
<223> /nota = "cebador núm. 687"

<400> 127
    ccagcacctg agttcctggg gggatcaggc actacaaata ctgtggcagc a 51

45
<210> 128
<211> 45
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

50 <220>
<223> /nota = "cebador núm. 688"

<400> 128
55 gatagcagta cgataaacta tgcgcatct ctaaaggata aattc 45

<210> 129
<211> 45
60 <212> ADN
    <213> Secuencia artificial

<220>
<223> /nota = "cebador núm. 689"
65
<400> 129
    gaatttatcc tttagagatg gcgcatagtt tatcgtagc ctatc 45

```

ES 2 757 930 T3

```

5    <210> 130
    <211> 54
    <212> ADN
    <213> Secuencia artificial

    <220>
    <223> /nota = "cebador núm. 699"

10   <400> 130
    aaatttggat ccggcggggg aggttcctca ggactacaa atactgtggc agca          54

15   <210> 131
    <211> 39
    <212> ADN
    <213> Secuencia artificial

20   <220>
    <223> /nota = "cebador núm. 700"

    <400> 131
25   aaatttggat cctcaggcac tacaataact gtggcagca          39

    <210> 132
    <211> 57
    <212> ADN
30   <213> Secuencia artificial

    <220>
    <223> /nota = "cebador núm. 701"

35   <400> 132
    accaaggtgg acaagagagt tgagtccaaa tcaggcacta caaatactgt ggcagca      57

40   <210> 133
    <211> 60
    <212> ADN
    <213> Secuencia artificial

    <220>
45   <223> /nota = "cebador núm. 702"

    <400> 133
    tgctgccaca gtattttagt tgcttgattt ggactcaact ctcttgtcca ccttgggtgtt    60

50   <210> 134
    <211> 57
    <212> ADN
    <213> Secuencia artificial

55   <220>
    <223> /nota = "cebador núm. 703"

    <400> 134
60   gtcacaaaga gcttcaacag gggagagtgt tcaggcacta caaatactgt ggcagca      57

    <210> 135
    <211> 57
65   <212> ADN
    <213> Secuencia artificial

```

ES 2 757 930 T3

```

<220>
<223> /nota = "cebador núm. 704"

<400> 135
5  tgctgccaca gtattttag tagcctgaaca ctctcccctg ttgaagctct ttgtgac 57

<210> 136
<211> 60
10 <212> ADN
    <213> Secuencia artificial

<220>
<223> /nota = "cebador núm. 800"
15
<400> 136
    cagaagagcc tctccctgtc tctgggtaaa tcaggcacta caaatactgt ggcagcatat 60

<210> 137
<211> 60
20 <212> ADN
    <213> Secuencia artificial

<220>
<223> /nota = "cebador núm. 801"
25
<400> 137
30  atagctgcc acagtatttg tagtgctga tttaccaga gacagggaga ggctcttctg 60

<210> 138
<211> 49
35 <212> ADN
    <213> Secuencia artificial

<220>
<223> /nota = "cebador núm. 842"
40
<400> 138
    aaatttaagc ttgccccac catgaggtgc cttagctgagt tctggggc 49

<210> 139
<211> 45
45 <212> ADN
    <213> Secuencia artificial

<220>
<223> /nota = "cebador núm. 843"
50
<400> 139
    aaatttcgta cgttttattt ccaactttgt ccccgagccg aacgt 45

<210> 140
<211> 49
55 <212> ADN
    <213> Secuencia artificial

60
<220>
<223> /nota = "cebador núm. 844"

<400> 140
65  aaatttaagc ttgccccac catggaatgg agcgggtct ttatcttc 49

```

ES 2 757 930 T3

```

<210> 141
<211> 39
<212> ADN
<213> Secuencia artificial
5
<220>
<223> /nota = "cebador núm. 845"

<400> 141
10 aaatttgcta gctgaggaga cggtgactga ggttccttg 39

<210> 142
<211> 55
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> /nota = "cebador 1000"
20
<400> 142
ctgtctctgg gtaaacacca tcaccaccac cactgagaat tccccgacct cgacc 55

<210> 143
<211> 55
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> /nota = "cebador núm. 1001"

<400> 143
35 gaggtcgggg aattctcagt ggtggtggtg atggtgttta ccagagaca gggag 55

<210> 144
<211> 48
<212> ADn
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> /nota = "cebador núm. 1002"

<400> 144
45 ctcttttaaa aggggtccag tgtgagtcca aatatggtcc cccatgcc 48

<210> 145
<211> 50
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> /nota = "cebador núm. 1003"

<400> 145
55 catgggggac catatttggga ctcacactgg acccctttta aaagagcaac 50

<210> 146
<211> 233
<212> PRT
<213> Secuencia artificial
60
<220>
<223> /nota = "0061VH-CH1"
65

```

ES 2 757 930 T3

<400> 146

5 Met Asp Phe Gly Leu Ile Phe Phe Ile Val Ala Leu Leu Lys Gly Val
 1 5 10 15

10 Gln Cys Glu Val Lys Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro
 20 25 30

15 Gly Gly Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Asp Phe Ser
 35 40 45

20 Arg Tyr Trp Met Thr Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu
 50 55 60

25 Trp Ile Gly Glu Ile Asn Pro Asp Ser Ser Thr Ile Asn Tyr Asn Pro
 65 70 75 80

30 Ser Leu Lys Asp Lys Phe Ile Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr
 85 90 95

35 Leu Tyr Leu Gln Met Ser Glu Val Arg Ser Glu Asp Thr Ala Leu Tyr
 100 105 110

40 Tyr Cys Ala Ser Gly Val Phe Thr Ser Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val
 115 120 125

45 Thr Val Ser Ala Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala
 130 135 140

50 Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu
 145 150 155 160

55 Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly
 165 170 175

60 Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser
 180 185 190

65 Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu
 195 200 205

70 Gly Thr Lys Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn Thr
 210 215 220

75 Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Ser Lys
 225 230

80 <210> 147
 <211> 247
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

ES 2 757 930 T3

<220>

<223> /nota = "bisagra-CH2-CH3 de hIgG4"

5 <400> 147

Met Asp Phe Gly Leu Ile Phe Phe Ile Val Ala Leu Leu Lys Gly Val
1 5 10 15

10

Gln Cys Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro
20 25 30

15

Glu Phe Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys
35 40 45

20

Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val
50 55 60

25

Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp
65 70 75 80

30

Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe
85 90 95

35

Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu
115 120 125

40

Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg
130 135 140

45

Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys
145 150 155 160

50

Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp
165 170 175

55

Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys
180 185 190

60

Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser
195 200 205

65

Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser
210 215 220

Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser
225 230 235 240

Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys

ES 2 757 930 T3

245

5 <210> 148
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 10 <223> /nota = "Etiqueta His6"

 <400> 148

 His His His His His His
 15 1 5

 <210> 149
 <211> 172
 20 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 25 <223> /nota = "hTLT-1.18-188"

 <400> 149

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

 Ser Ile Leu Val Gln Cys His Tyr Arg Leu Gln Asp Val Lys Ala Gln
 20 25 30

 35 Lys Val Trp Cys Arg Phe Leu Pro Glu Gly Cys Gln Pro Leu Val Ser
 35 40 45

 40 Ser Ala Val Asp Arg Arg Ala Pro Ala Gly Arg Arg Thr Phe Leu Thr
 50 55 60

 45 Asp Leu Gly Gly Gly Leu Leu Gln Val Glu Met Val Thr Leu Gln Glu
 65 70 75 80

 50 Glu Asp Ala Gly Glu Tyr Gly Cys Met Val Asp Gly Ala Arg Gly Pro
 85 90 95

 Gln Ile Leu His Arg Val Ser Leu Asn Ile Leu Pro Pro Glu Glu Glu
 100 105 110

 55 Glu Glu Thr His Lys Ile Gly Ser Leu Ala Glu Asn Ala Phe Ser Asp
 115 120 125

 60 Pro Ala Gly Ser Ala Asn Pro Leu Glu Pro Ser Gln Asp Glu Lys Ser
 130 135 140

 65 Ile Pro Leu Ile Trp Gly Ala Val Leu Leu Val Gly Leu Leu Val Ala
 145 150 155 160

ES 2 757 930 T3

Ala Val Val Leu Phe Ala Val Met Ala Lys Arg Lys
 165 170

5 <210> 150
 <211> 32
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> /nota = "cebador núm. 1004"

<400> 150
 ggaattccat atgatagttg gcagcctccc tg 32

15

<210> 151
 <211> 39
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <223> /nota = "cebador núm. 1005"

25 <400> 151
 ataagaatgc ggccgcctat ttctcttgg ccatcacag 39

30 <210> 152
 <211> 215
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

35 <220>
 <223> /nota = "HC del Fab 0100"

<400> 152

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

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

45

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

50

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

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

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

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

Ser Ala Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys

ES 2 757 930 T3

115 120 125

5 Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys
130 135 140

10 Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu
145 150 155 160

15 Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu
165 170 175

20 Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr
180 185 190

25 Lys Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val
195 200 205

30 Asp Lys Arg Val Glu Ser Lys
210 215

<210> 153
<211> 219
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

35 <220>
<223> /nota = "LC del Fab 0100"
<400> 153

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

45 Asp Gln Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val His Arg
20 25 30

50 Asn Gly Asn Thr Tyr Phe His Trp Ala Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
35 40 45

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

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

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

Thr His Val Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105 110

Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu
115 120 125

ES 2 757 930 T3

5 Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe
 130 135 140
 Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln
 145 150 155 160
 10 Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser
 165 170 175
 15 Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu
 180 185 190
 20 Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser
 195 200 205
 25 Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 210 215
 <210> 154
 <211> 6588
 <212> ADN
 30 <213> Homo sapiens
 <400> 154
 gcgcagctgc gccagtttta tgtggcggcg cagggcatta gctggagcta tcgcccggaa 60
 35 ccgaccaaca gcagcctgaa cctgagcgtg accagcttta aaaaaattgt gtatcgcgaa 120
 tatgaaccgt attttaaaaa agaaaaaccg cagagcacca ttagcggcct gctgggccccg 180
 40 accctgtatg cggaagtggg cgatattatt aaagtgcatt ttaaaaacaa agcggataaa 240
 ccgctgagca ttcattccga gggcattcgc tatagcaaac tgagcgaagg cgcgagctat 300
 ctggatcata cctttccggc ggaaaaaatg gatgatgcgg tggcgccggg ccgcgaatat 360
 45 acctatgaat ggagcattag cgaagatagc ggcccgacct atgatgatcc gccgtgacctg 420
 accatatttt attatagcca tgaaaacctg attgaagatt ttaacagcgg cctgattggc 480
 50 ccgctgctga tttgcaaaaa aggcaccctg accgaaggcg gcaccagaa aacctttgat 540
 aaacagattg tgctgctggt tgcggtgttt gatgaaagca aaagctggag ccagagcagc 600
 agcctgatgt ataccgtgaa cggctatgtg aacggcacca tgccggatat taccgtgtgc 660
 55 gcgcatgatc atattagctg gcatctgctg ggcatgagca gcggcccggg actgttttagc 720
 attcatttta acggccaggt gctggaacag aaccatcata aagtgagcgc gattaccctg 780
 60 gtgagcgcga ccagcaccac cgcgaacatg accgtgggccc cggaggcaa atggattatt 840
 agcagcctga ccccgaacaa tctgcaggcg ggcatgcagg cgtatattga tattaaaaac 900
 tgcccgaaaa aaaccgcaa cctgaaaaaa attaccgcgc aacagcgcgc ccatatgaaa 960
 65 cgctgggaat atttatttgc ggcggaagaa gtgatttggg attatgcgcc ggtgattccg 1020
 gcgaacatgg ataaaaaata tcgcagccag catctggata acttttagcaa ccagattggc 1080

ES 2 757 930 T3

aaacattata aaaaagtgat gtatacccgag tatgaagatg aaagctttac caaacataacc 1140
 5 gtgaacccga acatgaaaga agatggcatt ctgggcccgga ttattcgcgc gcaggtgcgc 1200
 gataccctga aaattgtggt taaaaacatg gcgagccgcc cgtatagcat ttatccgcat 1260
 ggcgtgacct ttagcccgta tgaagatgaa gtgaacagca gctttaccag cggccgcaac 1320
 10 aacacatga ttcgcgcggt gcagccgggc gaaacctata cctataaatg gaacattctg 1380
 gaatttgatg aaccgaccga aaacgatgcg cagtgcctga cccgccgta ttatagcgtat 1440
 15 gtggatatta tgcgcgatat tgcgagcggc ctgattggcc tgctgctgat ttgcaaaagc 1500
 cgcagcctgg atcgcgcggg cattcagcgc gcggcggata ttgaacagca ggcggtgttt 1560
 gcggtgtttg atgaaaacaa aagctggtat ctggaagata acattaacaa attttgcgaa 1620
 20 aaccgggatg aagtgaaacg cgatgatccg aaattttatg aaagcaacat tatgagcacc 1680
 attaacggct atgtgccgga aagcattacc accctgggct tttgctttga tgataccgtg 1740
 25 cagtggcatt tttgcagcgt gggcacccag aacgaaatc tgaccattca ttttaccggc 1800
 catagcttta tttatggcaa acgccatgaa gataccctga cctgtttcc gatgcgcggc 1860
 gaaagcgtga ccgtgacct ggataacgtg ggcacctgga tgctgaccag catgaacagc 1920
 30 agcccgcgca gcaaaaaact gcgcctgaaa tttcgcgatg tgaatgcat tccggatgat 1980
 gatgaagata gctatgaaat ttttgaaccg ccggaagca ccgtgatggc gaccgcgaaa 2040
 35 atgcatgata gcctggaacc ggaagatgaa gaaagcgtg cggattatga ttatcagaac 2100
 cgctggcgg cggcgctggg cattcgcagc tttcgaaca gcagcctgaa ccaggaagaa 2160
 gaagaattta acctgaccgc gctggcgtg gaaaacggca ccgaatttgt gagcagcaac 2220
 40 accgatatta ttgtgggcag caactatagc agcccagca acattagcaa atttaccgtg 2280
 aacaacctgg cggaaaccga gaaagcgcg agccatcagc aggcgaccac cgcgggcagc 2340
 45 ccgctgcgcc atctgattgg caaaaacagc gtgctgaaca gcagcaccgc ggaacatagc 2400
 agcccgtata gcgaagatcc gattgaagat ccgctgcagc cggatgtgac cggcattcgc 2460
 ctgctgagcc tgggcgcggg cgaatttaaa agccaggaac atgcgaaaca taaaggcccc 2520
 50 aaagtggaac gcgatcaggc ggcgaaacat cgctttagct ggatgaaact gctggcgcgt 2580
 aaagtgggcc gccatctgag ccaggatacc ggcagcccg ggcgcatgcg cccgtgggaa 2640
 55 gatctgcgga gccaggatac cggcagcccc agccgcctgc gccctgggaa agatccgccc 2700
 agcgatctgc tgctgctgaa acagagcaac agcagcaaaa ttctggtggg ccgctggcat 2760
 ctggcgagcg aaaaaggcag ctatgaaatt attcaggata ccgatgaaga taccgcggtg 2820
 60 aacaactggc tgattagccc gcagaacgcg agccgcgcgt ggggcgaaag caccgcgctg 2880
 gcgaacaaac cgggcaaaca gagcggccat ccgaaatttc cgcgcgtgcg ccataaaagc 2940
 65 ctgcaggtgc gccaggatgg cggcaaaagc gcctgaaaa aaagccagtt tctgattaaa 3000
 accgcgaaaa aaaaaaaga aaaacatacc catcatgcgc cgctgagccc gcgcaccttt 3060

ES 2 757 930 T3

	catccgctgc gcagcgaagc gtataacacc tttagcgaac gccgcctgaa acatagcctg	3120
	gtgctgcata aaagcaacga aaccagcctg ccgaccgatc tgaaccagac cctgcccagc	3180
5	atggatthttg gctggattgc gagcctgccg gatcataacc agaacagcag caacgatacc	3240
	ggccaggcga gctgcccgcc gggcctgtat cagaccgtgc cgccggaaga acattatcag	3300
10	acctttccga ttcaggatcc ggatcagatg catagcacca gcgatccgag ccatcgcagc	3360
	agcagcccgg aactgagcga aatgctggaa tatgatcgca gccataaaag ctttccgacc	3420
	gatattagcc agatgagccc gagcagcga catgaagtgt ggccagaccgt gattagcccg	3480
15	gatctgagcc aggtgacct gagcccggaa ctgagccaga ccaacctgag cccggatctg	3540
	agccatacca cctgagccc ggaactgatt cagcgcgaacc tgagcccggc gctgggccag	3600
20	atgccgatta gcccggatct gagccatacc accctgagcc cggatctgag ccataccacc	3660
	ctgagcctgg atctgagcca gaccaacctg agcccggaa tgagccagac caacctgagc	3720
	ccggcgtgg gccagatgcc gctgagcccg gatctgagcc ataccacct gagcctggat	3780
25	tttagccaga ccaacctgag cccggaactg agccatatga ccctgagccc ggaactgagc	3840
	cagaccaacc tgagcccggc gctgggccag atgccgatta gcccggatct gagccatacc	3900
30	accctgagcc tggatthttg ccagaccaac ctgagcccgg aactgagcca gaccaacctg	3960
	agcccggcgc tgggccagat gccgctgagc ccggatccga gccataccac cctgagcctg	4020
	gatctgagcc agaccaacct gagcccggaa ctgagccaga ccaacctgag cccggatctg	4080
35	agcgaatgc cgctgtttgc ggatctgagc cagattccgc tgaccccgga tctggatcag	4140
	atgacctga gcccggatct gggcgaaacc gatctgagcc cgaactthtg ccagatgagc	4200
40	ctgagcccgg atctgagcca ggtgacctg agcccggata ttagcgatac caccctgctg	4260
	ccggatctga gccagattag cccgccgccg gatctggatc agatthttta tccgagcgaa	4320
	agcagccaga gcctgctgct gcaggaattt aacgaaagct ttccgtatcc ggatctgggc	4380
45	cagatgccga gcccgagcag cccgacctg aacgatacct thctgagcaa agaatttaac	4440
	ccgctggtga thgtggccct gagcaaagat ggcaccgatt atattgaaat tattccgaaa	4500
50	gaagaagtgc agagcagcga agatgattat gcggaaattg attatgtgcc gtatgatgat	4560
	ccgtataaaa ccgatgtgcg caccaacatt aacagcagcc gcgatccgga taacattgcg	4620
	gcgtggtatc tgcgcagcaa caacggcaac cgccgcaact attatattgc ggcggaagaa	4680
55	attagctggg attatagcga atthgtgcag cgcgaaaccg atattgaaga tagcgatgat	4740
	attccggaag ataccaccta taaaaagtg gtgtthtcga aatathctgga tagcacctth	4800
60	accaaaccgc atccgcgcgg cgaatatgaa gaacatctgg gcattctggg cccgattatt	4860
	cgcgccggaag tggatgatgt gattcaggtg cgctthtaaaa acctggcgag ccgcccgtat	4920
	agcctgcatg cgcattggcct gagctatgaa aaaagcagcg aaggcaaaac ctatgaagat	4980
65	gatagcccgg aatggtthaa agaagataac gcggtgcagc cgaacagcag ctatacctat	5040
	gtgtggcatg cgaccgaacg cagcggcccc gaaagcccgg gcagcgcgtg ccgcccgtgg	5100

ES 2 757 930 T3

gcgtattata gcgcggtgaa cccggaaaaa gatattcata gcggcctgat tggcccgctg 5160
 ctgatttggc agaaaggcat tctgcataaa gatagcaaca tgccgatgga tatgcgcgaa 5220
 5 tttgtgctgc tgtttatgac cttt gatgaa aaaaaaagct ggtattatga aaaaaaagc 5280
 cgcagcagct ggcgcctgac cagcagcgaa atgaaaaaaa gccatgaatt tcatgcgatt 5340
 10 aacggcatga tttatagcct gccgggctg aaaaatgatg aacaggaatg ggtgcgcctg 5400
 catctgctga acattggcgg cagccaggat attcatgtgg tgcattttca tggccagacc 5460
 ctgctggaaa acggcaacaa acagcatcag ctgggcgtgt ggccgctgct gccgggcagc 5520
 15 tttaaaacc tggaaatgaa agcagcaaaa cccggctggt ggctgctgaa caccgaagt 5580
 ggcgaaaacc agcgcgcggg catgcagacc ccgtttctga ttatggatcg cgattgccgc 5640
 20 atgccgatgg gcctgagcac cggcattatt agcगतagcc agattaaagc gagcgaattt 5700
 ctgggctatt gggaaaccgc cctggcgcgc ctgaacaacg gcggcagcta taacgcgtgg 5760
 agcgtggaaa aactggcggc ggaatttgcg agcaaaccgt ggattcaggt ggatatgcag 5820
 25 aaagaagtga ttattaccgg cattcagacc cagggcgcga aacattatct gaaaagctgc 5880
 tataccaccg aattttatgt ggcgtatagc agcaaccaga ttaactggca gatttttaaa 5940
 30 ggcaacagca cccgcaacgt gatgtathtt aacggcaaca gcgatgcgag caccattaaa 6000
 gaaaaccagt ttgatccgcc gattgtggcg cgctatattc gcattagccc gaccgcgcgc 6060
 tataaccgcc cgaccctgcg cctggaactg cagggctgcg aagtgaacgg ctgcagcacc 6120
 35 ccgctgggca tggaaaacgg caaaattgaa aacaaacaga ttaccgcgag cagctttaa 6180
 aaaagctggt ggggcgatta ttgggaaccg tttcgcgcgc gcctgaacgc gcagggccgc 6240
 40 gtgaacgcgt ggcaggcgaa agcgaacaac aacaaacagt ggctggaaat tgatctgctg 6300
 aaaatataaa aaattaccgc gattattacc cagggctgca aaagcctgag cagcgaatg 6360
 tatgtgaaaa gctataccat tcattatagc gaacagggcg tggaaatggaa accgtatcgc 6420
 45 ctgaaaagca gcatggtgga taaaathtt gaaggcaaca ccaacaccaa aggccatgtg 6480
 aaaaacthtt ttaaccgcc gattattagc cgctttattc gcgtgattcc gaaaacctg 6540
 50 aaccagagca ttgcgctgcg cctggaactg tttggctgcg atatttat 6588

<210> 155
 <211> 2196
 55 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 155

60 Ala Gln Leu Arg Gln Phe Tyr Val Ala Ala Gln Gly Ile Ser Trp Ser
 1 5 10 15

65 Tyr Arg Pro Glu Pro Thr Asn Ser Ser Leu Asn Leu Ser Val Thr Ser
 20 25 30

ES 2 757 930 T3

Phe Lys Lys Ile Val Tyr Arg Glu Tyr Glu Pro Tyr Phe Lys Lys Glu
 35 40 45
 5 Lys Pro Gln Ser Thr Ile Ser Gly Leu Leu Gly Pro Thr Leu Tyr Ala
 50 55 60
 10 Glu Val Gly Asp Ile Ile Lys Val His Phe Lys Asn Lys Ala Asp Lys
 65 70 75 80
 15 Pro Leu Ser Ile His Pro Gln Gly Ile Arg Tyr Ser Lys Leu Ser Glu
 85 90 95
 20 Gly Ala Ser Tyr Leu Asp His Thr Phe Pro Ala Glu Lys Met Asp Asp
 100 105 110
 25 Ala Val Ala Pro Gly Arg Glu Tyr Thr Tyr Glu Trp Ser Ile Ser Glu
 115 120 125
 30 Asp Ser Gly Pro Thr His Asp Asp Pro Pro Cys Leu Thr His Ile Tyr
 130 135 140
 35 Tyr Ser His Glu Asn Leu Ile Glu Asp Phe Asn Ser Gly Leu Ile Gly
 145 150 155 160
 40 Pro Leu Leu Ile Cys Lys Lys Gly Thr Leu Thr Glu Gly Gly Thr Gln
 165 170 175
 45 Lys Thr Phe Asp Lys Gln Ile Val Leu Leu Phe Ala Val Phe Asp Glu
 180 185 190
 50 Ser Lys Ser Trp Ser Gln Ser Ser Ser Leu Met Tyr Thr Val Asn Gly
 195 200 205
 55 Tyr Val Asn Gly Thr Met Pro Asp Ile Thr Val Cys Ala His Asp His
 210 215 220
 60 Ile Ser Trp His Leu Leu Gly Met Ser Ser Gly Pro Glu Leu Phe Ser
 225 230 235 240
 65 Ile His Phe Asn Gly Gln Val Leu Glu Gln Asn His His Lys Val Ser
 245 250 255
 Ala Ile Thr Leu Val Ser Ala Thr Ser Thr Thr Ala Asn Met Thr Val
 260 265 270
 Gly Pro Glu Gly Lys Trp Ile Ile Ser Ser Leu Thr Pro Lys His Leu
 275 280 285
 Gln Ala Gly Met Gln Ala Tyr Ile Asp Ile Lys Asn Cys Pro Lys Lys
 290 295 300

ES 2 757 930 T3

Thr Arg Asn Leu Lys Lys Ile Thr Arg Glu Gln Arg Arg His Met Lys
 305 310 315 320
 5
 Arg Trp Glu Tyr Phe Ile Ala Ala Glu Glu Val Ile Trp Asp Tyr Ala
 325 330 335
 10
 Pro Val Ile Pro Ala Asn Met Asp Lys Lys Tyr Arg Ser Gln His Leu
 340 345 350
 15
 Asp Asn Phe Ser Asn Gln Ile Gly Lys His Tyr Lys Lys Val Met Tyr
 355 360 365
 20
 Thr Gln Tyr Glu Asp Glu Ser Phe Thr Lys His Thr Val Asn Pro Asn
 370 375 380
 Met Lys Glu Asp Gly Ile Leu Gly Pro Ile Ile Arg Ala Gln Val Arg
 385 390 395 400
 25
 Asp Thr Leu Lys Ile Val Phe Lys Asn Met Ala Ser Arg Pro Tyr Ser
 405 410 415
 30
 Ile Tyr Pro His Gly Val Thr Phe Ser Pro Tyr Glu Asp Glu Val Asn
 420 425 430
 35
 Ser Ser Phe Thr Ser Gly Arg Asn Asn Thr Met Ile Arg Ala Val Gln
 435 440 445
 40
 Pro Gly Glu Thr Tyr Thr Tyr Lys Trp Asn Ile Leu Glu Phe Asp Glu
 450 455 460
 45
 Pro Thr Glu Asn Asp Ala Gln Cys Leu Thr Arg Pro Tyr Tyr Ser Asp
 465 470 475 480
 50
 Val Asp Ile Met Arg Asp Ile Ala Ser Gly Leu Ile Gly Leu Leu Leu
 485 490 495
 55
 Ile Cys Lys Ser Arg Ser Leu Asp Arg Arg Gly Ile Gln Arg Ala Ala
 500 505 510
 60
 Asp Ile Glu Gln Gln Ala Val Phe Ala Val Phe Asp Glu Asn Lys Ser
 515 520 525
 Trp Tyr Leu Glu Asp Asn Ile Asn Lys Phe Cys Glu Asn Pro Asp Glu
 530 535 540
 65
 Val Lys Arg Asp Asp Pro Lys Phe Tyr Glu Ser Asn Ile Met Ser Thr
 545 550 555 560
 Ile Asn Gly Tyr Val Pro Glu Ser Ile Thr Thr Leu Gly Phe Cys Phe
 565 570 575

ES 2 757 930 T3

5 Asp Asp Thr Val Gln Trp His Phe Cys Ser Val Gly Thr Gln Asn Glu
 580 585 590
 Ile Leu Thr Ile His Phe Thr Gly His Ser Phe Ile Tyr Gly Lys Arg
 595 600 605
 10 His Glu Asp Thr Leu Thr Leu Phe Pro Met Arg Gly Glu Ser Val Thr
 610 615 620
 15 Val Thr Met Asp Asn Val Gly Thr Trp Met Leu Thr Ser Met Asn Ser
 625 630 635 640
 20 Ser Pro Arg Ser Lys Lys Leu Arg Leu Lys Phe Arg Asp Val Lys Cys
 645 650 655
 25 Ile Pro Asp Asp Asp Glu Asp Ser Tyr Glu Ile Phe Glu Pro Pro Glu
 660 665 670
 Ser Thr Val Met Ala Thr Arg Lys Met His Asp Arg Leu Glu Pro Glu
 675 680 685
 30 Asp Glu Glu Ser Asp Ala Asp Tyr Asp Tyr Gln Asn Arg Leu Ala Ala
 690 695 700
 35 Ala Leu Gly Ile Arg Ser Phe Arg Asn Ser Ser Leu Asn Gln Glu Glu
 705 710 715 720
 40 Glu Glu Phe Asn Leu Thr Ala Leu Ala Leu Glu Asn Gly Thr Glu Phe
 725 730 735
 45 Val Ser Ser Asn Thr Asp Ile Ile Val Gly Ser Asn Tyr Ser Ser Pro
 740 745 750
 Ser Asn Ile Ser Lys Phe Thr Val Asn Asn Leu Ala Glu Pro Gln Lys
 755 760 765
 50 Ala Pro Ser His Gln Gln Ala Thr Thr Ala Gly Ser Pro Leu Arg His
 770 775 780
 55 Leu Ile Gly Lys Asn Ser Val Leu Asn Ser Ser Thr Ala Glu His Ser
 785 790 795 800
 60 Ser Pro Tyr Ser Glu Asp Pro Ile Glu Asp Pro Leu Gln Pro Asp Val
 805 810 815
 65 Thr Gly Ile Arg Leu Leu Ser Leu Gly Ala Gly Glu Phe Lys Ser Gln
 820 825 830
 Glu His Ala Lys His Lys Gly Pro Lys Val Glu Arg Asp Gln Ala Ala

ES 2 757 930 T3

Tyr Gln Thr Phe Pro Ile Gln Asp Pro Asp Gln Met His Ser Thr
 1100 1105 1110

5 Ser Asp Pro Ser His Arg Ser Ser Ser Pro Glu Leu Ser Glu Met
 1115 1120 1125

10 Leu Glu Tyr Asp Arg Ser His Lys Ser Phe Pro Thr Asp Ile Ser
 1130 1135 1140

15 Gln Met Ser Pro Ser Ser Glu His Glu Val Trp Gln Thr Val Ile
 1145 1150 1155

20 Ser Pro Asp Leu Ser Gln Val Thr Leu Ser Pro Glu Leu Ser Gln
 1160 1165 1170

25 Thr Asn Leu Ser Pro Asp Leu Ser His Thr Thr Leu Ser Pro Glu
 1175 1180 1185

30 Ser Pro Asp Leu Ser His Thr Thr Leu Ser Pro Asp Leu Ser His
 1205 1210 1215

35 Thr Thr Leu Ser Leu Asp Leu Ser Gln Thr Asn Leu Ser Pro Glu
 1220 1225 1230

40 Leu Ser Gln Thr Asn Leu Ser Pro Ala Leu Gly Gln Met Pro Leu
 1235 1240 1245

45 Ser Pro Asp Leu Ser His Thr Thr Leu Ser Leu Asp Phe Ser Gln
 1250 1255 1260

50 Thr Asn Leu Ser Pro Glu Leu Ser Pro Ala Leu Gly Gln Met Pro Ile
 1265 1270 1275

55 Leu Ser Gln Thr Asn Leu Ser Pro Ala Leu Gly Gln Met Pro Ile
 1280 1285 1290

60 Ser Pro Asp Leu Ser His Thr Thr Leu Ser Leu Asp Phe Ser Gln
 1295 1300 1305

65 Thr Asn Leu Ser Pro Glu Leu Ser Gln Thr Asn Leu Ser Pro Ala
 1310 1315 1320

60 Leu Gly Gln Met Pro Leu Ser Pro Asp Pro Ser His Thr Thr Leu
 1325 1330 1335

65 Ser Leu Asp Leu Ser Gln Thr Asn Leu Ser Pro Glu Leu Ser Gln
 1340 1345 1350

ES 2 757 930 T3

Thr Asn Leu Ser Pro Asp Leu Ser Glu Met Pro Leu Phe Ala Asp
 1355 1360 1365
 5
 Leu Ser Gln Ile Pro Leu Thr Pro Asp Leu Asp Gln Met Thr Leu
 1370 1375 1380
 10
 Ser Pro Asp Leu Gly Glu Thr Asp Leu Ser Pro Asn Phe Gly Gln
 1385 1390 1395
 15
 Met Ser Leu Ser Pro Asp Leu Ser Gln Val Thr Leu Ser Pro Asp
 1400 1405 1410
 20
 Ile Ser Asp Thr Thr Leu Leu Pro Asp Leu Ser Gln Ile Ser Pro
 1415 1420 1425
 25
 Pro Pro Asp Leu Asp Gln Ile Phe Tyr Pro Ser Glu Ser Ser Gln
 1430 1435 1440
 30
 Ser Leu Leu Leu Gln Glu Phe Asn Glu Ser Phe Pro Tyr Pro Asp
 1445 1450 1455
 35
 Leu Gly Gln Met Pro Ser Pro Ser Ser Pro Thr Leu Asn Asp Thr
 1460 1465 1470
 40
 Phe Leu Ser Lys Glu Phe Asn Pro Leu Val Ile Val Gly Leu Ser
 1475 1480 1485
 45
 Lys Asp Gly Thr Asp Tyr Ile Glu Ile Ile Pro Lys Glu Glu Val
 1490 1495 1500
 50
 Gln Ser Ser Glu Asp Asp Tyr Ala Glu Ile Asp Tyr Val Pro Tyr
 1505 1510 1515
 55
 Asp Asp Pro Tyr Lys Thr Asp Val Arg Thr Asn Ile Asn Ser Ser
 1520 1525 1530
 60
 Arg Asp Pro Asp Asn Ile Ala Ala Trp Tyr Leu Arg Ser Asn Asn
 1535 1540 1545
 65
 Gly Asn Arg Arg Asn Tyr Tyr Ile Ala Ala Glu Glu Ile Ser Trp
 1550 1555 1560
 Asp Tyr Ser Glu Phe Val Gln Arg Glu Thr Asp Ile Glu Asp Ser
 1565 1570 1575
 70
 Asp Asp Ile Pro Glu Asp Thr Thr Tyr Lys Lys Val Val Phe Arg
 1580 1585 1590
 75
 Lys Tyr Leu Asp Ser Thr Phe Thr Lys Arg Asp Pro Arg Gly Glu
 1595 1600 1605

ES 2 757 930 T3

5 Tyr Glu Glu His Leu Gly Ile Leu Gly Pro Ile Ile Arg Ala Glu
1610 1615 1620

10 Val Asp Asp Val Ile Gln Val Arg Phe Lys Asn Leu Ala Ser Arg
1625 1630 1635

15 Pro Tyr Ser Leu His Ala His Gly Leu Ser Tyr Glu Lys Ser Ser
1640 1645 1650

20 Glu Gly Lys Thr Tyr Glu Asp Asp Ser Pro Glu Trp Phe Lys Glu
1655 1660 1665

25 Asp Asn Ala Val Gln Pro Asn Ser Ser Tyr Thr Tyr Val Trp His
1670 1675 1680

30 Ala Thr Glu Arg Ser Gly Pro Glu Ser Pro Gly Ser Ala Cys Arg
1685 1690 1695

35 Ala Trp Ala Tyr Tyr Ser Ala Val Asn Pro Glu Lys Asp Ile His
1700 1705 1710

40 Ser Gly Leu Ile Gly Pro Leu Leu Ile Cys Gln Lys Gly Ile Leu
1715 1720 1725

45 His Lys Asp Ser Asn Met Pro Met Asp Met Arg Glu Phe Val Leu
1730 1735 1740

50 Leu Phe Met Thr Phe Asp Glu Lys Lys Ser Trp Tyr Tyr Glu Lys
1745 1750 1755

55 Lys Ser Arg Ser Ser Trp Arg Leu Thr Ser Ser Glu Met Lys Lys
1760 1765 1770

60 Ser His Glu Phe His Ala Ile Asn Gly Met Ile Tyr Ser Leu Pro
1775 1780 1785

65 Gly Leu Lys Met Tyr Glu Gln Glu Trp Val Arg Leu His Leu Leu
1790 1795 1800

70 Asn Ile Gly Gly Ser Gln Asp Ile His Val Val His Phe His Gly
1805 1810 1815

75 Gln Thr Leu Leu Glu Asn Gly Asn Lys Gln His Gln Leu Gly Val
1820 1825 1830

80 Trp Pro Leu Leu Pro Gly Ser Phe Lys Thr Leu Glu Met Lys Ala
1835 1840 1845

85 Ser Lys Pro Gly Trp Trp Leu Leu Asn Thr Glu Val Gly Glu Asn

ES 2 757 930 T3

	1850					1855						1860			
5	Gln	Arg	Ala	Gly	Met	Gln	Thr	Pro	Phe	Leu	Ile	Met	Asp	Arg	Asp
	1865						1870					1875			
10	Cys	Arg	Met	Pro	Met	Gly	Leu	Ser	Thr	Gly	Ile	Ile	Ser	Asp	Ser
	1880						1885					1890			
15	Gln	Ile	Lys	Ala	Ser	Glu	Phe	Leu	Gly	Tyr	Trp	Glu	Pro	Arg	Leu
	1895						1900					1905			
20	Ala	Arg	Leu	Asn	Asn	Gly	Gly	Ser	Tyr	Asn	Ala	Trp	Ser	Val	Glu
	1910						1915					1920			
25	Lys	Leu	Ala	Ala	Glu	Phe	Ala	Ser	Lys	Pro	Trp	Ile	Gln	Val	Asp
	1925						1930					1935			
30	Met	Gln	Lys	Glu	Val	Ile	Ile	Thr	Gly	Ile	Gln	Thr	Gln	Gly	Ala
	1940						1945					1950			
35	Lys	His	Tyr	Leu	Lys	Ser	Cys	Tyr	Thr	Thr	Glu	Phe	Tyr	Val	Ala
	1955						1960					1965			
40	Tyr	Ser	Ser	Asn	Gln	Ile	Asn	Trp	Gln	Ile	Phe	Lys	Gly	Asn	Ser
	1970						1975					1980			
45	Thr	Arg	Asn	Val	Met	Tyr	Phe	Asn	Gly	Asn	Ser	Asp	Ala	Ser	Thr
	1985						1990					1995			
50	Ile	Lys	Glu	Asn	Gln	Phe	Asp	Pro	Pro	Ile	Val	Ala	Arg	Tyr	Ile
	2000						2005					2010			
55	Arg	Ile	Ser	Pro	Thr	Arg	Ala	Tyr	Asn	Arg	Pro	Thr	Leu	Arg	Leu
	2015						2020					2025			
60	Glu	Leu	Gln	Gly	Cys	Glu	Val	Asn	Gly	Cys	Ser	Thr	Pro	Leu	Gly
	2030						2035					2040			
65	Met	Glu	Asn	Gly	Lys	Ile	Glu	Asn	Lys	Gln	Ile	Thr	Ala	Ser	Ser
	2045						2050					2055			
70	Phe	Lys	Lys	Ser	Trp	Trp	Gly	Asp	Tyr	Trp	Glu	Pro	Phe	Arg	Ala
	2060						2065					2070			
75	Arg	Leu	Asn	Ala	Gln	Gly	Arg	Val	Asn	Ala	Trp	Gln	Ala	Lys	Ala
	2075						2080					2085			
80	Asn	Asn	Asn	Lys	Gln	Trp	Leu	Glu	Ile	Asp	Leu	Leu	Lys	Ile	Lys
	2090						2095					2100			

ES 2 757 930 T3

	Lys	Ile	Thr	Ala	Ile	Ile	Thr	Gln	Gly	Cys	Lys	Ser	Leu	Ser	Ser
	2105						2110					2115			
5	Glu	Met	Tyr	Val	Lys	Ser	Tyr	Thr	Ile	His	Tyr	Ser	Glu	Gln	Gly
	2120						2125					2130			
10	Val	Glu	Trp	Lys	Pro	Tyr	Arg	Leu	Lys	Ser	Ser	Met	Val	Asp	Lys
	2135						2140					2145			
15	Ile	Phe	Glu	Gly	Asn	Thr	Asn	Thr	Lys	Gly	His	Val	Lys	Asn	Phe
	2150						2155					2160			
20	Phe	Asn	Pro	Pro	Ile	Ile	Ser	Arg	Phe	Ile	Arg	Val	Ile	Pro	Lys
	2165						2170					2175			
25	Thr	Trp	Asn	Gln	Ser	Ile	Ala	Leu	Arg	Leu	Glu	Leu	Phe	Gly	Cys
	2180						2185					2190			
30	Asp	Ile	Tyr												
	2195														
35	<210>	156													
	<211>	1218													
	<212>	ADN													
	<213>	Homo sapiens													
40	<400>	156													
	gcgaacgcgt	ttctggaaga	actgcgcccg	ggcagcctgg	aacgcgaatg	caaagaagaa	60								
	cagtgcagct	ttgaagaagc	gcgcgaaatt	tttaaagatg	cggaacgcac	caaactgttt	120								
45	tggattagct	atagcgatgg	cgatcagtgc	gcgagcagcc	cgtgccagaa	cggcggcagc	180								
	tgcaaagatc	agctgcagag	ctatatattgc	ttttgctgc	cggcgtttga	aggccgcaac	240								
	tgcgaaacc	ataaagatga	tcagctgatt	tgctgaacg	aaaacggcgg	ctgcgaacag	300								
50	tattgcagcg	atcataccgg	caccaaaccg	agctgccgct	gcatgaagg	ctatagcctg	360								
	ctggcggatg	gcgtgagctg	caccccgacc	gtggaatata	cgtgcggcaa	aattccgatt	420								
	ctggaaaaac	gcaacgcgag	caaaccgcag	ggccgcattg	tgggcggcaa	agtgtgcccg	480								
55	aaaggcgaat	gcccgtggca	ggtgctgctg	ctggtgaacg	gcgcgagct	gtgcggcggc	540								
	accctgatta	acaccatttg	ggtggtgagc	gcgcgagcatt	gctttgataa	aattaaaaac	600								
	tggcgcaacc	tgattgcggt	gctgggcgaa	catgatctga	gcgaacatga	tggcgatgaa	660								
	cagagccgcc	gcgtggcgca	ggtgattatt	ccgagcacct	atgtgccggg	caccaccaac	720								
60	catgatattg	cgctgctgcg	cctgcatcag	ccggtggtgc	tgaccgatca	tgtggtgccg	780								
	ctgtgctgctg	cggaaacgcac	ctttagcgaa	cgcaccctgg	cgtttgctgcg	ctttagcctg	840								
	gtgagcggct	ggggccagct	gctggatcgc	ggcgcgaccg	cgctggaact	gatggtgctg	900								
65	aacgtgccgc	gcctgatgac	ccaggattgc	ctgcagcaga	gccgcaaagt	ggcgatagc	960								
	ccgaacatta	ccgaatatat	gttttgctgcg	ggctatagcg	atggcagcaa	agatagctgc	1020								

ES 2 757 930 T3

aaaggcgata gcggcggccc gcatgcgacc cattatcgcg gcacctggta tctgaccggc 1080
 attgtgagct ggggccaggg ctgcgcgacc gtgggccatt ttggcgtgta taccgcgctg 1140
 5 agccagtata ttgaatggct gcagaaactg atgcgcgagcg aaccgcgccc gggcgtgctg 1200
 ctgcgcgcgc cgtttccg 1218
 10
 <210> 157
 <211> 406
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 15
 <400> 157
 Ala Asn Ala Phe Leu Glu Glu Leu Arg Pro Gly Ser Leu Glu Arg Glu
 1 5 10 15
 20 Cys Lys Glu Glu Gln Cys Ser Phe Glu Glu Ala Arg Glu Ile Phe Lys
 20 25 30
 25 Asp Ala Glu Arg Thr Lys Leu Phe Trp Ile Ser Tyr Ser Asp Gly Asp
 35 40 45
 30 Gln Cys Ala Ser Ser Pro Cys Gln Asn Gly Gly Ser Cys Lys Asp Gln
 50 55 60
 35 Leu Gln Ser Tyr Ile Cys Phe Cys Leu Pro Ala Phe Glu Gly Arg Asn
 65 70 75 80
 40 Cys Glu Thr His Lys Asp Asp Gln Leu Ile Cys Val Asn Glu Asn Gly
 85 90 95
 45 Gly Cys Glu Gln Tyr Cys Ser Asp His Thr Gly Thr Lys Arg Ser Cys
 100 105 110
 50 Arg Cys His Glu Gly Tyr Ser Leu Leu Ala Asp Gly Val Ser Cys Thr
 115 120 125
 55 Pro Thr Val Glu Tyr Pro Cys Gly Lys Ile Pro Ile Leu Glu Lys Arg
 130 135 140
 60 Asn Ala Ser Lys Pro Gln Gly Arg Ile Val Gly Gly Lys Val Cys Pro
 145 150 155 160
 Lys Gly Glu Cys Pro Trp Gln Val Leu Leu Leu Val Asn Gly Ala Gln
 165 170 175
 65 Leu Cys Gly Gly Thr Leu Ile Asn Thr Ile Trp Val Val Ser Ala Ala
 180 185 190
 His Cys Phe Asp Lys Ile Lys Asn Trp Arg Asn Leu Ile Ala Val Leu
 195 200 205

ES 2 757 930 T3

5 Gly Glu His Asp Leu Ser Glu His Asp Gly Asp Glu Gln Ser Arg Arg
 210 215 220
 Val Ala Gln Val Ile Ile Pro Ser Thr Tyr Val Pro Gly Thr Thr Asn
 225 230 235 240
 10 His Asp Ile Ala Leu Leu Arg Leu His Gln Pro Val Val Leu Thr Asp
 245 250 255
 15 His Val Val Pro Leu Cys Leu Pro Glu Arg Thr Phe Ser Glu Arg Thr
 260 265 270
 20 Leu Ala Phe Val Arg Phe Ser Leu Val Ser Gly Trp Gly Gln Leu Leu
 275 280 285
 25 Asp Arg Gly Ala Thr Ala Leu Glu Leu Met Val Leu Asn Val Pro Arg
 290 295 300
 30 Leu Met Thr Gln Asp Cys Leu Gln Gln Ser Arg Lys Val Gly Asp Ser
 305 310 315 320
 35 Pro Asn Ile Thr Glu Tyr Met Phe Cys Ala Gly Tyr Ser Asp Gly Ser
 325 330 335
 40 Arg Gly Thr Trp Tyr Leu Thr Gly Ile Val Ser Trp Gly Gln Gly Cys
 355 360 365
 45 Ala Thr Val Gly His Phe Gly Val Tyr Thr Arg Val Ser Gln Tyr Ile
 370 375 380
 50 Glu Trp Leu Gln Lys Leu Met Arg Ser Glu Pro Arg Pro Gly Val Leu
 385 390 395 400
 Leu Arg Ala Pro Phe Pro
 405
 55 <210> 158
 <211> 6996
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens
 60 <400> 158
 gcgacccgcc gctattatct gggcgcggtg gaactgagct gggattatat gcagagcgat 60
 ctggcggaac tgccgggtgga tgcgcgcttt ccgccgcgcg tgccgaaaag ctttccgttt 120
 65 aacaccagcg tgggtgataa aaaaacctg tttgtggaat ttaccgatca tctgtttaac 180
 attgcgaaac cgcgcccgcc gtggatgggc ctgctgggcc cgaccattca ggcggaagtg 240

ES 2 757 930 T3

	tatgataccg tggtgattac cctgaaaaac atggcgagcc atccggtgag cctgcatgcg	300
5	gtgggcgtga gctattggaa agcagacgaa ggcgcggaat atgatgatca gaccagccag	360
	cgcgaaaaag aagatgataa agtgtttccg ggcggcagcc atacctatgt gtggcaggtg	420
	ctgaaagaaa acggccccgat ggcgagcgat ccgctgtgcc tgacctatag ctatctgagc	480
10	catgtggatc tggtgaaaga tctgaacagc ggctgattg gcgcgctgct ggtgtgccgc	540
	gaaggcagcc tggcgaaaga aaaaaccag accctgcata aatttattct gctgtttgcg	600
15	gtgtttgatg aaggcaaaaag ctggcatagc gaaacaaaa acagcctgat gcaggatcgc	660
	gatgcggcga gcgcgcgcgc gtggccgaaa atgcataccg tgaacggcta tgtgaaccgc	720
	agcctgccgg gcctgattgg ctgccatcgc aaaagcgtgt attggcatgt gattggcatg	780
20	ggcaccaccc cggaaagtgc tagcattttt ctggaaggcc atacctttct ggtgcgcaac	840
	catcgccagg cgagcctgga aattagcccg attacctttc tgaccgcgca gacctgctg	900
25	atggatctgg gccagtttct gctgttttgc catattagca gccatcagca tgatggcatg	960
	gaagcgtatg taaaagtgga tagctgcccg gaagaaccgc agctgcgcat gaaaaacaac	1020
	gaagaagcgg aagattatga tgatgatctg accgatagcg aaatggatgt ggtgcgcttt	1080
30	gatgatgata acagcccagc ctttattcag attcgcagcg tggcgaaaaa acatccgaaa	1140
	acctgggtgc attatattgc ggcggaagaa gaagattggg attatgcgcc gctggtgctg	1200
35	gcgccggatg atcgcagcta taaaagccag tatctgaaca acggcccgca gcgcattggc	1260
	cgcaaatata aaaaagtgcg ctttatggcg tataccgatg aaacctttaa aaccgcgaa	1320
	gcgattcagc atgaaagcgg cattctgggc ccgctgctgt atggcgaagt gggcgatacc	1380
40	ctgctgatta tttttaaaaa ccaggcgagc cgcccgtata acatttatcc gcatggcatt	1440
	accgatgtgc gcccgctgta tagccgccgc ctgccgaaag gcgtgaaaca tctgaaagat	1500
45	tttccgattc tgccgggcca aatttttaa tataaatgga ccgtgaccgt ggaagatggc	1560
	ccgacaaaaa gcgatccgcg ctgcctgacc cgctattata gcagctttgt gaacatggaa	1620
	cgcgatctgg cgagcggcct gattggcccc ctgctgattt gctataaaga aagcgtggat	1680
50	cagcgcggca accagattat gagcgataaa cgcaacgtga ttctgtttag cgtgtttgat	1740
	gaaaaccgca gctggtatct gaccgaaaac attcagcgtt ttctgccgaa cccggcgggc	1800
55	gtgcagctgg aagatccgga atttcaggcg agcaacatta tgcatagcat taacggctat	1860
	gtgtttgata gcctgcagct gagcgtgtgc ctgcatgaag tggcgtattg gtatattctg	1920
	agcattggcg cgcagaccga ttttctgagc gtgtttttta gcggctatac ctttaaacat	1980
60	aaaatggtgt atgaagatac cctgaccctg tttccgttta gcggcgaaaac cgtgtttatg	2040
	agcatggaaa acccgggcct gtggattctg ggctgccata acagcgattt tcgcaaccgc	2100
65	ggcatgaccg cgctgctgaa agtgagcagc tgcgataaaa acaccggcga ttattatgaa	2160
	gatagctatg aagatattag cgcgtatctg ctgagcaaaa acaacgcgat tgaaccgcgc	2220

ES 2 757 930 T3

	agcttttagcc agaacagccg ccatccgagc acccgccaga aacagtttaa cgcgaccacc	2280
	attccggaaa acgatattga aaaaaccgat ccgtggtttg cgcacgcac cccgatgccg	2340
5	aaaattcaga acgtgagcag cagcgatctg ctgatgctgc tgcgccagag cccgaccccg	2400
	catggcctga gcctgagcga tctgcaggaa gcgaaatatg aaacctttag cgatgatccg	2460
10	agcccgggcg cgattgatag caacaacagc ctgagcgaaa tgaccattt tcgcccgcag	2520
	ctgcatcata gggcgatat ggtgtttacc ccggaaagcg gcctgcagct ggcctgaac	2580
	gaaaaactgg gcaccaccgc ggcgaccgaa ctgaaaaaac tggattttaa agtgagcagc	2640
15	accagcaaca acctgattag caccattccg agcgataacc tggcggcggg caccgataac	2700
	accagcagcc tgggcccgcc gagcatgccg gtgcattatg atagccagct ggataccacc	2760
20	ctgtttggca aaaaaagcag cccgctgacc gaaagcggcg gcccgctgag cctgagcgaa	2820
	gaaaaacaacg atagcaaac gctggaaagc ggctgatga acagccagga aagcagctgg	2880
	ggcaaaaacg tgagcagcac cgaaagcggc cgctgttta aaggcaaacg cgcgcatggc	2940
25	ccggcgctgc tgaccaaaaga taacgcgctg tttaaagtga gcattagcct gctgaaaacc	3000
	aacaaaaacca gcaacaacag cgcgaccaac cgcaaaacc atattgatgg cccgagcctg	3060
30	ctgattgaaa acagcccag cgtgtggcag aacattctgg aaagcgatac cgaatttaaa	3120
	aaagtgacct cgctgattca tgatcgcag ctgatggata aaaacgcgac cgcgctgcgc	3180
	ctgaaccata tgagcaacaa aaccaccagc agcaaaaaca tggaaatggt gcagcagaaa	3240
35	aaagaaggcc cgattccgcc ggatgcgagc aaccgggata tgagcttttt taaaatgctg	3300
	tttctgcgg aaagcgcgcg ctggattcag cgcacccatg gcaaaaacag cctgaacagc	3360
40	ggccagggcc cgagcccga acagctggtg agcctgggccc cggaaaaaag cgtggaaggc	3420
	cagaactttc tgagcgaaaa aaacaagtg gtggtgggca aaggcgaatt taccaaatg	3480
	gtggcctga aagaaatggt gtttccgagc agccgcaacc tgtttctgac caacctggat	3540
45	aacctgcatg aaaacaacac ccataaccag gaaaaaaaaa ttcaggaaga aattgaaaaa	3600
	aaagaaaacc tgattcagga aaactgggtg ctgccgcaga ttcataaccgt gaccggcacc	3660
50	aaaaacttta tgaaaaacct gtttctgctg agcaccgcc agaactgga aggcagctat	3720
	gatggcgcgt atgcgccggt gctgcaggat tttcgcagcc tgaacgatag caccaaccgc	3780
	accaaaaaac ataccgcgca ttttagcaaa aaaggcgaag aagaaaacct ggaaggcctg	3840
55	ggcaaccaga ccaaacagat tgtggaaaaa tatgctgca ccaccgcat tagcccgaac	3900
	accagccagc agaactttgt gaccagcgc agcaaacgcg cgctgaaaca gtttgcctg	3960
60	ccgctggaag aaaccgaact ggaaaaacgc attattgtgg atgataccag caccagtg	4020
	agcaaaaaca tgaaacatct gacccgagc accctgacc agattgatta taacgaaaaa	4080
	gaaaaaggcg cgattacca gagccgctg agcgattgcc tgaccgcag ccatagcatt	4140
65	ccgagggcga accgcagccc gctgccgatt gcgaaagtga gcagctttcc gagcattcgc	4200
	ccgatttatc tgaccgcggt gctgtttcag gataaacgca gccatctgcc ggcggcgagc	4260

ES 2 757 930 T3

5 t atcgc aaaaa aagatagcgg cgtgcaggaa agcagccatt ttctgcaggg cgcg aaaaaa 4320
 aacaacctga gcctggcgat tctgaccctg gaaatgaccg gcgatcagcg cgaagtgggc 4380
 agcctgggca ccagcgcgac caacagcgtg acctataaaa aagtggaaaa caccgtgctg 4440
 ccgaaaccgg atctgccgaa aaccagcggc aaagtggaa tgcctgccgaa agtgcataatt 4500
 10 t atcagaaaag atctgtttcc gaccgaaacc agcaacggca gcccgggcca tctggatctg 4560
 gtggaaggca gcctgctgca gggcaccgaa ggcgcgatta aatggaacga agcgaaccgc 4620
 ccgggcaaaag tgccgtttct gcgcgtggcg accgaaagca gcgcgaaaaac cccgagcaaa 4680
 15 ctgctggatc cgctggcgtg ggataacat tatggcacc agattccgaa agaagaatgg 4740
 aaaagccagg aaaaaagccc ggaaaaaac gcgtttaaaa aaaaagatac cattctgagc 4800
 20 ctgaacgcgt gcgaaagcaa ccatgcgatt gcggcgatta acgaaggcca gaacaaaccg 4860
 gaaattgaag tgacctgggc gaaacagggc cgcaccgaac gcctgtgcag ccagaacccg 4920
 ccggtgctga aacgccatca gcgcgaaatt acccgacca ccctgcagag cgatcaggaa 4980
 25 gaaattgatt atgatgatac cattagcgtg gaaatgaaaa aagaagattt tgatatttat 5040
 gatgaagatg aaaaccagag cccgcgcagc ttccagaaaa aaaccgcga ttattttatt 5100
 30 gcggcgggtg aacgcctgtg ggattatggc atgagcagca gcccgcatgt gctgcgcaac 5160
 cgcgcgcaga gcggcagcgt gccgcagttt aaaaagtgg tgtttcagga atttaccgat 5220
 ggcagcttta cccagccgct gtatcgccgc gaactgaacg aacatctggg cctgctgggc 5280
 35 ccgtatattc gcgcggaagt ggaagataac attatggtga cctttcgcaa ccaggcgcg 5340
 cgcccgata gcttttatag cagcctgatt agctatgaag aagatcagcg ccaggcgcg 5400
 40 gaaccgcgca aaaactttgt gaaaccgaac gaaacaaaa cctatttttg gaaagtgcag 5460
 catcatatgg cgcgaccaaa agatgaattt gattgcaaag cgtgggcgta ttttagcga 5520
 gtggatctgg aaaaagatgt gcatagcggc ctgattggcc cgctgctggt gtgccatacc 5580
 45 aacaccctga acccggcgca tggccgccag gtgaccgtgc aggaatttgc gctgttttt 5640
 accatttttg atgaaaccaa aagctggtat tttaccgaaa acatggaacg caactgccgc 5700
 50 gcgccgtgca acattcagat ggaagatccg acctttaaag aaaactatcg ctttcatgcg 5760
 attaacggct atattatgga taccctgccg ggctggtga tggcgcagga tcagcgcatt 5820
 cgctggtatc tgcctgagcat gggcagcaac gaaaacattc atagcattca ttttagcggc 5880
 55 catgtgttta ccgtgcgcaa aaaagaagaa tataaaatgg cgctgtataa cctgtatccg 5940
 ggcgtgtttg aaaccgtgga aatgctgccg agcaaagcgg gcatttggcg cgtggaatgc 6000
 60 ctgattggcg aacatctgca tgcgggcatg agcaccctgt ttctggtgta tagcaacaaa 6060
 tgccagacc cgctgggcat ggcgagcggc catattcgcg attttcagat taccgcgagc 6120
 ggccagtatg gccagtgggc gccgaaactg gcgcgcctgc attatagcgg cagcattaac 6180
 65 gcgtggagca ccaaagaacc gtttagctgg attaaagtgg atctgctggc gccgatgatt 6240

ES 2 757 930 T3

attcatggca ttaaaaccca gggcgcgcgc cagaaattta gcagcctgta tattagccag 6300
 tttattatta tgtatagcct ggatggcaaa aaatggcaga cctatcgcgg caacagcacc 6360
 5 ggcaccctga tgggtgttttt tggcaacgtg gatagcagcg gcattaaaca taacatTTTT 6420
 aaccgcgcga ttattgcgcg ctatattcgc ctgcatccga cccattatag cattcgcagc 6480
 10 accctgcgca tggaaactgat gggctgcgat ctgaacagct gcagcatgcc gctgggcatg 6540
 gaaagcaaag cgattagcga tgcgcagatt accgcgagca gctatTTTtac caacatgTTT 6600
 gcgacctgga gcccagcaaa agcgcgcctg catctgcagg gccgcagcaa cgcgtggcgc 6660
 15 ccgcaggTga acaaccgcga agaatggctg caggtggatt ttcagaaaac catgaaagtG 6720
 accggcgtga ccaccaggg cgtgaaaagc ctgctgacca gcatgtatgt gaaagaattt 6780
 ctgattagca gcagccagga tggccatcag tggaccctgt tttttcagaa cggcaaagtG 6840
 20 aaagtgtttc agggcaacca ggatagcttt accccggtgg tgaacagcct ggatccgcgc 6900
 ctgctgaccc gctatctgcg cattcatccg cagagctggg tgcacagat tgcgctgcgc 6960
 25 atggaagtgc tgggctgcga agcgcaggat ctgtat 6996

<210> 159
 <211> 2332
 30 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 159

35 Ala Thr Arg Arg Tyr Tyr Leu Gly Ala Val Glu Leu Ser Trp Asp Tyr
 1 5 10 15

40 Met Gln Ser Asp Leu Gly Glu Leu Pro Val Asp Ala Arg Phe Pro Pro
 20 25 30

45 Arg Val Pro Lys Ser Phe Pro Phe Asn Thr Ser Val Val Tyr Lys Lys
 35 40 45

50 Thr Leu Phe Val Glu Phe Thr Asp His Leu Phe Asn Ile Ala Lys Pro
 50 55 60

55 Arg Pro Pro Trp Met Gly Leu Leu Gly Pro Thr Ile Gln Ala Glu Val
 65 70 75 80

60 Tyr Asp Thr Val Val Ile Thr Leu Lys Asn Met Ala Ser His Pro Val
 85 90 95

65 Ser Leu His Ala Val Gly Val Ser Tyr Trp Lys Ala Ser Glu Gly Ala
 100 105 110

70 Glu Tyr Asp Asp Gln Thr Ser Gln Arg Glu Lys Glu Asp Asp Lys Val
 115 120 125

75 Phe Pro Gly Gly Ser His Thr Tyr Val Trp Gln Val Leu Lys Glu Asn

ES 2 757 930 T3

	130						135								140	
5	Gly 145	Pro	Met	Ala	Ser	Asp 150	Pro	Leu	Cys	Leu	Thr 155	Tyr	Ser	Tyr	Leu	Ser 160
10	His	Val	Asp	Leu	Val 165	Lys	Asp	Leu	Asn	Ser 170	Gly	Leu	Ile	Gly	Ala	Leu 175
15	Leu	Val	Cys	Arg 180	Glu	Gly	Ser	Leu	Ala 185	Lys	Glu	Lys	Thr	Gln 190	Thr	Leu
20	His	Lys	Phe 195	Ile	Leu	Leu	Phe	Ala 200	Val	Phe	Asp	Glu	Gly 205	Lys	Ser	Trp
25	His	Ser 210	Glu	Thr	Lys	Asn	Ser 215	Leu	Met	Gln	Asp	Arg 220	Asp	Ala	Ala	Ser
30	Ala 225	Arg	Ala	Trp	Pro	Lys 230	Met	His	Thr	Val	Asn 235	Gly	Tyr	Val	Asn	Arg 240
35	Ser	Leu	Pro	Gly	Leu 245	Ile	Gly	Cys	His	Arg 250	Lys	Ser	Val	Tyr	Trp 255	His
40	Val	Ile	Gly	Met 260	Gly	Thr	Thr	Pro	Glu 265	Val	His	Ser	Ile	Phe 270	Leu	Glu
45	Gly	His	Thr 275	Phe	Leu	Val	Arg	Asn 280	His	Arg	Gln	Ala	Ser 285	Leu	Glu	Ile
50	Ser	Pro	Ile	Thr	Phe	Leu	Thr 295	Ala	Gln	Thr	Leu	Leu	Met 300	Asp	Leu	Gly
55	Gln 305	Phe	Leu	Leu	Phe	Cys 310	His	Ile	Ser	Ser	His 315	Gln	His	Asp	Gly	Met 320
60	Glu	Ala	Tyr	Val	Lys 325	Val	Asp	Ser	Cys	Pro 330	Glu	Glu	Pro	Gln	Leu	Arg 335
65	Met	Lys	Asn	Asn 340	Glu	Glu	Ala	Glu	Asp 345	Tyr	Asp	Asp	Asp	Leu	Thr	Asp 350
70	Ser	Glu	Met 355	Asp	Val	Val	Arg	Phe 360	Asp	Asp	Asp	Asn	Ser 365	Pro	Ser	Phe
75	Ile	Gln 370	Ile	Arg	Ser	Val	Ala 375	Lys	Lys	His	Pro	Lys 380	Thr	Trp	Val	His
80	Tyr 385	Ile	Ala	Ala	Glu	Glu	Glu	Asp	Trp	Asp	Tyr 395	Ala	Pro	Leu	Val	Leu 400

ES 2 757 930 T3

Ala Pro Asp Asp Arg Ser Tyr Lys Ser Gln Tyr Leu Asn Asn Gly Pro
405 410 415

5 Gln Arg Ile Gly Arg Lys Tyr Lys Lys Val Arg Phe Met Ala Tyr Thr
420 425 430

10 Asp Glu Thr Phe Lys Thr Arg Glu Ala Ile Gln His Glu Ser Gly Ile
435 440 445

15 Leu Gly Pro Leu Leu Tyr Gly Glu Val Gly Asp Thr Leu Leu Ile Ile
450 455 460

20 Phe Lys Asn Gln Ala Ser Arg Pro Tyr Asn Ile Tyr Pro His Gly Ile
465 470 475 480

25 Thr Asp Val Arg Pro Leu Tyr Ser Arg Arg Leu Pro Lys Gly Val Lys
485 490 495

30 His Leu Lys Asp Phe Pro Ile Leu Pro Gly Glu Ile Phe Lys Tyr Lys
500 505 510

35 Trp Thr Val Thr Val Glu Asp Gly Pro Thr Lys Ser Asp Pro Arg Cys
515 520 525

40 Leu Thr Arg Tyr Tyr Ser Ser Phe Val Asn Met Glu Arg Asp Leu Ala
530 535 540

45 Ser Gly Leu Ile Gly Pro Leu Leu Ile Cys Tyr Lys Glu Ser Val Asp
545 550 555 560

50 Gln Arg Gly Asn Gln Ile Met Ser Asp Lys Arg Asn Val Ile Leu Phe
565 570 575

55 Ser Val Phe Asp Glu Asn Arg Ser Trp Tyr Leu Thr Glu Asn Ile Gln
580 585 590

60 Arg Phe Leu Pro Asn Pro Ala Gly Val Gln Leu Glu Asp Pro Glu Phe
595 600 605

65 Gln Ala Ser Asn Ile Met His Ser Ile Asn Gly Tyr Val Phe Asp Ser
610 615 620

70 Leu Gln Leu Ser Val Cys Leu His Glu Val Ala Tyr Trp Tyr Ile Leu
625 630 635 640

75 Ser Ile Gly Ala Gln Thr Asp Phe Leu Ser Val Phe Phe Ser Gly Tyr
645 650 655

80 Thr Phe Lys His Lys Met Val Tyr Glu Asp Thr Leu Thr Leu Phe Pro
660 665 670

ES 2 757 930 T3

Phe Ser Gly Glu Thr Val Phe Met Ser Met Glu Asn Pro Gly Leu Trp
 675 680 685
 5
 Ile Leu Gly Cys His Asn Ser Asp Phe Arg Asn Arg Gly Met Thr Ala
 690 695 700
 10
 Leu Leu Lys Val Ser Ser Cys Asp Lys Asn Thr Gly Asp Tyr Tyr Glu
 705 710 715 720
 15
 Asp Ser Tyr Glu Asp Ile Ser Ala Tyr Leu Leu Ser Lys Asn Asn Ala
 725 730 735
 20
 Ile Glu Pro Arg Ser Phe Ser Gln Asn Ser Arg His Pro Ser Thr Arg
 740 745 750
 25
 Gln Lys Gln Phe Asn Ala Thr Thr Ile Pro Glu Asn Asp Ile Glu Lys
 755 760 765
 30
 Thr Asp Pro Trp Phe Ala His Arg Thr Pro Met Pro Lys Ile Gln Asn
 770 775 780
 35
 Val Ser Ser Ser Asp Leu Leu Met Leu Leu Arg Gln Ser Pro Thr Pro
 785 790 795 800
 40
 His Gly Leu Ser Leu Ser Asp Leu Gln Glu Ala Lys Tyr Glu Thr Phe
 805 810 815
 45
 Ser Asp Asp Pro Ser Pro Gly Ala Ile Asp Ser Asn Asn Ser Leu Ser
 820 825 830
 50
 Glu Met Thr His Phe Arg Pro Gln Leu His His Ser Gly Asp Met Val
 835 840 845
 55
 Phe Thr Pro Glu Ser Gly Leu Gln Leu Arg Leu Asn Glu Lys Leu Gly
 850 855 860
 60
 Thr Thr Ala Ala Thr Glu Leu Lys Lys Leu Asp Phe Lys Val Ser Ser
 865 870 875 880
 65
 Thr Ser Asn Asn Leu Ile Ser Thr Ile Pro Ser Asp Asn Leu Ala Ala
 885 890 895
 Gly Thr Asp Asn Thr Ser Ser Leu Gly Pro Pro Ser Met Pro Val His
 900 905 910
 Tyr Asp Ser Gln Leu Asp Thr Thr Leu Phe Gly Lys Lys Ser Ser Pro
 915 920 925
 70
 Leu Thr Glu Ser Gly Gly Pro Leu Ser Leu Ser Glu Glu Asn Asn Asp
 930 935 940

ES 2 757 930 T3

5 Ser Lys Leu Leu Glu Ser Gly Leu Met Asn Ser Gln Glu Ser Ser Trp
945 950 955 960

10 Gly Lys Asn Val Ser Ser Thr Glu Ser Gly Arg Leu Phe Lys Gly Lys
965 970 975

15 Arg Ala His Gly Pro Ala Leu Leu Thr Lys Asp Asn Ala Leu Phe Lys
980 985 990

20 Val Ser Ile Ser Leu Leu Lys Thr Asn Lys Thr Ser Asn Asn Ser Ala
995 1000 1005

25 Thr Asn Arg Lys Thr His Ile Asp Gly Pro Ser Leu Leu Ile Glu
1010 1015 1020

30 Asn Ser Pro Ser Val Trp Gln Asn Ile Leu Glu Ser Asp Thr Glu
1025 1030 1035

35 Phe Lys Lys Val Thr Pro Leu Ile His Asp Arg Met Leu Met Asp
1040 1045 1050

40 Lys Asn Ala Thr Ala Leu Arg Leu Asn His Met Ser Asn Lys Thr
1055 1060 1065

45 Thr Ser Ser Lys Asn Met Glu Met Val Gln Gln Lys Lys Glu Gly
1070 1075 1080

50 Pro Ile Pro Pro Asp Ala Gln Asn Pro Asp Met Ser Phe Phe Lys
1085 1090 1095

55 Met Leu Phe Leu Pro Glu Ser Ala Arg Trp Ile Gln Arg Thr His
1100 1105 1110

60 Gly Lys Asn Ser Leu Asn Ser Gly Gln Gly Pro Ser Pro Lys Gln
1115 1120 1125

65 Leu Val Ser Leu Gly Pro Glu Lys Ser Val Glu Gly Gln Asn Phe
1130 1135 1140

70 Leu Ser Glu Lys Asn Lys Val Val Val Gly Lys Gly Glu Phe Thr
1145 1150 1155

75 Lys Asp Val Gly Leu Lys Glu Met Val Phe Pro Ser Ser Arg Asn
1160 1165 1170

80 Leu Phe Leu Thr Asn Leu Asp Asn Leu His Glu Asn Asn Thr His
1175 1180 1185

85 Asn Gln Glu Lys Lys Ile Gln Glu Glu Ile Glu Lys Lys Glu Thr

ES 2 757 930 T3

	1190						1195								1200
5	Leu	Ile	Gln	Glu	Asn	Val	Val	Leu	Pro	Gln	Ile	His	Thr	Val	Thr
	1205						1210					1215			
10	Gly	Thr	Lys	Asn	Phe	Met	Lys	Asn	Leu	Phe	Leu	Leu	Ser	Thr	Arg
	1220						1225					1230			
15	Gln	Asn	Val	Glu	Gly	Ser	Tyr	Asp	Gly	Ala	Tyr	Ala	Pro	Val	Leu
	1235						1240					1245			
20	Gln	Asp	Phe	Arg	Ser	Leu	Asn	Asp	Ser	Thr	Asn	Arg	Thr	Lys	Lys
	1250						1255					1260			
25	His	Thr	Ala	His	Phe	Ser	Lys	Lys	Gly	Glu	Glu	Glu	Asn	Leu	Glu
	1265						1270					1275			
30	Gly	Leu	Gly	Asn	Gln	Thr	Lys	Gln	Ile	Val	Glu	Lys	Tyr	Ala	Cys
	1280						1285					1290			
35	Thr	Thr	Arg	Ile	Ser	Pro	Asn	Thr	Ser	Gln	Gln	Asn	Phe	Val	Thr
	1295						1300					1305			
40	Gln	Arg	Ser	Lys	Arg	Ala	Leu	Lys	Gln	Phe	Arg	Leu	Pro	Leu	Glu
	1310						1315					1320			
45	Glu	Thr	Glu	Leu	Glu	Lys	Arg	Ile	Ile	Val	Asp	Asp	Thr	Ser	Thr
	1325						1330					1335			
50	Gln	Trp	Ser	Lys	Asn	Met	Lys	His	Leu	Thr	Pro	Ser	Thr	Leu	Thr
	1340						1345					1350			
55	Gln	Ile	Asp	Tyr	Asn	Glu	Lys	Glu	Lys	Gly	Ala	Ile	Thr	Gln	Ser
	1355						1360					1365			
60	Pro	Leu	Ser	Asp	Cys	Leu	Thr	Arg	Ser	His	Ser	Ile	Pro	Gln	Ala
	1370						1375					1380			
65	Asn	Arg	Ser	Pro	Leu	Pro	Ile	Ala	Lys	Val	Ser	Ser	Phe	Pro	Ser
	1385						1390					1395			
70	Ile	Arg	Pro	Ile	Tyr	Leu	Thr	Arg	Val	Leu	Phe	Gln	Asp	Asn	Ser
	1400						1405					1410			
75	Ser	His	Leu	Pro	Ala	Ala	Ser	Tyr	Arg	Lys	Lys	Asp	Ser	Gly	Val
	1415						1420					1425			
80	Gln	Glu	Ser	Ser	His	Phe	Leu	Gln	Gly	Ala	Lys	Lys	Asn	Asn	Leu
	1430						1435					1440			

ES 2 757 930 T3

Ser Leu Ala Ile Leu Thr Leu Glu Met Thr Gly Asp Gln Arg Glu
1445 1450 1455

5 Val Gly Ser Leu Gly Thr Ser Ala Thr Asn Ser Val Thr Tyr Lys
1460 1465 1470

10 Lys Val Glu Asn Thr Val Leu Pro Lys Pro Asp Leu Pro Lys Thr
1475 1480 1485

15 Ser Gly Lys Val Glu Leu Leu Pro Lys Val His Ile Tyr Gln Lys
1490 1495 1500

20 Asp Leu Phe Pro Thr Glu Thr Ser Asn Gly Ser Pro Gly His Leu
1505 1510 1515

25 Asp Leu Val Glu Gly Ser Leu Leu Gln Gly Thr Glu Gly Ala Ile
1520 1525 1530

30 Lys Trp Asn Glu Ala Asn Arg Pro Gly Lys Val Pro Phe Leu Arg
1535 1540 1545

35 Val Ala Thr Glu Ser Ser Ala Lys Thr Pro Ser Lys Leu Leu Asp
1550 1555 1560

40 Pro Leu Ala Trp Asp Asn His Tyr Gly Thr Gln Ile Pro Lys Glu
1565 1570 1575

45 Glu Trp Lys Ser Gln Glu Lys Ser Pro Glu Lys Thr Ala Phe Lys
1580 1585 1590

50 Lys Lys Asp Thr Ile Leu Ser Leu Asn Ala Cys Glu Ser Asn His
1595 1600 1605

55 Ala Ile Ala Ala Ile Asn Glu Gly Gln Asn Lys Pro Glu Ile Glu
1610 1615 1620

60 Val Thr Trp Ala Lys Gln Gly Arg Thr Glu Arg Leu Cys Ser Gln
1625 1630 1635

65 Asn Pro Pro Val Leu Lys Arg His Gln Arg Glu Ile Thr Arg Thr
1640 1645 1650

70 Thr Leu Gln Ser Asp Gln Glu Glu Ile Asp Tyr Asp Asp Thr Ile
1655 1660 1665

75 Ser Val Glu Met Lys Lys Glu Asp Phe Asp Ile Tyr Asp Glu Asp
1670 1675 1680

80 Glu Asn Gln Ser Pro Arg Ser Phe Gln Lys Lys Thr Arg His Tyr
1685 1690 1695

ES 2 757 930 T3

Phe Ile Ala Ala Val Glu Arg Leu Trp Asp Tyr Gly Met Ser Ser
 1700 1705 1710
 5
 Ser Pro His Val Leu Arg Asn Arg Ala Gln Ser Gly Ser Val Pro
 1715 1720 1725
 10
 Gln Phe Lys Lys Val Val Phe Gln Glu Phe Thr Asp Gly Ser Phe
 1730 1735 1740
 15
 Thr Gln Pro Leu Tyr Arg Gly Glu Leu Asn Glu His Leu Gly Leu
 1745 1750 1755
 20
 Leu Gly Pro Tyr Ile Arg Ala Glu Val Glu Asp Asn Ile Met Val
 1760 1765 1770
 25
 Thr Phe Arg Asn Gln Ala Ser Arg Pro Tyr Ser Phe Tyr Ser Ser
 1775 1780 1785
 30
 Leu Ile Ser Tyr Glu Glu Asp Gln Arg Gln Gly Ala Glu Pro Arg
 1790 1795 1800
 35
 Lys Asn Phe Val Lys Pro Asn Glu Thr Lys Thr Tyr Phe Trp Lys
 1805 1810 1815
 40
 Val Gln His His Met Ala Pro Thr Lys Asp Glu Phe Asp Cys Lys
 1820 1825 1830
 45
 Ala Trp Ala Tyr Phe Ser Asp Val Asp Leu Glu Lys Asp Val His
 1835 1840 1845
 50
 Ser Gly Leu Ile Gly Pro Leu Leu Val Cys His Thr Asn Thr Leu
 1850 1855 1860
 55
 Asn Pro Ala His Gly Arg Gln Val Thr Val Gln Glu Phe Ala Leu
 1865 1870 1875
 60
 Phe Phe Thr Ile Phe Asp Glu Thr Lys Ser Trp Tyr Phe Thr Glu
 1880 1885 1890
 65
 Asn Met Glu Arg Asn Cys Arg Ala Pro Cys Asn Ile Gln Met Glu
 1895 1900 1905
 Asp Pro Thr Phe Lys Glu Asn Tyr Arg Phe His Ala Ile Asn Gly
 1910 1915 1920
 Tyr Ile Met Asp Thr Leu Pro Gly Leu Val Met Ala Gln Asp Gln
 1925 1930 1935
 70
 Arg Ile Arg Trp Tyr Leu Leu Ser Met Gly Ser Asn Glu Asn Ile
 1940 1945 1950

ES 2 757 930 T3

5 His Ser Ile His Phe Ser Gly His Val Phe Thr Val Arg Lys Lys
1955 1960 1965

10 Glu Glu Tyr Lys Met Ala Leu Tyr Asn Leu Tyr Pro Gly Val Phe
1970 1975 1980

15 Glu Thr Val Glu Met Leu Pro Ser Lys Ala Gly Ile Trp Arg Val
1985 1990 1995

20 Phe Leu Val Tyr Ser Asn Lys Cys Gln Thr Pro Leu Gly Met Ala
2015 2020 2025

25 Ser Gly His Ile Arg Asp Phe Gln Ile Thr Ala Ser Gly Gln Tyr
2030 2035 2040

30 Gly Gln Trp Ala Pro Lys Leu Ala Arg Leu His Tyr Ser Gly Ser
2045 2050 2055

35 Ile Asn Ala Trp Ser Thr Lys Glu Pro Phe Ser Trp Ile Lys Val
2060 2065 2070

40 Ala Arg Gln Lys Phe Ser Ser Leu Tyr Ile Ser Gln Phe Ile Ile
2090 2095 2100

45 Met Tyr Ser Leu Asp Gly Lys Lys Trp Gln Thr Tyr Arg Gly Asn
2105 2110 2115

50 Ser Thr Gly Thr Leu Met Val Phe Phe Gly Asn Val Asp Ser Ser
2120 2125 2130

55 Gly Ile Lys His Asn Ile Phe Asn Pro Pro Ile Ile Ala Arg Tyr
2135 2140 2145

60 Ile Arg Leu His Pro Thr His Tyr Ser Ile Arg Ser Thr Leu Arg
2150 2155 2160

65 Met Glu Leu Met Gly Cys Asp Leu Asn Ser Cys Ser Met Pro Leu
2165 2170 2175

Gly Met Glu Ser Lys Ala Ile Ser Asp Ala Gln Ile Thr Ala Ser
2180 2185 2190

Ser Tyr Phe Thr Asn Met Phe Ala Thr Trp Ser Pro Ser Lys Ala

ES 2 757 930 T3

	2195	2200	2205	
5	Arg Leu His Leu Gln Gly	Arg Ser Asn Ala Trp	Arg Pro Gln Val	
	2210	2215	2220	
10	Asn Asn Pro Lys Glu Trp	Leu Gln Val Asp Phe	Gln Lys Thr Met	
	2225	2230	2235	
15	Lys Val Thr Gly Val Thr	Thr Gln Gly Val Lys	Ser Leu Leu Thr	
	2240	2245	2250	
20	Ser Met Tyr Val Lys Glu	Phe Leu Ile Ser Ser	Ser Gln Asp Gly	
	2255	2260	2265	
25	Gln Gly Asn Gln Asp Ser	Phe Thr Pro Val Val	Asn Ser Leu Asp	
	2285	2290	2295	
30	Pro Pro Leu Leu Thr Arg	Tyr Leu Arg Ile His	Pro Gln Ser Trp	
	2300	2305	2310	
35	Val His Gln Ile Ala Leu	Arg Met Glu Val Leu	Gly Cys Glu Ala	
	2315	2320	2325	
40	Gln Asp Leu Tyr			
	2330			
45	<210> 160			
	<211> 1245			
	<212> ADN			
	<213> Homo sapiens			
50	<400> 160			
	tataattcag gtaaattgga agagtttggt caagggaaacc ttgagagaga atgtatggaa			60
	gaaaagtgta gttttgaaga agcacgagaa gtttttgaaa aactgaaag aacaactgaa			120
55	ttttggaagc agtatgttga tggagatcag tgtgagtcca atccatgttt aaatggcggc			180
	agttgcaagg atgacattaa ttctatgaa tgttggtgtc cctttggatt tgaaggaaag			240
60	aactgtgaat tagatgtaac atgtaacatt aagaatggca gatgcgagca gttttgtaaa			300
	aatagtgctg ataacaaggt ggtttgctcc tgtactgagg gatatcgact tgcagaaaac			360
65	cagaagtctt gtgaaccagc agtgccattt ccatgtggaa gagtttctgt ttcacaaact			420
	tctaaactca cccgtgctga ggctgttttt cctgatgtgg actatgtaaa ttctactgaa			480
	gctgaaacca ttttgataa catcactcaa agcacccaat catttaatga cttcactcgg			540
	gttgttggtg gagaagatgc caaaccaggt caattccctt ggcaggttgt tttgaaatggt			600
	aaagttgatg cattctgtgg aggctctatc gttaatgaaa aatggattgt aactgctgcc			660

ES 2 757 930 T3

cactgtggtg aaactggtgt taaaattaca gttgtcgcag gtgaacataa tattgaggag 720
 acagaacata cagagcaaaa gcgaaatgtg attcgaatta ttctcacca caactacaat 780
 5 gcagctatta ataagtacaa ccatgacatt gcccttctgg aactggacga acccttagtg 840
 ctaaacagct acgttacacc tatttgcatt gctgacaagg aatacacgaa catcttctc 900
 10 aaatttgat ctggctatgt aagtggctgg ggaagagtct tccacaaagg gagatcagct 960
 ttagttcttc agtaccttag agttccactt gttgaccgag ccacatgtct tcgatctaca 1020
 aagttcacca tctataacaa catgttctgt gctggcttcc atgaaggagg tagagattca 1080
 15 tgtcaaggag atagtggggg accccatggt actgaagtgg aagggaccag tttcttaact 1140
 ggaattatta gctgggggtga agagtgtgca atgaaaggca aatatggaat atataccaag 1200
 20 gtatcccggg atgtcaactg gattaaggaa aaaacaaagc tcact 1245

 <210> 161
 <211> 415
 <212> PRT
 25 <213> Homo sapiens

 <400> 161

 Tyr Asn Ser Gly Lys Leu Glu Glu Phe Val Gln Gly Asn Leu Glu Arg
 30 1 5 10 15

 Glu Cys Met Glu Glu Lys Cys Ser Phe Glu Glu Ala Arg Glu Val Phe
 35 20 25 30

 Glu Asn Thr Glu Arg Thr Thr Glu Phe Trp Lys Gln Tyr Val Asp Gly
 40 35 40 45

 Asp Gln Cys Glu Ser Asn Pro Cys Leu Asn Gly Gly Ser Cys Lys Asp
 45 50 55 60

 Asp Ile Asn Ser Tyr Glu Cys Trp Cys Pro Phe Gly Phe Glu Gly Lys
 50 65 70 75 80

 Asn Cys Glu Leu Asp Val Thr Cys Asn Ile Lys Asn Gly Arg Cys Glu
 55 85 90 95

 Gln Phe Cys Lys Asn Ser Ala Asp Asn Lys Val Val Cys Ser Cys Thr
 60 100 105 110

 Glu Gly Tyr Arg Leu Ala Glu Asn Gln Lys Ser Cys Glu Pro Ala Val
 65 115 120 125

 Pro Phe Pro Cys Gly Arg Val Ser Val Ser Gln Thr Ser Lys Leu Thr
 70 130 135 140

 Arg Ala Glu Ala Val Phe Pro Asp Val Asp Tyr Val Asn Ser Thr Glu
 75 145 150 155 160

ES 2 757 930 T3

Ala Glu Thr Ile Leu Asp Asn Ile Thr Gln Ser Thr Gln Ser Phe Asn
165 170 175

5
Asp Phe Thr Arg Val Val Gly Gly Glu Asp Ala Lys Pro Gly Gln Phe
180 185 190

10
Pro Trp Gln Val Val Leu Asn Gly Lys Val Asp Ala Phe Cys Gly Gly
195 200 205

15
Ser Ile Val Asn Glu Lys Trp Ile Val Thr Ala Ala His Cys Val Glu
210 215 220

20
Thr Gly Val Lys Ile Thr Val Val Ala Gly Glu His Asn Ile Glu Glu
225 230 235 240

25
Thr Glu His Thr Glu Gln Lys Arg Asn Val Ile Arg Ile Ile Pro His
245 250 255

30
His Asn Tyr Asn Ala Ala Ile Asn Lys Tyr Asn His Asp Ile Ala Leu
260 265 270

35
Leu Glu Leu Asp Glu Pro Leu Val Leu Asn Ser Tyr Val Thr Pro Ile
275 280 285

40
Cys Ile Ala Asp Lys Glu Tyr Thr Asn Ile Phe Leu Lys Phe Gly Ser
290 295 300

45
Gly Tyr Val Ser Gly Trp Gly Arg Val Phe His Lys Gly Arg Ser Ala
305 310 315 320

50
Leu Val Leu Gln Tyr Leu Arg Val Pro Leu Val Asp Arg Ala Thr Cys
325 330 335

55
Leu Arg Ser Thr Lys Phe Thr Ile Tyr Asn Asn Met Phe Cys Ala Gly
340 345 350

60
Phe His Glu Gly Gly Arg Asp Ser Cys Gln Gly Asp Ser Gly Gly Pro
355 360 365

65
His Val Thr Glu Val Glu Gly Thr Ser Phe Leu Thr Gly Ile Ile Ser
370 375 380

70
Trp Gly Glu Glu Cys Ala Met Lys Gly Lys Tyr Gly Ile Tyr Thr Lys
385 390 395 400

75
Val Ser Arg Tyr Val Asn Trp Ile Lys Glu Lys Thr Lys Leu Thr
405 410 415

80
<210> 162
<211> 1344

ES 2 757 930 T3

<212> ADN
 <213> Homo sapiens

<400> 162

5 gcgaacagct ttctggaaga aatgaaaaaa ggccatctgg aacgcgaatg catggaagaa 60
 acctgcagct atgaagaagc gcgcgaagtg tttgaagata gcgataaaac caacgaattt 120
 10 tggaaacaaat ataaagatgg cgatcagtgc gaaaccagcc cgtgccagaa ccagggcaaa 180
 tgcaaagatg gcctggggcga atatacctgc acctgcctgg aaggctttga aggcaaaaac 240
 tgcgaactgt ttaccgcgaa actgtgcagc ctggataacg gcgattgcga tcagttttgc 300
 15 catgaagaac agaacagcgt ggtgtgcagc tgcgcgcgcg gctataacct ggccgataac 360
 ggcaaagcgt gcattccgac cggcccgtat ccgtgcggca aacagacctt ggaacgccgc 420
 aaacgcagcg tggcgcaggg gaccagcagc agcggcgaag cgccggatag cattacctgg 480
 20 aaaccgtatg atgcggcgga tctggatccg accgaaaacc cgtttgatct gctggatttt 540
 aaccagacct agccggaacg cggcgataac aacctgacct gcattgtggg cggccaggaa 600
 25 tgcaaagatg gcgaatgccc gtggcagggc ctgctgatta acgaagaaaa cgaaggcttt 660
 tgcggcggca ccattctgag cgaattttat attctgacct cggcgcattg cctgtatcag 720
 gcgaaacgct ttaaagtgcg cgtgggcgat cgcaacaccg aacaggaaga aggcggcgaa 780
 30 gcggtgcatg aagtggaggt ggtgattaaa cataaccgct ttaccaaaaga aacctatgat 840
 tttgatattg cgggtctgcg cctgaaaacc ccgattacct ttcgcatgaa cgtggcgccg 900
 35 gcgtgcctgc cggaacgcga ttgggcggaa agcaccctga tgaccagaa aaccggcatt 960
 gtgagcggct ttggccgcac ccatgaaaaa ggccgccaga gcaccgcctt gaaaatgctg 1020
 gaagtgccgt atgtggatcg caacagctgc aaactgagca gcagctttat tattaccag 1080
 40 aacatgtttt gcgcgggcta tgataccaaa caggaagatg cgtgccaggg cgatagcggc 1140
 ggcccgcagc tgaccgcctt taaagatacc tattttgtga ccggcattgt gagctggggc 1200
 45 gaaggctgcg cgcgcaaagg caaatatggc atttatacca aagtgaccgc gtttctgaaa 1260
 tggattgatc gcagcatgaa aaccgcgggc ctgccgaaag cgaaaagcca tgcgccggaa 1320
 50 gtgattacca gcagcccgt gaaa 1344

<210> 163
 <211> 448
 <212> PRT
 55 <213> Homo sapiens

<400> 163

60 Ala Asn Ser Phe Leu Glu Glu Met Lys Lys Gly His Leu Glu Arg Glu
 1 5 10 15
 Cys Met Glu Glu Thr Cys Ser Tyr Glu Glu Ala Arg Glu Val Phe Glu
 20 25 30
 65 Asp Ser Asp Lys Thr Asn Glu Phe Trp Asn Lys Tyr Lys Asp Gly Asp

ES 2 757 930 T3

	35		40		45														
5	Gln	Cys	Glu	Thr	Ser	Pro	Cys	Gln	Asn	Gln	Gly	Lys	Cys	Lys	Asp	Gly			
	50						55					60							
10	Leu	Gly	Glu	Tyr	Thr	Cys	Thr	Cys	Leu	Glu	Gly	Phe	Glu	Gly	Lys	Asn			
	65					70					75					80			
15	Cys	Glu	Leu	Phe	Thr	Arg	Lys	Leu	Cys	Ser	Leu	Asp	Asn	Gly	Asp	Cys			
				85						90					95				
20	Asp	Gln	Phe	Cys	His	Glu	Glu	Gln	Asn	Ser	Val	Val	Cys	Ser	Cys	Ala			
			100						105					110					
25	Arg	Gly	Tyr	Thr	Leu	Ala	Asp	Asn	Gly	Lys	Ala	Cys	Ile	Pro	Thr	Gly			
			115					120					125						
30	Pro	Tyr	Pro	Cys	Gly	Lys	Gln	Thr	Leu	Glu	Arg	Arg	Lys	Arg	Ser	Val			
	130						135					140							
35	Ala	Gln	Ala	Thr	Ser	Ser	Ser	Gly	Glu	Ala	Pro	Asp	Ser	Ile	Thr	Trp			
	145					150					155					160			
40	Lys	Pro	Tyr	Asp	Ala	Ala	Asp	Leu	Asp	Pro	Thr	Glu	Asn	Pro	Phe	Asp			
				165						170					175				
45	Leu	Leu	Asp	Phe	Asn	Gln	Thr	Gln	Pro	Glu	Arg	Gly	Asp	Asn	Asn	Leu			
				180					185					190					
50	Thr	Arg	Ile	Val	Gly	Gly	Gln	Glu	Cys	Lys	Asp	Gly	Glu	Cys	Pro	Trp			
			195					200					205						
55	Gln	Ala	Leu	Leu	Ile	Asn	Glu	Glu	Asn	Glu	Gly	Phe	Cys	Gly	Gly	Thr			
	210						215					220							
60	Ile	Leu	Ser	Glu	Phe	Tyr	Ile	Leu	Thr	Ala	Ala	His	Cys	Leu	Tyr	Gln			
	225					230						235				240			
65	Ala	Lys	Arg	Phe	Lys	Val	Arg	Val	Gly	Asp	Arg	Asn	Thr	Glu	Gln	Glu			
				245						250					255				
70	Glu	Gly	Gly	Glu	Ala	Val	His	Glu	Val	Glu	Val	Val	Ile	Lys	His	Asn			
				260					265					270					
75	Arg	Phe	Thr	Lys	Glu	Thr	Tyr	Asp	Phe	Asp	Ile	Ala	Val	Leu	Arg	Leu			
			275					280					285						
80	Lys	Thr	Pro	Ile	Thr	Phe	Arg	Met	Asn	Val	Ala	Pro	Ala	Cys	Leu	Pro			
	290						295					300							

ES 2 757 930 T3

	Glu	Arg	Asp	Trp	Ala	Glu	Ser	Thr	Leu	Met	Thr	Gln	Lys	Thr	Gly	Ile	
	305					310					315					320	
5	Val	Ser	Gly	Phe	Gly	Arg	Thr	His	Glu	Lys	Gly	Arg	Gln	Ser	Thr	Arg	
				325						330					335		
10	Leu	Lys	Met	Leu	Glu	Val	Pro	Tyr	Val	Asp	Arg	Asn	Ser	Cys	Lys	Leu	
				340					345					350			
15	Ser	Ser	Ser	Phe	Ile	Ile	Thr	Gln	Asn	Met	Phe	Cys	Ala	Gly	Tyr	Asp	
			355					360					365				
20	Thr	Lys	Gln	Glu	Asp	Ala	Cys	Gln	Gly	Asp	Ser	Gly	Gly	Pro	His	Val	
	370						375					380					
25	Thr	Arg	Phe	Lys	Asp	Thr	Tyr	Phe	Val	Thr	Gly	Ile	Val	Ser	Trp	Gly	
	385					390					395					400	
30	Glu	Gly	Cys	Ala	Arg	Lys	Gly	Lys	Tyr	Gly	Ile	Tyr	Thr	Lys	Val	Thr	
				405						410					415		
35	Ala	Phe	Leu	Lys	Trp	Ile	Asp	Arg	Ser	Met	Lys	Thr	Arg	Gly	Leu	Pro	
			420						425					430			
40	Lys	Ala	Lys	Ser	His	Ala	Pro	Glu	Val	Ile	Thr	Ser	Ser	Pro	Leu	Lys	
			435					440					445				
45	<210>	164															
	<211>	1821															
	<212>	ADN															
50	<213>	Homo sapiens															
55	<400>	164															
	gaatgcgtga	cccagctgct	gaaagatacc	tgctttgaag	gcggcgatat	taccaccgtg											60
60	tttaccocga	gcgcgaaata	ttgccaggtg	gtgtgcacct	atcatccgcg	ctgcctgctg											120
	tttaccttta	ccgcggaaag	cccgagcgaa	gatccgaccc	gctggtttac	ctgcctgctg											180
65	aaagatagcg	tgaccgaaac	cctgcccgcg	gtgaaccgca	ccgcggcgat	tagcggctat											240
	agctttaaac	agtgcagcca	tcagattagc	gcgtgcaaca	aagatattta	tgtggatctg											300
	gatatgaaag	gcattaacta	taacagcagc	gtggcgaaaa	gcgcgcagga	atgccaggaa											360
70	cgctgcaccg	atgatgtgca	ttgccatttt	tttacctatg	cgaccgcgca	gtttccgagc											420
	ctggaacatc	gcaacatttg	cctgctgaaa	catacccaga	ccggcacccc	gaccgcgatt											480
75	accaaactgg	ataaagtggg	gagcggcttt	agcctgaaaa	gctgcgcgct	gagcaacctg											540
	gcgtgcattc	gcgatatttt	tccgaacacc	gtgtttgcgg	atagcaacat	tgatagcgtg											600
	atggcgcggg	atgcgtttgt	gtgcggccgc	atttgacccc	atcatccggg	ctgcctgttt											660
80	tttacctttt	ttagccagga	atggccgaaa	gaaagccagc	gcaacctgtg	cctgctgaaa											720
	accagcgaaa	gcggcctgcc	gagcacccgc	attaaaaaaaa	gcaaagcgct	gagcggcttt											780

ES 2 757 930 T3

agcctgcaga gctgccgcca tagcattccg gtgttttgcc atagcagctt ttatcatgat 840
 accgattttc tgggcgaaga actggatatt gtggcggcga aaagccatga agcgtgccag 900
 5 aaactgtgca ccaacgcggt gcgctgccag tttttacct ataccccggc gcaggcgagc 960
 tgcaacgaag gcaaaaggcaa atgctatctg aaactgagca gcaacggcag cccgacccaa 1020
 10 attctgcatg gccgcggcgg cattagcggc tataccctgc gcctgtgcaa aatggataac 1080
 gaatgcacca ccaaaattaa accgcgcatt gtggggcgca ccgcgagcgt gcgcggcgaa 1140
 tggccgtggc aggtgaccct gcataccacc agcccagacc agcgcctatct gtgcggcggc 1200
 15 agcattattg gcaaccagtg gattctgacc gcggcgcatt gcttttatgg cgtggaaagc 1260
 ccgaaaattc tgcgcgtgta tagcggcatt ctgaaccaga gcgaaattaa agaagatacc 1320
 20 agcttttttg gcgtgcagga aattattatt catgatcagt ataaaatggc ggaaagcggc 1380
 tatgatattg cgctgctgaa actggaaacc accgtgaact ataccgatag ccagcgcgcc 1440
 atttgcctgc cgagcaaagg cgatcgcaac gtgatttata ccgattgctg ggtgaccggc 1500
 25 tggggctatc gaaaactgcg cgataaaatt cagaacaccc tgcagaaagc gaaaattccg 1560
 ctggtgacca acgaagaatg ccagaaacgc tatcgcggcc ataaaattac ccataaaatg 1620
 30 atttgcgagg gctatcgcga aggcggcaaa gatgcgtgca aaggcgatag cggcggcccc 1680
 ctgagctgca aacataacga agtgtggcat ctggtgggca ttaccagctg gggcgaaggc 1740
 tgcgcgcagc gcgaacgccc gggcgtgtat accaacgtgg tggaaatgt ggattggatt 1800
 35 ctggaaaaaa cccaggcggg g 1821

40 <210> 165
 <211> 607
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

45 <400> 165

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

ES 2 757 930 T3

Tyr Val Asp Leu Asp Met Lys Gly Ile Asn Tyr Asn Ser Ser Val Ala
 100 105 110
 5
 Lys Ser Ala Gln Glu Cys Gln Glu Arg Cys Thr Asp Asp Val His Cys
 115 120 125
 10
 His Phe Phe Thr Tyr Ala Thr Arg Gln Phe Pro Ser Leu Glu His Arg
 130 135 140
 15
 Asn Ile Cys Leu Leu Lys His Thr Gln Thr Gly Thr Pro Thr Arg Ile
 145 150 155 160
 20
 Thr Lys Leu Asp Lys Val Val Ser Gly Phe Ser Leu Lys Ser Cys Ala
 165 170 175
 25
 Leu Ser Asn Leu Ala Cys Ile Arg Asp Ile Phe Pro Asn Thr Val Phe
 180 185 190
 30
 Ala Asp Ser Asn Ile Asp Ser Val Met Ala Pro Asp Ala Phe Val Cys
 195 200 205
 35
 Gly Arg Ile Cys Thr His His Pro Gly Cys Leu Phe Phe Thr Phe Phe
 210 215 220
 40
 Ser Gln Glu Trp Pro Lys Glu Ser Gln Arg Asn Leu Cys Leu Leu Lys
 225 230 235 240
 45
 Thr Ser Glu Ser Gly Leu Pro Ser Thr Arg Ile Lys Lys Ser Lys Ala
 245 250 255
 50
 Leu Ser Gly Phe Ser Leu Gln Ser Cys Arg His Ser Ile Pro Val Phe
 260 265 270
 55
 Cys His Ser Ser Phe Tyr His Asp Thr Asp Phe Leu Gly Glu Glu Leu
 275 280 285
 60
 Asp Ile Val Ala Ala Lys Ser His Glu Ala Cys Gln Lys Leu Cys Thr
 290 295 300
 65
 Asn Ala Val Arg Cys Gln Phe Phe Thr Tyr Thr Pro Ala Gln Ala Ser
 305 310 315 320
 Cys Asn Glu Gly Lys Gly Lys Cys Tyr Leu Lys Leu Ser Ser Asn Gly
 325 330 335
 Ser Pro Thr Lys Ile Leu His Gly Arg Gly Gly Ile Ser Gly Tyr Thr
 340 345 350
 70
 Leu Arg Leu Cys Lys Met Asp Asn Glu Cys Thr Thr Lys Ile Lys Pro

ES 2 757 930 T3

		355					360								365			
5	Arg	Ile	Val	Gly	Gly	Thr	Ala	Ser	Val	Arg	Gly	Glu	Trp	Pro	Trp	Gln		
		370					375					380						
10	Val	Thr	Leu	His	Thr	Thr	Ser	Pro	Thr	Gln	Arg	His	Leu	Cys	Gly	Gly		
		385				390					395					400		
15	Ser	Ile	Ile	Gly	Asn	Gln	Trp	Ile	Leu	Thr	Ala	Ala	His	Cys	Phe	Tyr		
					405					410					415			
20	Gly	Val	Glu	Ser	Pro	Lys	Ile	Leu	Arg	Val	Tyr	Ser	Gly	Ile	Leu	Asn		
				420					425					430				
25	Ile	Ile	His	Asp	Gln	Tyr	Lys	Met	Ala	Glu	Ser	Gly	Tyr	Asp	Ile	Ala		
		450					455					460						
30	Leu	Leu	Lys	Leu	Glu	Thr	Thr	Val	Asn	Tyr	Thr	Asp	Ser	Gln	Arg	Pro		
		465				470					475					480		
35	Ile	Cys	Leu	Pro	Ser	Lys	Gly	Asp	Arg	Asn	Val	Ile	Tyr	Thr	Asp	Cys		
					485					490					495			
40	Trp	Val	Thr	Gly	Trp	Gly	Tyr	Arg	Lys	Leu	Arg	Asp	Lys	Ile	Gln	Asn		
				500					505					510				
45	Thr	Leu	Gln	Lys	Ala	Lys	Ile	Pro	Leu	Val	Thr	Asn	Glu	Glu	Cys	Gln		
			515					520					525					
50	Lys	Arg	Tyr	Arg	Gly	His	Lys	Ile	Thr	His	Lys	Met	Ile	Cys	Ala	Gly		
		530					535					540						
55	Tyr	Arg	Glu	Gly	Gly	Lys	Asp	Ala	Cys	Lys	Gly	Asp	Ser	Gly	Gly	Pro		
		545				550					555					560		
60	Leu	Ser	Cys	Lys	His	Asn	Glu	Val	Trp	His	Leu	Val	Gly	Ile	Thr	Ser		
					565					570					575			
65	Trp	Gly	Glu	Gly	Cys	Ala	Gln	Arg	Glu	Arg	Pro	Gly	Val	Tyr	Thr	Asn		
				580					585					590				
70	Val	Val	Glu	Tyr	Val	Asp	Trp	Ile	Leu	Glu	Lys	Thr	Gln	Ala	Val			
			595					600					605					
75	<210>	166																
	<211>	750																
	<212>	ADN																
	<213>	Secuencia artificial																

ES 2 757 930 T3

<220>

<223> 0012LC.C36A-HPC4

5 <400> 166
 atgaagttgc ctggtgggct gttggtgctg atgttctgga ttccagcttc cagcagtgat 60
 gttgtgatga cccaaactcc actctccctg cctgtcagtc ttggagatca agcctccatc 120
 10 tcttgcagat ctagtccagag cctgttacac agaaatggaa acacctatctt tcattggggcc 180
 ctgcagaaac caggccagtc tccaaagctc ctgatctaca aagtttccaa ccgattttct 240
 ggggtcccag acaggttcag tggcagtgga tcagggacag atttcacact caagatcagc 300
 15 agagtggagg ctgaggatct gggagtttat ttctgctctc aaagtacaca tgttccgtac 360
 acgttcggag gggggaccaa gctggaaata aaacgtacgg tggtgcacc atctgtcttc 420
 20 atcttcccgc catctgatga gcagttgaaa tctggaactg cctctgttgt gtgcctgctg 480
 aataacttct atcccagaga ggccaaagta cagtgggaagg tggataacgc cctccaatcg 540
 ggtaactccc aggagagtgt cacagagcag gacagcaagg acagcaccta cagcctcagc 600
 25 agcacctga cgctgagcaa agcagactac gagaacaca aagtctacgc ctgccaagtc 660
 acccatcagg gcctgagctc gcccgtcaca aagagcttca acaggggaga gtgtgaggac 720
 30 caggtggacc ccagactgat cgacggcaag 750

<210> 167

<211> 250

35 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> 0012LC.C36A-HPC4

40 <400> 167
 Met Lys Leu Pro Val Gly Leu Leu Val Leu Met Phe Trp Ile Pro Ala
 1 5 10 15
 45 Ser Ser Ser Asp Val Val Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Pro Val
 20 25 30
 50 Ser Leu Gly Asp Gln Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu
 35 40 45
 55 Val His Arg Asn Gly Asn Thr Tyr Phe His Trp Ala Leu Gln Lys Pro
 50 55 60
 60 Gly Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser
 65 70 75 80
 65 Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr
 85 90 95
 Leu Lys Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Val Tyr Phe Cys

ES 2 757 930 T3

	100	105	110
5	Ser Gln Ser Thr His Val Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu 115 120 125		
10	Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro 130 135 140		
15	Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu 145 150 155 160		
20	Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn 165 170 175		
25	Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser 180 185 190		
30	Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala 195 200 205		
35	Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly 210 215 220		
40	Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys Glu Asp 225 230 235 240		
45	Gln Val Asp Pro Arg Leu Ile Asp Gly Lys 245 250		
50	<210> 168 <211> 735 <212> ADN <213> Secuencia artificial		
55	<220> <223> 0012VH-CH1-HPC4 <400> 168 atggattttg ggctgatttt ttttattggt gctcttttaa aaggggtcca gtgtgagggtg		60
60	aaacttctcg agtctggagg tggcctggtg cagcctggag gatccctgaa actctcctgt gcagcctcag gattcgattt tagtagatac tggatgactt ggtcccgga ggctccaggg		120
65	aaagggctag aatggattgg agaaattaat ccagatagca gtacgataaa ctatacgcca tctctaaagg ataaattcat catctccaga gacaacgcca agaatacgct gtacctgcaa		240
70	atgagcgaag tgagatctga ggacacagcc ctttattact gtgcaagcgg ggtgtttact tcctggggcc aagggactct ggtcactgtc tctgcagcta gcaccaaggg cccatccgtc		360
75	ttccccctgg cgcctgctc caggagcacc tccgagagca cagccgcctt gggctgcctg		480
80	gtcaaggact acttccccga accggtgacg gtgtcgtgga actcaggcgc cctgaccagc ggcgtgcaca ccttccccgc tgtcctacag tcctcaggac tctactccct cagcagcgtg		540
85			600

ES 2 757 930 T3

gtgaccgtgc cctccagcag cttgggcacg aagacctaca cctgcaacgt agatcacaag 660
 5 cccagcaaca ccaaggtgga caagagagtt gagtccaaag aggaccaggt ggaccccaga 720
 ctgatcgacg gcaag 735

<210> 169
 <211> 245
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> 0012VH-CH1-HPC4

<400> 169

Met Asp Phe Gly Leu Ile Phe Phe Ile Val Ala Leu Leu Lys Gly Val
 20 1 5 10 15

Gln Cys Glu Val Lys Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro
 25 20 25 30

Gly Gly Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Asp Phe Ser
 30 35 40 45

Arg Tyr Trp Met Thr Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu
 35 50 55 60

Trp Ile Gly Glu Ile Asn Pro Asp Ser Ser Thr Ile Asn Tyr Thr Pro
 40 65 70 75 80

Ser Leu Lys Asp Lys Phe Ile Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr
 45 85 90 95

Leu Tyr Leu Gln Met Ser Glu Val Arg Ser Glu Asp Thr Ala Leu Tyr
 50 100 105 110

Tyr Cys Ala Ser Gly Val Phe Thr Ser Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val
 55 115 120 125

Thr Val Ser Ala Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala
 60 130 135 140

Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu
 65 145 150 155 160

Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly
 70 165 170 175

Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser
 75 180 185 190

Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu

ES 2 757 930 T3

195 200 205

5 Gly Thr Lys Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn Thr
210 215 220

10 Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Ser Lys Glu Asp Gln Val Asp Pro Arg
225 230 235 240

15 Leu Ile Asp Gly Lys
245

20 <210> 170
<211> 714
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

25 <220>
<223> 0012VH.T60N-CH1-YGPPC

30 <400> 170
atggattttg ggctgatttt ttttattggt gctcttttaa aaggggtcca gtgtgaggtg 60
aaacttctcg agtctggagg tggcctgggtg cagcctggag gatccctgaa actctctctgt 120
gcagcctcag gattcgattt tagtagatac tggatgactt gggtcggca ggctccaggg 180
35 aaagggctag aatggattgg agaaattaat ccagatagca gtacgataaa ctataaccca 240
tctctaaagg ataaattcat catctccaga gacaacgcca agaatacgct gtacctgcaa 300
atgagcgaag tgagatctga ggacacagcc ctttattact gtgcaagcgg ggtgtttact 360
tcctggggcc aagggactct ggctactgtc tctgcagcta gcaccaaggg cccatccgtc 420
40 ttccccctgg cgcctgctc caggagcacc tccgagagca cagccgcctt gggctgctg 480
gtcaaggact acttccccga accggtgacg gtgtcgtgga actcaggcgc cctgaccagc 540
ggcgtgcaca ccttcccggc tgtcctacag tcctcaggac tctactocct cagcagcgtg 600
45 gtgaccgtgc cctccagcag cttgggcacg aagacctaca cctgcaacgt agatcacaag 660
cccagcaaca ccaaggtgga caagagagtt gagtccaaat atggtcccc atgc 714

50 <210> 171
<211> 238
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

55 <220>
<223> 0012VH.T60N-CH1-YGPPC

60 <400> 171

65 Met Asp Phe Gly Leu Ile Phe Phe Ile Val Ala Leu Leu Lys Gly Val
1 5 10 15

Gln Cys Glu Val Lys Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro
20 25 30

ES 2 757 930 T3

	Gly	Gly	Ser	Leu	Lys	Leu	Ser	Cys	Ala	Ala	Ser	Gly	Phe	Asp	Phe	Ser	
			35					40					45				
5	Arg	Tyr	Trp	Met	Thr	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu	Glu	
		50					55					60					
10	Trp	Ile	Gly	Glu	Ile	Asn	Pro	Asp	Ser	Ser	Thr	Ile	Asn	Tyr	Asn	Pro	
	65					70					75					80	
15	Ser	Leu	Lys	Asp	Lys	Phe	Ile	Ile	Ser	Arg	Asp	Asn	Ala	Lys	Asn	Thr	
					85					90					95		
20	Leu	Tyr	Leu	Gln	Met	Ser	Glu	Val	Arg	Ser	Glu	Asp	Thr	Ala	Leu	Tyr	
				100					105					110			
25	Tyr	Cys	Ala	Ser	Gly	Val	Phe	Thr	Ser	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Leu	Val	
			115					120					125				
30	Thr	Val	Ser	Ala	Ala	Ser	Thr	Lys	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Pro	Leu	Ala	
		130					135					140					
35	Pro	Cys	Ser	Arg	Ser	Thr	Ser	Glu	Ser	Thr	Ala	Ala	Leu	Gly	Cys	Leu	
	145					150					155					160	
40	Val	Lys	Asp	Tyr	Phe	Pro	Glu	Pro	Val	Thr	Val	Ser	Trp	Asn	Ser	Gly	
					165					170					175		
45	Ala	Leu	Thr	Ser	Gly	Val	His	Thr	Phe	Pro	Ala	Val	Leu	Gln	Ser	Ser	
				180					185					190			
50	Gly	Leu	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Val	Val	Thr	Val	Pro	Ser	Ser	Ser	Leu	
			195					200					205				
55	Gly	Thr	Lys	Thr	Tyr	Thr	Cys	Asn	Val	Asp	His	Lys	Pro	Ser	Asn	Thr	
		210					215					220					
60	Lys	Val	Asp	Lys	Arg	Val	Glu	Ser	Lys	Tyr	Gly	Pro	Pro	Cys			
	225					230					235						
65	<210>	172															
	<211>	2091															
	<212>	ADN															
	<213>	Secuencia artificial															
	<220>																
	<223>	FIX-L4b-0012LC															
	<400>	172															
		atgcagcgcg	tgaacatgat	catggcagaa	tcaccaggcc	tcatcaccat	ctgcctttta										60
		ggatatctac	tcagtgctga	atgtacagtt	tttcttgatc	atgaaaacgc	caacaaaatt										120
		ctgaatcggc	caaagaggta	taattcaggt	aaattggaag	agtttggtca	agggaacctt										180

ES 2 757 930 T3

	gagagagaat gtatggaaga aaagtgtagt tttgaagaag cacgagaagt ttttghaaaac	240
	actgaaagaa caactgaatt ttggaagcag tatgttgatg gagatcagtg tgagtccaat	300
5	ccatgtttaa atggcggcag ttgcaaggat gacattaatt cctatgaatg ttggtgtccc	360
	tttggatttg aaggaaagaa ctgtgaatta gatgtaacat gtaacattaa gaatggcaga	420
10	tgcgagcagt tttgtaaaaa tagtgctgat aacaagggtgg tttgctctctg tactgagggg	480
	tatcgacttg cagaaaacca gaagtctctgt gaaccagcag tgccatttcc atgtggaaga	540
	gtttctgttt cacaaacttc taagctcacc cgtgctgagg ctgtttttcc tgatgtggac	600
15	tatgtaaatt ctactgaagc tgaaacatt ttggataaca tcaactcaaag caccacaatca	660
	tttaatgact tcaactcgggt tgttgggtgga gaagatgcca aaccagggtca attcccttgg	720
20	caggttgttt tgaatggtaa agttgatgca ttctgtggag gctctatcgt taatgaaaa	780
	tggattgtaa ctgctgcccc ctgtgttgaa actggtgtta aaattacagt tgtcgcaggt	840
	gaacataata ttgaggagac agaacataca gagcaaaagc gaaatgtgat tcgaattatt	900
25	cctcaccaca actacaatgc agctattaat aagtacaacc atgacattgc ccttctggaa	960
	ctggacgaac ccttagtgct aaacagctac gttacaccta tttgcattgc tgacaaggaa	1020
30	tacacgaaca tcttctcaa atttggatct ggctatgtaa gtggctgggg aagagtcttc	1080
	cacaaagggg gatcagcttt agttcttcag taccttagag ttccacttgt tgaccgagcc	1140
	acatgtcttc gatctacaaa gttcaccatc tataacaaca tgttctgtgc tggcttccat	1200
35	gaaggaggta gagattcatg tcaaggagat agtgggggac cccatgttac tgaagtggaa	1260
	gggaccagtt tcttaactgg aattattagc tgggggtgaag agtgtgcaat gaaaggcaaa	1320
40	tatggaatat ataccaaggt atcccggat gtcaactgga ttaaggaaaa aacaaagctc	1380
	actggagggtg gcgggtctgg tggcggggga tcaggcgggg gaggttccgg atccgatgtt	1440
	gtgatgacc aaactccact ctccctgect gtcagtcttg gagatcaagc ctccatctct	1500
45	tgcatgcta gtcagagcct tgtacacaga aatggaaaca cctattttca ttggtgctg	1560
	cagaaaccag gccagtctcc aaagtctctg atctacaaa tttccaaccg attttctggg	1620
50	gtcccagaca ggttcagtg cagtggatca gggacagatt tcacactcaa gatcagcaga	1680
	gtggaggctg aggatctggg agtttatttc tgctctcaaa gtacacatgt tccgtacacg	1740
	ttcggagggg ggaccaagct gaaataaaa cgtacgggtg ctgcaccatc tgtcttcatc	1800
55	ttcccgccat ctgatgagca gttgaaatct ggaactgect ctgttgtgtg cctgctgaat	1860
	aacttctatc ccagagaggc caaagtacag tggaaagggtg ataacgccct ccaatcgggt	1920
60	aactcccagg agagtgtcac agagcaggac agcaaggaca gcacctacag cctcagcagc	1980
	accctgacgc tgagcaaagc agactacgag aaacacaaag tctacgectg cgaagtcacc	2040
	catcagggcc tgagctcgcc cgtcacaaa agcttcaaca ggggagagtg t	2091
65	<210> 173	
	<211> 697	

ES 2 757 930 T3

<212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 5 <223> FIX-L4b-0012LC

<400> 173

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

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

20 Asp His Glu Asn Ala Asn Lys Ile Leu Asn Arg Pro Lys Arg Tyr Asn
 35 40 45

25 Ser Gly Lys Leu Glu Glu Phe Val Gln Gly Asn Leu Glu Arg Glu Cys
 50 55 60

30 Met Glu Glu Lys Cys Ser Phe Glu Glu Ala Arg Glu Val Phe Glu Asn
 65 70 75 80

35 Thr Glu Arg Thr Thr Glu Phe Trp Lys Gln Tyr Val Asp Gly Asp Gln
 85 90 95

40 Cys Glu Ser Asn Pro Cys Leu Asn Gly Gly Ser Cys Lys Asp Asp Ile
 100 105 110

45 Asn Ser Tyr Glu Cys Trp Cys Pro Phe Gly Phe Glu Gly Lys Asn Cys
 115 120 125

50 Glu Leu Asp Val Thr Cys Asn Ile Lys Asn Gly Arg Cys Glu Gln Phe
 130 135 140

55 Cys Lys Asn Ser Ala Asp Asn Lys Val Val Cys Ser Cys Thr Glu Gly
 145 150 155 160

60 Tyr Arg Leu Ala Glu Asn Gln Lys Ser Cys Glu Pro Ala Val Pro Phe
 165 170 175

65 Pro Cys Gly Arg Val Ser Val Ser Gln Thr Ser Lys Leu Thr Arg Ala
 180 185 190

70 Glu Ala Val Phe Pro Asp Val Asp Tyr Val Asn Ser Thr Glu Ala Glu
 195 200 205

75 Thr Ile Leu Asp Asn Ile Thr Gln Ser Thr Gln Ser Phe Asn Asp Phe
 210 215 220

80 Thr Arg Val Val Gly Gly Glu Asp Ala Lys Pro Gly Gln Phe Pro Trp
 225 230 235 240

ES 2 757 930 T3

Gln Val Val Leu Asn Gly Lys Val Asp Ala Phe Cys Gly Gly Ser Ile
 245 250 255
 5
 Val Asn Glu Lys Trp Ile Val Thr Ala Ala His Cys Val Glu Thr Gly
 260 265 270
 10
 Val Lys Ile Thr Val Val Ala Gly Glu His Asn Ile Glu Glu Thr Glu
 275 280 285
 15
 His Thr Glu Gln Lys Arg Asn Val Ile Arg Ile Ile Pro His His Asn
 290 295 300
 20
 Tyr Asn Ala Ala Ile Asn Lys Tyr Asn His Asp Ile Ala Leu Leu Glu
 305 310 315 320
 Leu Asp Glu Pro Leu Val Leu Asn Ser Tyr Val Thr Pro Ile Cys Ile
 325 330 335
 25
 Ala Asp Lys Glu Tyr Thr Asn Ile Phe Leu Lys Phe Gly Ser Gly Tyr
 340 345 350
 30
 Val Ser Gly Trp Gly Arg Val Phe His Lys Gly Arg Ser Ala Leu Val
 355 360 365
 35
 Leu Gln Tyr Leu Arg Val Pro Leu Val Asp Arg Ala Thr Cys Leu Arg
 370 375 380
 40
 Ser Thr Lys Phe Thr Ile Tyr Asn Asn Met Phe Cys Ala Gly Phe His
 385 390 395 400
 45
 Glu Gly Gly Arg Asp Ser Cys Gln Gly Asp Ser Gly Gly Pro His Val
 405 410 415
 50
 Thr Glu Val Glu Gly Thr Ser Phe Leu Thr Gly Ile Ile Ser Trp Gly
 420 425 430
 55
 Glu Glu Cys Ala Met Lys Gly Lys Tyr Gly Ile Tyr Thr Lys Val Ser
 435 440 445
 60
 Arg Tyr Val Asn Trp Ile Lys Glu Lys Thr Lys Leu Thr Gly Gly Gly
 450 455 460
 65
 Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Ser Asp Val
 465 470 475 480
 Val Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Pro Val Ser Leu Gly Asp Gln
 485 490 495
 Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val His Arg Asn Gly
 500 505 510

ES 2 757 930 T3

5 Asn Thr Tyr Phe His Trp Cys Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Lys
 515 520 525
 10 Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro Asp Arg
 530 535 540
 15 Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile Ser Arg
 545 550 555 560
 20 Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Val Tyr Phe Cys Ser Gln Ser Thr His
 565 570 575
 25 Val Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Thr
 580 585 590
 30 Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu
 595 600 605
 35 Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro
 610 615 620
 40 Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly
 625 630 635 640
 45 Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr
 645 650 655
 50 Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His
 660 665 670
 55 Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val
 675 680 685
 60 Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 690 695
 65 <210> 174
 <211> 246
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> 0003Fab LC=0062LC-HPC4
 <400> 174
 60 Met Met Ser Ser Ala Gln Phe Leu Gly Leu Leu Leu Leu Cys Phe Gln
 1 5 10 15
 65 Gly Thr Arg Cys Asp Ile Gln Met Thr Gln Thr Thr Ser Ser Leu Ser
 20 25 30

ES 2 757 930 T3

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

5 Val His Ser Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Pro Met Lys
 20 25 30

10 Pro Gly Ala Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Thr Gly Tyr Thr Phe
 35 40 45

15 Ser Ser His Trp Ile Glu Trp Ile Lys Gln Arg Pro Gly His Gly Leu
 50 55 60

20 Glu Trp Ile Gly Glu Ile Leu Pro Gly Ser Gly Asn Thr Asn Tyr Asn
 65 70 75 80

25 Glu Lys Phe Lys Gly Lys Ala Thr Phe Thr Ala Asp Thr Ser Ser Asn
 85 90 95

30 Thr Ala Tyr Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val
 100 105 110

35 Tyr Tyr Cys Ala Arg Gly Tyr Tyr Gly Leu Asn Tyr Asp Trp Tyr Phe
 115 120 125

40 Asp Val Trp Gly Ala Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr
 130 135 140

45 Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser
 145 150 155 160

50 Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu
 165 170 175

55 Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His
 180 185 190

60 Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser
 195 200 205

65 Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr Tyr Thr Cys
 210 215 220

Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu
 225 230 235 240

60 Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys
 245

65 <210> 176
 <211> 246
 <212> PRT

ES 2 757 930 T3

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> 0051VH-CH1-YGPPC (parte de 0074Fab)

5

<400> 176

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

10

Val His Ser Gln Val Gln Leu Glu Gln Ser Gly Ala Glu Leu Val Arg
 20 25 30

15

Pro Gly Val Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Gly Ser Gly Tyr Thr Phe
 35 40 45

20

Thr Asp Tyr Ser Met His Trp Val Lys Gln Ser His Ala Lys Ser Leu
 50 55 60

25

Glu Trp Ile Gly Val Ile Ser Thr Tyr Tyr Gly Asp Val Arg Tyr Asn
 65 70 75 80

30

Gln Lys Phe Lys Gly Lys Ala Thr Met Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser
 85 90 95

35

Thr Ala Tyr Met Ala Leu Ala Arg Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Ile
 100 105 110

40

Tyr Tyr Cys Ala Arg Ala Pro Met Ile Thr Thr Gly Ala Trp Phe Ala
 115 120 125

45

Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ala Ala Ser Thr Lys
 130 135 140

50

Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu
 145 150 155 160

55

Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro
 165 170 175

60

Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr
 180 185 190

65

Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val
 195 200 205

70

Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr Tyr Thr Cys Asn
 210 215 220

75

Val Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Ser
 225 230 235 240

ES 2 757 930 T3

Lys Tyr Gly Pro Pro Cys
245

5 <210> 177
<211> 246
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

10 <220>
<223> 0051LC-HPC4 (parte de 0074Fab)
<400> 177

15 Met Lys Ser Gln Thr Gln Val Phe Val Phe Leu Leu Leu Cys Val Ser
1 5 10 15

20 Gly Ala His Gly Ser Ile Val Met Thr Gln Thr Pro Lys Phe Leu Leu
20 25 30

25 Val Ser Ala Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Ser
35 40 45

30 Val Ser Asn Asp Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro
50 55 60

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

35 Arg Phe Thr Gly Ser Gly Tyr Gly Thr Asp Phe Thr Phe Thr Ile Ser
85 90 95

40 Thr Val Gln Ala Glu Asp Leu Ala Val Tyr Phe Cys Gln Gln Asp Tyr
100 105 110

45 Ser Ser Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Glu Arg
115 120 125

50 Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln
130 135 140

55 Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr
145 150 155 160

55 Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser
165 170 175

60 Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr
180 185 190

65 Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys
195 200 205

His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro

ES 2 757 930 T3

210 215 220

5 Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys Glu Asp Gln Val Asp Pro
 225 230 235 240

Arg Leu Ile Asp Gly Lys
 245

10

<210> 178
 <211> 246
 <212> PRT
 15 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> 0023VH-CH1-YGPPC (parte de 0004Fab)

20 <400> 178

Met Asn Leu Gly Leu Ser Leu Ile Phe Leu Val Leu Val Leu Lys Gly
 1 5 10 15

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

30 Pro Gly Gly Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Thr Ser Gly Phe Thr Phe
 35 40 45

Ser Asp Tyr Phe Met Tyr Trp Ile Arg Gln Thr Pro Glu Lys Arg Leu
 50 55 60

Glu Trp Val Ala Tyr Ile Ser Asn Gly Gly Asp Ser Ser Ser Tyr Pro
 65 70 75 80

40 Asp Thr Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn
 85 90 95

45 Thr Leu Tyr Leu Gln Met Ser Arg Leu Lys Ser Glu Asp Thr Ala Met
 100 105 110

50 Tyr Tyr Cys Ala Thr Asn Lys Asn Trp Asp Asp Tyr Tyr Asp Met Asp
 115 120 125

Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys
 130 135 140

55 Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu
 145 150 155 160

60 Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro
 165 170 175

65 Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr
 180 185 190

ES 2 757 930 T3

Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp
 165 170 175
 5
 Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp
 180 185 190
 10
 Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys
 195 200 205
 15
 Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln
 210 215 220
 20
 Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys Glu
 225 230 235 240
 25
 Asp Gln Val Asp Pro Arg Leu Ile Asp Gly Lys
 245 250
 30
 <210> 180
 <211> 696
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 35
 <220>
 <223> FVII-L4b-0062VH-CH1-HPC4 humano
 <400> 180
 40
 Met Val Ser Gln Ala Leu Arg Leu Leu Cys Leu Leu Leu Gly Leu Gln
 1 5 10 15
 45
 Gly Cys Leu Ala Ala Val Phe Val Thr Gln Glu Glu Ala His Gly Val
 20 25 30
 50
 Leu His Arg Arg Arg Arg Ala Asn Ala Phe Leu Glu Glu Leu Arg Pro
 35 40 45
 55
 Gly Ser Leu Glu Arg Glu Cys Lys Glu Glu Gln Cys Ser Phe Glu Glu
 50 55 60
 60
 Ala Arg Glu Ile Phe Lys Asp Ala Glu Arg Thr Lys Leu Phe Trp Ile
 65 70 75 80
 65
 Ser Tyr Ser Asp Gly Asp Gln Cys Ala Ser Ser Pro Cys Gln Asn Gly
 85 90 95
 70
 Gly Ser Cys Lys Asp Gln Leu Gln Ser Tyr Ile Cys Phe Cys Leu Pro
 100 105 110
 75
 Ala Phe Glu Gly Arg Asn Cys Glu Thr His Lys Asp Asp Gln Leu Ile
 115 120 125

ES 2 757 930 T3

Cys Val Asn Glu Asn Gly Gly Cys Glu Gln Tyr Cys Ser Asp His Thr
 130 135 140

5 Gly Thr Lys Arg Ser Cys Arg Cys His Glu Gly Tyr Ser Leu Leu Ala
 145 150 155 160

10 Asp Gly Val Ser Cys Thr Pro Thr Val Glu Tyr Pro Cys Gly Lys Ile
 165 170 175

15 Pro Ile Leu Glu Lys Arg Asn Ala Ser Lys Pro Gln Gly Arg Ile Val
 180 185 190

20 Gly Gly Lys Val Cys Pro Lys Gly Glu Cys Pro Trp Gln Val Leu Leu
 195 200 205

25 Leu Val Asn Gly Ala Gln Leu Cys Gly Gly Thr Leu Ile Asn Thr Ile
 210 215 220

30 Trp Val Val Ser Ala Ala His Cys Phe Asp Lys Ile Lys Asn Trp Arg
 225 230 235 240

35 Asn Leu Ile Ala Val Leu Gly Glu His Asp Leu Ser Glu His Asp Gly
 245 250 255

40 Asp Glu Gln Ser Arg Arg Val Ala Gln Val Ile Ile Pro Ser Thr Tyr
 260 265 270

45 Val Pro Gly Thr Thr Asn His Asp Ile Ala Leu Leu Arg Leu His Gln
 275 280 285

50 Pro Val Val Leu Thr Asp His Val Val Pro Leu Cys Leu Pro Glu Arg
 290 295 300

55 Thr Phe Ser Glu Arg Thr Leu Ala Phe Val Arg Phe Ser Leu Val Ser
 305 310 315 320

60 Gly Trp Gly Gln Leu Leu Asp Arg Gly Ala Thr Ala Leu Glu Leu Met
 325 330 335

65 Val Leu Asn Val Pro Arg Leu Met Thr Gln Asp Cys Leu Gln Gln Ser
 340 345 350

70 Arg Lys Val Gly Asp Ser Pro Asn Ile Thr Glu Tyr Met Phe Cys Ala
 355 360 365

75 Gly Tyr Ser Asp Gly Ser Lys Asp Ser Cys Lys Gly Asp Ser Gly Gly
 370 375 380

80 Pro His Ala Thr His Tyr Arg Gly Thr Trp Tyr Leu Thr Gly Ile Val
 385 390 395 400

ES 2 757 930 T3

Ser Trp Gly Gln Gly Cys Ala Thr Val Gly His Phe Gly Val Tyr Thr
 405 410 415
 5
 Arg Val Ser Gln Tyr Ile Glu Trp Leu Gln Lys Leu Met Arg Ser Glu
 420 425 430
 10
 Pro Arg Pro Gly Val Leu Leu Arg Ala Pro Phe Pro Gly Gly Gly Gly
 435 440 445
 15
 Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Ser Gln Val Gln
 450 455 460
 20
 Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Pro Met Lys Pro Gly Ala Ser Val Lys
 465 470 475 480
 25
 Ile Ser Cys Lys Ala Thr Gly Tyr Thr Phe Ser Ser His Trp Ile Glu
 485 490 495
 30
 Trp Ile Lys Gln Arg Pro Gly His Gly Leu Glu Trp Ile Gly Glu Ile
 500 505 510
 35
 Leu Pro Gly Ser Gly Asn Thr Asn Tyr Asn Glu Lys Phe Lys Gly Lys
 515 520 525
 40
 Ala Thr Phe Thr Ala Asp Thr Ser Ser Asn Thr Ala Tyr Met Gln Leu
 530 535 540
 45
 Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Gly
 545 550 555 560
 50
 Tyr Tyr Gly Leu Asn Tyr Asp Trp Tyr Phe Asp Val Trp Gly Ala Gly
 565 570 575
 55
 Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe
 580 585 590
 60
 Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu
 595 600 605
 65
 Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp
 610 615 620
 70
 Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu
 625 630 635 640
 75
 Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser
 645 650 655
 80
 Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro
 660 665 670

ES 2 757 930 T3

Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Ser Lys Glu Asp Gln Val
 675 680 685
 5
 Asp Pro Arg Leu Ile Asp Gly Lys
 690 695
 10
 <210> 181
 <211> 407
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 15
 <220>
 <223> FVII-407C humano (cisteína C terminal)
 <400> 181
 20
 Ala Asn Ala Phe Leu Glu Glu Leu Arg Pro Gly Ser Leu Glu Arg Glu
 1 5 10 15
 25
 Cys Lys Glu Glu Gln Cys Ser Phe Glu Glu Ala Arg Glu Ile Phe Lys
 20 25 30
 30
 Asp Ala Glu Arg Thr Lys Leu Phe Trp Ile Ser Tyr Ser Asp Gly Asp
 35
 Gln Cys Ala Ser Ser Pro Cys Gln Asn Gly Gly Ser Cys Lys Asp Gln
 50 55 60
 35
 Leu Gln Ser Tyr Ile Cys Phe Cys Leu Pro Ala Phe Glu Gly Arg Asn
 65 70 75 80
 40
 Cys Glu Thr His Lys Asp Asp Gln Leu Ile Cys Val Asn Glu Asn Gly
 85 90 95
 45
 Gly Cys Glu Gln Tyr Cys Ser Asp His Thr Gly Thr Lys Arg Ser Cys
 100 105 110
 50
 Arg Cys His Glu Gly Tyr Ser Leu Leu Ala Asp Gly Val Ser Cys Thr
 115 120 125
 55
 Pro Thr Val Glu Tyr Pro Cys Gly Lys Ile Pro Ile Leu Glu Lys Arg
 130 135 140
 60
 Asn Ala Ser Lys Pro Gln Gly Arg Ile Val Gly Gly Lys Val Cys Pro
 145 150 155 160
 65
 Lys Gly Glu Cys Pro Trp Gln Val Leu Leu Leu Val Asn Gly Ala Gln
 165 170 175
 65
 Leu Cys Gly Gly Thr Leu Ile Asn Thr Ile Trp Val Val Ser Ala Ala
 180 185 190

ES 2 757 930 T3

His Cys Phe Asp Lys Ile Lys Asn Trp Arg Asn Leu Ile Ala Val Leu
 195 200 205
 5
 Gly Glu His Asp Leu Ser Glu His Asp Gly Asp Glu Gln Ser Arg Arg
 210 215 220
 10 Val Ala Gln Val Ile Ile Pro Ser Thr Tyr Val Pro Gly Thr Thr Asn
 225 230 235 240
 15 His Asp Ile Ala Leu Leu Arg Leu His Gln Pro Val Val Leu Thr Asp
 245 250 255
 20 His Val Val Pro Leu Cys Leu Pro Glu Arg Thr Phe Ser Glu Arg Thr
 260 265 270
 25 Leu Ala Phe Val Arg Phe Ser Leu Val Ser Gly Trp Gly Gln Leu Leu
 275 280 285
 30 Asp Arg Gly Ala Thr Ala Leu Glu Leu Met Val Leu Asn Val Pro Arg
 290 295 300
 35 Pro Asn Ile Thr Glu Tyr Met Phe Cys Ala Gly Tyr Ser Asp Gly Ser
 325 330 335
 40 Lys Asp Ser Cys Lys Gly Asp Ser Gly Gly Pro His Ala Thr His Tyr
 340 345 350
 45 Arg Gly Thr Trp Tyr Leu Thr Gly Ile Val Ser Trp Gly Gln Gly Cys
 355 360 365
 50 Ala Thr Val Gly His Phe Gly Val Tyr Thr Arg Val Ser Gln Tyr Ile
 370 375 380
 55 Leu Arg Ala Pro Phe Pro Cys
 405
 60 <210> 182
 <211> 697
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> FIX-L4b-0061LC humano
 65 <400> 182

ES 2 757 930 T3

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

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

10 Asp His Glu Asn Ala Asn Lys Ile Leu Asn Arg Pro Lys Arg Tyr Asn
 35 40 45

15 Ser Gly Lys Leu Glu Glu Phe Val Gln Gly Asn Leu Glu Arg Glu Cys
 50 55 60

20 Met Glu Glu Lys Cys Ser Phe Glu Glu Ala Arg Glu Val Phe Glu Asn
 65 70 75 80

25 Thr Glu Arg Thr Thr Glu Phe Trp Lys Gln Tyr Val Asp Gly Asp Gln
 85 90 95

30 Cys Glu Ser Asn Pro Cys Leu Asn Gly Gly Ser Cys Lys Asp Asp Ile
 100 105 110

35 Asn Ser Tyr Glu Cys Trp Cys Pro Phe Gly Phe Glu Gly Lys Asn Cys
 115 120 125

40 Glu Leu Asp Val Thr Cys Asn Ile Lys Asn Gly Arg Cys Glu Gln Phe
 130 135 140

45 Cys Lys Asn Ser Ala Asp Asn Lys Val Val Cys Ser Cys Thr Glu Gly
 145 150 155 160

50 Tyr Arg Leu Ala Glu Asn Gln Lys Ser Cys Glu Pro Ala Val Pro Phe
 165 170 175

55 Pro Cys Gly Arg Val Ser Val Ser Gln Thr Ser Lys Leu Thr Arg Ala
 180 185 190

60 Glu Ala Val Phe Pro Asp Val Asp Tyr Val Asn Ser Thr Glu Ala Glu
 195 200 205

65 Thr Ile Leu Asp Asn Ile Thr Gln Ser Thr Gln Ser Phe Asn Asp Phe
 210 215 220

70 Thr Arg Val Val Gly Gly Glu Asp Ala Lys Pro Gly Gln Phe Pro Trp
 225 230 235 240

75 Gln Val Val Leu Asn Gly Lys Val Asp Ala Phe Cys Gly Gly Ser Ile
 245 250 255

80 Val Asn Glu Lys Trp Ile Val Thr Ala Ala His Cys Val Glu Thr Gly
 260 265 270

ES 2 757 930 T3

Val Lys Ile Thr Val Val Ala Gly Glu His Asn Ile Glu Glu Thr Glu
 275 280 285
 5
 His Thr Glu Gln Lys Arg Asn Val Ile Arg Ile Ile Pro His His Asn
 290 295 300
 10
 Tyr Asn Ala Ala Ile Asn Lys Tyr Asn His Asp Ile Ala Leu Leu Glu
 305 310 315 320
 15
 Leu Asp Glu Pro Leu Val Leu Asn Ser Tyr Val Thr Pro Ile Cys Ile
 325 330 335
 20
 Ala Asp Lys Glu Tyr Thr Asn Ile Phe Leu Lys Phe Gly Ser Gly Tyr
 340 345 350
 25
 Val Ser Gly Trp Gly Arg Val Phe His Lys Gly Arg Ser Ala Leu Val
 355 360 365
 30
 Leu Gln Tyr Leu Arg Val Pro Leu Val Asp Arg Ala Thr Cys Leu Arg
 370 375 380
 35
 Ser Thr Lys Phe Thr Ile Tyr Asn Asn Met Phe Cys Ala Gly Phe His
 385 390 395 400
 40
 Glu Gly Gly Arg Asp Ser Cys Gln Gly Asp Ser Gly Gly Pro His Val
 405 410 415
 45
 Thr Glu Val Glu Gly Thr Ser Phe Leu Thr Gly Ile Ile Ser Trp Gly
 420 425 430
 50
 Glu Glu Cys Ala Met Lys Gly Lys Tyr Gly Ile Tyr Thr Lys Val Ser
 435 440 445
 55
 Arg Tyr Val Asn Trp Ile Lys Glu Lys Thr Lys Leu Thr Gly Gly Gly
 450 455 460
 60
 Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Ser Asp Val
 465 470 475 480
 65
 Val Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Pro Val Ser Leu Gly Asp Gln
 485 490 495
 Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val His Arg Asn Gly
 500 505 510
 Asn Thr Tyr Phe His Trp Ala Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Lys
 515 520 525
 Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro Asp Arg
 530 535 540

ES 2 757 930 T3

5 Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile Ser Arg
 545 550 555 560

10 Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Val Tyr Phe Cys Ser Gln Ser Thr His
 565 570 575

15 Val Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Thr
 580 585 590

20 Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu
 595 600 605

25 Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro
 610 615 620

30 Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly
 625 630 635 640

35 Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr
 645 650 655

40 Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His
 660 665 670

45 Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val
 675 680 685

50 Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 690 695

REIVINDICACIONES

1. Una proteína procoagulante que comprende
 - (i) al menos un factor de coagulación, que es un polipéptido de FVII o un polipéptido de FIX, unido covalentemente a
 - (ii) un anticuerpo monoclonal, o un fragmento de este, que es un fragmento Fab, que es capaz de unirse específicamente al
 - (iii) transcrito 1 similar a TREM (TLT-1).
2. La proteína procoagulante de conformidad con la reivindicación 1, en donde el epítipo de (ii) comprende uno o más residuos seleccionados del grupo que consiste en K133, I134, G135, S136, L137, A138, N140, A141, F142, S143, D144, P145 y A146 de la SEQ ID NO: 2.
3. La proteína procoagulante de conformidad con una cualquiera de las reivindicaciones 1-2, en donde el epítipo de (ii) comprende K133, I134, G135, S136, L137, A138, N140, A141, F142, S143, D144, P145 y A146 de la SEQ ID NO: 2.
4. La proteína procoagulante de conformidad con una cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en donde la cadena pesada de (ii) comprende:
 - una secuencia CDR1 de los aminoácidos 49 a 53 (RYWMT) de la SEQ ID NO: 40, en donde uno de estos residuos de aminoácidos puede sustituirse por un aminoácido diferente; y/o
 - una secuencia CDR2 de los aminoácidos 68 a 84 (EINPDSSTINYNP SLKD) de la SEQ ID NO: 40, en donde uno, dos, tres o cuatro de estos aminoácidos pueden sustituirse por un aminoácido diferente; y/o
 - una secuencia CDR3 de los aminoácidos 117 a 121 (GVFTS) de la SEQ ID NO: 40, en donde uno, dos o tres de estos aminoácidos pueden sustituirse por un aminoácido diferente; y en donde la cadena ligera de (ii) comprende:
 - y en donde la cadena ligera de (ii) comprende:
 - una secuencia CDR1 de los aminoácidos 43 a 58 (RSSQSLVHRNGNTYFH) de la SEQ ID NO: 41, en donde uno, dos, tres o cuatro de estos aminoácidos pueden sustituirse con un aminoácido diferente; y/o
 - una secuencia CDR2 de los aminoácidos 74 a 80 (KVS NRFS) de la SEQ ID NO: 41, en donde uno o dos de estos aminoácidos pueden sustituirse con un aminoácido diferente; y/o
 - una secuencia CDR3 de los aminoácidos 113 a 121 (SQSTHVPYT) de la SEQ ID NO: 41, en donde uno o dos de estos aminoácidos pueden sustituirse con un aminoácido diferente.
5. La proteína procoagulante de conformidad con una cualquiera de las reivindicaciones 1-4, en donde (ii) es un anticuerpo humanizado o fragmento de este.
6. La proteína procoagulante de conformidad con una cualquiera de las reivindicaciones 1-5, que es un conjugado de (i) y (ii).
7. La proteína procoagulante de conformidad con una cualquiera de las reivindicaciones 1-5, que comprende, además, un enlazador entre (i) y (ii).
8. El conjugado de conformidad con una cualquiera de las reivindicaciones 1-7, en donde (i) y (ii) se conjugan covalentemente a través de un glicano de al menos una de dichas proteínas.
9. Una proteína procoagulante de conformidad con una cualquiera de las reivindicaciones 1-8, en donde (ii) se une al TLT-1 sin competir con la unión del fibrinógeno al TLT-1.
10. Una proteína procoagulante de conformidad con una cualquiera de las reivindicaciones 1-9, en donde (ii) no inhibe la agregación plaquetaria.
11. Un proceso para preparar el conjugado de conformidad con una cualquiera de las reivindicaciones 6-8, que comprende conjugar químicamente (i), el anticuerpo monoclonal TLT-1 o fragmento de este, con un grupo reactivo (RS1) de un enlazador y hacer reaccionar (ii), el factor de coagulación, con otro grupo reactivo (RS2) de dicho enlazador.
12. El proceso como se define en la reivindicación 11, en donde dicho enlazador es un polímero.
13. La proteína procoagulante de conformidad con una cualquiera de las reivindicaciones 1-12, para su uso como un medicamento.
14. La proteína procoagulante de conformidad con la reivindicación 13, para su uso en el tratamiento de una coagulopatía.

15. La proteína procoagulante para su uso de conformidad con la reivindicación 14, en donde dicha coagulopatía es hemofilia A, con o sin inhibidores, o hemofilia B, con o sin inhibidores.

Fig. 1

M G L T L L L L L L L L G L E G Q G I
 1 ATGGGCCCTC ACCCTGCTC TTGCTGCTG CTCCCTGGGA CTAGAAGGT CAGGGCATA
 V G S L P E V L Q A P V G S S I L V
 55 GTTGGCAGC CTCCTGAG GTGCTGCAG GCACCCGTG GGAAGCTCC ATTCGNGTG
 Q C H Y R L Q D V K A Q K V W C R F
 109 CAGTGCCAC TACAGGCTC CAGGATGTC AAAGCTCAG AAGGTGTGG TGCCGGTTC
 L P E G C Q P L V S S A V D R R A P
 163 TTGCCGGAG GGGTGCCAG CCCTGGTG TCCTCAGCT GTGGATCGC AGAGCTCCG
 A G R R T F L T D L G G G L L Q V E
 217 GCGGGCAGG CGTACGTT CTCACAGAC CTGGGTGGG GGCTGCTG CAGGTGGAA
 M V T L Q E E D A G E Y G C M V D G
 271 ATGGTTACC CTCAGGAA GAGGATGCT GGCGAGTAT GGCTGCATG GTGGATGGG
 A R G P Q I L H R V S L N I L P P E
 325 GCCAGGGGG CCCAGATT TTGCACAGA GTCCTCTG AACATACTG CCCCAGAG
 E E E E Y H K I G S L A E N A F S D
 379 GAAGAAGAA GAGACCCAT AAGATTGGC AGTCTGGCT GAGAAGCA TTCCTCAGAC
 P A G S A N P L E P S Q D E K S I P
 433 CCTGCAGG AGTGCCAAC CCTTTGGAA CCCAGCCAG GATGAGAAG AGCATCCCC
L I W G A V L L V G L L V A A V V L
 487 TTGATCTGG GGTGCTGTG CTCCCTGTA GGTCTGCTG GTGCCAGCG GTGGTGTG
F A V M A K R K Q G N R L G V C G R
 541 TTGCTGTG ATGGCCAAG AGGAACAA GGAACAGG CTTGGTGTG TGTGGCCGA
 F L S S R V S G M N P S S V V H H V
 595 TTCCTGAGC AGCAGAGTT TCAGGCATG AATCCCTCC TCAGTGGTC CACCACGTC
 S D S G P A A E L P L D V P H I R L
 649 AGTGACTCY GGACCGGCT GCTGAATG CCTTTGGAT GTACCACAC ATTAGGCTT
 D S P P S F D N T T Y T S L P L D S
 703 GACTCACCA CCTTCATT GACAATACC ACCTACACC AGCCTACCT CTTGATTCG
 P S G K P S L P A P S S L P P L P P
 757 CCATCAGGA AAACCTCA CTCCCAGCT CCATCCTCA TTGCCCCCT CTACCTCCT
 K V L V C S K P V T Y A T V I F P G
 811 AAGGTCTGT GTCGTCTCC AAGCCGTG ACAATATGCC ACAGTAATC TTCCCGGA
 G N K G G G Y S C G P A Q N P P N N
 865 GGAACAAG GGTGGAGG ACCTCGTGT GGGCCAGCC CAGAATCCA CCTAACAA
 Q T P S S
 919 CAGACTCCA TCCAGC

Fig. 2

```

HindIII          M G L T L L L L L L L G L
1  AAGCTTGGC GCCACCATG GGCCTCACC CTGCTCTTG CTGCTGCTC CTGGGACTA
   E G Q G I V G S L P E V L Q A P V G
55 GAAGGTCAG GGCATAGTT GGCAGCCTC CCTGAGGTG CTGCAGGCA CCCGTGGGA
   S S I L V Q C H Y R L Q D V K A Q K
109 AGCTCCATT CTGGTCAG TGCCTACTAC AGGCTCCAG GATGTCAAA GCTCAGAAG
   V W C R F L P E G C Q P L V S S A V
163 GGTGGTGC CGGTCTTG CCGGAGGGG TGCCAGCCC CTGGTGTCC TCAGCTGTG
   D R R A P A G R R T F L T D L G G G
217 GATCGAGA GCTCCGGCG GGCAGGCGT ACGTTTCTC ACAGACCTG GGTGGGGGC
   L L Q V E M V T L Q E E D A G E Y G
271 CTGCTGCAG GTGGAATG GTTACCTTG CAGGAAGAG GATGCTGGC GAGTATGGC
   C N V D G A R G P Q I L H R V S L N
325 TGCATGGTG GATGGGGCC AGGGGGCCC CAGATTTTG CACAGAGTC TCTCTGAAC
   I L P P E E E E E T H K I G S L A E
379 ATACTGCC CCAGAGGAA GAAGAAGAG ACCCATAAG ATTGGCAGT CTGGCTGAG
   N A F S D P A G S A N P L E P S Q D
433 AACGCATTC TCAGACCTT GCAGGCAGT GCCAACCTT TTGGAACCC AGCCAGGAT
   E K S I P H H H H H H * EcoRI
487 GAGAAGAGC ATCCCCCAG CATCACCAT CACCATTAA GAATTC

```

Fig. 3

A

```

      M K L P V G L L V L M F W I P A S S
1  ATGAAGTTG CCTGTTGGG CYGTGGTG CTGATGTC TGGATTCCA GCTTCCAGC

      S D V V M T Q T P L S L P V S L G D
55 AGTGATGTT GTGATGACC CAAACITCCA CTCTCCCTG CCTGTGAGT CTGAGGAT

      Q A S I S C R S S Q S L V H R N G N
109 CAAGCCTCC ATCTCTTGC AGATCTAGT CAGAGCCTT GTACACAGA AATGGAAAC

      T Y F H W C L Q K P G Q S P K L L I
163 ACCTATTTT CATTGGTGC CTGCAGAAA CCAGGCCAG TCTCCAAAG CTCCTGATC

      Y K V S N R F S G W P D R F S G S G
217 TACAAAGTT TCCAACCGA TTTTCTGGG GTCCAGAC AGGTTCAGT GGCAGTGA

      S G T D F T L K I S R V E A E D L G
271 TCAGGGACA GATTTACA CTCAAGATC AGCAGAGTG GAGGCTGAG GATCTGGGA

      V Y F C S Q S T H W P Y T F G G G T
325 GTTTATTTT TGCTCTCAA AGTACACAT GTTCCGTAC ACGTTCGGA GGGGGACC

      K L E I K R
379 AAGCTGGAA ATAAAACGT
    
```

B

1	2	3	4	5	6	
123456789012345678901234	56789012345678901234	56789012345678901234	56789012345678901234	56789012345678901234	56789012345678901234	Kabat
DVVMTQTPLSLPVLSDQASISCRSSQSLVHR	NGNTYFHWCLQKPGQSPKLLIYKVSNRFS	GVDP				0012LC-V
7	8	9	10			
1234567890123456789012345678	90123456789012345678	90123456789012345678	9012345678	Kabat		
RFSGSGSGTDFTLKI	SRVEAEDLGVYFCSQSTHVP	--YTFGGG	TKLEIKR	0012LC-V		

C

```

      M D F G L I F F I V A L L K G V Q C
1  ATGGATTTT GGGCTGATT TTTTTTATF GTTGCTCTT TTA AAAAGGG GTCCAGTGT

      E V K L L E S G G G L V Q P G G S L
55 GAGTGAAA CTTCTCGAG TCTGGAGGT GGCTGGTG CAGCCTGGA GGATCCCTG

      K L S C A A S G F D F S R Y W M T W
109 AAACCTCTCC TGTGAGCC TCAGGATTC GATTTTATG AGATACTGG ATGACTTGG

      V R Q A P G K G L E W I G E I N P D
163 GTCCGGCAG GCTCCAGGG AAAGGGCTA GAATGGATT GGAGAAAT AATCCAGAT

      S S T I N Y T P S L K D K F I I S R
217 AGCAGTACG ATAAACTAT ACGCCATCT CTAAAGGAT AAATTCATC ATCTCCAGA

      D N A K N T L Y L Q M S E V R S E D
271 GACAACGCC AAGAATACG CTGTACCTG CAAATGAGC GAAGTGAGA TGTGAGGAC

      T A L Y Y C A S G V F T S W G Q G T
325 ACAGCCCTT TATFACTGT GCAAGCGGG GTGTTTACT TCCTGGGGC CAAGGGACT

      L V T V S A
379 CTGGTCACT GTCTCTGCA
    
```

ES 2 757 930 T3

D

1	2	3	4	5	6	
123456789012345678901234567890	12345678901234567890	12345678901234567890	12345678901234567890	12345678901234567890	12345678901234567890	Kabat
EVKLLESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFD	FSRYWMT--WVRQAPGKLEWIGEIN--	PDSSTINYT				0012HC-V
7	8	9	10	11		
123456789012345678901234567890	123456789012345678901234567890	123456789012345678901234567890	123456789012345678901234567890	123456789012345678901234567890	123456789012345678901234567890	Kabat
PSLKDKPIISRDNAGNTLYLQMSVRS	EDTALYYCAGVFTS-----	WGQGT	LVTVSA			0012HC-V

Fig. 4



```

M K L P V G L L V L M F W I P A S S
1 ATGAAGTTG CCTGTTGGG CTGTTGGTG CTGATGTTT TGGATTCCA GCTTCCAGC

S D V V M T Q T P L S L F V S L G D
55 AGTGATGTT GTGATGACC CAACTCCA CTCTCCCTG CCTGTCAGT CTGAGAGAT

Q A S I S C R S S Q S L V H R N G N
109 CAAGCCICC ATCTCTTGC AGATCTAGT CAGAGCCIT GTACACAGA AATGGAAAC

T Y F H W C L Q K P G Q S P K L L I
163 ACCTATITF CATTGGTGC CTGCAGAAA CCAGGCCAG TCTCCAAAG CTCCTGATC

Y K V S N R F S G V P D R F S G S G
217 TACAAAGTT TCCAACCGA TTTTCTGGG GTCCACAGC AGTTCAGT GGCAGTGA

S G T D F T L K I S R V E A E D L G
271 TCAGGGACA GATTCACA CTCAAGATC AGCAGAGTG GAGGCTGAG GATCTGGGA

V Y F C S Q S T H V P Y T F G G G T
325 GITTATITC TGCTCTCAA AGTACACAT GTTCCGTAC ACGTTCGGA GGGGGGACC

K L E I K R T V A A P S V F I F P P
379 AAGCTGGAA AAAAAAGT ACGGTGGCT GCACCATCT GTCTTCATC TTCCCGCCA

S D E Q L K S G T A S V V C L L N N
433 TCTGATGAG CAGTTGAAA TCTGGAACT GCCTCTGTT GTGTGCCTG CTGATAAAC

F Y P R E A K V Q W K V D N A L Q S
487 TTCTATCCC AGAGAGGCC AAAGTACAG TGGAGGTTG GATAACGCC CTCCAATCG

G N S Q E S V T E Q D S K D S T Y S
541 GGTAACTCC CAGGAGAGT GTCACAGAG CAGGACAGC AAGGACAGC ACCTACAGC

L S S T L T L S K A D Y E K H K V Y
595 CTCAGCAGC ACCCTGACG CTGAGCAAA GCAGACTAC GAGAAACAC AAAGTCTAC

A C E V T H Q G L S S P V T K S F N
649 GCCTGCGAA GTCACCCAT CAGGGCTG AGCTCGCCC GTCACAAAG AGCTTCAAC

R G E C E D Q V D P R L I D G K
703 AGGGGAGAG TGTGAGGAC CAGGTGGAC CCCAGACTG ATCGACGGC AAG
    
```

Fig. 5



```

M D F G L I F F I W A L L K G V Q C
1 ATGGATTTT GGGCTGATT TTTTTFATT GTTGCTCTT TAAAAAGGG GTCCAGTGT

E V K L L E S G G G L V Q P G G S L
55 GAGGTGAAA CTTCTCGAG TCTGGAGGT GGCCTGGTG CAGCCTGGA GGATCCCTG

K L S C A A S G F D F S R Y W M T W
109 AAATCTCC TGTGCAGCC TCAGGATTC GATTTTAGT AGATACTGG ATGACTTGG

V R Q A P G K G L E W I G E I N F D
163 GTCCGGCAG GCTCCAGGG AAAGGGCTA GAATGGATT GGAGAAATT AATCCAGAT

S S T I N Y T P S L K D K F I I S R
217 AGCAGTACG ATAAACTAT ACGCCATCT CTAAGGAT AAATTCATC ATCTCCAGA

D N A K N T L Y L Q M S E V R S E D
271 GACAACGCC AAGAATACG CTGTACCTG CAAATGAGC GAAGTGAGA TCTGAGGAC

T A L Y Y C A S G W F T S W G Q G T
325 ACAGCCCTT TATTACTGT GCAAGCGGG GTGTTTACT TCCTGGGGC CAAGGGACT

L V T V S A A S T K G P S V F P L A
379 CTGGTCACT GTCTCTGCA GCTAGCACC AAGGGCCCA TCCGTCTTC CCCCTGGCG

P C S R S T S E S T A A L G C L V K
433 CCCTGCTCC AGGAGCACC TCCGAGAGC ACAGCCGCC CTGGGCTGC CTGCTCAAG

D Y F P E P V T V S W N S G A L T S
487 GACTACTTC CCCGAACCG GTGACGGTG TCGTGGAAC TCAGCCGCC CTGACCAGC

G V H T F P A V L Q S S G L Y S L S
541 GCGGTGCAC ACCTTCCCG GCTGTCTTA CAGTCCCTA GGACTCTAC TCCCTCAGC

S V V T V P S S S L G T K T Y T C N
595 AGCGTGGTG ACCGTGCCC TCCAGCAGC TTGGGCAGG AAGACTTAC ACCTGCAAC

V D H K P S N T K V D K R V E S K Y
649 GTAGATCAC AAGCCCAGC AACACCAAG GTGGACAAG AGAGTTGAG TCCAAATAT

G P P C P P C P A P E F L G G P S V
703 GGTCCCCCA TGCCACCA TSCCCAGCA CCTGAGTTC CTGGGGGGA CCATCAGTC

F L F P P K P K D T L M I S R T P E
757 TTCTGTTC CCCCCAAA CCAAGGAC ACTCTCATG ATCTCCCGG ACCCCTGAG

V T C V V V D V S Q E D P E V Q F N
811 GTCACGTGC GTGGTGGTG GACGTGAGC CAGGAAGAC CCCGAGGTC CAGTTCAAC

W Y V D G V E V H N A K T K P R E E
865 TGGTACGTG GATGGCGTG GAGGTGCAT AATGCCAAG ACAAGCCG CGGGAGGAG

Q F N S T Y R V V S V L T V L H Q D
919 CAGTTCAAC AGCACGTAC CGTGTGGTC AGCCTCCTC ACCGTCTTG CACCAGGAC

W L N G K E Y K C K V S N K G L P S
973 TGGCTGAAC GGCAAGGAG TACAAGTGC AAGGTCTCC AACAAAGGC CTCCCCTCC

S I E K T I S K A K G Q P R E F Q V
1027 TCCATCGAG AAAACCATC TCCAAAGCC AAAGGGCAG CCCCAGAG CCACAGGTG

Y T L P P S Q E E M T K N Q V S L T
1081 TACACCTG CCCCATCC CAGGAGGAG ATGACCAAG AACCAGGTC AGCCTGACC
    
```

ES 2 757 930 T3

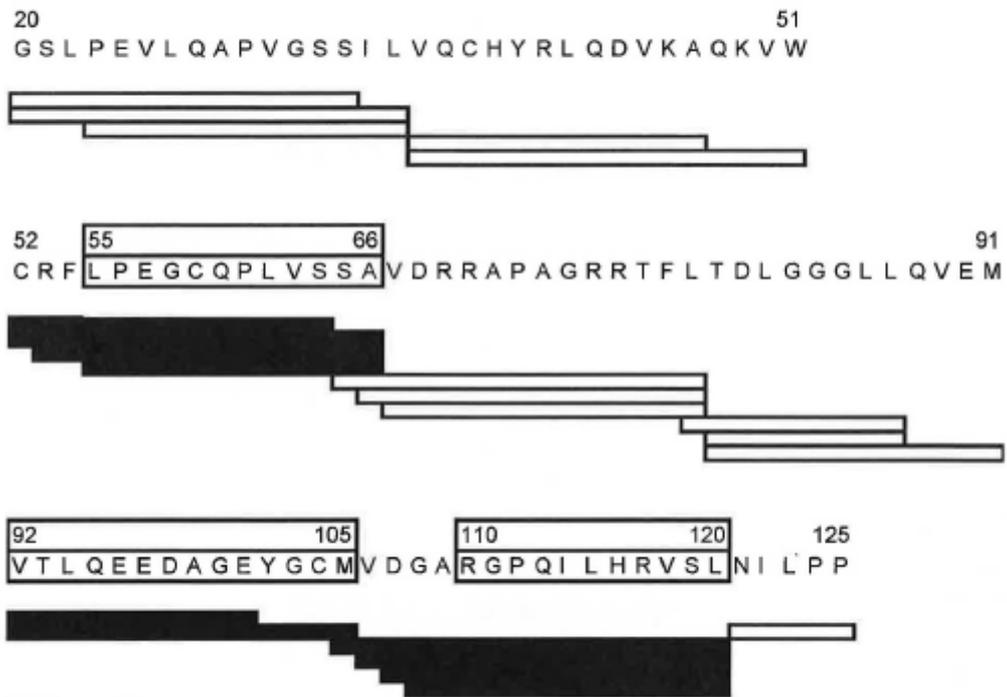
```
      C L V K G F Y P S D I A V E W E S N
1135 TGCCGGTC AAAGGCTTC TACCCGAGC GACATCGCC GTGGAGTGG GAGAGCAAT
      G Q P E N N Y K T T P P V L D S D G
1189 GGGCAGCCG GAGAACAAC TACAAGACC ACGCCTCCC GTGCTGGAC TCCGACGGC
      S F F L Y S R L T V D K S R W Q E G
1243 TCCTTCTTC CICTACAGC AGGCTAACC GTGGACAAG AGCAGGTGG CAGGAGGGG
      N V F S C S V M H E A L H N H Y T Q
1297 AATGTCCTC TCAAGCTCC GTGATGCAT GAGGCTCTG CACAACCAC TACACACAG
      K S L S L S L G K
1351 AAGAGCCTC TCCCTGTCT CTGGSTAAA
```

Fig. 6



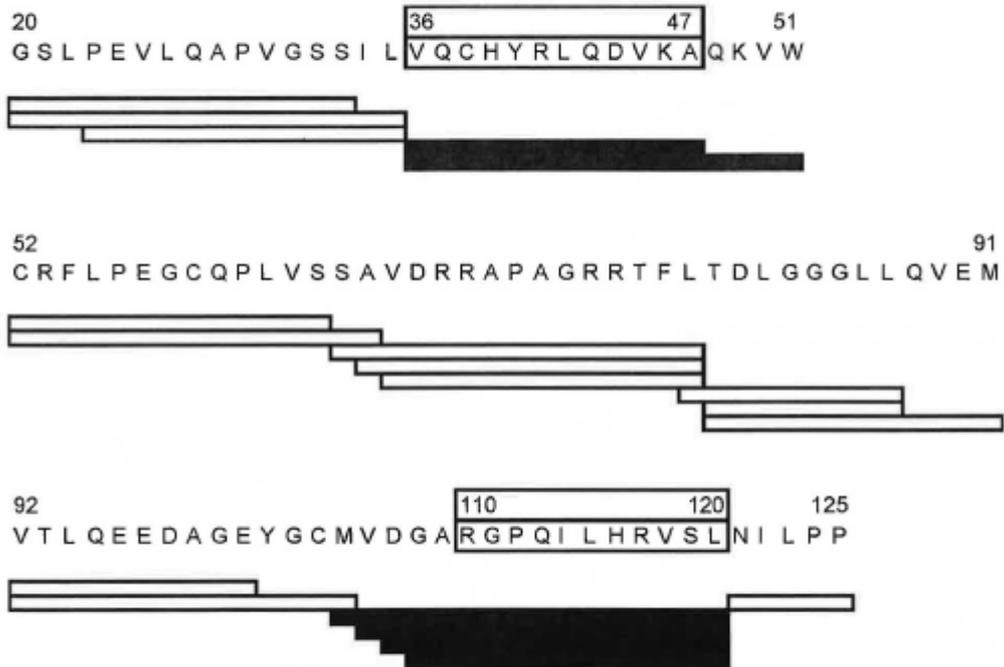
Blanco: Sin diferencia
 Negro: Epitopo 0023

Fig. 7



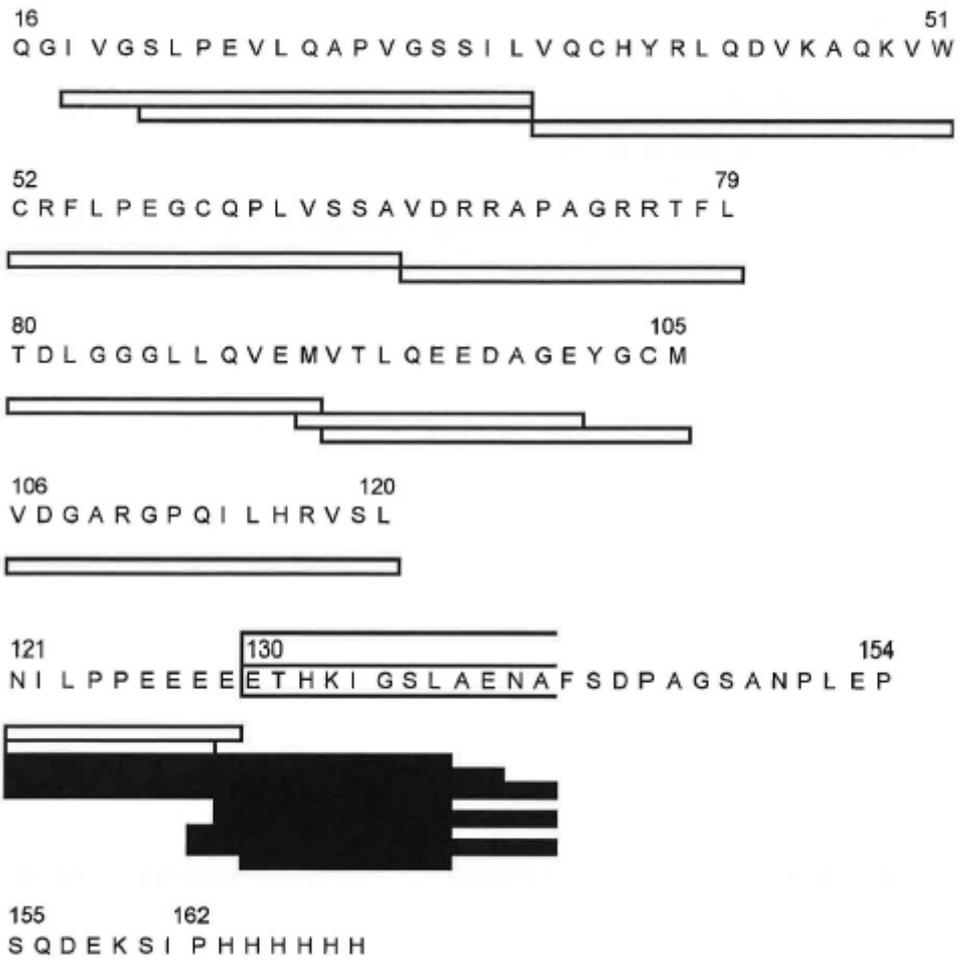
Blanco: sin diferencia
 Negro: Epítipo 0051

Fig. 8



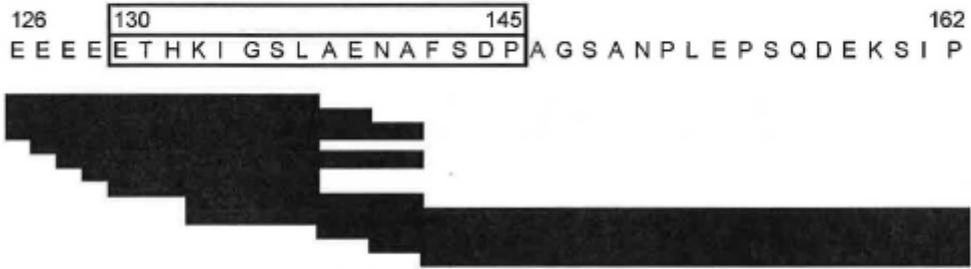
Blanco: sin diferencia
Negro: Epítipo 0062

Fig. 9



Blanco: sin diferencia
Negro: Epitopo 0061

Fig. 10



Blanco: sin diferencia
Negro: epítopo 0061

Fig. 11A

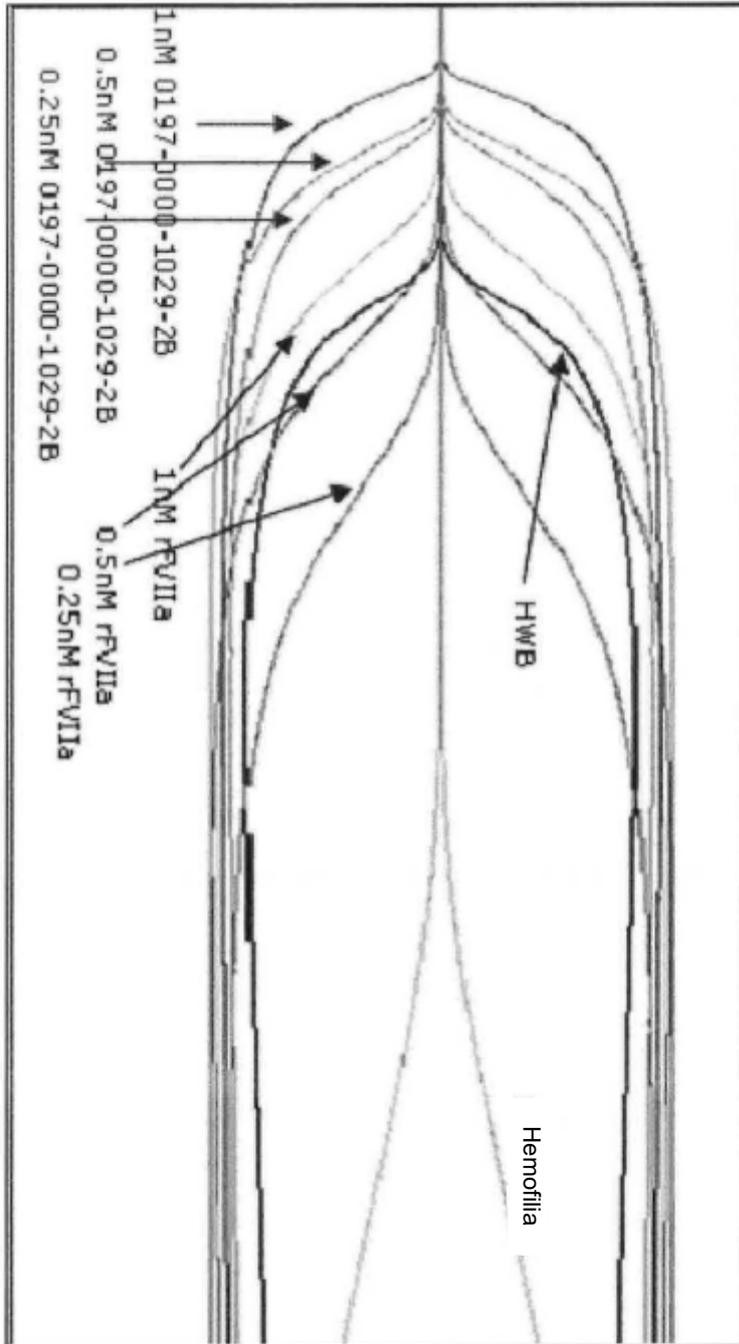


Fig. 11B

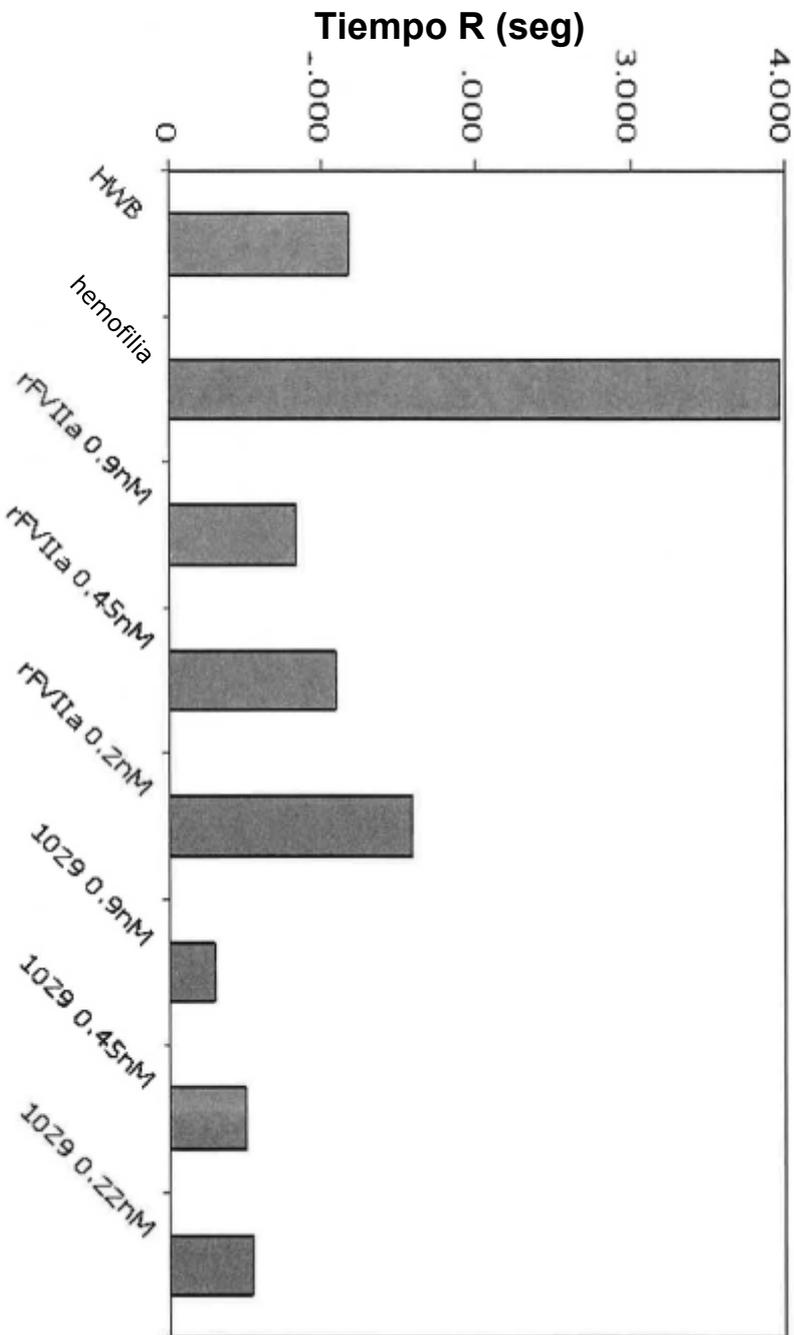


Fig. 12

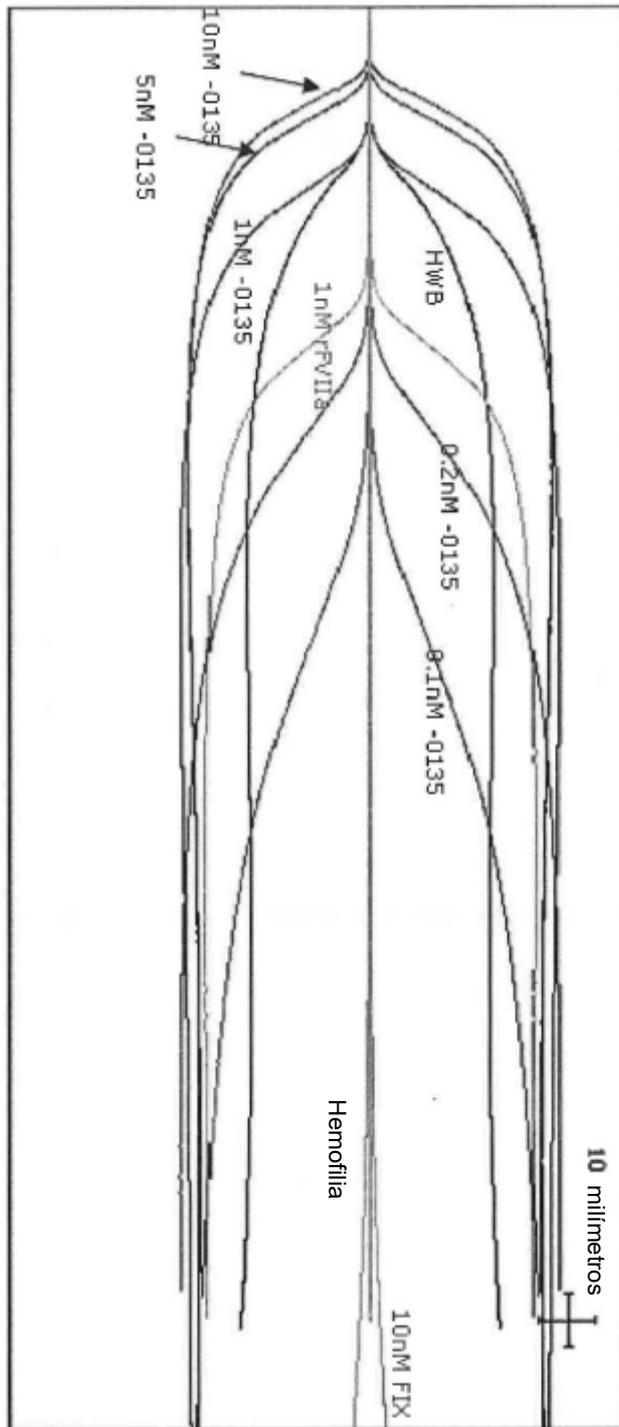
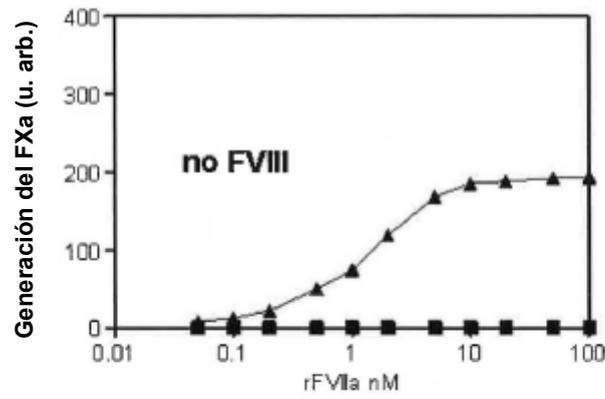
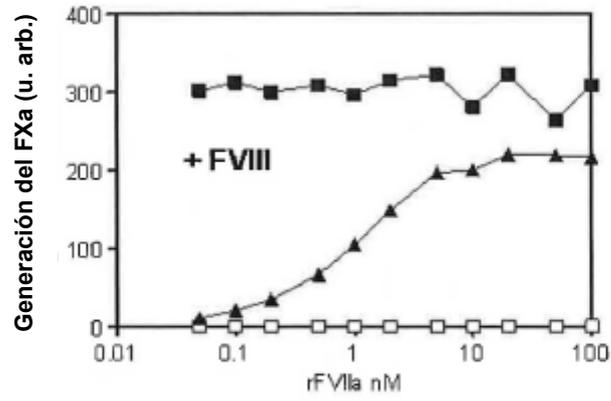
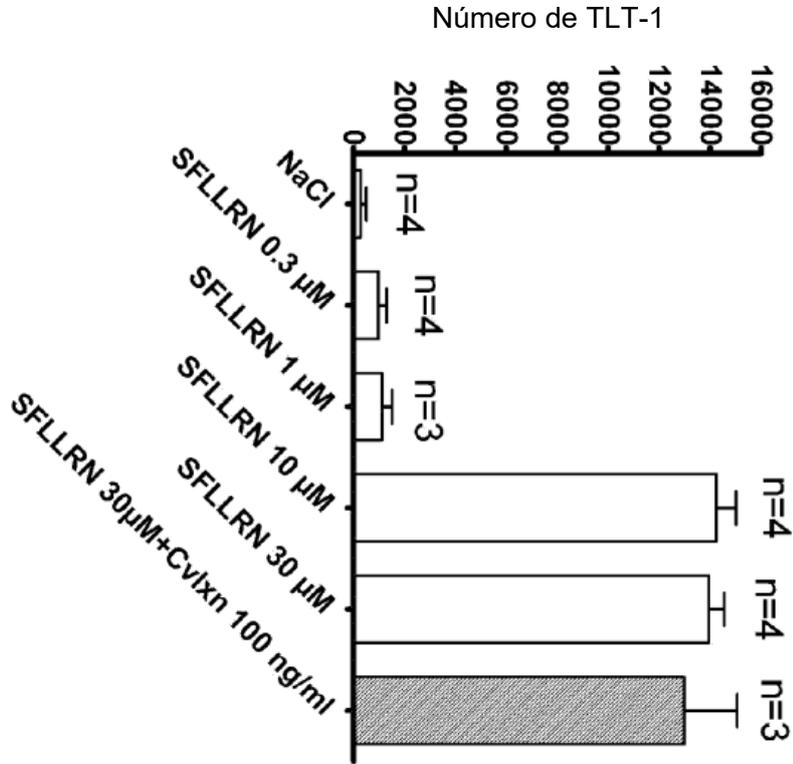


Fig. 13

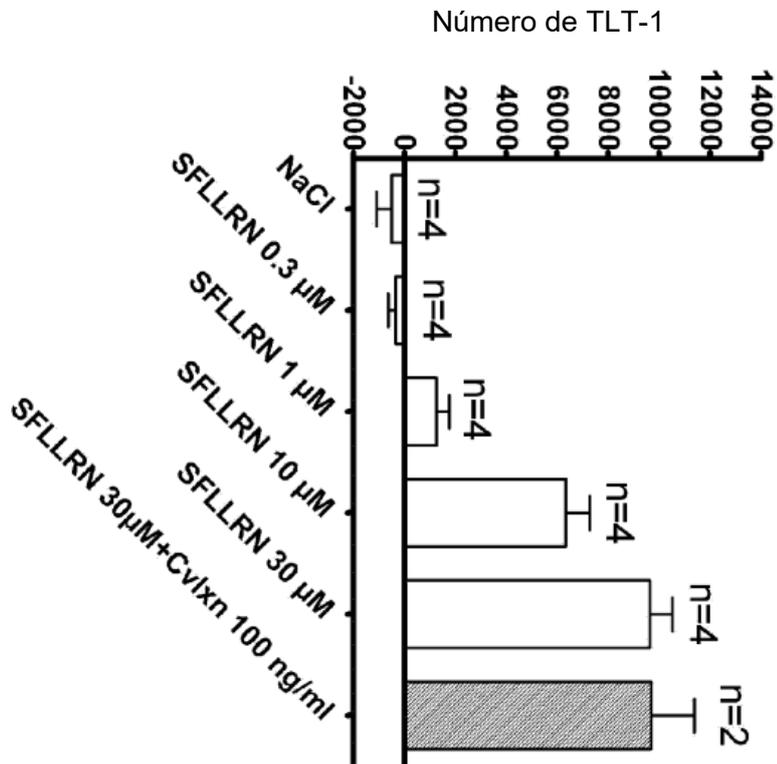


- Tampón
- FX
- FXa
- ▲ 0197-0000-0135

Fig. 14



0197-0000-136



0197-0000-123

Fig. 15

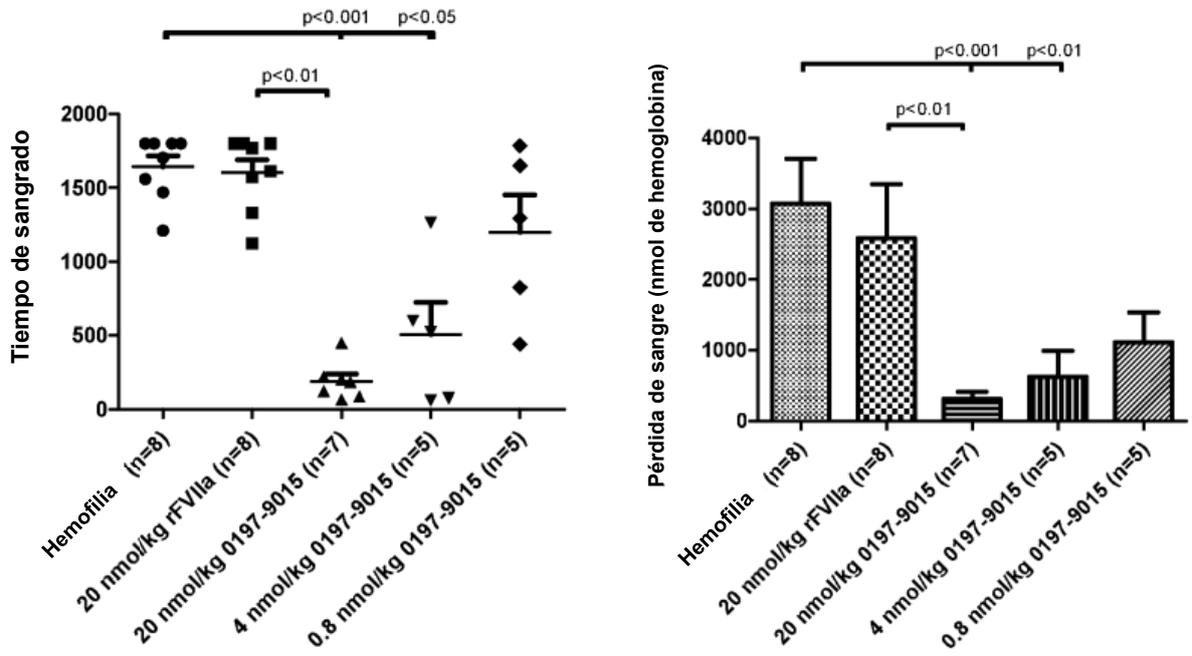


Fig. 16

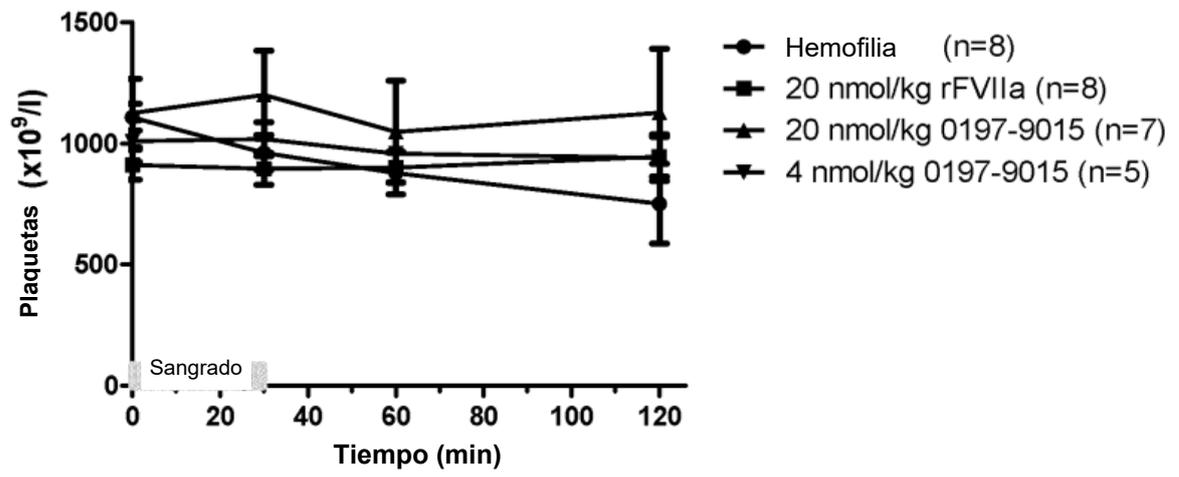


Fig. 17A

Variantes del FVII 25 nM
Plaquetas activadas con SFLLRN (30 μ M) y Convulxina (100 ng/ml)

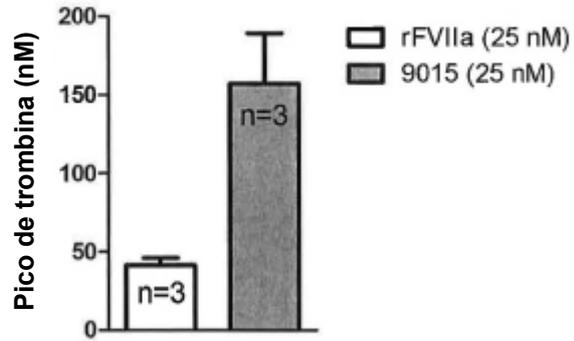


Fig 17B

Variantes del FVII 5 nM
Plaquetas activadas con SFLLRN (30 μ M) y Convulxina (100 ng/ml)

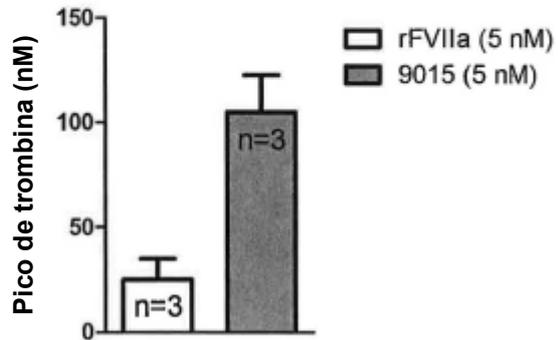


Fig. 18

9015 (25 nM)

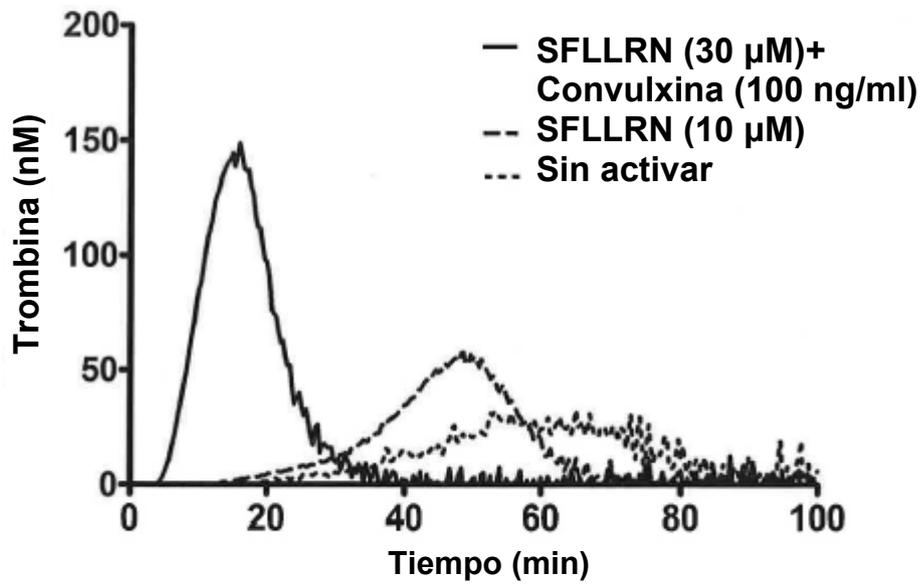


Fig. 19

SFLLRN (30 μ M)+Convulxina (100 ng/ml)

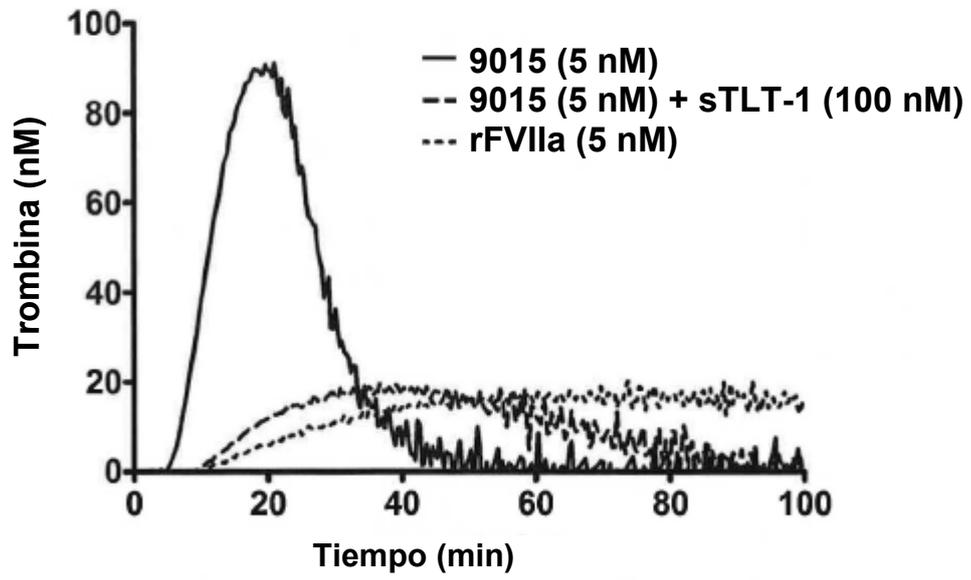
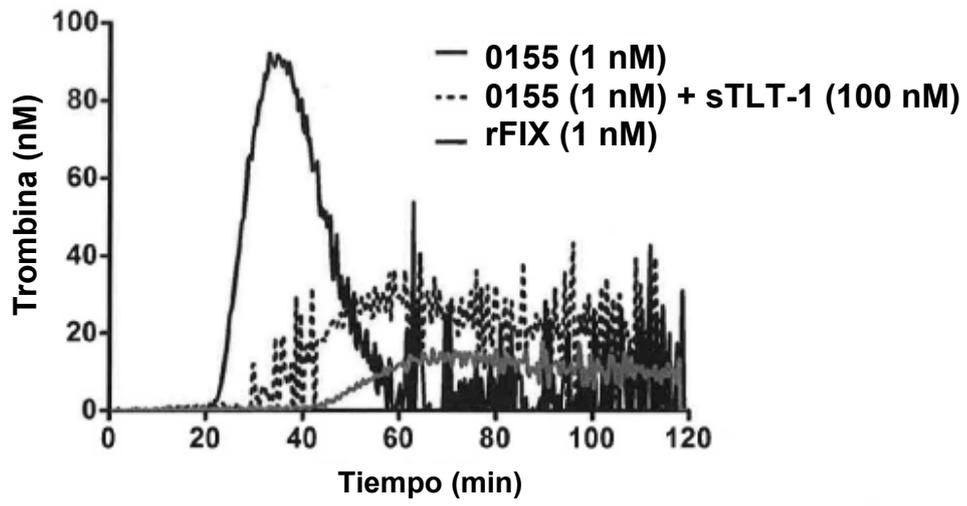


Fig. 20



Activación del FX (+PC:PS, sTF)

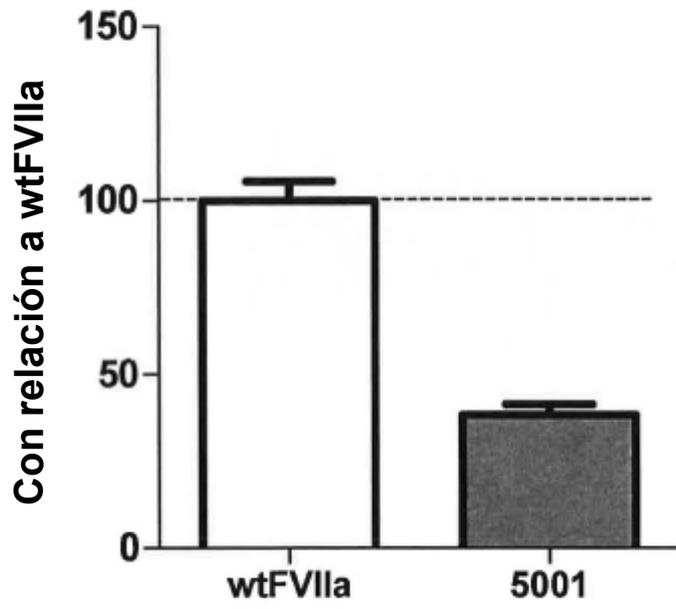


Fig. 22A

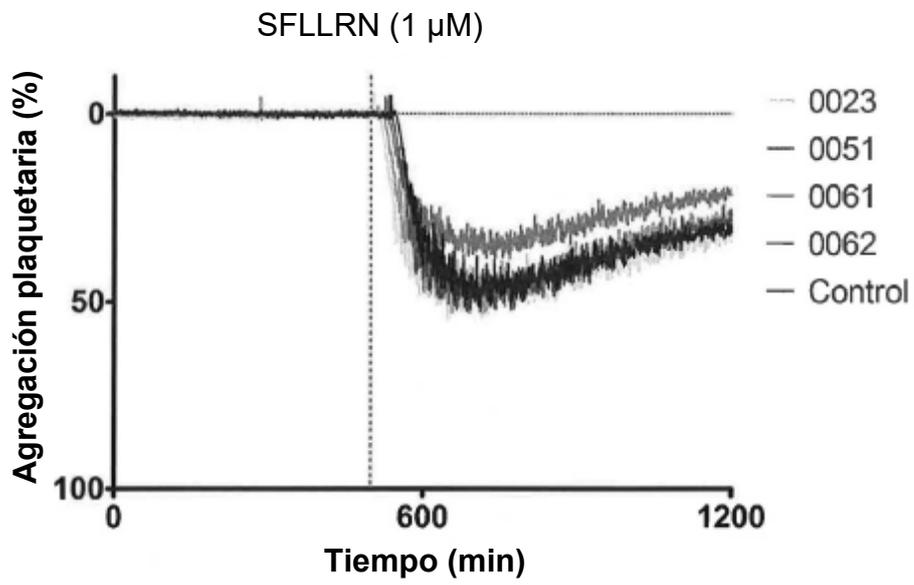


Fig. 22B

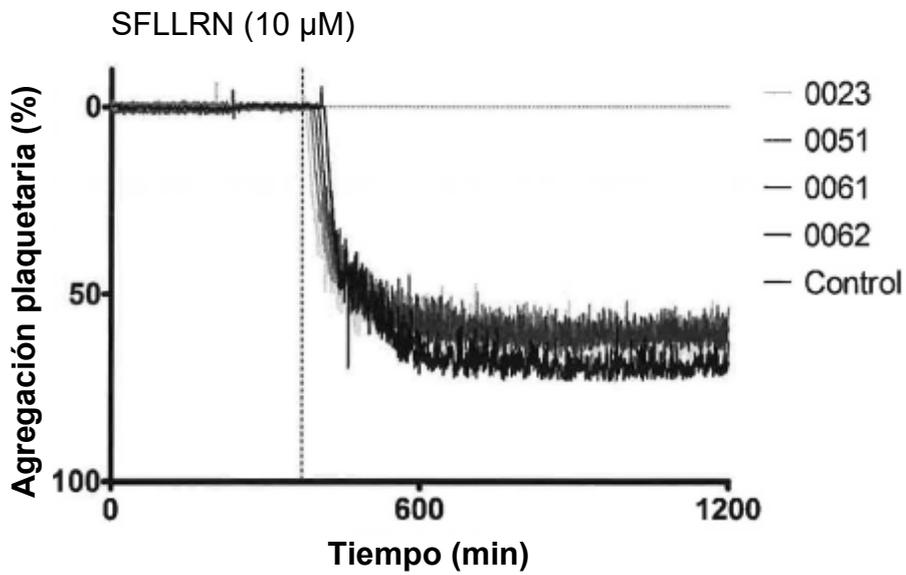


Fig. 23

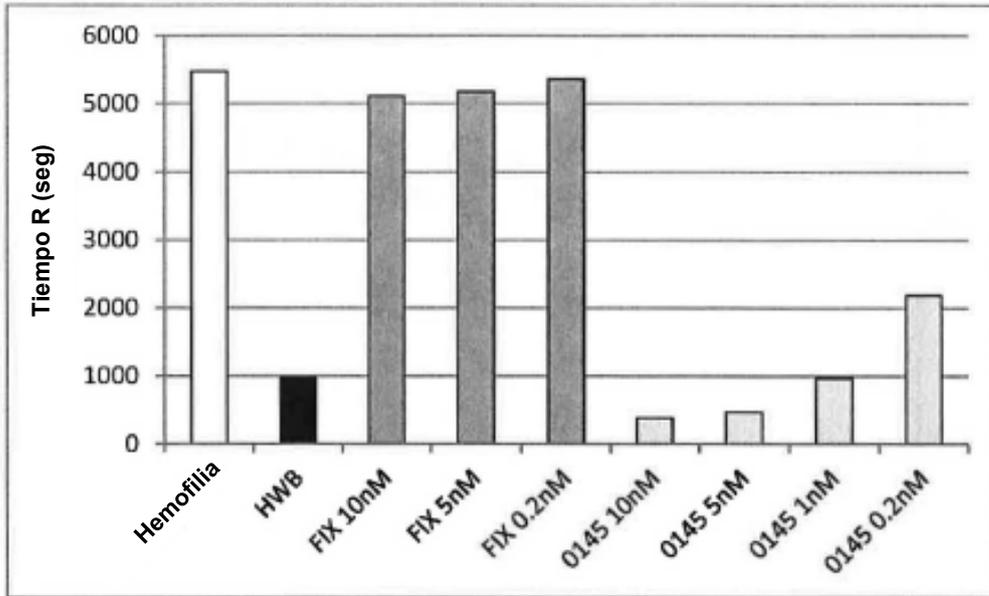


Fig. 24

Variantes del FVII 25 nM
Plaquetas activadas con SFLLRN (30 μ M)+Convulxina (100 ng/ml)

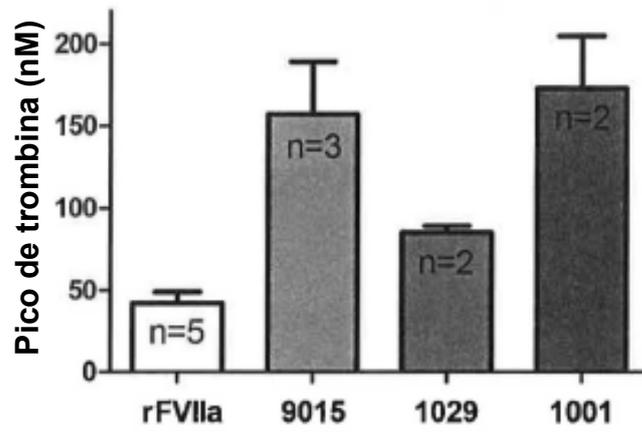


Fig. 25

Variantes del FVIIa (25 nM) en plasma deficiente del Factor VIII con plaquetas humanas

