(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 351 208**

(51) Int. Cl.:
C07K 16/28 (2006.01)

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(96) Número de solicitud europea: **02800666 .6**
(96) Fecha de presentación : **10.10.2002**
(97) Número de publicación de la solicitud: **1438340**
(97) Fecha de publicación de la solicitud: **21.07.2004**

(54) Título: **Anticuerpos frente a KDR, su producción y usos.**

(30) Prioridad: **10.10.2001 GB 0124317**

(45) Fecha de publicación de la mención BOPI:
01.02.2011

(45) Fecha de la publicación del folleto de la patente:
01.02.2011

(73) Titular/es: **UCB Pharma, S.A.**
allée de la Recherche 60
1070 Bruxelles, BE

(72) Inventor/es: **Popplewell, Andrew George;**
Tickle, Simon Peter;
Morrison, Robert Kendall y
Zinkewich-Peotti, Karen

(74) Agente: **Elzaburu Márquez, Alberto**

ES 2 351 208 T3

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

DESCRIPCIÓN

Anticuerpos frente a KDR, su producción y usos.

La presente invención se refiere a una molécula de anticuerpo que tiene especificidad para determinantes antigénicos del receptor con dominios de inserción de quinasa humana (KDR). La molécula de anticuerpo se une a KDR con mayor afinidad que el factor de crecimiento endotelial vascular humano (VEGF) y evita la interacción entre VEGF y KDR. La presente invención se refiere también a los usos terapéuticos de la molécula de anticuerpo y a métodos para producir la molécula de anticuerpo.

Esta invención se refiere a moléculas de anticuerpo. En una molécula de un anticuerpo, hay dos cadenas pesadas y dos cadenas ligeras. Cada cadena pesada y cada cadena ligera tienen en su extremo N-terminal un dominio variable. Cada dominio variable se compone de cuatro regiones marco (FR) que se alternan con tres regiones determinantes de la complementariedad (CDR). Las CDR determinan la especificidad de unión al antígeno de los anticuerpos y son secuencias peptídicas relativamente cortas mantenidas sobre las regiones marco de los dominios variables. Los residuos de los dominios variables se numeran convencionalmente según un sistema creado por Kabat *et al*. Este sistema está descrito por Kabat *et al*., 1987, en Sequences of Proteins of Immunological Interest, US Department of Health and Human Services, NIH, USA (de aquí en adelante "Kabat *et al*. (cita anterior)"). Este sistema de numeración se usa en la presente memoria descriptiva excepto cuando se indica otra cosa.

Las designaciones de los residuos de Kabat no siempre se corresponden directamente con la numeración lineal de los residuos de aminoácidos. La secuencia lineal real de aminoácidos puede contener menos aminoácidos o aminoácidos adicionales que los de la numeración estricta de Kabat que corresponde a un acortamiento de un componente estructural o a una inserción en un componente estructural, ya sea marco o CDR, de la estructura del dominio variable básico. La numeración correcta de Kabat de los residuos se puede determinar para un anticuerpo dado por alineamiento de los residuos de homología en la secuencia del anticuerpo con una secuencia "estándar" numerada según Kabat.

Las CDR del dominio variable de cadena pesada están localizadas en los residuos 31-35 (CDR-H1), residuos 50-65 (CDR-H2) y residuos 95-102 (CDR-H3) según la numeración de Kabat.

Las CDR del dominio variable de cadena ligera están localizadas en los residuos 24-34 (CDR-L1), residuos 50-56 (CDR-L2) y residuos 89-97 (CDR-L3) según la numeración de Kabat.

La construcción de anticuerpos injertados con CDR se describe en la solicitud de patente europea EP-A-0239400, que describe un procedimiento en el que las CDR de un anticuerpo monoclonal de ratón se injertan en las regiones marco de los dominios variables de una inmunoglobulina humana mediante mutagénesis dirigida al sitio utilizando oligonucleótidos largos.

El primer trabajo sobre anticuerpos monoclonales humanizados por injertos de CDR se llevó a cabo sobre anticuerpos monoclonales que reconocen antígenos sintéticos, tales como NP. Sin embargo, ejemplos en los que un anticuerpo monoclonal de ratón que reconoce la lisozima y un anticuerpo monoclonal de rata que reconoce un antígeno sobre las células T humanas fueron humanizados por injertos de CDR, han sido descritos por Verhoeyen *et al*. (Science, 239, 1534-1536, 1988) y Riechmann *et al*. (Nature, 332, 323-324, 1988), respectivamente.

Riechmann *et al*., encontraron que la transferencia de las CDR solas (como han sido definidas por Kabat (Kabat *et al*. (cita anterior) y Wu *et al*., J. Exp. Med., 132, 211-250, 1970)) no fue suficiente para proporcionar una actividad satisfactoria de unión al antígeno en el producto injertado con CDR. Se encontró que muchos residuos marco tenían que ser alterados para que se correspondieran con los de la región marco del donante. Los criterios propuestos para seleccionar qué residuos marco necesitan ser alterados están descritos en la solicitud de patente internacional No. WO 90/07861.

Se han publicado una serie de reseñas que exponen los anticuerpos injertados con CDR, incluyendo Vaughan *et al*. (Nature Biotechnology, 16, 535-539, 1998).

VEGF es una glicoproteína homodimérica de dos subunidades de 23kD con similitud estructural con PDGF. Tiene un importante papel evolutivo en la vasculogénesis, el establecimiento de un sistema de nuevos vasos sanguíneos, y está implicado en la angiogénesis, la formación de nuevos vasos a partir de los ya existentes. La angiogénesis implica la proliferación, migración e infiltración tisular de células endoteliales capilares a partir de vasos sanguíneos preexistentes. Además de jugar un importante papel en los procesos fisiológicos normales, tales como el desarrollo embrionario, el crecimiento folicular (incluyendo la formación del cuerpo lúteo) y la curación de heridas, la angiogénesis se produce en numerosas condiciones patológicas incluyendo la inflamación, la psoriasis, la artritis reumatoide y el crecimiento y la metástasis tumoral (Folkman, J and Klagsbrun, M., Science, 235:442-447, 1987). Por ejemplo, se cree generalmente que los tumores son incapaces de crecer más allá de cierto tamaño a menos que estén provistos de un suministro de sangre entregado por medio de angiogénesis.

El VEGF es distinto de otros factores implicados como posibles reguladores de la angiogénesis *in vivo* ya que es un inductor de la angiogénesis específico de las células endoteliales.

Existen cinco isoformas monoméricas diferentes de VEGF, resultantes del empalme alternativo del ARNm. Las isoformas incluyen dos formas unidas a membrana ($VEGF_{206}$ y $VEGF_{189}$) y tres formas solubles ($VEGF_{165}$, $VEGF_{121}$ y $VEGF_{145}$). En todos los tejidos excepto en placenta humana, el $VEGF_{165}$ es la isoforma más abundante.

Los efectos de VEGF están mediados por su interacción con dos receptores tirosina quinasa de alta afinidad, receptor tirosina quinasa de tipo fms (FLT-1 o VEGFR-1, Shibuya M. *et al*., Oncogene, 5 519-524, 1990) y KDR (o VEGFR-2, Terman *et al*., Oncogene, 6, 1677-1683, 1991). Tanto KDR como FLT-1 son receptores que abarcan la membrana que contienen cada uno siete dominios de tipo inmunoglobulina en la región de unión al ligando extracelular, un dominio tirosina quinasa intracelular y un dominio transmembrana. El dominio transmembrana sirve para anclar el receptor en la membrana celular de las células en las cuales es expresado.

Existen varios informes de la expresión en exceso tanto de VEGF como de sus receptores en los tumores, tanto a nivel de ARN como de proteína (Dvorak *et al*., Curr. Top. Microbiol. Imunol., 237, 97, 1999). La expresión de VEGF está regulada al alza en respuesta a la hipoxia, que se produce frecuentemente en los tumores, y el aumento de concentración de ligando induce la expresión de sus receptores. Los ejemplos de los estudios que muestran un aumento de la expresión de KDR en tumores humanos incluyen: cáncer de mama (Brown *et al*., Hum. Pathol., 26, 86, 1995); cáncer de colon (Takahashi *et al*., Cancer Res., 55, 3964, 1995); cáncer renal (Takahashi *et al*, BBRC 257, 855, 1999) y adenocarcinoma del tracto gastrointestinal (Brown *et al*., Cancer Res., 53, 4727, 1993). En un estudio más reciente en el que se utiliza un anticuerpo que reconoce específicamente VEGF unido a KDR, se observó la regulación al alza de la ruta angiogénica de VEGF/KDR en un cáncer de pulmón de células no pequeñas (Koukourakis *et al*., Cancer Res., 60, 3088, 2000).

Numerosas evidencias experimentales demuestran la conexión causal entre la actividad de VEGF y la angiogénesis tumoral *in vivo.* Kim *et al*. inyectaron un anticuerpo monoclonal neutralizador anti-VEGF en ratones carentes de sistema inmunitario que portaban tumores y mostraron una supresión del crecimiento tumoral (Nature 362, 841, 1993). La expresión retroviral de una KDR de ratón negativa dominante (FLK-1) también inhibió el crecimiento tumoral en ratones (Millauer *et al*., Nature, 367, 576, 1993). De un modo similar, el VEGF antisentido (Cheng *et al*., PNAS, 93, 8502, 1996), y los anticuerpos anti-FLK-1 (Witte *et al*., Cancer Metast. Rev., 17, 155, 1998) y la expresión de FLT-1 soluble (Goldman *et al*., PNAS, 95, 8795, 1998) inhibieron todos el crecimiento de tumores en modelos de ratón.

Varias evidencias experimentales sugieren que los efectos biológicos de VEGF referentes a la angiogénesis están mediados predominantemente por el receptor de KDR (para una revisión véase Larrivee y Karsan, Int. J. Mol. Med., 5, 447, 2000).

Se demostró que la activación mediada por VEGF de KDR solo (en líneas celulares que expresan un tipo de VEGFR solamente) era suficiente para ocasionar la proliferación y la migración celular (Waltenburger *et al*., J. Biol. Chem., 269, 26988, 1994). Por el contrario, cuando se activa FLT-1 solo, no se observa proliferación celular y no siempre se observa migración celular.

Los experimentos que utilizan mutantes de VEGF selectivos para el receptor han demostrado que la ligación de KDR activa la proteína quinasa activada por mitógeno (MAPK) dando lugar a la proliferación, migración y permeabilidad vascular (Keyt *et al*., J. Biol. Chem., 271, 5638, 1996). El mutante selectivo de FLT-1 fue inactivo en estos análisis.

Un anticuerpo monoclonal anti-VEGF que bloqueaba la interacción con KDR pero no con FLT-1 fue capaz de inhibir la permeabilidad vascular inducida por VEGF, mientras un anticuerpo anti-VEGF no bloqueante no tuvo efecto (Brekken *et al*., Cancer Res., 60, 5117, 2000).

Se ha descrito la producción de anticuerpos monoclonales contra el receptor de VEGF murino, FLK-1, mediante tecnología de hibridoma (WO 94/11499). Se demostró que estos inhibían la activación del receptor de FLK-1 bloqueando la interacción de VEGF con el receptor. Esta inhibición de la activación del receptor fue eficaz en la inhibición de la angiogénesis inducida por VEGF en ciertos modelos. Además, este anticuerpo anti-FLK-1 ha demostrado ser eficaz en el tratamiento de diferentes tumores por xenoinjerto de ratón. No obstante, no todos los anticuerpos que se unen a FLK-1 se unirán a KDR con suficiente afinidad para una eficacia terapéutica.

La unión VEGF-KDR también inhibe la apoptosis de vasos sanguíneos recién formados por medio de la activación mediada por KDR de las rutas de señalización de la quinasa PI3-quinasa Akt (la quinasa Akt es una quinasa aguas abajo de bien conocida de la ruta de la quinasa PI3 implicada en la supervivencia celular, Gerber *et al*., J. Biol. Chem., 273, 30336, 1998). Los modelos animales también demostraron la eficacia del bloqueo de esta respuesta antiapoptótica a través del bloqueo de la interacción VEGF-KDR.

Actualmente se cree que KDR es el receptor más importante en la mediación de los efectos del VEGF y su papel en la promoción de la angiogénesis y la supervivencia de los nuevos vasos parece universalmente admitido.

Por lo tanto, una molécula de anticuerpo capaz de unirse a KDR y bloquear su activación por VEGF puede tener un beneficio terapéutico en el tratamiento de las patologías en las cuales están implicados VEGF y/o KDR. Por ejemplo, casos de inflamación, psoriasis, artritis reumatoide y crecimiento tumoral. También existen fuertes argumentos de que esto se puede lograr mejor por medio del bloqueo de su interacción con el receptor KDR. Existe la necesidad de una

molécula de anticuerpo que se pueda usar repetidamente y que se produzca de manera fácil y eficiente. Existe también la necesidad de una molécula de anticuerpo, que tenga una alta afinidad por KDR y una baja inmunogenicidad en los seres humanos.

Se proporciona una molécula de anticuerpo que tiene especificidad para KDR, que comprende una cadena pesada en la que el dominio variable comprende una CDR (como definen Kabat *et al*., (cita anterior)) que tiene la secuencia dada como H1 en la Figura 1 (SEQ ID NO: 1) para CDRH1, como H2 en la Figura 1 (SEQ ID NO: 2) para CDRH2 o como H3 en la Figura 1 (SEQ ID NO: 3) para CDRH3.

La molécula de anticuerpo comprende al menos un CDR seleccionado entre H1, H2 y H3 (SEQ ID NO: 1 a SEQ ID NO: 3) para el dominio variable de la cadena pesada. La molécula de anticuerpo comprende al menos dos o las tres CDR en el dominio variable de la cadena pesada.

Además, se proporciona una molécula de anticuerpo que tiene especificidad para KDR humano, que comprende una cadena ligera en la que el dominio variable comprende una CDR (como definen Kabat *et al*., (cita anterior)) que tiene la secuencia dada como L1 en la Figura 1 (SEQ ID NO: 4) para CDRL1, como L2 en la Figura 1 (SEQ ID NO: 5) para CDRL2 o como L3 en la Figura 1 (SEQ ID NO: 6) para CDRL3.

La molécula de anticuerpo comprende al menos una CDR seleccionada entre L1, L2 y L3 (SEQ ID NO: 4 a SEQ ID NO: 6) para el dominio variable de la cadena ligera. La molécula de anticuerpo comprende al menos dos o las tres CDR en el dominio variable de la cadena ligera.

Dichas moléculas de anticuerpo pueden tener una cadena ligera complementaria o una cadena pesada complementaria, respectivamente.

La molécula de anticuerpo comprende una cadena pesada en la que el dominio variable comprende una CDR (como definen Kabat *et al*., (cita anterior)) que tiene la secuencia dada como H1 en la Figura 1 (SEQ ID NO: 1) para CDRH1, como H2 en la Figura 1 (SEQ ID NO: 2) para CDRH2 o como H3 en la Figura 1 (SEQ ID NO: 3) para CDRH3 y una cadena ligera donde el dominio variable comprende una CDR (como definen Kabat *et al*., (cita anterior)) que tiene la secuencia dada como L1 en la Figura 1 (SEQ ID NO: 4) para CDRL1, como L2 en la Figura 1 (SEQ ID NO: 5) para CDRL2 o como L3 en la Figura 1 (SEQ ID NO: 6) para CDRL3.

Las CDR dadas en los SEQ ID NOS: 1 a 6 (Figura 1) mencionadas anteriormente se derivan de un anticuerpo monoclonal de ratón VR165. La presente invención también proporciona el anticuerpo monoclonal de ratón VR165. Las secuencias de los dominios variables del anticuerpo VR165 se muestran en la Figura 2 (SEQ ID NOS: 7 y 8). La región constante de la cadena ligera de VR165 es kappa y la región constante de la cadena pesada es IgG2a. Este anticuerpo de ratón es referido más abajo como “el anticuerpo del donante”.

Además, el anticuerpo puede ser una molécula de anticuerpo quimérico ratón/humano, referida en la presente memoria como molécula de anticuerpo VR165 quimérica. La molécula de anticuerpo quimérico VR165 comprende los dominios variables del anticuerpo monoclonal de ratón VR165 (SEQ ID NOS: 7 y 8) y los dominios constantes humanos. La molécula de anticuerpo VR165 quimérico comprende el dominio C kappa humano (Hieter *et al*., Cell, 22, 197-207, 1980; número de acceso Genebank J00241) en la cadena ligera y los 4 dominios gamma humanos (Flanagan *et al*., Nature, 300, 709-713, 1982) en la cadena pesada.

Además, el anticuerpo puede ser una molécula de anticuerpo injertada con CDR. La expresión “una molécula de anticuerpo injertada con CDR” como se usa en la presente memoria se refiere a una molécula de anticuerpo en la que la cadena pesada y/o la cadena ligera contiene una o más CDR del anticuerpo del donante (p. ej. un anticuerpo monoclonal murino) injertada en un marco de la región variable de la cadena pesada y/o ligera de un anticuerpo del aceptor (p. ej. un anticuerpo humano).

Dicho anticuerpo injertado con CDR tiene un dominio variable que comprende las regiones marco del aceptor humano así como una o más CDR del donante mencionadas anteriormente.

Cuando se injertan las CDR, se puede usar cualquier secuencia marco apropiada de la región variable del aceptor teniendo en cuenta la clase/tipo del anticuerpo del donante del que se derivan las CDR, incluyendo las regiones marco de ratón, de primates y humanas. Ejemplos de marcos humanos que se pueden usar en la presente invención son KOL, NEWM, REI, EU, TUR, TEI, LAY y POM (Kabat *et al*. (cita anterior)). Por ejemplo, KOL y NEWM se pueden usar para la cadena pesada, REI se puede usar para la cadena ligera y EU, LAY y POM se pueden usar tanto para la cadena pesada como para la cadena ligera.

Las regiones marco preferidas para la cadena pesada son las regiones marco del grupo 3 de la línea germinal humana mostradas en la Figura 3 (VH3-7 GL, SEQ ID NO: 9). Las regiones marco preferidas para la cadena ligera son las 1 regiones marco del grupo 1 de las secuencias de la línea germinal humana mostradas en la Figura 3 (A30GL, SEQ ID NO: 10).

En un anticuerpo injertado con CDR, se prefiere utilizar como anticuerpo aceptor uno que tenga cadenas que sean homólogas a las cadenas del anticuerpo del donante. Las cadenas pesadas y ligeras del aceptor no tienen que ser

derivadas necesariamente del mismo anticuerpo y, si se desea, pueden comprender cadenas compuestas con regiones marco derivadas de diferentes cadenas.

También, en un anticuerpo injertado con CDR, las regiones marco no tienen que tener necesariamente exactamente la misma secuencia que las del anticuerpo del aceptor. Por ejemplo, los residuos inusuales pueden ser cambiados a residuos que se presentan más frecuentemente para esa clase o tipo de cadena del aceptor. Alternativamente, los residuos seleccionados en las regiones marco del aceptor se pueden cambiar de manera que correspondan con el residuo encontrado en la misma posición en el anticuerpo del donante. Dichos cambios se deben mantener al mínimo necesario para recuperar la afinidad del anticuerpo del donante. En el documento WO 91/09967 se expone un protocolo para seleccionar residuos en las regiones marco del aceptor que puede ser necesario cambiar.

En una molécula de anticuerpo injertada con CDR de la presente invención, si la cadena pesada del aceptor tiene regiones marco del grupo 3 de la línea germinal humana (mostrado en la Figura 3) (SEQ ID NO: 9) las regiones marco del aceptor de la cadena pesada comprenden, además de una o más CDR del donante, residuos del donante en las posiciones 77 y 93 (de acuerdo con Kabat *et al*. (cita anterior)).

En una molécula de anticuerpo injertada con CDR de la presente invención, si la cadena ligera del aceptor tiene regiones marco del grupo 1 humano (mostradas en la Figura 3) (SEQ ID NO: 10) las regiones marco del aceptor de la cadena ligera comprenden residuos del donante en las posiciones 36, 44, 60, 66, 69, 70 y 71 (de acuerdo con Kabat *et al*. (cita anterior)).

Los residuos del donante son residuos procedentes del anticuerpo del donante, esto es el anticuerpo del cual se derivaron originalmente las CDR.

La molécula de anticuerpo de la presente invención es definida en las reivindicaciones adjuntas.

La molécula de anticuerpo de la presente invención puede comprender: una molécula de anticuerpo completa, que tiene las cadenas pesadas y ligeras de longitud completa; uno de sus fragmentos, tales como un fragmento Fab, Fab modificado, di-Fab, a di-(Fab modificado), Fab', $F(ab')_2$ o Fv; un monómero o dímero de cadena ligera o cadena pesada; un anticuerpo de cadena sencilla, por ejemplo, un Fv de cadena sencilla en el que los dominios variables de cadena pesada y de cadena ligera están unidos por un enlace peptídico. Similarmente, las regiones variables de cadena pesada y de cadena ligera se pueden combinar con otros dominios de anticuerpo cuando sea apropiado.

Preferiblemente la molécula de anticuerpo de la presente invención es un fragmento Fab. Dicho fragmento Fab tiene una cadena ligera que tiene la secuencia dada como SEQ ID NO: 11 (Figura 4) y una cadena pesada que tiene la secuencia dada como SEQ ID NO: 12 (Figura 5). Las secuencias de aminoácidos dadas en los SEQ ID NO: 11 y SEQ ID NO: 12 son codificadas preferiblemente por las secuencias de nucleótidos dadas en los SEQ ID NO: 13 y SEQ ID NO: 14, respectivamente (Figura 4 y Figura 5).

Alternativamente, se prefiere que la molécula de anticuerpo de la presente invención sea un fragmento Fab modificado donde la modificación es la adición al extremo C-terminal de su cadena pesada de uno o más aminoácidos para permitir el anclaje de una molécula efectora o indicadora. Preferiblemente, los aminoácidos adicionales forman una región bisagra modificada que contiene uno o dos residuos de cisteína a los cuales puede ser anclada la molécula efectora o indicadora. Dicho fragmento Fab modificado tiene preferiblemente una cadena ligera que tiene la secuencia dada como SEQ ID NO: 11y una cadena pesada que tiene la secuencia dada como SEQ ID NO: 12. Las secuencias de aminoácidos dadas en los SEQ ID NO: 11 y SEQ ID NO: 12 son codificadas preferiblemente por las secuencias de nucleótidos dadas en los SEQ ID NO: 13 y SEQ ID NO: 14, respectivamente.

En una alternativa adicional, es particularmente preferido que la molécula de anticuerpo de la presente invención sea un fragmento di-(Fab modificado) donde la modificación es la adición al extremo C-terminal de cada cadena pesada de Fab de uno o más aminoácidos para permitir el anclaje de la cadena a otra cadena semejante y a una molécula efectora o indicadora. Preferiblemente, los aminoácidos adicionales forman una región bisagra modificada que contiene uno, dos o tres residuos de cisteína, para el anclaje al otro Fab, de las moléculas efectoras o indicadoras.

Un grupo efector preferido es una molécula de polímero, que puede unirse al fragmento Fab modificado o di-(Fab modificado) para incrementar su vida media *in vivo*.

La molécula de polímero puede ser, en general, un polímero sintético o natural, por ejemplo una cadena sustituida opcionalmente lineal o ramificada de polialquileno, polialquenileno o polioxialquileno o un polisacárido ramificado o no ramificado, p. ej. un homo o hetero-polisacárido.

Los sustituyentes opcionales concretos que pueden estar presentes en los polímeros sintéticos mencionados anteriormente incluyen uno o más grupos hidroxi, metilo o metoxi. Los ejemplos concretos de polímeros sintéticos incluyen poli(etilenglicol), poli(propilenglicol), poli(alcohol vinílico) de cadena lineal o ramificada opcionalmente sustituidos, o derivados de estos, en especial poli(etilenglicol) opcionalmente sustituido, tal como metoxipoli(etilenglicol) o derivados de éste.

Los polímeros naturales particulares incluyen lactosa, amilosa, dextrano, glucógeno o derivados de estos. "Derivados" tal y como se usa en la presente memoria se pretende que incluya derivados reactivos, por ejemplo grupos reactivos selectivos tiol tales como maleimidas y semejantes. El grupo reactivo puede unirse directamente o a través de un segmento conector al polímero. Se apreciará que el resto de dicho grupo será parte en algunos casos del producto como grupo conector entre el fragmento de anticuerpo y el polímero.

El tamaño del polímero puede variarse según se desee, pero estará generalmente en un intervalo de peso molecular medio de 500 Da a 50.000 Da, preferiblemente de 5.000 a 40.000 Da y más preferiblemente de 25.000 a 40.000 Da. El tamaño del polímero puede seleccionarse en particular tomando como base el uso pretendido del producto.

Los polímeros particularmente preferidos incluyen un polímero de polialquileno, tal como poli(etilenglicol) o, especialmente, un metoxipoli(etilenglicol) o un derivado de éste, y especialmente con un peso molecular en el intervalo de aproximadamente 25.000 Da a aproximadamente 40.000 Da.

Cada molécula de polímero unida al fragmento de anticuerpo modificado puede unirse covalentemente al átomo de azufre de un residuo de cisteína localizado en el fragmento. La unión covalente será generalmente un enlace disulfuro o, en particular, un enlace azufre-carbono.

Cuando se desee, el fragmento de anticuerpo puede tener una o más moléculas efectoras o indicadoras unidas a él. Las moléculas efectoras o indicadoras pueden unirse al fragmento de anticuerpo a través de cualquier grupo funcional de la cadena lateral de aminoácidos o aminoácido terminal localizado en el fragmento, por ejemplo cualquier grupo amino, imino, hidroxilo o carboxilo libre.

Un polímero activado puede usarse como material de partida en la preparación de polímero-fragmentos de anticuerpo modificados como se ha descrito anteriormente. El polímero activado puede ser cualquier polímero que contenga un grupo reactivo tiol tal como un ácido o éster α-halocarboxílico, p. ej. yodoacetamida, una imida, p. ej. maleimida, una vinilsulfona o un disulfuro. Dichos materiales de partida pueden obtenerse comercialmente (por ejemplo de Shearwater polimers Inc., Huntsville, AL, USA), o pueden prepararse a partir de materiales de partida disponibles comercialmente usando procedimientos químicos convencionales.

En cuanto a los radicales de poli(etilenglicol) (PEG) de anclaje, se hace referencia a "poli(etilenglicol) Chemistry, Biotechnical and Biomedical Applications", 1992, J. Milton Harris (ed), Plenum Press, Nueva York, "poli(etilenglicol) Chemistry and Biological Applications", 1997, J. Milton Harris y S. Zalipsky (eds), American Chemical Society, Washington DC y "Bioconjugation Protein Coupling Techniques for the Biomedical Sciences", 1998, M. Aslam y A. Dent, Grove Publishers, Nueva York.

Cuando se desea obtener un fragmento de anticuerpo unido a una molécula efectora o indicadora, éste se puede preparar mediante procedimientos químicos o de ADN recombinante convencionales en los que el fragmento de anticuerpo se une directamente o por medio de un agente de acoplamiento a la molécula efectora o indicadora antes o después de la reacción con el polímero activado apropiado. Los procedimientos químicos particulares incluyen, por ejemplo, los descritos en los documentos WO 93/06231, WO 92/22583, WO 90/09195/, y WO 89/01476. Alternativamente, cuando la molécula efectora o indicadora es una proteína o polipéptido, la unión puede conseguirse usando procedimientos de ADN recombinante, por ejemplo como se describe en el documento WO 86/01533 y EP-A-0392745.

Preferiblemente, el fragmento Fab o di-Fab modificado de la presente invención está PEGilado (esto es tiene PEG (poli(etilenglicol)) o mPEG (metoxipoli(etilenglicol)) anclado covalentemente de acuerdo con los métodos descritos en los documentos EP-A-0948544 y EP-A-1090037. Preferiblemente la molécula de anticuerpo de la presente invención es un fragmento Fab modificado PEGilado como se muestra en la Figura 6 o un fragmento di-(Fab modificado) PEGilado. Como se muestra en la Figura 6, el fragmento Fab modificado tiene un grupo maleimida unido covalentemente a un único grupo tiol en una región bisagra modificada. Un residuo de lisina está unido covalentemente a un grupo maleimida. A cada uno de los grupos amino del residuo de lisina se une un polímero de metoxipoli(etilenglicol) que tiene un peso molecular de aproximadamente 20.000 Da. El peso molecular total de la molécula efectora completa es por lo tanto aproximadamente 40.000 Da. De un modo similar cada mPEG se puede unir a un residuo de lisina unido covalentemente a un conector de bis-maleimida como se describe en el documento EP-A-1090037 para formar un di-(Fab modificado) PEGilado de acuerdo con la invención.

Preferiblemente, en el compuesto mostrado en la Figura 6, la cadena pesada de la porción de anticuerpo tiene la secuencia dada como SEQ ID NO: 12 y la cadena ligera tiene la secuencia dada en el SEQ ID NO: 11.

Los dominios de la región constante de la molécula de anticuerpo de la presente invención, si están presentes, se pueden seleccionar considerando la función propuesta de la molécula de anticuerpo, y en particular las funciones efectoras que se pueden requerir. Por ejemplo, los dominios de la región constante pueden ser dominios de IgA, IgD, IgE, IgG o IgM humanas. En particular, se pueden utilizar los dominios de las regiones constantes de IgG humanas, especialmente los isotipos IgG1 e IgG3 cuando la molécula de anticuerpo está destinada a usos terapéuticos y se requieren funciones efectoras de anticuerpos. Alternativamente, se pueden utilizar los isotipos IgG2 y IgG4 cuando la molécula de anticuerpo está destinada a usos terapéuticos y no se requieren funciones efectoras de anticuerpos, p. ej. simplemente para bloquear la ligación de KDR por VEGF.

Asimismo, la molécula de anticuerpo de la presente invención puede tener unida a ella, una molécula efectora o una molécula indicadora. Por ejemplo, puede tener un macrociclo, para quelar un átomo de un metal pesado, o una toxina, tal como ricina, unida a ella por una estructura de puente covalente. Alternativamente, se pueden usar procedimientos de tecnología de ADN recombinante para producir una molécula de anticuerpo en la que el fragmento Fc (CH2, CH3 y dominios bisagra), los dominios CH2 y CH3 o el dominio CH3 de una molécula de inmunoglobulina completa han sido reemplazados, o han sido unidos a la misma por un enlace peptídico, una proteína no inmunoglobulina funcional, tal como una enzima o una molécula de toxina.

La molécula de anticuerpo de la presente invención tiene una afinidad de unión de $0{,}4x10^{-10}$ M. La molécula de anticuerpo de la presente invención comprende el dominio gH3 de la cadena pesada (SEQ ID NO: 15) y el dominio gL3 de la cadena ligera (SEQ ID NO: 16). Las secuencias de los dominios variables de estas cadenas ligeras y pesadas se muestran en la Figura 7.

La presente invención también hace referencia a las variantes de la molécula de anticuerpo de la presente invención, que tienen una afinidad mejorada por KDR. Dichas variantes se pueden obtener por una serie de protocolos de maduración de afinidad incluyendo la mutación de las CDR (Yang *et al*., J. Mol. Biol., 254, 392-403, 1995), barajado de cadenas (Marks *et al*., Bio/Technology, 10, 779-783, 1992), el uso de cepas mutantes de *E. coli* (Low *et al*., J. Mol. Biol., 250, 359-368, 1996), barajado de ADN (Patten *et al*., Curr. Opin. Biotechnol., 8, 724-733, 1997), la presentación en fagos (Thompson *et al*., J. Mol. Biol., 256, 77-88, 1996) y la PCR sexual (Crameri *et al*., Nature, 391, 288-291, 1998). Vaughan *et al*. (cita anterior) expone estos métodos de maduración de afinidad.

La presente invención también proporciona una secuencia de ADN que codifica las cadenas pesadas y/o ligeras de la molécula de anticuerpo de la presente invención, por ejemplo como se describe en las Figuras de la presente memoria.

La secuencia de ADN de la presente invención puede comprender ADN sintético, por ejemplo producido por un proceso químico, ADNc, ADN genómico o cualquier combinación de los mismos.

La presente invención se refiere también a un vector de clonación o de expresión que comprende una o más secuencias de ADN de la presente invención. Preferiblemente, el vector de clonación o de expresión comprende dos secuencias de ADN, que codifican la cadena ligera y la cadena pesada de la molécula de anticuerpo de la presente invención, respectivamente.

En una realización preferida, la presente invención proporciona un vector de expresión de *E. coli* que comprende una secuencia de ADN de la presente invención. Preferiblemente el vector de expresión es pTTOD(CDP791) como se muestra esquemáticamente en la Figura 8.

Los métodos generales por los que los vectores se pueden construir, los métodos de transfección y los métodos de cultivo son bien conocidos por los expertos en la técnica. A este respecto, se hace referencia a "Current Protocols in Molecular Biology", 1999, F. M. Ausubel (ed), Wiley Interscience, Nueva York y el Maniatis Manual producido por Cold Spring Harbor Publishing.

Las secuencias de ADN que codifican la molécula de anticuerpo de la presente invención se pueden obtener por métodos bien conocidos por los expertos en la técnica. Por ejemplo, las secuencias de ADN que codifican la totalidad o parte de las cadenas pesadas y ligeras del anticuerpo se pueden sintetizar como se desee a partir de las secuencias de ADN determinadas o sobre la base de las correspondientes secuencias de aminoácidos.

El ADN que codifica las secuencias marco del aceptor está ampliamente disponible para los expertos en la técnica y se puede sintetizar fácilmente sobre la base de sus secuencias conocidas de aminoácidos.

Las técnicas estándar de biología molecular se pueden usar para preparar las secuencias de ADN que codifican la molécula de anticuerpo de la presente invención. Las secuencias de ADN deseadas se pueden sintetizar completamente o en parte utilizando técnicas de síntesis de oligonucleótidos. Se pueden utilizar la mutagénesis dirigida al sitio y las técnicas de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) según sea apropiado.

Se puede utilizar cualquier sistema adecuado de célula anfitriona/vector para la expresión de las secuencias de ADN que codifican la molécula de anticuerpo de la presente invención. Se pueden usar sistemas bacterianos, por ejemplo *E. coli,* y otros sistemas microbianos, en parte, para la expresión de fragmentos de anticuerpo tales como los fragmentos Fab, di-(Fab modificado), y $F(ab')_2$, y especialmente los fragmentos Fv y los fragmentos de anticuerpo de cadena sencilla, por ejemplo, los Fv de cadena sencilla. Se pueden usar sistemas de expresión de células anfitrionas eucarióticas, por ejemplo, de mamífero, para la producción de moléculas de anticuerpo más grandes, incluyendo las moléculas de anticuerpo completas. Las células anfitrionas de mamífero adecuadas incluyen células de CHO, de mieloma o hibridoma.

La presente invención proporciona también un procedimiento para la producción de una molécula de anticuerpo según la presente invención, que comprende el cultivo de una célula anfitriona que contiene un vector de la presente invención en condiciones adecuadas para llevar a la expresión de una proteína a partir de ADN que codifica la molécula de anticuerpo de la presente invención, y al aislamiento de la molécula de anticuerpo.

Preferiblemente, el procedimiento para la producción de la molécula de anticuerpo de la presente invención comprende cultivar *E. coli* que comprende un vector de expresión de *E. coli* que comprende la secuencia de ADN de la presente invención en condiciones adecuadas para llevar a cabo la expresión de la proteína a partir de la secuencia de ADN y aislar la molécula de anticuerpo. La molécula de anticuerpo puede ser secretada a partir de la célula o dirigida al periplasma mediante secuencias señal adecuadas. Alternativamente, las moléculas de anticuerpo se pueden acumular en el citoplasma de la célula. Preferiblemente la molécula de anticuerpo es dirigida al periplasma. Dependiendo de la molécula de anticuerpo que se esté produciendo y del procedimiento utilizado, es deseable permitir que las moléculas de anticuerpo se replieguen y adopten una conformación funcional. Los procedimientos para permitir que las moléculas de anticuerpo se replieguen son bien conocidos por los expertos en la técnica.

La molécula de anticuerpo puede comprender solamente un polipéptido de cadena pesada o ligera, en cuyo caso solo es necesario utilizar una secuencia codificante del polipéptido de cadena pesada o ligera para transfectar las células anfitrionas. Para la producción de productos que comprenden tanto cadenas pesadas como cadenas ligeras, la línea de células se puede transfectar con dos vectores, un primer vector que codifica un polipéptido de cadena ligera y un segundo vector que codifica un polipéptido de cadena pesada. Alternativamente, se puede utilizar un vector sencillo, y el vector incluye secuencias que codifican polipéptidos de cadena ligera y de cadena pesada.

La presente invención proporciona también una composición terapéutica o para diagnóstico, que comprende una molécula de anticuerpo de la presente invención en combinación con un excipiente, diluyente o vehículo farmacéuticamente aceptable.

La presente invención proporciona también un procedimiento para la preparación de una composición terapéutica o para diagnóstico, que comprende la mezcla de una molécula de anticuerpo de la presente invención junto con un excipiente, diluyente o vehículo farmacéuticamente aceptable.

La molécula de anticuerpo puede ser el único ingrediente activo en la composición terapéutica o para diagnóstico o puede ir acompañado por otros ingredientes activos incluyendo otros ingredientes anticuerpos, por ejemplo anticuerpos anti-células T, anti-IFNγ o anti-LPS, o ingredientes no anticuerpos tales como las xantinas.

Las composiciones farmacéuticas preferiblemente comprenden una cantidad terapéuticamente eficaz del anticuerpo de la invención. La expresión "cantidad terapéuticamente eficaz" como se usa aquí se refiere a una cantidad de un agente terapéutico necesario para tratar, mejorar o prevenir una enfermedad o condición determinada, o para poner de manifiesto un efecto terapéutico o preventivo detectable. Para cualquier anticuerpo, la dosis terapéuticamente eficaz se puede estimar inicialmente o en ensayos de cultivo celular o en modelos animales, usualmente en roedores, conejos, perros, cerdos o primates. El modelo animal se puede usar también para determinar el intervalo de concentración apropiado y la vía de administración. Dicha información se puede usar entonces para determinar las dosis útiles y las vías de administración en los seres humanos.

La cantidad eficaz precisa para un sujeto humano dependerá de la gravedad de la enfermedad, de la salud general del sujeto, de la edad, peso y sexo del sujeto, de la dieta, tiempo y frecuencia de la administración, combinación o combinaciones de fármacos, reacciones de sensibilidad y tolerancia/respuesta a la terapia. Esta cantidad se puede determinar por experimentación rutinaria y depende de la opinión del clínico. Generalmente, una dosis eficaz variará de 0,01 mg/kg a 50 mg/kg, preferiblemente de 0,1 mg/kg a 20 mg/kg, más preferiblemente aproximadamente 15 mg/kg.

Las composiciones se pueden administrar individualmente a un paciente o se pueden administrar en combinación con otros agentes, fármacos u hormonas.

La dosis a la cual se administra la molécula de anticuerpo de la presente invención depende de la afección a tratar, del grado al cual el nivel de VEGF que se va a neutralizar se eleva, o se espera que se eleve, por encima de un nivel deseable, y de si la molécula de anticuerpo se está utilizando profilácticamente o para tratar una afección existente. La dosis también será seleccionada de acuerdo con la edad y el estado del paciente.

De este modo, por ejemplo, cuando el producto es para el tratamiento o la profilaxis de una enfermedad inflamatoria crónica, tal como la artritis reumatoide, las dosis adecuadas de la molécula de anticuerpo de la presente invención se encuentran en el intervalo entre 0,5 y 50 mg/kg, más preferiblemente entre 1 y 20 mg/kg y muy preferiblemente aproximadamente 15 mg/kg. La frecuencia de la dosis dependerá de la vida media de la molécula de anticuerpo y de la duración de su efecto.

Si la molécula de anticuerpo tiene una vida media corta (por ejemplo, 2 a 10 horas) puede ser necesario administrar una o más dosis al día. Alternativamente, si la molécula de anticuerpo tiene una vida media larga (por ejemplo, 2 a 15 días) puede ser necesario administrar solamente una dosis una vez al día, una vez por semana o incluso una vez cada 1 ó 2 meses.

Una composición farmacéutica puede contener también un vehículo farmacéuticamente aceptable para la administración del anticuerpo. El vehículo no debe inducir por sí mismo la producción de anticuerpos nocivos para el individuo que recibe la composición y no debe ser tóxico. Pueden ser vehículos adecuados las macromoléculas grandes, metabolizadas lentamente, tales como las proteínas, polipéptidos, liposomas, polisacáridos, ácidos polilácticos, ácidos poliglicólicos, aminoácidos poliméricos, copolímeros de aminoácidos y partículas de virus inactivas.

Se pueden usar sales farmacéuticamente aceptables, por ejemplo sales de un ácido mineral, tales como hidrocloruros, hidrobromuros, fosfatos y sulfatos, o sales de ácidos orgánicos, tales como acetatos, propionatos, malonatos y benzoatos.

Los vehículos farmacéuticamente aceptables de las composiciones terapéuticas pueden contener adicionalmente líquidos tales como agua, solución salina, glicerol y etanol. Adicionalmente pueden estar presentes en dichas composiciones, sustancias auxiliares, tales como agentes humectantes o emulsionantes o sustancias tamponantes del pH. Tales vehículos hacen posible que las composiciones farmacéuticas sean formuladas como comprimidos, píldoras, grageas, cápsulas, líquidos, geles, jarabes, mezclas y suspensiones, para su ingestión por el paciente.

Las formas preferidas para administración incluyen formas adecuadas para administración parenteral, por ejemplo, mediante inyección o perfusión, por ejemplo por inyección rápida o por perfusión continua. Cuando el producto es para inyección o para perfusión, puede tomar la forma de una suspensión, solución o emulsión en un vehículo acuoso u oleoso y puede contener agentes de formulación, tales como agentes de suspensión, conservantes, estabilizantes y/o dispersantes. Alternativamente, la molécula de anticuerpo puede estar en forma seca, para reconstitución antes de su uso con un líquido estéril apropiado.

Una vez formuladas, las composiciones de la invención se pueden administrar directamente al sujeto. Los sujetos a ser tratados pueden ser animales. Sin embargo, es preferible que las composiciones se adapten para administración a sujetos humanos.

Las composiciones farmacéuticas de esta invención se pueden administrar por varias rutas incluyendo, pero sin limitarse a, las rutas oral, intravenosa, intramuscular, intraarterial, intramedular, intratecal, intraventricular, transdérmica, transcutánea (por ejemplo, véase WO98/20734), subcutánea, intraperitoneal, intranasal, enteral, tópica, sublingual, intravaginal o rectal. Los *hyposprays* se pueden usar también para administrar las composiciones farmacéuticas de la invención. Típicamente, las composiciones terapéuticas se pueden preparar como inyectables, ya sea como soluciones líquidas o como suspensiones. Se pueden preparar también formas sólidas adecuadas para solución, o suspensión, en vehículos líquidos previamente a la inyección.

La administración directa de las composiciones generalmente se realizará por inyección, subcutáneamente, intraperitonealmente, intravenosamente o intramuscularmente, o se pueden administrar en el espacio intersticial de un tejido. Las composiciones se pueden administrar también en una lesión. La posología de tratamiento puede ser un programa de dosis única o un programa de dosis múltiples.

Se apreciará que el ingrediente activo de la composición será una molécula de anticuerpo. Como tal, será susceptible de degradación en el tracto gastrointestinal. Por tanto, si la composición es para ser administrada por una vía que usa el tracto gastrointestinal, la composición necesitará contener agentes que protejan al anticuerpo de la degradación pero que liberen el anticuerpo una vez que ha sido absorbido del tracto gastrointestinal.

Una exposición concienzuda de vehículos farmacéuticamente aceptables está disponible en Remington's Pharmaceutical Sciences (Mack Publishing Company, N.J. 1991).

También se contempla que el anticuerpo de la presente invención sea administrado mediante el uso de terapia génica. Con el fin de conseguir esto, las secuencias de ADN que codifican las cadenas pesadas y ligeras de la molécula de anticuerpo bajo el control de componentes apropiados de ADN se introducen en un paciente, de tal modo que las cadenas de anticuerpo se expresen a partir de las secuencias de ADN y sean ensambladas *in situ*.

La presente invención proporciona también la molécula de anticuerpo de la presente invención, para su uso en el tratamiento de una enfermedad en la cual están implicados VEGF y/o KDR.

La presente invención proporciona además el uso de la molécula de anticuerpo según la presente invención, en la fabricación de un medicamento para el tratamiento en el que están implicados VEGF y/o KDR.

La molécula de anticuerpo de la presente invención se puede utilizar en cualquier terapia en la que se desee reducir el nivel de KDR biológicamente activo presente en el cuerpo humano o animal. El VEGF puede estar circulando en el cuerpo o estar presente a un nivel indeseablemente alto localizado en un sitio particular del cuerpo.

Por ejemplo, el VEGF (y por lo tanto el KDR) han sido implicados en numerosas afecciones patológicas incluyendo la inflamación, la psoriasis, la artritis reumatoide y el crecimiento y la metástasis de tumores.

Se ha descrito un método para tratar sujetos humanos o animales que padecen o tienen riesgo de padecer un trastorno en el que están implicados el VEGF y/o el KDR, que comprende administrar al sujeto una cantidad eficaz de la molécula de anticuerpo de la presente invención.

La molécula de anticuerpo de la presente invención se puede usar también en el diagnóstico, por ejemplo en el diagnóstico *in vivo* y en el diagnóstico por imagen de las enfermedades que implican niveles elevados de KDR.

La presente invención se describe adicionalmente sólo a modo de ilustración en los siguientes ejemplos, que hacen referencia a las Figuras adjuntas, en las cuales:

La Figura 1 muestra las secuencias de las CDR de las regiones V de las cadenas pesadas y ligeras del gen del anticuerpo monoclonal de ratón VR165 (SEQ ID NOS 1-6).

La Figura 2 muestra la secuencia de proteínas de los dominios VH y VL del anticuerpo monoclonal de ratón VR165 (SEQ ID NO: 7 y SEQ ID NO: 8).

La Figura 3 muestra las secuencias de proteína de la región V seleccionada como marcos aceptores de la línea germinal humana. VH3-7 GL es un gen VH de la línea germinal humana (SEQ ID NO: 9). A30 GL hace referencia al gen A30 de la secuencia de la línea germinal VL humana (SEQ ID NO: 10). En cada caso la secuencia de la línea germinal del marco 4 es proporcionada por J_H4 y J_K1 de la línea germinal humana, respectivamente.

La Figura 4 muestra la secuencia de aminoácidos y nucleótidos de la cadena ligera de Fab CDP791 (SEQ ID NO: 11 y SEQ ID NO: 13).

La Figura 5 muestra la secuencia de aminoácidos y nucleótidos de la cadena pesada de Fab CDP791 (SEQ ID NO: 12 y SEQ ID NO: 14).

La Figura 6 muestra la estructura de un fragmento Fab modificado derivado del anticuerpo VR165 unido covalentemente por medio de un residuo de cisteína a un conector de lisil-maleimida donde cada grupo amino del residuo lisilo tiene unido covalentemente a él un residuo de metoxi-PEG donde n es aproximadamente 420;

La Figura 7 muestra las secuencias de proteínas para el gen de los dominios VH y VL injertado con CDR optimizadas (SEQ ID NO: 15 y SEQ ID NO: 16).

La Figura 8 muestra el plásmido pTTOD(CDP791) optimizado que contiene la variante IGS-2 entre los injertos gL3 y gH3.

La Figura 9 muestra la secuencia de proteínas de los injertos VH y VL designados (gH1-3 y gL1-3, SEQ ID NOS 17-22). El injerto gH1 contiene residuos del marco no murinos. El injerto gH2 contiene residuos murinos en las posiciones 77 y 93 (numeración de Kabat). Tanto T como S son comunes en las secuencias de la línea germinal humana en la posición 77, de manera que la inclusión de T todavía concuerda con un resto humano. Es probable que la V de la posición 93 sea importante en la interfaz VH/VL. La inclusión de los residuos 60 y 62 humanos representa los cambios en la porción C-terminal de CDR-H2. El injerto gL2 contiene residuos murinos en las posiciones 60, 66, 69, 70 y 71 (numeración de Kabat). El injerto gL3 contiene más restos murinos en las posiciones 36 y 44).

La Figura 10 muestra el diseño de genes que codifican los injertos gH1 y gL1 (SEQ ID NO: 23 y SEQ ID NO: 24).

La Figura 11 muestra los oligonucléotidos utilizados para ensamblar los genes que codifican los injertos gL1 y gH1 (SEQ ID NOS: 25-40).

La Figura 12 muestra los plásmidos pCR2.1(gH1) y pCR2.1 (gL1) que contienen los injertos gH1 y gL1, respectivamente.

La Figura 13 muestra las casetes de oligonucleótidos utilizadas en la construcción de los injertos gH2, gH3, gL2 y gL3 (SEQ ID NOS: 41-44).

La Figura 14 muestra los pares de oligonucleótidos utilizados en la construcción de los injertos gH2, gH3, gL2 y gL3 (SEQ ID NOS: 45-52).

La Figura 15 muestra los plásmidos pGamma4 y pMR10.1 en los que los injertos VH y VL, respectivamente, fueron sub-clonados para permitir la expresión en líneas celulares CHO.

La Figura 16 muestra el plásmido de expresión de Fab' en *E. coli* pTTOD, en este caso conteniendo la secuencia IGS-3.

La Figura 17 muestra la secuencia de nucleótidos de las tres regiones IGS sometidas a ensayo (SEQ ID NOS: 53-55).

La Figura 18 muestra los resultados de la comparación de la fermentación de Fab' del funcionamiento de IGS.

La Figura 19 muestra la secuencia codificante y limítrofe del fragmento Fab' de CDP791 (SEQ ID NO: 56).

La Figura 20 muestra los resultados del radioinmunoanálisis, en el cual se someten a ensayo los fragmentos de anticuerpo en busca del bloqueo de la unión de VEGF a KDR.

La Figura 21 muestra la secuencia de aminoácidos de la cadena pesada completa del anticuerpo monoclonal derivado de VR165 injertado con gH3 (SEQ ID NO: 57).

Ejemplos

Producción y Selección de Anticuerpos Monoclonales

Se inició un programa de inmunización de la propia compañía para seleccionar un anticuerpo para KDR humano que bloquee potencialmente la interacción con su ligando VEGF. Se inmunizaron ratones con una variedad de inmunógenos incluyendo células CHO transfectadas con KDR completamente humano, proteínas de fusión de KDR humano-Fc humano purificadas y ADN que codificaba estas proteínas de fusión. De un total de 19 fusiones de animales inmunizados con inmunógenos celulares/proteínas, y 4 fusiones de animales inmunizados con ADN, se escrutaron aproximadamente 23.000 pocillos en un formato de ELISA primario en busca de la unión a KDR-Fc de 7 dominios humano. Después se sometieron aproximadamente 800 anticuerpos a un escrutinio secundario, un radioinmunoanálisis que medía el bloqueo de la unión de VEGF-I^{125} a KDR-Fc de 7 dominios humano. Un escrutinio terciario midió el bloqueo de la liberación de Factor Tisular estimulada por VEGF de células endoteliales de vena umbilical humana (HUVEC). A partir de esta cascada de escrutinios, se seleccionó un anticuerpo VR165 (datos no mostrados).

Clonación Génica de VR165

Se preparó ARN a partir de células de hibridoma que expresaban VR165 y se transcribió inversamente a ADN. Después se utilizó esto como molde para una serie de reacciones de PCR para amplificar las secuencias de la región V. Se utilizaron reservas de cebadores degenerados diseñados para el recocido en las secuencias señal de la cadena pesada y ligera conservadas como cebadores directos, mientras los cebadores que codificaban el empalme del marco 4/región C sirvieron como cebadores inversos. De este modo, los genes de la región V de las cadenas tanto pesada como ligera fueron amplificados y después clonados y secuenciados. Las secuencias de ADN fueron traducidas para dar la secuencia de aminoácidos de la región V de VR165 que fue verificada mediante la referencia a la secuencia de proteínas determinada por la secuenciación N terminal. Después los genes de la región V murina se sub-clonaron en los vectores de expresión pMR10.1 y pGamma-4. Estos son vectores separados para la expresión de la cadena ligera y de la cadena pesada respectivamente que contienen ADN genómico que codifica las regiones constantes de la cadena ligera kappa humana y de la cadena pesada gamma-4 humana. La co-transfección en células CHO genera el anticuerpo VR165 quimérico.

Diseño de secuencias injertadas con CDR

Se injertó con CDR VR165 sobre marcos humanos con el fin de reducir la inmunogenicidad potencial y facilitar la expresión en *E. coli*. Se seleccionaron marcos aceptores de la línea germinal humana del sub-grupo VHIII y VLI. El marco aceptor de la cadena pesada es la secuencia VH3-7 de la línea germinal humana, procediendo el marco 4 de esta porción de JH4 de la línea germinal de la región JH humana. El marco aceptor de la cadena ligera es la secuencia A30 de la línea germinal humana, procediendo el marco 4 de esta porción de JK1 de la línea germinal de la región JK humana. El alineamiento demuestra que hay 15 diferencias en el marco entre las cadenas pesadas del donante y el aceptor. En cada una de estas posiciones se realizó un análisis del potencial de ese residuo para contribuir a la unión al antígeno; si se consideraba importante, el residuo del donante murino era conservado. El alineamiento de la cadena ligera demuestra que hay 24 diferencias en el marco entre las secuencias del donante y el aceptor. El potencial del residuo murino para contribuir a la unión al antígeno se analizó de nuevo. De este modo, se diseñaron tres injertos de VH y tres injertos de VL (Figura 9, SEQ ID NOS: 17-22). En cada caso el injerto 1 representa un injerto sin residuos del marco murino. Los injertos 2 y 3 contienen residuos del marco murino en las posiciones mostradas. El injerto gH3 también contiene residuos humanos adicionales en el extremo C terminal de CDR-H2. Esta porción de la CDR no está en la superficie de unión al antígeno. Se diseñaron los genes para codificar las secuencias injertadas, utilizando los codones utilizados frecuentemente en los genes de *E. coli* y evitando codones de *E. coli* "raros" (Wada *et al*., Nucl. Acids Res., 19, 1981-86, 1991). Se introdujeron sitios de restricción en la secuencia de ADN a intervalos para facilitar la manipulación genética adicional. La Figura 10 muestra el diseño de genes para gH1 y gL1 (SEQ ID NO: 23 y SEQ ID NO: 24). Los oligonucleótidos utilizados para construir los genes se muestran en la Figura 11 (SEQ ID NOS: 25-40).

Construcción de genes para secuencias injertadas

Se empleó una técnica de ensamblaje por la PCR para construir los genes de la región V gH1 y gL1 injertada con CDR. Se prepararon volúmenes de reacción de 100 μl que contenían Tris-HCl 10 mM pH 8,3, MgCl2 1,5 mM, KCl 50 mM, gelatina al 0,001%, cada desoxiribonucleósido-trifosfato a concentración 0,25 mM, 1 pmol de cada uno de los cebadores "internos" (F1, F3, F4, R2, R3, R4), 10 pmol de cada uno de los cebadores "externos" (F1, R1), y 1 unidad de polimerasa Taq (AmpliTaq, Applied BioSystems, núm. de catálogo N808-0171). Los parámetros del ciclo de la PCR fueron 94ºC durante 1 minuto, 55ºC durante 1 minuto y 72ºC durante 1 minuto, durante 30 ciclos. Los productos de reacción se aplicaron entonces a un gel de agarosa al 1,5%, se separaron y se recuperaron utilizando columnas giratorias QIAGEN (kit de extracción en gel QIAquick, núm. de cat. 28706). El ADN se eluyó en un volumen de 30 μl. Se clonaron entonces alícuotas (1 μl) del ADN de gH1 y gL1 en el vector de clonación pCR2.1 TOPO de InVitrogen TOPO TA (núm. de catálogo K4500-01) según las instrucciones del fabricante. Este vector de no expresión sirvió como un intermedio de clonación para facilitar la secuenciación de un gran número de clones. La secuenciación de ADN

utilizando cebadores específicos del vector se utilizó para identificar los clones correctos que contienen gH1 y gL1, creando los plásmidos pCR2.1 (gH1) y pCR2.1 (gL1) (véase la Figura 12).

Se utilizó un método de sustitución de casete de oligonucleótido para crear los injertos humanizados gH2 y gL2. La Figura 13 muestra el diseño de las casetes de oligonucleótidos (SEQ ID NO: 41 y SEQ ID NO: 43). Para construir cada variante, se cortó el vector (pCR2.1(gH1) o pCR2.1(gL1)) con las enzimas de restricción mostradas (Figura 13, sitios de restricción subrayados), el fragmento del vector grande se purificó en gel de agarosa y se utilizó en la ligación con la casete de oligonucleótidos. La Figura 14 muestra las secuencias de los oligonucleótidos utilizados en las casetes (SEQ ID NOS: 45-46 y SEQ ID NOS: 49-50). Se hibridaron los pares entre sí mezclando a una concentración de 0,5 pmoles/μl en un volumen de 200 μl que contenía TrisHCl 12,5 mM pH 7,5, $MgCl_2$ 2,5 mM, NaCl 25 mM, ditiotreitol 0,25 mM, y calentando a 95ºC durante 3 minutos en un baño de agua (volumen 500 ml) después se dejó que la temperatura se enfriara lentamente hasta la temperatura ambiente. La casete de oligonucleótido hibridada se diluyó entonces diez veces en agua antes de la ligación con el vector cortado apropiadamente. La secuenciación del ADN se utilizó para confirmar la secuencia correcta, creando los plásmidos pCR2.1 (gH2) y pCR2.1 (gL2).

Se construyeron las variantes gH3 y gL3 de una manera similar a partir de gH2 y gL2. Las casetes y los oligonucleótidos se muestran en las Figuras 13 y 14 (SEQ ID NO: 42 y SEQ ID NO: 44, SEQ ID NOS: 47-48 y SEQ ID NOS: 51-52). La construcción de gL3 requirió una estrategia modificada debido a la existencia de sitios PvuI en el esqueleto del vector pCR2.1. La escisión de pCR2.1 (gL2) con AatII y SfuI creó una molécula de vector en la cual se ligó la casete hibridada PvuI-AatII más un fragmento SfuI-PvuI de 225 pares de bases también preparado a partir de pCR2.1 (gL2). La secuenciación del ADN se utilizó para confirmar la secuencia correcta, creando los plásmidos pCR2.1 (gH3) y pCR2.1 (gL3).

Cada uno de los 3 injertos de la cadena pesada se sub-clonó después en el vector de expresión pGamma-4 como fragmentos HindIII-ApaI. Cada uno de los 3 injertos de la cadena ligera se sub-clonó en el vector de expresión de la cadena ligera pMR10.1 como fragmentos SfuI-BsiWI. La Figura 15 muestra los mapas de estos vectores de expresión. Los anticuerpos fueron expresados transitoriamente mediante co-transfección en células CHO. Todas las combinaciones de la cadena injertada y la cadena quimérica se expresaron y se compararon con el anticuerpo quimérico doble.

Se analizó la unión en un ELISA de unión a KDR, en un radioinmunoanálisis de inhibición de la unión de VEGF marcado a KDR y en un análisis BIAcore de unión a KDR. Todas las formas injertadas funcionaron bien en el ELISA y el radioinmunoanálisis, mostrando una actividad similar a la quimérica. Del análisis BIAcore, se seleccionó el injerto gL3gH3 como el óptimo (datos no mostrados), y a partir de entonces se refirió como g165.

Construcción del plásmido pTTOD

El plásmido pTTO-1 se construyó como sigue.

(a) *Reemplazo del poliligador ppTTQ9*

Se obtuvo el plásmido pTTQ9 de Amersham. Se digirió una alícuota (2 μg) con las enzimas de restricción SalI y EcoRI, el producto digerido se hizo correr sobre un gel de agarosa al 1% y el fragmento de ADN grande (4520 pb) se purificó. Se sintetizaron dos oligonucleótidos que, cuando se hibridaban entre sí, codificaban la región poliligadora OmpA. Esta secuencia tiene extremos cohesivos que son compatibles con los extremos SalI y EcoRI generados mediante la restricción de pTTQ9. Clonando esta "casete" de oligonucleótidos en el vector pTTQ9, no se regenera el sitio SalI, pero se mantiene el sitio EcoRI. La casete codifica los primeros 13 aminoácidos de la secuencia señal de la proteína de la membrana externa de *E. coli* Omp-A, precedida por el sitio de unión al ribosoma de Shine Dalgarno del gen OmpA. Además se encuentran presentes los sitios de restricción para las enzimas XbaI, MunI, StyI y SplI. Los sitios MunI y StyI están en la región codificante de la secuencia señal OmpA y están previstos como los sitios de clonación 5' para la inserción de los genes. Los dos oligonucleótidos que componen esta casete fueron recocidos juntos mezclando a una concentración de 5 pmoles/μl y calentando en un baño de agua a 95ºC durante 3 minutos, enfriando después lentamente a la temperatura ambiente. La secuencia recocida se ligó después en pTTQ9 cortado con SalI/EcoRI. El intermedio plasmídico resultante, denominado pTQOmp, fue verificado mediante secuenciación de ADN.

(b) *Preparación de Fragmentos y Ligación*

Se construyó el plásmido pTTO-1 ligando un fragmento de ADN del plásmido pACYC184 a dos fragmentos generados a partir de pTQOmp. Se obtuvo el plásmido pACYC184 de New England Biolabs. Se digirió una alícuota (2 μg) por completo con la enzima de restricción StyI, después se trató con Nucleasa de Judía Mung; Este tratamiento crea extremos romos recortando los salientes de bases 5'. Tras la extracción con fenol y la precipitación con etanol, se restringió el ADN con la enzima PvuII, generando fragmentos de 2348, 1081, 412 y 403 pb. El fragmento de 2348 pb se purificó tras la electroforesis en gel de agarosa. Este fragmento codifica el marcador de resistencia a tetraciclina y el origen de replicación p15A. Después se trató el fragmento con fosfatasa alcalina intestinal de ternera para separar los fosfatos terminales 5', evitando de ese modo la auto-ligación de esta molécula.

Se digirió una alícuota (2 μg) del plásmido pTQOmp con las enzimas SspI y EcoRI, y el fragmento de 2350 pb se purificó de los fragmentos no deseados de 2040 pb y 170 pb después de la electroforesis en gel de agarosa; este fragmento codifica la región terminadora de la transcripción y el gen lacI9. Se digitó otra alícuota (2 μg) de pTQOmp con EcoRI y XmnI, generando fragmentos de 2289, 1670, 350 y 250 pb. El fragmento de 350 pb, que codificaba el promotor tac, la secuencia señal OmpA y el sitio de multiclonación, se purificó en gel.

Después se ligaron los tres fragmentos, utilizando aproximadamente cantidades equimolares de cada fragmento, para generar el plásmido pTTO-1. Todos los empalmes de clonación se verificaron mediante secuenciación de ADN.

(c) *Producción del Plásmido pTTOD*

El plásmido pTTOD fue obtenido a partir de pTTO-1 por eliminación de los sitios de restricción del esqueleto para PvuII (3 sitios), EcoRV (2 sitios) y ApaI (1 sitio). Estos cambios se realizaron para simplificar las estrategias de codificación de Fab'. Al realizar estos cambios no se alteraron la secuencia de proteínas codificante del gen lacIq ni el gen de resistencia a tetraciclina, aunque se realizaron cambios "silenciosos" a nivel de ADN. Se utilizó una estrategia de PCR, en la cual se diseñaron cebadores que portaban cambios "silenciosos" que eliminaban estos sitios de restricción y se utilizaron para amplificar las secciones del plásmido parental (pTTO-1). Después se utilizaron sitios de restricción colindantes (no alterados) para remplazar las secuencias del plásmido parental por estas secuencias modificadas. Por medio de este procedimiento de múltiples fases se creó el plásmido pTTOD. Se logró la transferencia de los genes Fab' existentes en el vector pTTO a pTTOD utilizando los sitios de restricción PstI y EcoRI únicos que flanquean los genes, creando pTTOD(Fab').

Inserción de los genes de la región V de g165 en el plásmido de expresión de Fab' en E. coli pTTOD

El punto de partida para la inserción de las secuencias g165 fueron 3 vectores para la expresión de un Fab' irrelevante, pTTOD(Fab' IGS-1), pTTOD(Fab' IGS-2) y pTTOD(Fab' IGS-3) (por ejemplo, véase la Figura 16). Estos difieren solamente en la denominada IGS o secuencia intergénica que separa el gen de la cadena ligera del gen de la cadena pesada. Estas regiones IGS se muestran en la Figura 17 (SEQ ID NOS: 53-55). La clonación de las secuencias g165 en estos vectores se realizó como un procedimiento de 2 fases. Primero se restringió la cadena ligera de pCR2.l (gL3) como un fragmento EcoRV-BsiWI (395 pb) y se insertó en un fragmento del vector grande de la digestión con EcoRV-BsiWI de pTTOD(Fab' IGS-1), pTTOD(Fab' IGS-2) y pTTOD(Fab' IGS-3). Esto creó los intermedios de clonación pTTOD(g165L IGS-1), pTTOD(g165L IGS-2) y pTTOD(g165L IGS-3). Estos intermedios de clonación se cortaron después con PvuII y ApaI, el fragmento del vector grande se purificó y se insertó el fragmento PvuII-ApaI de 435 pb de pCR2.1 (gH3). Esto creó los 3 plásmidos de expresión Fab' pTTOD(g165 IGS-1), pTTOD(g165 IGS-2) y pTTOD(g165 IGS-3).

Estos plásmidos se transformaron en la cepa anfitriona W3110 y se comparó la expresión de Fab' por estos 3 plásmidos en matraces con sacudimiento y en el fermentador. La Figura 18 muestra los resultados de una comparación del fermentador, demostrando claramente el funcionamiento superior de la variante IGS-2.

El plásmido pTTOD(g165 IGS-2) se redenominó pTTOD(CDP791). El mapa del plásmido de este constructo se muestra en la Figura 8. La Figura 19 muestra la secuencia de ADN y de proteína total de la región codificante del Fab' en este vector, más algunas de las secuencias colindantes 5' y 3' (SEQ ID NO: 56).

PEGilación de Fab Modificado basado en VR165, injertado con CDR

El Fab modificado purificado es conjugado de una manera específica del sitio con una molécula ramificada de mPEG. Esto se logra mediante activación de un único residuo de cisteína en una región bisagra truncada del Fab modificado, seguido de reacción con (mPEG)-lisilmaleimida como se ha descrito previamente (A.P. Chapman *et al*., Nature Biotechnology 17, 780-783, 1999). La molécula PEGilada se muestra en la Figura 6. Alternativamente, la reacción del Fab activado con (mPEG)-lisil-bis-maleimida como se describe en el documento EP-A-1090037 produce un di-(Fab modificado) PEGilado, referido en adelante como DFM.

Actividades BIAcore de fragmentos desnudos y PEGilados

Se capturó KDR humano con 7 dominios Ig fusionado con Fc humano sobre un chip recubierto con anti-Fc, y los diferentes fragmentos del anticuerpo g165 injertado con CDR y el anticuerpo parental murino VR165 se hicieron pasar permitiendo la determinación de la afinidad. La siguiente tabla resume los resultados obtenidos. En este formato de análisis, existe la ventaja de la divalencia como se demuestra mediante las velocidades de disociación inferiores (K_d) de las especies divalentes. La afinidad del DFM injertado es muy similar a la de la IgG murina, mostrando DFM-PEG una menor reducción de la afinidad. La KD de la molécula g165 DFM-PEG es de aproximadamente 4 x 10^{-11}M en este análisis.

TABLA 1

Actividades BIAcore de fragmentos desnudos y PEGilados

a-KDR	K_a e^5	K_d e^{-4}	K_d e^{-10}
DFM	**21,6**	**0,64**	**0,29**
DFM-PEG40	**15,5**	**0,64**	**0,41**
mIgG	**19,8**	**0,60**	**0,30**
FAB	**13,6**	**12,4**	**9,1**
FAB-PEG40	**11,0**	**11,8**	**10,7**

Radioinmunoanálisis

La capacidad de los fragmentos para bloquear la unión de VEGF a KDR se midió en un radioinmunoanálisis, se utilizó anti Fc policlonal para capturar KDR con 7 dominios Ig fusionado con Fc humano en una placa de microtitulación, se añadió el anticuerpo o el fragmento seguido de VEGF-165 marcado con I^{125}. Los resultados de este análisis se muestran en la Figura 20. De nuevo en este entorno de análisis existe la ventaja de la divalencia, demostrada por el funcionamiento de bloqueo superior del DFM sobre el Fab'. El constructo DFM-PEG muestra una reducción de la actividad menor en comparación con el DFM desnudo, como se observa en el estudio BIAcore.

Análisis basados en células

La molécula de g164 DFM PEG también demostró actividad en los análisis basados en células. Su capacidad para bloquear la estimulación por VEGF de KDR se demostró por medio de la inhibición de la liberación de factor tisular por células endoteliales de vena umbilical humana (véase Clauss *et al*., J. Biol. Chem., 271, 17629-17634, 1996). La actividad también se demostró por medio de la inhibición de la movilización de Ca^{2+} mediada por VEGF en células endoteliales microvasculares humanas (véase Cunningham *et al*., Am. J. Physiol., 276, C176-181, 1999).

Se debe entender que los ejemplos descritos antes son meramente ilustrativos y no limitan el alcance de la presente invención como se define en las siguientes reivindicaciones.

REIVINDICACIONES

1. Una molécula de anticuerpo que tiene especificidad para KDR humano, que comprende una región variable de la cadena pesada del SEQ ID NO: 15 y una región variable de la cadena ligera del SEQ ID NO: 16.

2. La molécula de anticuerpo de la reivindicación 1, que tiene una cadena ligera que comprende la secuencia dada en los aminoácidos 22 a 235 del SEQ ID NO: 11.

3. La molécula de anticuerpo de la reivindicación 1, que tiene una cadena pesada que comprende la secuencia dada en el SEQ ID NO: 57.

4. La molécula de anticuerpo de la reivindicación 1, que tiene una cadena ligera que comprende la secuencia dada en los aminoácidos 22 a 235 del SEQ ID NO: 11 y una cadena pesada que comprende la secuencia dada en el SEQ ID NO: 57.

5. La molécula de anticuerpo de la reivindicación 1, que es un fragmento Fab modificado que tiene en el extremo C terminal de su cadena pesada uno o más aminoácidos que forman una región bisagra modificada que contiene uno o dos residuos de cisteína a los cuales puede ser anclada una molécula efectora o indicadora.

6. La molécula de anticuerpo de la reivindicación 5, que es un fragmento Fab modificado que comprende una cadena ligera que tiene la secuencia dada en los aminoácidos 22 a 235 del SEQ ID NO: 11 y una cadena pesada que tiene la secuencia dada en los aminoácidos 22 a 249 del SEQ ID NO: 12.

7. Un compuesto que comprende la molécula de anticuerpo de la reivindicación 5 que tiene anclado covalentemente a un residuo de cisteína de la región bisagra modificada una molécula efectora o indicadora.

8. El compuesto de la reivindicación 7, donde la molécula efectora comprende uno o más polímeros.

9. El compuesto de la reivindicación 8, donde el uno o más polímeros es/son un polímero de polialquileno, polialquenileno o polioxialquileno opcionalmente sustituido o un polisacárido ramificado o no ramificado.

10. El compuesto de la reivindicación 9, donde el uno o más polímeros es/son un metoxipoli(etilenglicol).

11. El compuesto de la reivindicación 7 que comprende la molécula de anticuerpo de la reivindicación 5 que tiene anclado a uno de los residuos de cisteína en el extremo C-terminal de la cadena pesada un grupo lisil-maleimida o lisil bis-maleimida donde cada grupo amino del residuo lisilo tiene unido covalentemente a él un residuo de metoxipoli (etilenglicol) que tiene un peso molecular de aproximadamente 20.000 Da.

12. Un compuesto que comprende la molécula de anticuerpo de la reivindicación 5, que es un di(Fab modificado) PEGilado en el que cada Fab modificado comprende una cadena ligera que tiene la secuencia dada en los aminoácidos 22 a 235 del SEQ ID NO: 11 y una cadena pesada que tiene la secuencia dada en los aminoácidos 22 a 249 del SEQ ID NO: 12.

13. El di-(Fab modificado) PEGilado de la reivindicación 12, que comprende al menos una molécula de mPEG.

14. El di(Fab modificado) PEGilado de la reivindicación 13, donde cada mPEG está unido a un residuo de lisina anclado covalentemente a un conector de bis-maleimida.

15. El di(Fab modificado) PEGilado de la reivindicación 13 o la reivindicación 14, donde cada molécula de mPEG tiene un peso molecular de aproximadamente 20.000 Da.

16. Secuencias de ADN que codifican la cadena pesada y ligera de la molécula de anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6.

17. Un vector de clonación o expresión que contiene las secuencias de ADN de la reivindicación 16.

18. Un vector de expresión de *E. coli* que comprende las secuencias de ADN de la reivindicación 16.

19. El vector de expresión de *E. coli* de la reivindicación 18 que es pTTOD(CDP791).

20. Una célula anfitriona transformada con el vector de una cualquiera de las reivindicaciones 17 a 19.

21. Un procedimiento para la producción de la molécula de anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, que comprende cultivar la célula anfitriona de la reivindicación 20 y aislar la molécula de anticuerpo.

22. Un procedimiento para la producción de la molécula de anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, que comprende cultivar *E. coli* que comprende un vector de expresión de acuerdo con la reivindicación 18 o la reivindicación 19 y aislar la molécula de anticuerpo.

23. El procedimiento de la reivindicación 22, donde la molécula de anticuerpo es dirigida al periplasma.

24. Una composición terapéutica o para diagnóstico, que comprende la molécula de anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, o el compuesto de una cualquiera de las reivindicaciones 7 a 15.

25. La molécula de anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, que tiene especificidad para KDR humano, o el compuesto de una cualquiera de las reivindicaciones 7 a 15, para su uso en el tratamiento de una patología en la cual están implicados VEGF y/o KDR.

26. La molécula de anticuerpo o el compuesto de la reivindicación 25, para su uso en el tratamiento de la inflamación, la psoriasis, la artritis reumatoide y crecimiento o la metástasis de tumores.

27. El uso de la molécula de anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, que tiene especificidad para KDR humano, o el compuesto de una cualquiera de las reivindicaciones 7 a 15, en la fabricación de un medicamento para el tratamiento de una patología en la cual están implicados VEGF y/o KDR.

28. El uso de la reivindicación 27, donde la patología es la inflamación, la psoriasis, la artritis reumatoide y el crecimiento o la metástasis tumoral.

Figura 1: Secuencia de CDR de VR165

Cadena Pesada

H1 SYGMS	(SEQ. ID. NO. 1)
H2 TITSGGSYTYYPDTVKG	(SEQ. ID. NO. 2)
H3 IGEDALDY	(SEQ. ID. NO. 3)

Cadena Ligera

L1 RASQDIAGSLN	(SEQ. ID. NO. 4)
L2 ATSSLDS	(SEQ. ID. NO. 5)
L3 LQYGSFPPT	(SEQ. ID. NO. 6)

Figura 2: Secuencia de Proteínas de dominios variables de anticuerpo monoclonal de ratón VR165

Cadena Pesada (SEQ. ID. NO. 7)

VR165 EVQLVESGGDLVKPGGSLKLSCAASGFTFSSYGMSWVRQTPDKRLQWVATITSGGSYTYYPDTVKG

VR165 RFTISRDNAENTLYLQMSSLKSEDTAMYYCVRIGEDALDYWGQGTSVTVSS

Cadena Ligera (SEQ. ID. NO. 8)

VR165 DIQMTQSPSSLSASLGERVSLTCRASQDIAGSLNWLRQEPDGTIKRLIYATSSLDS

VR165 GVPKRFSGSRSGSDYSLTISSLESEDFVDYYCLQYGSFPPTFGGGSKLEIKR

Figura 3: Comparación de la región VR165 con las regiones V marco Seleccionadas

Seq. Id. No. 9: **región V de VH3-7 GL**

```
VH3-7 GL   EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYWMSWVRQAPGKGLEWVANIKQDGSEKYYVDSVKG
                    |  |     |                       | | | |
VR165      EVQLVESGGDLVKPGGSLKLSCAASGFTFSSYGMSWVRQTPDKRLQWVATITSGGSYTYYPDTVKG


VH3-7 GL   RFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCAR        WGQGTLVTVSS
                   | |     |  ||    |   |            |
VR165      RFTISRDNAENTLYLQMSSLKSEDTAMYYCVRIGEDALDYWGQGTSVTVSS
```

Seq. Id. No.10: **región V de A30 GL**

```
A30 GL     DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGIRNDLGWYQQKPGKAPKRLIYAASSLQS
                       | |  ||               || | ||||
VR165      DIQMTQSPSSLSASLGERVSLTCRASQDIAGSLNWLRQEPDGTIKRLIYATSSLDS


A30 GL     GVPSRFSGSGSGTEFTLTISSLQPEDFATYYCLQHNSYP  FGQGTKVEIKR
             |     |  ||||      ||   ||            | | |
VR165      GVPKRFSGSRSGSDYSLTISSLESEDFVDYYCLQYGSFPPTFGGGSKLEIKR
```

Figura 4: Cadena Ligera, incluyendo secuencias señal

```
(Seq. Id. No. 13)  ATG AAA AAG ACA GCT ATC GCA ATT GCA
                   TAC TTT TTC TGT CGA TAG CGT TAA CGT

(Seq. Id. No. 11)   M   K   K   T   A   I   A   I   A>

(Seq. Id. No. 13)  GTG GCC TTG GCT GGT TTC GCT ACC GTA GCG CAA GCT GAT ATC CAG ATG ACC CAG AGT
                   CAC CGG AAC CGA CCA AAG CGA TGG CAT CGC GTT CGA CTA TAG GTC TAC TGG GTC TCA

(Seq. Id. No. 11)   V   A   L   A   G   F   A   T   V   A   Q   A   D   I   Q   M   T   Q   S>

(Seq. Id. No. 13)  CCA AGC AGT CTC TCC GCC AGC GTA GGC GAT CGT GTG ACT ATT ACC TGT CGT GCC AGT
                   GGT TCG TCA GAG AGG CGG TCG CAT CCG CTA GCA CAC TGA TAA TGG ACA GCA CGG TCA

(Seq. Id. No. 11)   P   S   S   L   S   A   S   V   G   D   R   V   T   I   T   C   R   A   S>

(Seq. Id. No. 13)  CAG GAC ATC GCG GGT AGC CTG AAC TGG TTG CAG CAA AAA CCG GGC AAA GCC ATC AAG
                   GTC CTG TAG CGC CCA TCG GAC TTG ACC AAC GTC GTT TTT GGC CCG TTT CGG TAG TTC

(Seq. Id. No. 11)   Q   D   I   A   G   S   L   N   W   L   Q   Q   K   P   G   K   A   I   K>

(Seq. Id. No. 13)  CGC CTC ATC TAT GCG ACG TCC AGC CTG GAT AGC GGT GTG CCA AAA CGT TTC AGT GGC
                   GCG GAG TAG ATA CGC TGC AGG TCG GAC CTA TCG CCA CAC GGT TTT GCA AAG TCA CCG
(Seq. Id. No. 11)   R   L   I   Y   A   T   S   S   L   D   S   G   V   P   K   R   F   S   G>

(Seq. Id. No. 13)  AGT CGC AGC GGT TCT GAC TAT ACC CTC ACA ATT TCG TCT CTC CAG CCG GAA GAT TTC
                   TCA GCG TCG CCA AGA CTG ATA TGG GAG TGT TAA AGC AGA GAG GTC GGC CTT CTA AAG

(Seq. Id. No. 11)   S   R   S   G   S   D   Y   T   L   T   I   S   S   L   Q   P   E   D   F>

(Seq. Id. No. 13)  GCC ACT TAC TAT TGT CTG CAA TAT GGC AGC TTC CCT CCG ACC TTC GGT CAG GGC ACT
                   CGG TGA ATG ATA ACA GAC GTT ATA CCG TCG AAG GGA GGC TGG AAG CCA CTC CCG TGA

(Seq. Id. No. 11)   A   T   Y   Y   C   L   Q   Y   G   S   F   P   P   T   F   G   Q   G   T>

(Seq. Id. No. 13)  AAA GTA GAA ATC AAA CGT ACG GTA GCG GCC CCA TCT GTC TTC ATC TTC CCG CCA TCT
                   TTT CAT CTT TAG TTT GCA TGC CAT CGC CGG GGT AGA CAG AAG TAG AAG GGC GGT AGA

(Seq. Id. No. 11)   K   V   E   I   K   R   T   V   A   A   P   S   V   F   I   F   P   P   S>

(Seq. Id. No. 13)  GAT GAG CAG TTG AAA TCT GGA ACT GCC TCT GTT GTG TGC CTG CTG AAT AAC TTC TAT
                   CTA CTC GTC AAC TTT AGA CCT TGA CGG AGA CAA CAC ACG GAC GAC TTA TTG AAG ATA

(Seq. Id. No. 11)   D   E   Q   L   K   S   G   T   A   S   V   V   C   L   L   N   N   F   Y>

(Seq. Id. No. 13)  CCC AGA GAG GCC AAA GTA CAG TGG AAG GTG GAT AAC GCC CTC CAA TCG GGT AAC TCC
                   GGG TCT CTC CGG TTT CAT GTC ACC TTC CAC CTA TTG CGG GAG GTT AGC CCA TTG AGG

(Seq. Id. No. 11)   P   R   E   A   K   V   Q   W   K   V   D   N   A   L   Q   S   G   N   S>


(Seq. Id. No. 13)  CAG GAG AGT GTC ACA GAG CAG GAC AGC AAG GAC AGC ACC TAC AGC CTC AGC AGC ACC
                   GTC CTC TCA CAG TGT CTC GTC CTG TCG TTC CTG TCG TGG ATG TCG GAG TCG TCG TGG

(Seq. Id. No. 11)   Q   E   S   V   T   E   Q   D   S   K   D   S   T   Y   S   L   S   S   T>

(Seq. Id. No. 13)  CTG ACG CTG AGC AAA GCA GAC TAC GAG AAA CAC AAA GTC TAC GCC TGC GAA GTC ACC
                   GAC TGC GAC TCG TTT CGT CTG ATG CTC TTT GTG TTT CAG ATG CGG ACG CTT CAG TGG

(Seq. Id. No. 11)   L   T   L   S   K   A   D   Y   E   K   H   K   V   Y   A   C   E   V   T>

(Seq. Id. No. 13)  CAT CAG GGC CTG AGC TCA CCA GTA ACA AAA AGT TTT AAT AGA GGG GAG TGT TAA
                   GTA GTC CCG GAC TCG AGT GGT CAT TGT TTT TCA AAA TTA TCT CCC CTC ACA ATT

(Seq. Id. No. 11)   H   Q   G   L   S   S   P   V   T   K   S   F   N   R   G   E   C   *>
```

Figura 5: Cadena Pesada, incluyendo secuencias señal

```
(Seq. Id. No. 13)  ATG AAA AAG ACA GCT ATC GCA ATT GCA
                   TAC TTT TTC TGT CGA TAG CGT TAA CGT

(Seq. Id. No. 11)   M   K   K   T   A   I   A   I   A>


(Seq. Id. No. 13)  GTG GCC TTG GCT GGT TTC GCT ACC GTA GCG CAA GCT GAT ATC CAG ATG ACC CAG AGT
                   CAC CGG AAC CGA CCA AAG CGA TGG CAT CGC GTT CGA CTA TAG GTC TAC TGG GTC TCA

(Seq. Id. No. 11)   V   A   L   A   G   F   A   T   V   A   Q   A   D   I   Q   M   T   Q   S>


(Seq. Id. No. 13)  CCA AGC AGT CTC TCC GCC AGC GTA GGC GAT CGT GTG ACT ATT ACC TGT CGT GCC AGT
                   GGT TCG TCA GAG AGG CGG TCG CAT CCG CTA GCA CAC TGA TAA TGG ACA GCA CGG TCA

(Seq. Id. No. 11)   P   S   S   L   S   A   S   V   G   D   R   V   T   I   T   C   R   A   S>


(Seq. Id. No. 13)  CAG GAC ATC GCG GGT AGC CTG AAC TGG TTG CAG CAA AAA CCG GGC AAA GCC ATC AAG
                   GTC CTG TAG CGC CCA TCG GAC TTG ACC AAC GTC GTT TTT GGC CCG TTT CGG TAG TTC

(Seq. Id. No. 11)   Q   D   I   A   G   S   L   N   W   L   Q   Q   K   P   G   K   A   I   K>


(Seq. Id. No. 13)  CGC CTC ATC TAT GCG ACG TCC AGC CTG GAT AGC GGT GTG CCA AAA CGT TTC AGT GGC
                   GCG GAG TAG ATA CGC TGC AGG TCG GAC CTA TCG CCA CAC GCT TTT GCA AAG TCA CCG
(Seq. Id. No. 11)   R   L   I   Y   A   T   S   S   L   D   S   G   V   P   K   R   F   S   G>


(Seq. Id. No. 13)  AGT CGC AGC GGT TCT GAC TAT ACC CTC ACA ATT TCG TCT CTC CAG CCG GAA GAT TTC
                   TCA GCG TCG CCA AGA CTG ATA TGG GAG TGT TAA AGC AGA GAG GTC GGC CTT CTA AAG

(Seq. Id. No. 11)   S   R   S   G   S   D   Y   T   L   T   I   S   S   L   Q   P   E   D   F>


(Seq. Id. No. 13)  GCC ACT TAC TAT TGT CTG CAA TAT GGC AGC TTC CCT CCG ACC TTC GGT CAG GGC ACT
                   CGG TGA ATG ATA ACA GAC GTT ATA CCG TCG AAG GGA GGC TGG AAG CCA GTC CCG TGA

(Seq. Id. No. 11)   A   T   Y   Y   C   L   Q   Y   G   S   F   P   P   T   F   G   Q   G   T>


(Seq. Id. No. 13)  AAA GTA GAA ATC AAA CGT ACG GTA GCG GCC CCA TCT GTC TTC ATC TTC CCG CCA TCT
                   TTT CAT CTT TAG TTT GCA TGC CAT CGC CGG GGT AGA CAG AAG TAG AAG GGC GGT AGA

(Seq. Id. No. 11)   K   V   E   I   K   R   T   V   A   A   P   S   V   F   I   F   P   P   S>


(Seq. Id. No. 13)  GAT GAG CAG TTG AAA TCT GGA ACT GCC TCT GTT GTG TGC CTG CTG AAT AAC TTC TAT
                   CTA CTC GTC AAC TTT AGA CCT TGA CGG AGA CAA CAC ACG GAC GAC TTA TTG AAG ATA

(Seq. Id. No. 11)   D   E   Q   L   K   S   G   T   A   S   V   V   C   L   L   N   N   F   Y>


(Seq. Id. No. 13)  CCC AGA GAG GCC AAA GTA CAG TGG AAG GTG GAT AAC GCC CTC CAA TCG GGT AAC TCC
                   GGG TCT CTC CGG TTT CAT GTC ACC TTC CAC CTA TTG CGG GAG GTT AGC CCA TTG AGG

(Seq. Id. No. 11)   P   R   E   A   K   V   Q   W   K   V   D   N   A   L   Q   S   G   N   S>


(Seq. Id. No. 13)  CAG GAG AGT GTC ACA GAG CAG GAC AGC AAG GAC AGC ACC TAC AGC CTC AGC AGC ACC
                   GTC CTC TCA CAG TGT CTC GTC CTG TCG TTC CTG TCG TGG ATG TCG GAG TCG TCG TGG

(Seq. Id. No. 11)   Q   E   S   V   T   E   Q   D   S   K   D   S   T   Y   S   L   S   S   T>


(Seq. Id. No. 13)  CTG ACG CTG AGC AAA GCA GAC TAC GAG AAA CAC AAA GTC TAC GCC TGC GAA GTC ACC
                   GAC TGC GAC TCG TTT CGT CTG ATG CTC TTT GTG TTT CAG ATG CGG ACG CTT CAG TGG

(Seq. Id. No. 11)   L   T   L   S   K   A   D   Y   E   K   H   K   V   Y   A   C   E   V   T>


(Seq. Id. No. 13)  CAT CAG GGC CTG AGC TCA CCA GTA ACA AAA AGT TTT AAT AGA GGG GAG TGT TAA
                   GTA GTC CCG GAC TCG AGT GGT CAT TGT TTT TCA AAA TTA TCT CCC CTC ACA ATT

(Seq. Id. No. 11)   H   Q   G   L   S   S   P   V   T   K   S   F   N   R   G   E   C   *>
```

Figura 6:

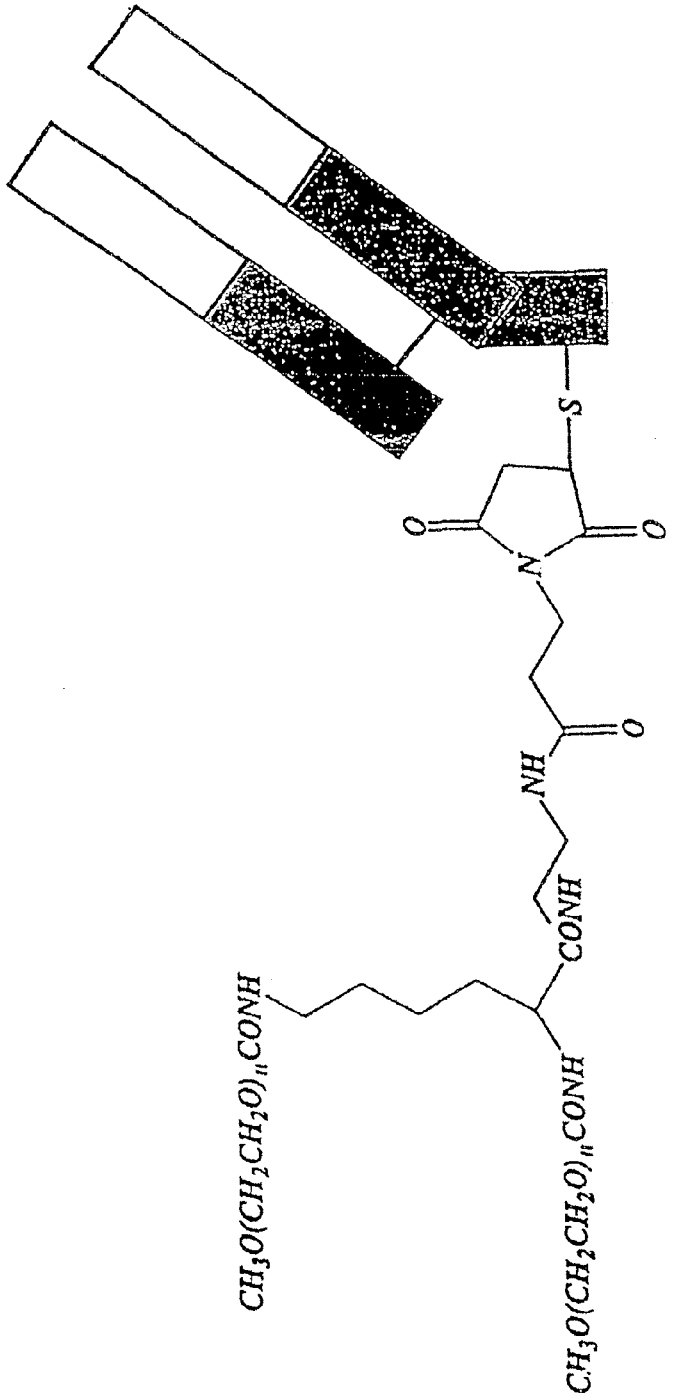


Figura 7:

gH3 **(SEQ ID NO: 15)**

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYGMSWVRQAPGKGLEWVATIT
SGGSYTYYVDSVKGRFTISRDNAKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCVRIGEDAL
DYWGQGTLVTVSS

gL3 **(SEQ ID NO: 16)**

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDIAGSLNWLQQKPGKAIKRLIYATSSL
DSGVPKRFSGSRSGSDYTLTISSLQPEDFATYYCLQYGSFPPTFGQGTKVEIKR

Figura 8: pTTOD(CDP791)

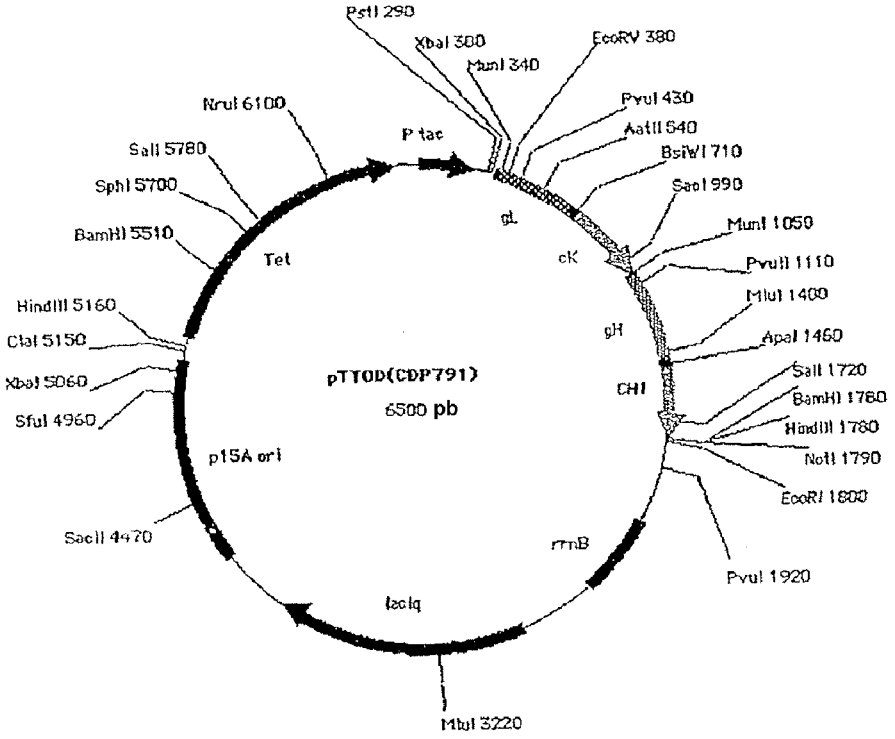


Figura 9: Secuencia de proteína de los injertos VH y VL diseñados

Cadena Pesada

(Seq.Id.No. 17)

gH1 EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYGMSWVRQAPGKGLEWVATITSGGSYTYYPDTVKG
gH1 RFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARIGEDALDYWGQGTLVTVSS

(Seq.Id.No. 18)

gH2 EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYGMSWVRQAPGKGLEWVATITSGGSYTYYPDTVKG
gH2 RFTISRDNAKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCVRIGEDALDYWGQGTLVTVSS

(Seq.Id.No. 19)

gH3 EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYGMSWVRQAPGKGLEWVATITSGGSYTYYVDSVKG
gH3 RFTISRDNAKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCVRIGEDALDYWGQGTLVTVSS

Cadena Ligera

(Seq.Id.No. 20)

gL1 DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDIAGSLNWYQQKPGKAPKRLIYATSSLDS
gL1 GVPSRFSGSGSGTEFTLTISSLQPEDFATYYCLQYGSFPPTFGQGTKVEIKR

(Seq.Id.No. 21)

gL2 DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDIAGSLNWYQQKPGKAPKRLIYATSSLDS
gL2 GVPKRFSGSRSGSDYTLTISSLQPEDFATYYCLQYGSFPPTFGQGTKVEIKR

(Seq.Id.No. 22)

gL3 DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDIAGSLNWLQQKPGKAIKRLIYATSSLDS
gL3 GVPKRFSGSRSGSDYTLTISSLQPEDFATYYCLQYGSFPPTFGQGTKVEIKR

Figura 10: Diseño Génico

secuencia gH1 (SEQ ID NO:23)

```
        HindIII     20             30             40             50             60
GAATAAAAGC TTGCCGCCAC C ATG AAG ATG TGG TTA AAC TGG GTT TTC CTT GCC CTC ATT
CTTATTTTCG AACGGCGGTG G TAC TTC TAC ACC AAT TTG ACC CAA AAG GAA CGG GAG TAA
                        M   K   M   W   L   N   W   V   F   L   A   L   I>

            70             80          PvuII          100            110
TTA AAA GGT GTC CAG TGT GAG GTG CAG CTG GTC GAG TCT GGA GGC GGG CTT GTC CAG
AAT TTT CCA CAG GTC ACA CTC CAC GTC GAC CAG CTC AGA CCT CCG CCC GAA CAG GTC
 L   K   G   V   Q   C   E   V   Q   L   V   E   S   G   G   G   L   V   Q>

120            130            140            150            160            170
CCT GGA GGG AGC CTG CGT CTC TCT TGT GCA GCA AGC GGC TTC ACC TTT TCC TCT TAC
GGA CCT CCC TCG GAC GCA GAG AGA ACA CGT CGT TCG CCG AAG TGG AAA AGG AGA ATG
 P   G   G   S   L   R   L   S   C   A   A   S   G   F   T   F   S   S   Y>

    180            190            200            210            220            230
GGT ATG TCC TGG GTG CGG CAG GCA CCT GGG AAG GGC CTG GAG TGG GTG GCA ACC ATT
CCA TAC AGG ACC CAC GCC GTC CGT GGA CCC TTC CCG GAC CTC ACC CAC CGT TGG TAA
 G   M   S   W   V   R   Q   A   P   G   K   G   L   E   W   V   A   T   I>

       BspEI           250            260            270            280
ACG TCC GGA GGC AGC TAT ACA TAC TAC CCG GAC ACC GTC AAG GGC CGT TTC ACC ATT
TGC AGG CCT CCG TCG ATA TGT ATG ATG GGC CTG TGG CAG TTC CCG GCA AAG TGG TAA
 T   S   G   G   S   Y   T   Y   Y   P   D   T   V   K   G   R   F   T   I>

290  XmaI    300            310            320            330            340
TCC CGG GAC AAT GCA AAG AAT AGC CTT TAC CTC CAG ATG AAC TCT CTC CGC GCA GAG
AGG GCC CTG TTA CGT TTC TTA TCG GAA ATG GAG GTC TAC TTG AGA GAG GCG CGT CTC
 S   R   D   N   A   K   N   S   L   Y   L   Q   M   N   S   L   R   A   E>

    350            360            370            380     MluI 390            400
GAC ACA GCA GTC TAT TAC TGT GCA CGG ATC GGC GAA GAC GCG TTG GAC TAC TGG GGA
CTG TGT CGT CAG ATA ATG ACA CGT GCC TAG CCG CTT CTG CGC AAC CTG ATG ACC CCT
 D   T   A   V   Y   Y   C   A   R   I   G   E   D   A   L   D   Y   W   G>

        410            420            430            440  ApaI    450
CAG GGG ACC CTT GTG ACA GTC TCC TCT GCT TCT ACA AAG GGC CCA AGA AA
GTC CCC TGG GAA CAC TGT CAG AGG AGA CGA AGA TGT TTC CCG GGT TCT TT
 Q   G   T   L   V   T   V   S   S   A   S   T   K   G   P>
```

secuencia gL1 (SEQ ID NO:24)

```
          SfuI       20             30             40             50             60
GGATGATTCG AAGCCGCCAC C ATG AGG ACC CCT GCT CAG ATT CTT GGC TTC TTG TTG CTC
CCTACTAAGC TTCGGCGGTG G TAC TCC TGG GGA CGA GTC TAA GAA CCG AAG AAC AAC GAG
                        M   R   T   P   A   Q   I   L   G   F   L   L   L>

            70             80   EcoRV   90            100            110
TTG TTT CCA GGT ACC AGA TGT GAT ATC CAG ATG ACC CAG AGT CCA AGC AGT CTC TCC
AAC AAA GGT CCA TGG TCT ACA CTA TAG GTC TAC TGG GTC TCA GGT TCG TCA GAG AGG
 L   F   P   G   T   R   C   D   I   Q   M   T   Q   S   P   S   S   L   S>

120            130            140            150            160            170
GCC AGC GTA GGC GAT CGT GTG ACT ATT ACC TGT CGT GCC AGT CAG GAC ATC GCG GGT
CGG TCG CAT CCG CTA GCA CAC TGA TAA TGG ACA GCA CGG TCA GTC CTG TAG CGC CCA
 A   S   V   G   D   R   V   T   I   T   C   R   A   S   Q   D   I   A   G>

    180            190            200            210            220            230
AGC CTG AAC TGG TAT CAG CAA AAA CCG GGC AAA GCC CCC AAG CGC CTC ATC TAT GCG
TCG GAC TTG ACC ATA GTC GTT TTT GGC CCG TTT CGG GGG TTC GCG GAG TAG ATA CGC
 S   L   N   W   Y   Q   Q   K   P   G   K   A   P   K   R   L   I   Y   A>

AatII   240            250            260            270            280
ACG TCC AGC CTG GAT AGC GGT GTG CCA TCT CGT TTC AGT GGC AGT GGC AGC GGT ACT
TGC AGG TCG GAC CTA TCG CCA CAC GGT AGA GCA AAG TCA CCG TCA CCG TCG CCA TGA
 T   S   S   L   D   S   G   V   P   S   R   F   S   G   S   G   S   G   T>

290            300            BsmBI          320            330            340
GAA TTT ACC CTC ACA ATT TCG TCT CTC CAG CCG GAA GAT TTC GCC ACT TAC TAT TGT
CTT AAA TGG GAG TGT TAA AGC AGA GAG GTC GGC CTT CTA AAG CGG TGA ATG ATA ACA
 E   F   T   L   T   I   S   S   L   Q   P   E   D   F   A   T   Y   Y   C>
```

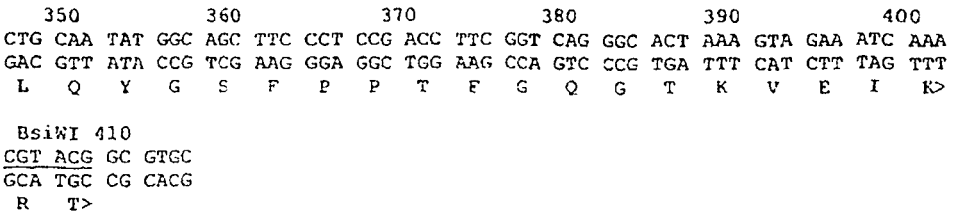

350 360 370 380 390 400
CTG CAA TAT GGC AGC TTC CCT CCG ACC TTC GGT CAG GGC ACT AAA GTA GAA ATC AAA
GAC GTT ATA CCG TCG AAG GGA GGC TGG AAG CCA GTC CCG TGA TTT CAT CTT TAG TTT
L Q Y G S F P P T F G Q G T K V E I K>
BsiWI 410
CGT ACG GC GTGC
GCA TGC CG CACG
R T>

Figura 11: Oligonucleótidos para ensamblaje de genes

gL1 F1 (SEQ ID NO:25)
GGATGATTCGAAGCCGCCAC

gL1 F2 (SEQ ID NO:26)
TCCAGGTACCAGATGTGATATCCAGATGACCCAGAGTCCAAGCAGTCTCTCCGCCAGCGTAGGCGATCGTG
TGACTATTACCTGTC

gL1 F3 (SEQ ID NO:27)
CAAAAACCGGGCAAAGCCCCCAAGCGCCTCATCTATGCGACGTCCAGCCTGGATAGCGGTGTGCCATCTCG
TTTCAGTGGCAGTGGC

gL1 F4 (SEQ ID NO:28)
AGATTTCGCCACTTACTATTGTCTGCAATATGGCAGCTTCCCTCCGACCTTCGGTCAGGGCACTAAAGTAGA
AATCAAACGTACGGCGTGC

gL1 R1 (SEQ ID NO:29)
GCACGCCGTACGTTTGATTTC

gL1 R2 (SEQ ID NO:30)
GACAATAGTAAGTGGCGAAATCTTCCGGCTGGAGAGACGAAATTGTGAGGGTAAATTCAGTACCGCTGCCA
CTGCCACTGAAACGAG

gL1 R3 (SEQ ID NO:31)
GGGGCTTTGCCCGGTTTTTGCTGATACCAGTTCAGGCTACCCGCGATGTCCTGACTGGCACGACAGGTAAT
AGTCACACGATC

gL1 R4 (SEQ ID NO:32)
GATATCACATCTGGTACCTGGAAACAAGAGCAACAAGAAGCCAAGAATCTGAGCAGGGGTCCTCATGGTGG
CGGCTTCGAATCATCC

gH1 F1 (SEQ ID NO:33)
GAATAAAAGCTTGCCGCCACC

gH1 F2 (SEQ ID NO:34)
TCCAGTGTGAGGTGCAGCTGGTCGAGTCTGGAGGCGGGCTTGTCCAGCCTGGAGGGAGCCTGCGTCTCTC
TTGTGCAGCAAGCGGCTTCAC

gH1 F3 (SEQ ID NO:35)
AGTGGGTGGCAACCATTACGTCCGGAGGCAGCTATACATACTACCCGCACACCGTCAAGGGCCGTTTCACC
ATTTCCCGGGACAATGCAA

gH1 F4 (SEQ ID NO:36)
CTATTACTGTGCACGGATCGGCGAAGACGCGTTGGACTACTGGGGACAGGGGACCCTTGTGACAGTCTCCT
CTGCTTCTACAAAGGGCCCAAGAAA

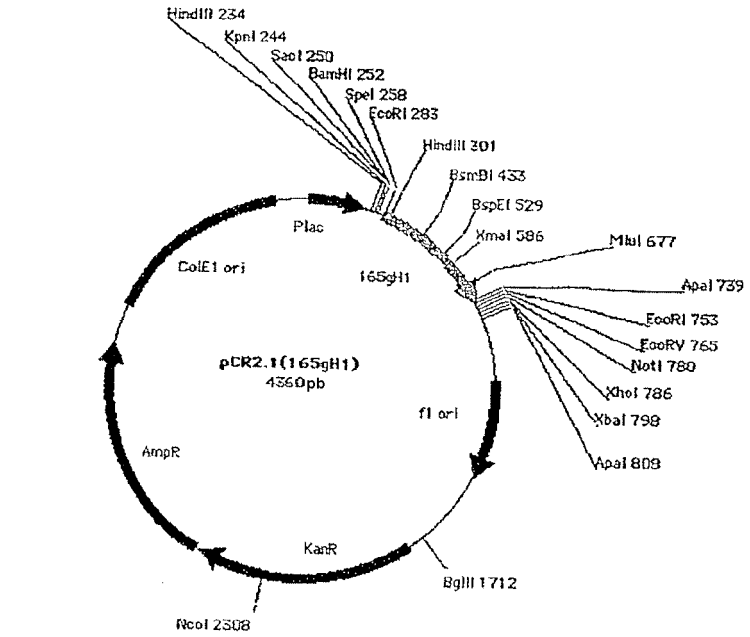
gH1 R1 (SEQ ID NO:37)
TTTCTTGGGCCCTTTGTAGAAG

gH1 R2 (SEQ ID NO:38)
CCGATCCGTGCACAGTAATAGACTGCTGTGTCCTCTGCGCGGAGAGAGTTCATCTGGAGGTAAAGGCTATT
CTTTGCATTGTCCCGGGAAATGG

gH1 R3 (SEQ ID NO:39)
ACGTAATGGTTGCCACCCACTCCAGGCCCTTCCCAGGTGCCTGCCGCACCCAGGACATACCGTAAGAGGAA
AAGGTGAAGCCGCTTGCTGCACA

gH1 R4 (SEQ ID NO:40)
CAGCTGCACCTCACACTGGACACCTTTTAAAATGAGGGCAAGGAAAACCCAGTTTAACCACATCTTCATGGT
GGCGGCAAGCTTTTATTC

Figura 12: Plásmido pCR2.1(gH1) y pCR2.1(gL1)



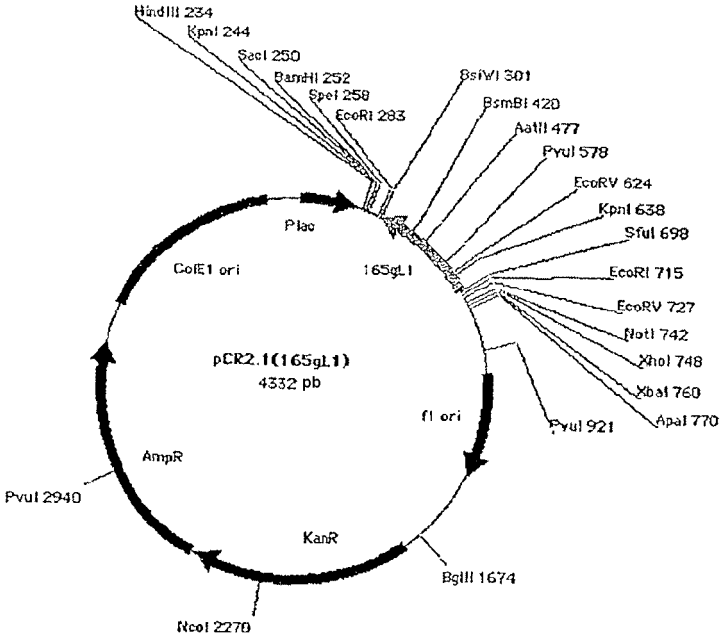


Figura 13: Casetes de oligonucleótidos para construcción de gH2, gH3, gL2, gH3

casete gH2 (SEQ ID NO: 41)

```
 XmaI       10          20          30          40          50
TCC CGG GAC AAT GCA AAG AAT ACC CTT TAC CTC CAG ATG AAC TCT CTC CGC GCA GAG
AGG GCC CTG TTA CGT TTC TTA TGG GAA ATG GAG GTC TAC TTG AGA GAG GCG CGT CTC
 S   R   D   N   A   K   N   T   L   Y   L   Q   M   N   S   L   R   A   E>

 60          70          80          90       MluI
GAC ACA GCA GTC TAT TAC TGT GTA CGG ATC GGC GAA GAC GCG TTG
CTG TGT CGT CAG ATA ATG ACA CAT GCC TAG CCG CTT CTG CGC AAC
 D   T   A   V   Y   Y   C   V   R   I   G   E   D   A   L>
```

casete gH3 (SEQ ID NO:42)

```
 BspEI      10          20          30          40          50
TCC GGA GGC AGC TAT ACA TAC TAC GTG GAC AGC GTC AAG GGC CGT TTC ACC ATT TCC
AGG CCT CCG TCG ATA TGT ATG ATG CAC CTG TCG CAG TTC CCG GCA AAG TGG TAA AGG
 S   G   G   S   Y   T   Y   Y   V   D   S   V   K   G   R   F   T   I   S>

XmaI
CGG GAC
GCC CTG
 R   D>
```

casete gL2 (SEQ ID NO:43)

```
   AatII    10          20          30          40          50
GCG ACG TCC AGC CTG GAT AGC GGT GTG CCA AAA CGT TTC AGT GGC AGT CGC AGC GGT
CGC TGC AGG TCG GAC CTA TCG CCA CAC GGT TTT GCA AAG TCA CCG TCA GCG TCG CCA
 A   T   S   S   L   D   S   G   V   P   K   R   F   S   G   S   R   S   G>

 60          70          80 BsmBI    90
TCT GAC TAT ACC CTC ACA ATT TCG TCT CTC CAG
AGA CTG ATA TGG GAG TGT TAA AGC AGA GAG GTC
 S   D   Y   T   L   T   I   S   S   L   Q>
```

casete gL3 (SEQ ID NO:44)

```
   PvuI     10          20          30          40          50
GCC GAT CGT GTG ACT ATT ACC TGT CGT GCC AGT CAG GAC ATC GCG GGT AGC CTG AAC
CGG CTA GCA CAC TGA TAA TGG ACA GCA CGG TCA GTC CTG TAG CGC CCA TCG GAC TTG
 G   D   R   V   T   I   T   C   R   A   S   Q   D   I   A   G   S   L   N>

 60          70          80          90          100       AatII
TGG TTG CAG CAA AAA CCG GGC AAA GCC ATC AAG CGC CTC ATC TAT GCG ACG TCC
ACC AAC GTC GTT TTT GGC CCG TTT CGG TAG TTC GCG GAG TAG ATA CGC TGC AGG
 W   L   Q   Q   K   P   G   K   A   I   K   R   L   I   Y   A   T   S>
```

los residuos no subrayados representan aminoácidos cambiados en comparación con la secuencia parental.

Figura 14: Pares de oligonucleótidos para la construcción de gH2, gH3, gL2, gL3

gH2T (SEQ ID NO:45)
CCGGGACAATGCAAAGAATACCCTTTACCTCCAGATGAACTCTCTCCGCGCAGAGGACACAGCAGT
CTATTACTGTGTACGGATCGGCGAAGA

gH2B (SEQ ID NO:46)
CGCGTCTTCGCCGATCCGTACACAGTAATAGACTGCTGTGTCCTCTGCGCGGAGAGAGTTCATCTG
GAGGTAAAGGGTATTCTTTGCATTGTC

gH3T (SEQ ID NO:47)
CCGGAGGCAGCTATACATACTACGTGGACAGCGTCAAGGGCCGTTTCACCATTTC

gH3B (SEQ ID NO:48)
CCGGGAAATGGTGAAACGGCCCTTGACGCTGTCCACGTAGTATGTATAGCTGCCT

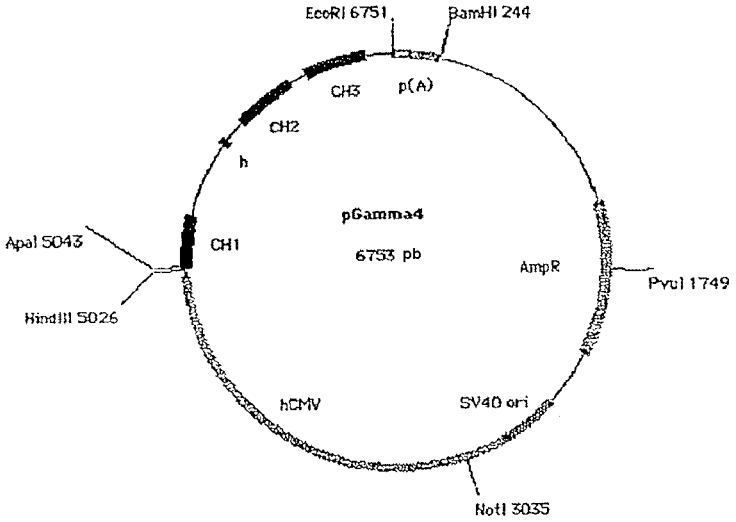
gL2T (SEQ ID NO:49)
CCAGCCTGGATAGCGGTGTGCCAAAACGTTTCAGTGGCAGTCGCAGCGGTTCTGACTATACCCTC
ACAATTTCGTCTCT

gL2B (SEQ ID NO:50)
CTGGAGAGACGAAATTGTGAGGGTATAGTCAGAACCGCTGCGACTGCCACTGAAACGTTTTGGCA
CACCGCTATCCAGGCTGGACGT

gL3T (SEQ ID NO:51)
CGTGTGACTATTACCTGTCGTGCCAGTCAGGACATCGCGGGTAGCCTGAACTGGTTGCAGCAAAA
ACCGGGCAAAGCCATCAAGCGCCTCATCTATGCGACGT

gH3B (SEQ ID NO:52)
CGCATAGATGAGGCGCTTGATGGCTTTGCCCGGTTTTTGCTGCAACCAGTTCAGGCTACCCGCGAT
GTCCTGACTGGCACGACAGGTAATAGTCACACGAT

Figura 15: plásmidos de expresión de CHO



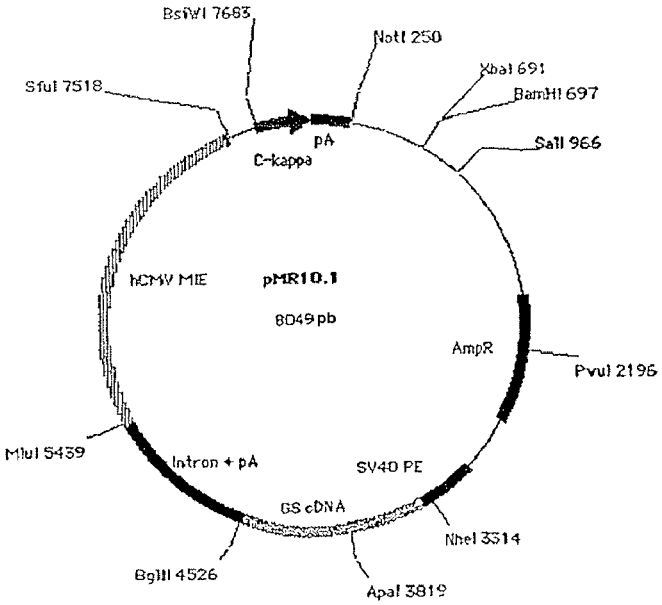


Figura 16: mapa de pTTOD(Fab' IGS-3)

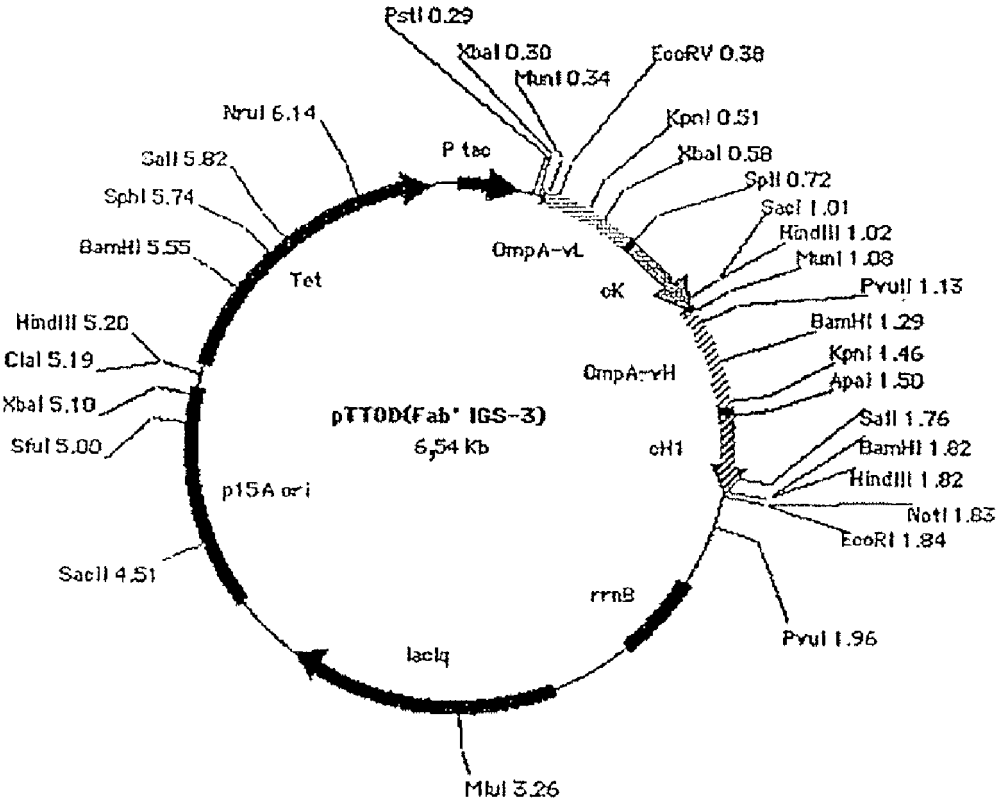


Figura 17: Secuencias IGS

(SEQ ID NO:53)

IGS-1; **Espacio intergénico = -1**

G,AGC,TCA,CCA,GTA,ACA,AAA,AGT,TTT,AAT,AGA,GGA,GAG,TGT,TAATG,AAG,AAG,ACT,GCT,ATA,GCA,ATT,G

S S P V T K S F N R G E C * M K K T A I A I

Extremo de la secuencia c-Kappa -> ***Inicio de la secuencia OmpA ->***

(SEQ ID NO:54)

IGS-2; **Espacio intergénico = +1**

G,AGC,TCA,CCA,GTA,ACA,AAA,AGT,TTT,AAT,AGA,GGG,GAG,TGT,TAA AATG,AAG,AAG,ACT,GCT,ATA,GCA,ATT,G

S S P V T K S F N R G E C * M K K T A I A I

(SEQ ID NO:55)

IGS-3; **Espacio intergénico = +13**

G,AGC,TCA,CCA,GTA,ACA,AAA,AGC,TTT,AAT,AGA,GGA,GAG,TGT,TGA GGAGGAAAAAAAAATG,AAG,AAA,ACT,GCT,ATA,GCA,ATT,G

S S P V T K S F N R G E C * M K K T A I A I

Figura 18: Fermentación de Fab'

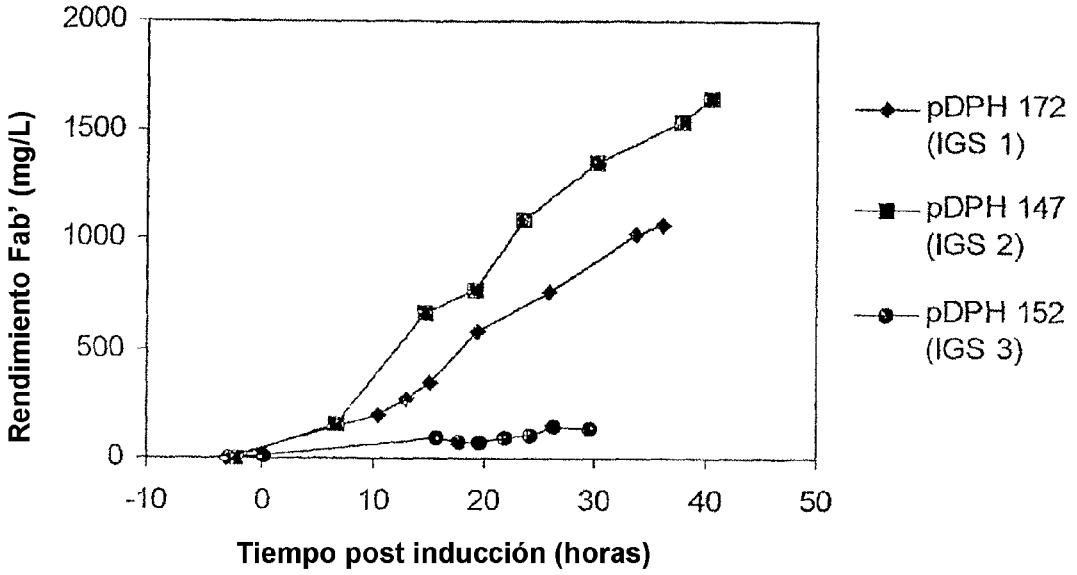


Figura 19: Secuencia codificante y limítrofe de Fab' CDP791 (SEQ ID NO: 56)

```
        10         20         30         40         50         60         70
AATTCTCATG TTTGACAGCT TATCATCGAC TGCACGGTGC ACCAATGCTT CTGGCGTCAG GCAGCCATCG
TTAAGAGTAC AAACTGTCGA ATAGTAGCTG ACGTGCCACG TGGTTACGAA GACCGCAGTC CGTCGGTAGC

        80         90        100        110        120        130        140
GAAGCTGTGG TATGGCTGTG CAGGTCGTAA ATCACTGCAT AATTCGTGTC GCTCAAGGCG CACTCCCGTT
CTTCGACACC ATACCGACAC GTCCAGCATT TAGTGACGTA TTAAGCACAG CGAGTTCCGC GTGAGGGCAA

       150        160        170        180        190        200        210
CTGGATAATG TTTTTTGCGC CGACATCATA ACGGTTCTGG CAAATATTCT GAAATGAGCT GTTGACAATT
GACCTATTAC AAAAAACGCG GCTGTAGTAT TGCCAAGACC GTTTATAAGA CTTTACTCGA CAACTGTTAA

       220        230        240        250        260        270        280
AATCATCGGC TCGTATAATG TGTGGAATTG TGAGCGGATA ACAATTTCAC ACAGGAAACA GCGATGAGCT
TTAGTAGCCG AGCATATTAC ACACCTTAAC ACTCGCCTAT TGTTAAAGTG TGTCCTTTGT CGCTACTCGA

       290        300        310        320        330        340
TGGCTGCAGG TCGAGTTCTA GATAACGAGG CGTAAAAA ATG AAA AAG ACA GCT ATC GCA ATT GCA
ACCGACGTCC AGCTCAAGAT CTATTGCTCC GCATTTTT TAC TTT TTC TGT CGA TAG CGT TAA CGT
                                          M   K   K   T   A   I   A   I   A>

   350        360        370        380        390        400
GTG GCC TTG GCT GGT TTC GCT ACC GTA GCG CAA GCT GAT ATC CAG ATG ACC CAG AGT
CAC CGG AAC CGA CCA AAG CGA TGG CAT CGC GTT CGA CTA TAG GTC TAC TGG GTC TCA
 V   A   L   A   G   F   A   T   V   A   Q   A   D   I   Q   M   T   Q   S>

       410        420        430        440        450
CCA AGC AGT CTC TCC GCC AGC GTA GGC GAT CGT GTG ACT ATT ACC TGT CGT GCC AGT
GGT TCG TCA GAG AGG CGG TCG CAT CCG CTA GCA CAC TGA TAA TGG ACA GCA CGG TCA
 P   S   S   L   S   A   S   V   G   D   R   V   T   I   T   C   R   A   S>

460        470        480        490        500        510
CAG GAC ATC GCG GGT AGC CTG AAC TGG TTG CAG CAA AAA CCG GGC AAA GCC ATC AAG
GTC CTG TAG CGC CCA TCG GAC TTG ACC AAC GTC GTT TTT GGC CCG TTT CGG TAG TTC
 Q   D   I   A   G   S   L   N   W   L   Q   Q   K   P   G   K   A   I   K>

   520        530        540        550        560        570
CGC CTC ATC TAT GCG ACG TCC AGC CTG GAT AGC GGT GTG CCA AAA CGT TTC AGT GGC
GCG GAG TAG ATA CGC TGC AGG TCG GAC CTA TCG CCA CAC GGT TTT GCA AAG TCA CCG
 R   L   I   Y   A   T   S   S   L   D   S   G   V   P   K   R   F   S   G>

       580        590        600        610        620        630
AGT CGC AGC GGT TCT GAC TAT ACC CTC ACA ATT TCG TCT CTC CAG CCG GAA GAT TTC
TCA GCG TCG CCA AGA CTG ATA TGG GAG TGT TAA AGC AGA GAG GTC GGC CTT CTA AAG
 S   R   S   G   S   D   Y   T   L   T   I   S   S   L   Q   P   E   D   F>

           640        650        660        670        680
GCC ACT TAC TAT TGT CTG CAA TAT GGC AGC TTC CCT CCG ACC TTC GGT CAG GGC ACT
CGG TGA ATG ATA ACA GAC GTT ATA CCG TCG AAG GGA GGC TGG AAG CCA GTC CCG TGA
 A   T   Y   Y   C   L   Q   Y   G   S   F   P   P   T   F   G   Q   G   T>

690        700        710        720        730        740
AAA GTA GAA ATC AAA CGT ACG GTA GCG GCC CCA TCT GTC TTC ATC TTC CCG CCA TCT
TTT CAT CTT TAG TTT GCA TGC CAT CGC CGG GGT AGA CAG AAG TAG AAG GGC GGT AGA
 K   V   E   I   K   R   T   V   A   A   P   S   V   F   I   F   P   P   S>

    750        760        770        780        790        800
GAT GAG CAG TTG AAA TCT GGA ACT GCC TCT GTT GTG TGC CTG CTG AAT AAC TTC TAT
CTA CTC GTC AAC TTT AGA CCT TGA CGG AGA CAA CAC ACG GAC GAC TTA TTG AAG ATA
 D   E   Q   L   K   S   G   T   A   S   V   V   C   L   L   N   N   F   Y>

       810        820        830        840        850
CCC AGA GAG GCC AAA GTA CAG TGG AAG GTG GAT AAC GCC CTC CAA TCG GGT AAC TCC
GGG TCT CTC CGG TTT CAT GTC ACC TTC CAC CTA TTG CGG GAG GTT AGC CCA TTG AGG
 P   R   E   A   K   V   Q   W   K   V   D   N   A   L   Q   S   G   N   S>

860        870        880        890        900        910
CAG GAG AGT GTC ACA GAG CAG GAC AGC AAG GAC AGC ACC TAC AGC CTC AGC AGC ACC
GTC CTC TCA CAG TGT CTC GTC CTG TCG TTC CTG TCG TGG ATG TCG GAG TCG TCG TGG
 Q   E   S   V   T   E   Q   D   S   K   D   S   T   Y   S   L   S   S   T>
```

```
   920          930          940          950          960          970
CTG ACG CTG AGC AAA GCA GAC TAC GAG AAA CAC AAA GTC TAC GCC TGC GAA GTC ACC
GAC TGC GAC TCG TTT CGT CTG ATG CTC TTT GTG TTT CAG ATG CGG ACG CTT CAG TGG
 L   T   L   S   K   A   D   Y   E   K   H   K   V   Y   A   C   E   V   T>

       980          990         1000         1010         1020         1030
CAT CAG GGC CTG AGC TCA CCA GTA ACA AAA AGT TTT AAT AGA GGG GAG TGT TAA A ATG
GTA GTC CCG GAC TCG AGT GGT CAT TGT TTT TCA AAA TTA TCT CCC CTC ACA ATT T TAC
 H   Q   G   L   S   S   P   V   T   K   S   F   N   R   G   E   C  *>
                                                                      M>

          1040         1050         1060         1070         1080
AAG AAG ACT GCT ATA GCA ATT GCA GTG GCG CTA GCT GGT TTC GCC ACC GTG GCG CAA
TTC TTC TGA CGA TAT CGT TAA CGT CAC CGC GAT CGA CCA AAG CGG TGG CAC CGC GTT
 K   K   T   A   I   A   I   A   V   A   L   A   G   F   A   T   V   A   Q>

1090         1100         1110         1120         1130         1140
GCT GAG GTT CAG CTG GTC GAG TCT GGA GGC GGG CTT GTC CAG CCT GGA GGG AGC CTG
CGA CTC CAA GTC GAC CAG CTC AGA CCT CCG CCC GAA CAG GTC GGA CCT CCC TCG GAC
 A   E   V   Q   L   V   E   S   G   G   G   L   V   Q   P   G   G   S   L>

    1150         1160         1170         1180         1190         1200
CGT CTC TCT TGT GCA GCA AGC GGC TTC ACC TTT TCC TCT TAC GGT ATG TCC TGG GTG
GCA GAG AGA ACA CGT CGT TCG CCG AAG TGG AAA AGG AGA ATG CCA TAC AGG ACC CAC
 R   L   S   C   A   A   S   G   F   T   F   S   S   Y   G   M   S   W   V>

       1210         1220         1230         1240         1250
CGG CAG GCA CCT GGG AAG GGC CTG GAG TGG GTG GCA ACC ATT ACG TCC GGA GGC AGC
GCC GTC CGT GGA CCC TTC CCG GAC CTC ACC CAC CGT TGG TAA TGC AGG CCT CCG TCG
 R   Q   A   P   G   K   G   L   E   W   V   A   T   I   T   S   G   G   S>

1260         1270         1280         1290         1300         1310
TAT ACA TAC TAC GTG GAC AGC GTC AAG GGC CGT TTC ACC ATT TCC CGG GAC AAT GCA
ATA TGT ATG ATG CAC CTG TCG CAG TTC CCG GCA AAG TGG TAA AGG GCC CTG TTA CGT
 Y   T   Y   Y   V   D   S   V   K   G   R   F   T   I   S   R   D   N   A>

   1320         1330         1340         1350         1360         1370
AAG AAT ACC CTT TAC CTC CAG ATG AAC TCT CTC CGC GCA GAG GAC ACA GCA GTC TAT
TTC TTA TGG GAA ATG GAG GTC TAC TTG AGA GAG GCG CGT CTC CTG TGT CGT CAG ATA
 K   N   T   L   Y   L   Q   M   N   S   L   R   A   E   D   T   A   V   Y>

       1380         1390         1400         1410         1420
TAC TGT GTA CGG ATC GGC GAA GAC GCG TTG GAC TAC TGG GGA CAG GGG ACC CTT GTG
ATG ACA CAT GCC TAG CCG CTT CTG CGC AAC CTG ATG ACC CCT GTC CCC TGG GAA CAC
 Y   C   V   R   I   G   E   D   A   L   D   Y   W   G   Q   G   T   L   V>

1430         1440         1450         1460         1470         1480
ACA GTC TCC TCT GCT TCT ACA AAG GGC CCA TCG GTC TTC CCC CTG GCA CCC TCC TCC
TGT CAG AGG AGA CGA AGA TGT TTC CCG GGT AGC CAG AAG GGG GAC CGT GGG AGG AGG
 T   V   S   S   A   S   T   K   G   P   S   V   F   P   L   A   P   S   S>

   1490         1500         1510         1520         1530         1540
AAG AGC ACC TCT GGG GGC ACA GCG GCC CTG GGC TGC CTG GTC AAG GAC TAC TTC CCC
TTC TCG TGG AGA CCC CCG TGT CGC CGG GAC CCG ACG GAC CAG TTC CTG ATG AAG GGG
 K   S   T   S   G   G   T   A   A   L   G   C   L   V   K   D   Y   F   P>

       1550         1560         1570         1580         1590         1600
GAA CCG GTG ACG GTG TCG TGG AAC TCA GGC GCC CTG ACC AGC GGC GTG CAC ACC TTC
CTT GGC CAC TGC CAC AGC ACC TTG AGT CCG CGG GAC TGG TCG CCG CAC GTG TGG AAG
 E   P   V   T   V   S   W   N   S   G   A   L   T   S   G   V   H   T   F>

          1610         1620         1630         1640         1650
CCG GCT GTC CTA CAG TCC TCA GGA CTC TAC TCC CTC AGC AGC GTG GTG ACC GTG CCC
GGC CGA CAG GAT GTC AGG AGT CCT GAG ATG AGG GAG TCG TCG CAC CAC TGG CAC GGG
 P   A   V   L   Q   S   S   G   L   Y   S   L   S   S   V   V   T   V   P>

1660         1670         1680         1690         1700         1710
TCC AGC AGC TTG GGC ACC CAG ACC TAC ATC TGC AAC GTG AAT CAC AAG CCC AGC AAC
AGG TCG TCG AAC CCG TGG GTC TGG ATG TAG ACG TTG CAC TTA GTG TTC GGG TCG TTG
 S   S   S   L   G   T   Q   T   Y   I   C   N   V   N   H   K   P   S   N>

   1720         1730         1740         1750         1760         1770
ACC AAG GTC GAC AAG AAA GTT GAG CCC AAA TCT TGT GAC AAA ACT CAC ACA TGC GCC
TGG TTC CAG CTG TTC TTT CAA CTC GGG TTT AGA ACA CTG TTT TGA GTG TGT ACG CGG
 T   K   V   D   K   K   V   E   P   K   S   C   D   K   T   H   T   C   A>
```

```
      1780       1790       1800       1810       1820       1830       1840
GCG TGA TGA GGATCCAAGC TTGCGGCCGC GAATTCACTG GCCGTCGTTT TACAACGTCG TGACTGGGAA
CGC ACT ACT CCTAGGTTCG AACGCCGGCG CTTAAGTGAC CGGCAGCAAA ATGTTGCAGC ACTGACCCTT
 A   *>

     1850       1860       1870       1880       1890       1900       1910
AACCCTGGCG TTACCCAACT TAATCGCCTT GCAGCACATC CCCCTTTCGC CAGCTCGCGT AATAGCGAAG
TTGGGACCGC AATGGGTTGA ATTAGCGGAA CGTCGTGTAG GGGGAAAGCG GTCGAGCGCA TTATCGCTTC

     1920       1930       1940       1950       1960       1970       1980
AGGCCCGCAC CGATCGCCCT TCCCAACAGT TGCGCAGCCT GAATGGCGAA TGGCGCCTGA TGCGGTATTT
TCCGGGCGTG GCTAGCGGGA AGGGTTGTCA ACGCGTCGGA CTTACCGCTT ACCGCGGACT ACGCCATAAA

     1990       2000
TCTCCTTACG CATCTGTGCG
AGAGGAATGC GTAGACACGC
```

Figura 20: Resultados del radioimunoanálisis

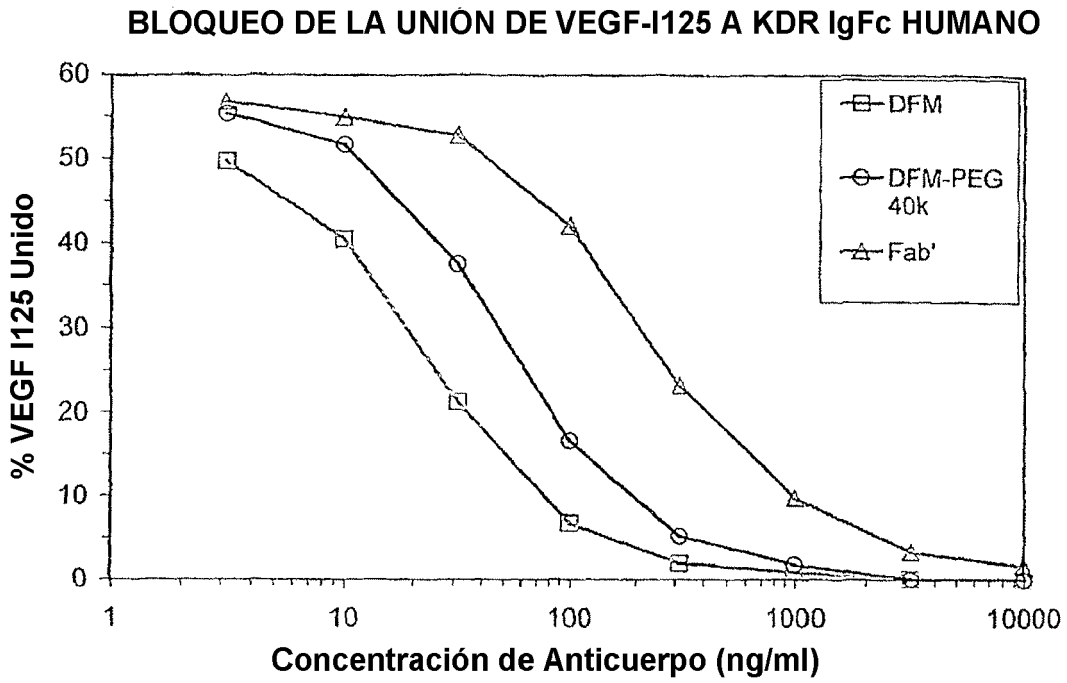


Figura 21: Secuencia de proteína de la cadena pesada injertada con gH3

Secuencia de anticuerpo de Cadena Pesada (SEQ ID NO:57)

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYGMSWVRQAPGKGLEWVATITSGGSY
TYYVDSVKGRFTISRDNAKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCVRIGEDALDYWGQGTLVT
VSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFP
AVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTKTYTCNVDHKPSNTKVDKRVESKYGPPCPSCPA
PEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAK
TKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPRE
PQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDG
SFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSLGK*