

(19)



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS
ESPAÑA



(11) Número de publicación: **2 998 307**

(51) Int. Cl.:

C07K 16/22 (2006.01)

A61K 39/395 (2006.01)

(12)

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **25.06.2009 E 20158159 (2)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **28.08.2024 EP 3722310**

(54) Título: **Anticuerpos estables y solubles inhibidores del VEGF**

(30) Prioridad:

**25.06.2008 US 75697 P
25.06.2008 US 13321208 P
24.02.2009 US 155041 P
25.06.2008 US 7569208 P**

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
19.02.2025

(73) Titular/es:

**NOVARTIS AG (100.00%)
Lichtstrasse 35
4056 Basel, CH**

(72) Inventor/es:

**BORRAS, LEONARDO;
URECH, DAVID y
GUNDE, TEA**

(74) Agente/Representante:

CARVAJAL Y URQUIJO, Isabel

ES 2 998 307 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 estables y solubles inhibidores del VEGF

5 Campo de la invención

Antecedentes de la invención

10 La angiogénesis está involucrada en la patogenia de una diversidad de trastornos que incluyen tumores sólidos, síndromes neovasculares intraoculares, tales como retinopatías proliferativas o degeneración macular senil (AMD, por sus siglas en inglés), artritis reumatoide y psoriasis (Folkman *et al.*, *J. Biol. Chem.* 267:10931-10934 (1992); Klagsbrun *et al.*, *Annu. Rev. Physiol.* 53:217-239 (1991); y Garner A, *Vascular diseases*. En: *Pathobiology of ocular disease. A dynamic approach*. Garner A, Klintworth G K, Ed. 2.^a Edición Marcel Dekker, NY, págs. 1625-1710 (1994)). En tumores sólidos, la angiogénesis y el crecimiento de nueva vasculatura permite la supervivencia del tumor, y se ha demostrado una correlación entre la densidad de microvasos en cortes tumorales y la supervivencia del paciente en cánceres de mama y otros cánceres (Weidner *et al.*, *N Engl J Med* 324:1-6 (1991); Horak *et al.*, *Lancet* 340:1120-1124 (1992); y Macchiarini *et al.*, *Lancet* 340:145-146 (1992)).

20 El factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF, por sus siglas en inglés) es un regulador conocido de la angiogénesis y la neovascularización, y se ha demostrado que es un mediador clave de la neovascularización asociada con tumores y trastornos intraoculares (Ferrara *et al.*, *Endocr. Rev.* 18:4-25 (1997)). El ARNm de VEGF se sobreexpresa en muchos tumores humanos, y la concentración de VEGF en los humores oculares están estrechamente correlacionados con la presencia de proliferación activa de vasos sanguíneos en pacientes con retinopatía diabética y otras retinopatías relacionadas con la isquemia (Berkman *et al.*, *J Clin Invest* 91:153-159 (1993); Brown *et al.*, *Human Pathol.* 26:86-91 (1995); Brown *et al.*, *Cancer Res.* 53:4727-4735 (1993); Mattern *et al.*, *Brit. J. Cancer* 73:931-934 (1996); y Dvorak *et al.*, *Am J. Pathol.* 146:1029-1039 (1995); Aiello *et al.*, *N. Engl. J. Med.* 331:1480-1487 (1994)). Además, unos estudios recientes han demostrado la presencia de VEGF localizado en membranas neovasculares coroideas en pacientes afectados por AMD (López *et al.*, *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 37:855-868 (1996)). Se pueden utilizar anticuerpos neutralizantes anti-VEGF para suprimir el crecimiento de diversas líneas celulares de tumor humano en ratones lampíños y también inhibir la angiogénesis intraocular en modelos de trastornos retinianos isquémicos (Kim *et al.*, *Nature* 362:841-844 (1993); Warren *et al.*, *J. Clin. Invest* 95:1789-1797 (1995); Borgstrom *et al.* *Cancer Res.* 56:4032-4039 (1996); y Melnyk *et al.*, *Cancer Res.* 56:921-924 (1996)) (Adamis *et al.*, *Arch. Ophthalmol.* 114:66-71 (1996))).

35 Liang, W-C et al.: «Cross-species vascular endothelial growth factor (VEGF)-blocking antibodies completely inhibit the growth of human tumor xenografts and measure the contribution of stromal VEGF», *JBC* (2006), 281(2):951-961, desvelan anticuerpos específicos contra el VEGF humano.

40 Por tanto, se necesitan anticuerpos monoclonales anti-VEGF que se puedan utilizar para el tratamiento de tumores sólidos y diferentes enfermedades intraoculares neovasculares.

Sumario de la invención

45 La invención se define en las reivindicaciones adjuntas.

50 La invención proporciona inmunoligadores anti-VEGF solubles y estables que comprenden CDR (regiones determinantes de complementariedad) de anticuerpos monoclonales de conejo. Dichos anticuerpos están diseñados para el diagnóstico y/o el tratamiento de trastornos mediados por VEGF. También se divultan, aunque no se reivindican, hibridomas, ácidos nucleicos, vectores y células hospedadoras para la expresión de los anticuerpos recombinantes de la invención, métodos para aislarlos y el uso de dichos anticuerpos en medicina.

Descripción breve de los dibujos

55 La Figura 1 ilustra la cinética de unión de scFv seleccionados a hVEGF₁₆₅ utilizando Biacore (hVEGF165). La Fig. 1a muestra los datos obtenidos para 511max: Ka (1/Ms): 6,59E+05; SE (ka): 1,10E+03; kd(l/s): 4,40E-05; SE(kd): 6,30E-07; KD(M): 6,67E-11. La Fig. 1b muestra los datos obtenidos para 578max: Ka (1/Ms): 7,00E+05; SE (ka): 1,40E+03; kd(1/s): 3,07E-04; SE(kd): 8,50E-07; KD(M): 4,39E-10.

60 La Figura 2 ilustra la especificidad de especie mostrando la cinética de unión de 578max a VEGF humano, de ratón y de rata. La Fig. 2a muestra los datos obtenidos para VEGF 165 humano: Ka (1/Ms): 7,00E+05; SE (ka): 1,40E+03; kd(1/s): 3,07E-04; SE(kd): 8,50E-07; KD(M): 4,39E-10. La Fig. 2b muestra los datos obtenidos para VEGF164 de ratón: Ka (1/Ms): 1,03E+06; SE (ka): 2,30E+03; kd(1/s): 4,40E-04; SE(kd): 9,40E-07; KD(M): 4,29E-10. La Fig. 2c muestra los datos obtenidos para VEGF 164 de rata: Ka (1/Ms): 8,83E+05; SE (ka): 2,50E+03; kd(1/s): 5,28E-04; SE(kd): 1,20E-06; KD(M): 5,98E-10.

- 5 La Figura 3 ilustra la cinética de unión de 578max a isoformas de VEGF (hVEGF121 y hVEGF110). La Fig. 3a muestra los datos obtenidos para VEGF 165 humano: Ka (1/Ms): 7,00E+05; SE (ka): 1,4E+03; kd(11s): 3,07E-04; SE(kd): 8,50E-07; KD(M): 4,39E-10. La Fig. 3b muestra los datos obtenidos para VEGF121 humano: Ka (1/Ms): 5,87E+05; SE (ka): 1,20E+03; kd(1/s): 5,58E-04; SE(kd): 9,60E-07; KD(M): 9,50E-11. La Fig. 3c muestra los datos obtenidos para VEGF 110 humano: Ka (1/Ms): 5,23E+05; SE (ka): 1,30E+03; kd(1/s): 7,22E-04; SE(kd): 8,10E-07; KD(M): 1,38E-09.
- 10 La Figura 4 representa la cinética de unión de 578max, 578minmax y 578wt a hVEGF165. La Fig. 4a muestra los datos obtenidos para 578max: Ka (1/Ms): 7,00E+05; SE (ka): 1,40E+03; kd(1/s): 3,07E-04; SE(kd): 8,50E-07; KD(M): 4,39E-10. La Fig. 4b muestra los datos obtenidos para 578minmax: Ka (1/Ms): 8,06E+05; SE (ka): 2,10E+03; kd(1/s): 5,04E-04; SE(kd): 1,10E-06; KD(M): 6,25E-10. La Fig. 4c muestra los datos obtenidos para 578wt-His: Ka (1/Ms): 8,45E+05; SE (ka): 1,60E+03; kd(1/s): 1,69E-04; SE(kd): 7,60E-07; KD(M): 2,00E-10.
- 15 La Figura 5 ilustra la estabilidad térmica de 578max, 578minmax y 578minmax_DHP (despliegamiento medido por FT-IR). Fig. 5a: 578minmax (ESBA903): Tm = 71,1°C; Figura 5b: 578minmax_DHP (#961): Tm = 70,2°C; Figura 5c: 578max (#821): Tm = 70,4°C.
- 20 La Figura 6 ilustra la desnaturización y la precipitación de derivados 578 después del estrés térmico (Fig 6a: 50°C, Fig 6b: 60°C, Fig 6c: 70°C) durante 30 min.
- 25 La Figura 7 ilustra la solubilidad de 578max, 578minmax y 578minmax_DHP (determinada por precipitación con sulfato de amonio). Fig 7a: 578max (#821). La V50 fue del 27,24 %. Fig. 7b: 578minmax (ESBA903). La V50 fue del 28,13. Fig.: 7c: 578minmax_DHP (#961). La V50 fue del 32,36 %.
- 30 La Figura 8 ilustra el ELISA de competición para VEGFR2 frente al ensayo con HUVEC como métodos para medir la potencia. Fig. 8a: Comparación de Lucentis y 511max (#802) en ELISA de competición para VEGFR2. R² de Lucentis: 0,9417; R² de ESBA802: 0,9700. CE50 de Lucentis: 7,137 nM; CE50 de #802: 0,8221 nM. Fig 8b: Comparación de Lucentis y 578max (#821) en ELISA de competición para VEGFR2. Fig 8c: Comparación de Lucentis, 511maxC-his y 534max en un ensayo con HUVEC. R² de Lucentis: 0,9399; R² de EP511maxC-his: 0,9313, R² de EP534max: 0,7391. CE50 de Lucentis: 0,08825 nM, CE50 de 511maxC-his: 0,7646 nM, CE50 de 534max: 63,49 nM. Fig. 8d: Comparación de Lucentis, 578min y 578max en un ensayo con HUVEC. R² de Lucentis: 0,9419, R² de EP578min: 0,8886, R² de EP578max: 0,9274. CE50 de Lucentis: 0,1529 nM, CE50 de 578min: 1,528 nM, CE50 de 578max: 0,1031 nM.
- 35 La Figura 9 ilustra los efectos de 578minmax sobre la proliferación de HUVEC inducida por hVEGF165. Los parámetros del ensayo fueron los siguientes: concentración de VEGF 165 h: 0,08nM (3 ng/ml); incubación con VEGF y elemento de prueba: 96h. La CE50 fue 0,08959 nM para Lucentis y 0,05516 nM para 578minmax, mientras que el R² fue 0,9066 para Lucentis y 0,9622 para 578minmax.
- 40 La Figura 10 ilustra los efectos de 578minmax sobre la proliferación de HUVEC inducida por VEGF 164 de ratón y VEGF164 de rata. Los parámetros del ensayo fueron los siguientes: concentración de VEGF164 de ratón: 0,08 nM (3 ng/ml); concentración de VEGF164 de rata: 0,3 nM (11,3 ng/ml). Ambas concentraciones se seleccionaron en la CE90 para la proliferación de HUVEC inducida por VEGF; incubación con VEGF y elemento de prueba: 96h. La Fig. 10a ilustra los datos obtenidos para VEGF de ratón. La CE50 fue 0,1196 nM para V1253 y 0,06309 nM para 578minmax, mientras que el R² fue 0,02744 para Lucentis y 0,9348 para V1253 y 0,9767 para EP578minmax. Lucentis no inhibió la proliferación de HUVEC inducida por VEGF de ratón. La Fig. 10b ilustra los datos obtenidos para VEGF de rata. La CE50 fue 1,597 nM para V1253 y 0,06974 nM para 578minmax, mientras que el R² fue 0,7664 para V1253 y 0,6635 para 578minmax.
- 45 La Figura 11 ilustra estudios de eficacia utilizando el ensayo de Miles en cobayas lampiñas (parte I). Se administró el tinte azul Alamar 1 por vía intravenosa a cobayas lampiñas. Una hora después de la inyección del tinte, se injectó una premezcla 2 de hVEGF (2,61nM) y Lucentis, ESBA903 o #802, respectivamente, en la piel del animal 3. Una hora después de la inyección de las disoluciones, los animales 3 se sacrificaron y sus pieles se recogieron, 50 se lavaron y se fotografiaron digitalmente utilizando luz incidente y transmitida. La zona de colorante azul de Evans que se extravió a los sitios de inyección se evaluó utilizando Image J y se representó gráficamente la retención de la dosis-zona.
- 55 La Figura 12 ilustra estudios de eficacia en los que se utiliza el ensayo de Miles en cobayas lampiñas (parte II). La Fig. 12a muestra los resultados obtenidos para #803 (511max). La CE50 fue 5,990nM y tenía una dispersión estadística de entre 2,060 y 17,41 nM mientras que el R² fue 0,5800. La Fig. 12b muestra los resultados obtenidos para ESBA903 (578minmax). La CE50 fue 3,989 y tenía una dispersión estadística de entre 1,456 y 10,93 nM mientras que el R² fue 0,3920. La Fig. 12c muestra la zona de extravasación de tinte para Lucentis. No se pudo calcular la CE50 para Lucentis debido al pobre ajuste de la curva.

La Figura 13 ilustra estudios de eficacia en los que se utiliza el ensayo de Miles modificado en ratas (hVEGF165 y 578minmax premezclados (ESBA903)). La Fig. 13a ilustra la eficacia anti-permeabilidad de Avastin tras la extravasación vascular retiniana inducida por VEGF en ratas - respuesta a la dosis. Avastin inhibe la permeabilidad

5 vascular retiniana inducida por hVEGF. Pomezclados antes de la inyección. Un exceso aproximadamente equimolar, del triple o del décuplo. *p<0,05 (VEGF frente a BSA), **p<0,05 (tratadas con Avastin frente a VEGF). La Fig. 13b muestra la eficacia anti-permeabilidad de ESBA903 tras la extravasación vascular retiniana inducida por VEGF en ratas. Respuesta a la dosis (premezcla, ivt). Inhibición completa de la permeabilidad vascular retinaria inducida por hVEGF por parte de ESBA903. Pomezclados antes de la inyección. Un exceso aproximadamente equimolar, del triple o del décuplo. *p<0,05 (VEGF frente a BSA), **p<0,05 (tratadas con ESBA903 frente a VEGF).

10 La Figura 14 ilustra estudios de eficacia en los que se utiliza el ensayo de Miles modificado en ratas (administración tópica de 578minmax (ESBA903)). Se evaluó la eficacia anti-permeabilidad de AL-51287 (ESBA903) tras la extravasación vascular retinaria inducida por VEGF en ratas tras la administración tópica. Cinco días antes del 15 tratamiento, 4 gotas/día con una formulación de ESBA903 de 10 ng/ml. *p<0,05 (VEGF frente a BSA), **p<0,05 (VEGF frente a AL-51287), ***p=0,060 (AL-51287 frente a AL-52667), ****(VEGF frente a AL-39324); p<0,05 (AL-39324 frente al control de ref. de vehículo). AL-51287: ESBA903; AL-52657: control de referencia de vehículo tópico; AL-39324: inhibidor de RTK de bajo peso molecular.

20 La Figura 15 ilustra la definición de CDR1 de VH tal como se utiliza en la presente.

Descripción detallada

25 La invención proporciona inmunoligadores anti-VEGF solubles y estables que comprenden CDR de anticuerpos monoclonales de conejo. Dichos inmunoligadores están diseñados para el diagnóstico y/o el tratamiento de trastornos mediados por VEGF. También se divulan, aunque no se reivindican, hibridomas, ácidos nucleicos, vectores y células hospedadoras para la expresión de los anticuerpos recombinantes de la invención, métodos para aislarlos y el uso de dichos anticuerpos en medicina.

30 **Definiciones**

Con el fin de que la presente invención se pueda entender más fácilmente, se definirán ciertos términos tal como se indica a continuación. Se exponen definiciones adicionales a lo largo de la descripción detallada.

35 El término «VEGF» se refiere al factor de crecimiento de células del endotelio vascular de 165 aminoácidos, y factores de crecimiento de células del endotelio vascular de 121, 189 y 206 aminoácidos relacionados, tal como se describen en Leung *et al.*, *Science* 246:1306 (1989) y Houck *et al.*, *Mol. Endocrin.* 5:1806 (1991) junto con las formas alélicas de origen natural y procesadas de esos factores de crecimiento.

40 El término «receptor de VEGF» o «VEGFr» se refiere a un receptor celular para VEGF, normalmente un receptor de la superficie celular presente en células del endotelio vascular, así como variantes de este que conservan la capacidad de unirse a hVEGF. Un ejemplo de un receptor de VEGF es la tirosina-cinasa similar a fms (fit), un receptor transmembranario de la familia de las tirosina-cinasas. DeVries *et al.*, *Science* 255:989 (1992); Shibuya *et al.*, *Oncogene* 5:519 (1990). El receptor fit comprende un dominio extracelular, un dominio transmembranario y 45 un dominio intracelular con actividad de tirosina-cinasa. El dominio extracelular interviene en la unión de VEGF, mientras que el dominio intracelular interviene en la transducción de señales. Otro ejemplo de un receptor de VEGF es el receptor flk-1 (denominado también KDR). Matthews *et al.*, *Proc. Nat. Acad. Sci.* 88:9026 (1991); Terman *et al.*, *Oncogene* 6:1677 (1991); Terman *et al.*, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 187:1579 (1992). La unión de VEGF al receptor fit da como resultado la formación de al menos dos complejos de alto peso molecular, que tienen un peso molecular aparente de 205.000 y 300.000 Dalton. Se cree que el complejo de 300 000 Dalton es un dímero que comprende dos moléculas de receptor unidas a una única molécula de VEGF.

50 El término «conejo», tal como se utiliza en la presente, se refiere a un animal que pertenece a la familia de los lepóridos.

55 El término «anticuerpo», tal como se utiliza en la presente, es un sinónimo de «inmunoglobulina». Los anticuerpos de acuerdo con la presente invención pueden ser inmunoglobulinas enteras o fragmentos de estas, que comprenden al menos un dominio variable de una inmunoglobulina, tal como dominios variables únicos, Fv (Skerra A. y Pluckthun, A. (1988) *Science* 240:1038-41), scFv (Bird, R.E. *et al.*, (1988) *Science* 242:423-26; Huston, J.S. *et al.*, (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85:5879-83), Fab, (Fab')2 u otros fragmentos muy conocidos por un experto en la técnica.

60 El término «CDR» se refiere a una de las seis regiones hipervariables dentro de los dominios variables de un anticuerpo que contribuyen principalmente a la unión del antígeno. Una de las definiciones utilizadas más

- habitualmente para las seis CDR fue proporcionada por Kabat E.A. et al., (1991) *Sequences of proteins of immunological interest*. Publicación de NIH 91-3242). Tal como se utiliza en la presente, la definición de Kabat de las CDR solamente se aplica a CDR1, CDR2 y CDR3 del dominio variable de cadena ligera (CDR L1, CDR L2, CDR L3, o L1, L2, L3), así como a CDR2 y CDR3 del dominio variable de cadena pesada (CDR H2, CDR H3, o H2, H3). Sin embargo, la CDR1 del dominio variable de cadena pesada (CDR H1 o H1), tal como se utiliza en la presente, está definida por los siguientes residuos (numeración de Kabat): Empieza en la posición 26 y termina antes de la posición 36. Esto es básicamente una fusión de CDR H1 tal como se define de forma diferente según Kabat y Chotia (véase también la Figura 15 con fines ilustrativos).
- 5 10 El término «armazón de anticuerpo», o en ocasiones únicamente «armazón», tal como se utiliza en la presente, se refiere a la parte del dominio variable, ya sea VL o VH, que sirve de soporte para los bucles de unión a antígeno (CDR) de este dominio variable. Básicamente, es el dominio variable sin las CDR.
- 15 Se pretende que el término «anticuerpo monocatenario», «Fv monocatenario» o «scFv» se refiera a una molécula que comprende un dominio (o región; VH) variable de cadena pesada de anticuerpo y un dominio (o región; VL) variable de cadena ligera de anticuerpo conectados por un conector. Tales moléculas de scFv pueden tener las estructuras generales: NH₂-VL-conector-VH-COOH o NH₂-VH-conector-VL-COOH.
- 20 25 30 35 Tal como se utiliza en la presente, «identidad» se refiere a la coincidencia secuencial entre dos polipéptidos, moléculas o entre dos ácidos nucleicos. Cuando una posición en ambas de las dos secuencias comparadas está ocupada por la misma base o subunidad monomérica de aminoácido (por ejemplo, si una posición en cada una de las dos moléculas de ADN está ocupada por adenina, o una posición en cada uno de dos polipéptidos está ocupada por una lisina), entonces las respectivas moléculas son idénticas en esa posición. El «porcentaje de identidad» entre dos secuencias es una función del número de posiciones coincidentes compartidas por las dos secuencias dividido por el número de posiciones comparadas x 100. Por ejemplo, si 6 de 10 de las posiciones en dos secuencias coinciden, entonces las dos secuencias tienen un 60% de identidad. A modo de ejemplo, las secuencias de ADN CTGACT y CAGGTT comparten un 50% de identidad (3 de las 6 posiciones totales coinciden). Generalmente, se realiza una comparación cuando dos secuencias están alineadas para obtener la máxima identidad. Tal alineación se puede proporcionar utilizando, por ejemplo, el método de Needleman et al. (1970) *J. Mol. Biol.* 48: 443-453, implementado convenientemente por programas informáticos tales como el programa Align (DNAstar, Inc.). El porcentaje de identidad entre dos secuencias de aminoácidos también se puede determinar utilizando el algoritmo de E. Meyers y W. Miller (*Comput. Appl. Biosci.*, 4:11-17 (1988)) que se ha incorporado al programa ALIGN (versión 2.0), utilizando una tabla de peso de residuos PAM120, una penalización por longitud de hueco de 12 y una penalización por hueco de 4. Además, el porcentaje de identidad entre dos secuencias de aminoácidos se puede determinar utilizando el algoritmo de Needleman y Wunsch (*J. Mol. Biol.* 48: 444-453 (1970)) que se ha incorporado al programa GAP en el paquete de programas informáticos GCG (disponible en www.gcg.com), utilizando ya sea una matriz Blossum 62 o una matriz PAM250, y un peso de hueco de 16, 14, 12, 10, 8, 6 o 4 y un peso de longitud de 1, 2, 3, 4, 5 o 6.
- 40 45 50 Son secuencias «similares» aquellas que, cuando se alinean, comparten residuos aminoacídicos idénticos y similares, donde los residuos similares son sustituciones conservadoras para residuos aminoacídicos correspondientes en una secuencia de referencia alineada. A este respecto, una «sustitución conservadora» de un residuo en una secuencia de referencia es una sustitución por un residuo que es física o funcionalmente similar al residuo de referencia correspondiente, por ejemplo, que tiene un tamaño, una forma, una carga eléctrica, propiedades químicas similares, que incluyen la capacidad de formar enlaces covalentes o de hidrógeno, o similares. Por tanto, una secuencia «modificada por sustitución conservadora» es una que difiere de una secuencia de referencia o una secuencia natural (*wildtype* o *wt*) en que hay una o más sustituciones conservadoras presentes. El "porcentaje de similitud" entre dos secuencias es una función del número de posiciones que contienen residuos coincidentes o sustituciones conservadoras compartidas por las dos secuencias dividido por el número de posiciones comparadas x 100. Por ejemplo, si 6 de 10 de las posiciones en dos secuencias coinciden y 2 de 10 posiciones contienen sustituciones conservadoras, entonces las dos secuencias tienen un 80% de similitud positiva.
- 55 60 Tal como se utiliza en la presente, se pretende que el término «modificaciones conservadoras de la secuencia» se refiera a modificaciones de aminoácidos que no afectan ni alteran negativamente las características de unión del anticuerpo que contiene la secuencia de aminoácidos. Tales modificaciones conservadoras de la secuencia incluyen sustituciones, adiciones y delecciones de nucleótidos y aminoácidos. Por ejemplo, pueden introducirse modificaciones mediante técnicas estándar conocidas en la materia, tales como mutagénesis dirigida al sitio y mutagénesis mediada por PCR. Las sustituciones de aminoácidos conservadoras incluyen aquellas en las que el residuo aminoacídico se reemplaza con un residuo aminoacídico que tiene una cadena lateral similar. En la técnica se han definido familias de residuos aminoacídicos que tienen cadenas laterales similares. Estas familias incluyen aminoácidos con cadenas laterales básicas (por ejemplo, lisina, arginina, histidina), cadenas laterales ácidas (por ejemplo, ácido aspártico, ácido glutámico), cadenas laterales polares sin carga (por ejemplo, glicina, asparagina, glutamina, serina, treonina, tirosina, cisteína, triptófano), cadenas laterales no polares (por ejemplo, alanina, valina, leucina, isoleucina, prolina, fenilalanina, metionina), cadenas laterales con ramificaciones en la posición beta (por

ejemplo, treonina, valina, isoleucina) y cadenas laterales aromáticas (por ejemplo, tirosina, fenilalanina, triptófano, histidina). Por tanto, un residuo aminoacídico no esencial predicho en un anticuerpo anti-VEGF humano se reemplaza preferentemente con otro residuo aminoacídico de la misma familia de cadenas laterales. Los métodos de identificación de sustituciones conservadoras de nucleótidos y aminoácidos que no eliminan la unión a antígeno 5 son muy conocidos en la técnica (véanse, p. ej., Brummell *et al.*, *Biochem.* 32:1180-1187 (1993); Kobayashi *et al.*, *Protein Eng.* 12(10):879-884 (1999); y Burks *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94:412-417 (1997))

«Secuencia de aminoácidos consenso», tal como se utiliza en la presente, se refiere a una secuencia de aminoácidos que se puede generar utilizando una matriz de al menos dos, y preferentemente más, secuencias de aminoácidos alineadas, y permitiendo huecos en la alineación, de tal modo que es posible determinar el residuo aminoacídico más frecuente en cada posición. La secuencia consenso es aquella secuencia que comprende los aminoácidos que están representados con la mayor frecuencia en cada posición. En el caso de que dos o más aminoácidos estén representados por igual en una única posición, la secuencia consenso incluye ambos o todos estos aminoácidos.

La secuencia de aminoácidos de una proteína se puede analizar a diferentes niveles. Por ejemplo, se puede presentar conservación o variabilidad a nivel de un único residuo, nivel de múltiples residuos, múltiples residuos con huecos, etc. Los residuos pueden presentar conservación del residuo idéntico o pueden estar conservados a nivel de clase. Los ejemplos de clases de aminoácidos incluyen grupos R polares pero sin carga (Serina, Treonina, Asparagina y Glutamina); grupos R cargados positivamente (Lisina, Arginina e Histidina); grupos R cargados negativamente (Ácido glutámico y Ácido aspártico); grupos R hidrófobos (Alanina, Isoleucina, Leucina, Metionina, Fenilalanina, Triptófano, Valina y Tirosina); y aminoácidos especiales (Cisteína, Glicina y Prolina). Un experto en la técnica conoce otras clases y estas se pueden definir utilizando determinaciones estructurales u otros datos para evaluar su sustituibilidad. En ese sentido, un aminoácido sustituible se puede referir a cualquier aminoácido que se puede sustituir y mantener la conservación funcional en esa posición.

Sin embargo, se reconocerá que los aminoácidos de la misma clase pueden variar en gran medida por sus propiedades biofísicas. Por ejemplo, se reconocerá que determinados grupos R hidrófobos (p. ej., Alanina, Serina o Treonina) son más hidrófilos (es decir, de mayor hidrofilicidad o menor hidrofobicidad) que otros grupos R hidrófobos (p. ej., Valina o Leucina). La hidrofilia o hidrofobia relativa se puede determinar utilizando métodos reconocidos en la técnica (véanse, p. ej., Rose *et al.*, *Science*, 229: 834-838 (1985) y Comette *et al.*, *J. Mol. Biol.*, 195: 659-685 (1987)).

Tal como se utiliza en la presente, cuando una secuencia de aminoácidos (por ejemplo, una primera secuencia V_H o V_L) se alinea con una o más secuencias de aminoácidos adicionales (por ejemplo, una o más secuencias V_H o V_L en una base de datos), una posición de aminoácido en una secuencia (por ejemplo, la primera secuencia V_H o V_L) se puede comparar con una «posición correspondiente» en la una o más secuencias de aminoácidos adicionales. Tal como se utiliza en la presente, la «posición correspondiente» representa la posición equivalente en la secuencia o secuencias que se están comparando cuando las secuencias tienen una alineación óptima, es decir, cuando las secuencias están alineadas para conseguir el porcentaje de identidad o porcentaje de similitud más alto.

Tal como se utiliza en la presente, la expresión "base de datos de anticuerpos" se refiere a una colección de dos o más secuencias de aminoácidos de anticuerpos (una "multiplicidad" de secuencias), y normalmente se refiere a una colección de decenas, cientos o incluso miles de secuencias de aminoácidos de anticuerpos. Una base de datos de anticuerpos puede almacenar secuencias de aminoácidos de, por ejemplo, una colección de regiones V_H de anticuerpos, regiones V_L de anticuerpos o ambas, o puede almacenar una colección de secuencias scFv compuestas por regiones V_H y V_L . Preferentemente, la base de datos se almacena en un medio fijo, con motor de búsqueda, tal como un ordenador dentro un programa informático con motor de búsqueda. En una realización, la base de datos de anticuerpos es una base de datos que comprende o consiste en secuencias de anticuerpos de la línea germinal. En otra realización, la base de datos de anticuerpos es una base de datos que comprende o consiste en secuencias de anticuerpos maduras (es decir, expresadas) (p. ej., una base de datos de Kabat de secuencias de anticuerpos maduros, p. ej., una base de datos KBD). En otra realización más, la base de datos de anticuerpos comprende o consiste en secuencias seleccionadas funcionalmente (p. ej., secuencias seleccionadas a partir de un ensayo QC).

El término «inmunolígador» se refiere a una molécula que contiene la totalidad o una parte del sitio de unión a antígeno de un anticuerpo, por ejemplo, la totalidad o parte del dominio variable de cadena pesada y/o ligera, de tal modo que el inmunolígador reconoce específicamente un antígeno diana. Como ejemplos no limitativos de inmunolígadores se incluyen moléculas de inmunoglobulina completa y scFv, así como fragmentos de anticuerpo, incluyendo pero sin limitación, (i) un fragmento Fab, un fragmento monovalente que consiste en los dominios V_L , V_H , C_L y C_H1 ; (ii) un fragmento $F(ab')_2$, un fragmento bivalente que comprende dos fragmentos Fab unidos por un puente disulfuro en la región bisagra; (iii) un fragmento Fab', que es esencialmente un Fab con parte de la región bisagra (véase, *Fundamental Immunology* (Paul ed., 3.^a ed. 1993); (iv) un fragmento Fd que consiste en los

dominios V_H y C_H1 ; (v) un fragmento Fv que consiste en los dominios V_L y V_H de un único brazo de un anticuerpo, (vi) un anticuerpo monodominio tal como un fragmento Dab (Ward *et al.*, (1989) *Nature* 341:544-546), que consiste en un dominio V_H o V_L , un anticuerpo de camélido (véase Hamers-Casterman, *et al.*, *Nature* 363:446-448 (1993) y Dumoulin, *et al.*, *Protein Science* 11:500-515 (2002)) o de tiburón (p. ej., Ig-NAR de tiburón Nanobodies[®]); y (vii) un nanocuerpo, una región de cadena pesada que contiene el dominio variable y dos dominios constantes.

Tal como se utiliza en la presente, la expresión «propiedad funcional» es una propiedad de un polipéptido (p. ej., un inmunolígador) para el que una mejora (p. ej., en relación con un polipéptido convencional) es deseable y/o ventajosa para un experto en la técnica, p. ej., con el fin de mejorar las propiedades de fabricación o la eficacia terapéutica del polipéptido. En una realización, la propiedad funcional es estabilidad (p. ej., estabilidad térmica). En otra realización, la propiedad funcional es solubilidad (p. ej., en condiciones celulares). En otra realización más, la propiedad funcional es la no agregación. Incluso en otra realización, la propiedad funcional es la expresión de proteínas (p. ej., en células procariotas). En otra realización más, la propiedad funcional es una eficiencia de replegamiento después de una solubilización de cuerpos de inclusión en un proceso de purificación correspondiente. En ciertas realizaciones, la afinidad de unión al antígeno no es una propiedad funcional que se desea mejorar.

El término «epítopo» o «determinante antigenético» se refiere a un sitio en un antígeno (p. ej., en VEGF) al que se une específicamente una inmunoglobulina o un anticuerpo. Un epítopo normalmente incluye al menos 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 o 15 aminoácidos consecutivos o no consecutivos en una conformación espacial singular. Véase, p. ej., Epitope Mapping Protocols in Methods in Molecular Biology, Vol. 66, G. E. Morris, Ed. (1996).

Los términos «unión específica», «unión selectiva», «se une selectivamente» y «se une específicamente» se refieren a un anticuerpo que se une a un epítopo en un antígeno predeterminado. Normalmente, el anticuerpo se une con una afinidad (K_D) de aproximadamente menos de 10^{-7} M, tal como aproximadamente menos de 10^{-8} M, 10^{-9} M o 10^{-10} M o incluso menor.

El término « K_D » o « K_d » se refiere a la constante de equilibrio de disociación de una interacción de anticuerpo-antígeno particular. Normalmente, los anticuerpos se la invención se unen a VEGF con una constante de equilibrio de disociación (K_D) de menos de aproximadamente 10^{-7} M, tal como menos de aproximadamente 10^{-8} M, 10^{-9} M o 10^{-10} M o incluso menor, por ejemplo, tal como se determina utilizando tecnología de resonancia de plasmiones superficiales (SPR, por sus siglas en inglés) en un instrumento BIACORE.

Los términos «neutraliza VEGF», «inhibe VEGF» y «bloquea VEGF» se utilizan indistintamente para hacer referencia a la capacidad de un anticuerpo de la invención para evitar que VEGF interactúe con uno o más receptores de VEGF tales como VEGFR-1 y/o VEGFR-2, y, por ejemplo, desencadene la transducción de señales.

Un «inmunolígador recombinante», tal como se utiliza en la presente, se refiere a un inmunolígador que se produce mediante expresión a partir de ADN recombinante.

Un inmunolígador "químérico", tal como se utiliza en la presente, tiene una parte de la cadena pesada y/o ligera idéntica u homóloga a secuencias correspondientes en anticuerpos derivados de una especie particular o que pertenecen a una clase o subclase particular de anticuerpos, mientras que el resto de la cadena o cadenas es idéntica u homóloga a secuencias correspondientes en anticuerpos derivados de otra especie o que pertenecen a otra clase o subclase de anticuerpos, así como fragmentos de tales anticuerpos. Un anticuerpo humanizado, tal como se utiliza en la presente, es un subgrupo de anticuerpos químéricos.

«Anticuerpos humanizados», tal como se utilizan en la presente, son inmunolígadores que se han sintetizado utilizando tecnología de ADN recombinante para eludir la respuesta inmunitaria a antígenos exógenos. La humanización es una técnica bien consolidada para reducir la inmunogenicidad de anticuerpos monoclonales de fuentes xenogénicas. Esto implica la elección de un armazón aceptor, preferentemente un armazón aceptor humano, la extensión de las CDR del inmunolígador donante que se han de insertar en el armazón aceptor y la sustitución de residuos procedentes del armazón donante en el armazón aceptor. En la Patente de EE. UU. N.º 5 225 539, Winter divulga un método general para injertar CDR en marcos aceptores humanos. El documento US6 407 213 divulga una serie de posiciones de aminoácidos del marco en las que se prefiere una sustitución del inmunolígador donante.

El término «molécula de ácido nucleico» se refiere a moléculas de ADN y moléculas de ARN. Una molécula de ácido nucleico puede ser monocatenaria o bicatenaria, pero es preferentemente ADN bicatenario. Un ácido nucleico está «unido operativamente» cuando se establece una relación funcional con otra secuencia de ácido nucleico. Por ejemplo, un promotor o potenciador está unido operativamente a una secuencia codificante si el promotor influye en la transcripción de la secuencia.

- El término «vector» se refiere a una molécula de ácido nucleico capaz de transportar otro ácido nucleico al que se ha ligado. Un tipo de vector es un «plásmido», que se refiere a un bucle de ADN bicatenario circular en que se pueden ligar segmentos de ADN adicionales. Otro tipo de vector es un vector vírico, donde pueden ligarse segmentos de ADN adicionales en el genoma vírico. Determinados vectores tienen capacidad de replicación autónoma en una célula hospedadora en la que se introducen (por ejemplo, vectores bacterianos que tienen un origen de replicación bacteriano y vectores episómicos de mamífero). Se pueden integrar otros vectores (por ejemplo, vectores no episómicos de mamífero) en el genoma de una célula hospedadora tras la introducción en la célula hospedadora, y de este modo se replican junto con el genoma hospedador.

5 El término «célula hospedadora» se refiere a una célula en la que se ha introducido un vector de expresión. Las células hospedadoras pueden incluir células bacterianas, microbianas, vegetales o de animales. Las bacterias, que son susceptibles de transformación, incluyen miembros de las enterobacterias, tales como cepas de *Escherichia coli* o *Salmonella*; *Bacillaceae*, tales como *Bacillus subtilis*; neumococos; estreptococos, y *Haemophilus influenzae*. Los microbios adecuados incluyen *Saccharomyces cerevisiae* y *Pichia pastoris*. Las líneas celulares hospedadoras de animal adecuadas incluyen células CHO (líneas de ovario de hámster chino) y NS0.

10 Los términos «tratar», «que trata/n» y «tratamiento» se refieren a medidas terapéuticas o preventivas descritas en la presente. Los métodos de «tratamiento» emplean la administración a un sujeto, que necesita tal tratamiento, un anticuerpo de la presente invención, por ejemplo, un sujeto que padece un trastorno mediado por VEGF o un sujeto que puede desarrollar un trastorno de este tipo a la larga, con el fin de prevenir, curar, retrasar, reducir la gravedad de, o mejorar uno o más síntomas del trastorno o trastorno recurrente, o con el fin de prolongar la supervivencia de un sujeto superando la esperada en ausencia de tal tratamiento.

15 20 El término «trastorno mediado por VEGF» se refiere a cualquier trastorno, la aparición, la evolución o la persistencia de los síntomas o estados patológicos de este que requiere la participación de VEGF. Como trastornos ilustrativos mediados por VEGF se incluyen, pero sin limitación, degeneración macular senil, glaucoma neovascular, retinopatía diabética, retinopatía de la prematuridad, fibroplasia retrolenticular, carcinomas de mama, carcinomas pulmonares, carcinomas gástricos, carcinomas esofágicos, carcinomas colorrectales, carcinomas hepáticos, carcinomas ováricos, sarcomas, arrenoblastomas, carcinomas cervicouterinos, carcinoma endometrial, hiperplasia endometrial, endometriosis, fibrosarcomas, coriocarcinoma, cáncer de cabeza y cuello, carcinoma nasofaríngeo, carcinomas laríngeos, hepatoblastoma, sarcoma de Kaposi, melanoma, carcinomas de piel, hemangioma, hemangioma cavernoso, hemangioblastoma, carcinomas pancreáticos, retinoblastoma, astrocitoma, glioblastoma, schwannoma, oligodendrogioma, meduloblastoma, neuroblastomas, rabdomiosarcoma, sarcoma osteogénico, 30 35 leiomiosarcomas, carcinomas de las vías urinarias, carcinomas de tiroides, tumor de Wilms, carcinoma de células renales, carcinoma prostático, proliferación vascular anómala asociada con facomatosis, edema (tal como el asociado con tumores cerebrales), síndrome de Meigs, artritis reumatoide, psoriasis y ateroesclerosis.

40 45 El término «dosis eficaz» o «dosificación eficaz» se refiere a una cantidad suficiente para conseguir o al menos conseguir parcialmente el efecto deseado. El término «dosis terapéuticamente eficaz» se define como una cantidad suficiente para curar o al menos detener parcialmente la enfermedad y sus complicaciones en un paciente que ya está sufriendo la enfermedad. Las cantidades eficaces para este uso dependerán de la gravedad del trastorno que se esté tratando y el estado general del propio sistema inmunitario del paciente.

50 55 60 El término «sujeto» se refiere a cualquier animal humano o no humano. Por ejemplo, los métodos y las composiciones de la presente invención se pueden utilizar para tratar un sujeto con un trastorno mediado por VEGF.

50 El término «Min-injerto» o «min», tal como se utiliza en la presente, se refiere a un dominio variable humanizado que se generó injertando CDR de conejo procedentes de un dominio variable de conejo en un armazón acceptor humano de origen natural (FW 1.4, SEQ ID No. 172). No se realizaron cambios en las regiones de armazón. El propio armazón se preseleccionó en función de propiedades funcionales deseables (solubilidad y estabilidad).

55 El término «Max-injerto» o «max», tal como se utiliza en la presente, se refiere a un dominio variable humanizado que se generó injertando CDR de conejo procedentes de un dominio variable de conejo en el marco acceptor humano, «conejizado» «RabTor» (rFW1.4, SEQ ID No. 173) o en un derivado de este denominado rFW1.4(v2) (SEQ ID No. 174). El armazón «RabTor» se preparó incorporando residuos de conejo conservados (que por lo demás son bastante variables en otras especies) en posiciones del armazón involucradas generalmente en la estructura y estabilidad del dominio variable de conejo, con el objetivo de generar un armazón aplicable universalmente que acepte prácticamente cualquier conjunto de CDR de conejo sin la necesidad de injertar residuos del armazón donante aparte de en posiciones que son diferentes en su presunta secuencia progenitora, p. ej., que se alteraron durante la hipermutación somática y, por tanto, contribuyen posiblemente a la unión a antígeno. La presunta secuencia progenitora se define de modo que sea la parte complementaria de la línea germinal de conejo más próxima y, en el caso de que no se pueda determinar la parte complementaria de la línea

germinal más próxima, el consenso de un subgrupo de conejo o el consenso de secuencias de conejo con un porcentaje de similitud alto.

5 El término «Min-Max» o «minmax», tal como se utiliza en la presente, se refiere a un dominio variable humanizado constituido por una cadena ligera variable de «Min-injerto» combinada con una cadena pesada variable de «Max-injerto».

10 El término «Max-Min» o «maxmin», tal como se utiliza en la presente, se refiere a un dominio variable humanizado constituido por una cadena ligera variable de «Max-injerto» combinada con una cadena pesada variable de «Min-injerto».

15 Se utilizaron diferentes nomenclaturas para los inmunoligadores generados. Estos se identifican normalmente mediante un número (p. ej., #578). En aquellos casos en los que se utiliza un prefijo tal como EP o Epi (p. ej., EP 578 que es idéntico a Epi 578), se indica así el mismo inmunoligador. Ocasionalmente, un inmunoligador recibió una segunda denominación que se identifica mediante el prefijo «ESBA». Por ejemplo, ESBA903 designa el mismo inmunoligador que 578minmax o EP578minmax o Epi578minmax.

20 A menos que se definan de otro modo, todos los términos técnicos y científicos utilizados en la presente tienen el mismo significado con el que los entiende normalmente un experto en la técnica a la que pertenece esta invención. En caso de conflicto, prevalecerá la presente memoria descriptiva, incluidas las definiciones. Además, los materiales, métodos y ejemplos son solamente ilustrativos y no se pretende que sean limitantes.

25 Varios aspectos de la invención se describen más detalladamente en las siguientes subsecciones. Se entiende que las diferentes realizaciones, preferencias e intervalos se pueden combinar según se deseé. Además, dependiendo de la realización específica, puede que no se apliquen definiciones, realizaciones o intervalos seleccionados.

Inmunoligadores anti-VEGF

30 En un aspecto, la presente invención proporciona inmunoligadores que se unen al VEGF y, por tanto, son adecuados para bloquear la función del VEGF *in vivo*. Las CDR de estos inmunoligadores proceden de anticuerpos monoclonales anti-VEGF de conejo que se obtuvieron a partir de conejos que se inmunizaron con VEGF humano y/o con un fragmento de este (SEQ ID No.1). A nuestro entender, esta es la primera vez que se obtuvieron anticuerpos anti-VEGF monoclonales a partir de conejos y se caracterizaron en detalle. Sorprendentemente, las afinidades (Kd) resultaron ser extraordinariamente altas.

35 En determinados aspectos, la divulgación no reivindicada proporciona un inmunoligador, que se une específicamente al VEGF, que comprende al menos una de una secuencia de aminoácidos de CDRH1, CDRH2, CDRH3, CDRL1, CDRL2 o CDRL3. Las secuencias de aminoácidos de CDR ilustrativas para su uso en los inmunoligadores se exponen en las SEQ ID No: 2-72 (Tablas 1-6).

Tabla 1. Secuencias de aminoácidos CDR H1 de inmunoligadores anti-VEGF

Identificador de secuencia	CDR-H1	SEQ ID NO.
60-11-4	GFPFSSGYWVC	2
60-11-6	GFSFSSGYWIC	3
435	GFSLNTNYWMC	4
453	GFSFSRSYYIY	5
375	GFSFTTTDYMC	6
610	GIDFSGAYYMG	7
578	GFSLTDYYYMT	8
534	GFSLSYYYMS	9
567	GFSLSDYYMC	10
509	GFSLSSYYMC	11
511	GFSLNYYYMN	12
509maxII	GFSLSSYYMS	13
Consenso	GFSLSSGGYYMC	14

Tabla 2. Secuencias de aminoácidos CDR H2 de inmunoligadores antiVEGF

Identificador de secuencia	CDR-H2	SEQ ID NO.
60	CIYAGSSGSTYYASWAKG	15
435	CMYTGSYNRAYYASWAKG	16
453	CIDAGSSGILVYANWAKG	17
375	CILAGDGSTYYANWAKG	18
610	YIDYDGDRYYASWAKG	19
578	FIDPDDDPYYATWAKG	20
534	IIGPGDYTDYASWAKG	21
567	CLDYFGSTDDASWAKG	22
509	CLDYVGDTDYASWAKG	23
511	IIAPDDTTYYASWAKS	24
509maxII	ILDYVGDTDYASWAKG	25
Consenso	CIDAGSDGDTYYASWAKG	26

Tabla 3. Secuencias de aminoácidos CDR H3 de inmunoligadores antiVEGF

Identificador de secuencia	CDR-H3	SEQ ID NO.
60	GNNYYIYTDGGYAYAGLEL	27
435	GSNWYSDL	28
453	GDASYGVDSFMLPL	29
375	SDPASSWSFAL	30
610	SDYSSSGWGLDI	31
578	GDHNSGWGLDI	32
534	GDDNSGWGEDI	33
567	TDDSRGWGLNI	34
509	TDDSRGWGLNI	35
511	SGDTTAWGADI	36
Consenso	GDDSSGYTDGGYAYWGLDI	37

Tabla 4. Secuencias de aminoácidos CDR L1 de inmunoligadores anti-VEGF

Identificador de secuencia	CDR-L1	SEQ ID NO.
60	QASQSISSYLS	38
435	QASQSIGSSLA	39
453	QSSQSVVNNNRLA	40
375	QASENINIWLS	41
610	QASQSISSWLS	42
578	QASEIIHSWUX	43
534	QASQSINIWLS	44
567	QADQSIYIWLS	45
509	QASQNIRIWLS	46
511	QASQSINIWC	47
511max	QASQSINIWLS	48
Consenso	QASQSININNWLS	49

Tabla 5. Secuencias de aminoácidos CDR L2 de inmunoligadores anti-VEGF.

Identificador de secuencia	CDR-L2	SEQ ID NO.
60	KASTLAS	50
435	TAANLAS	51
453	YASTLAS	52
375	QASKLAS	53
610	QASTLAS	54
578	LASTLAS	55
534	KESTLAS	56
567	KASTLES	57
509	KASTLES	58
511	RASTLAS	59
Consenso	KASTLAS	60

Tabla 6. Secuencias de aminoácidos CDR L3 de inmunoligadores anti-VEGF.

Identificador de secuencia	CDR-L3	SEQ ID NO.
60	QSNYGGSSSDYGNP	61
435	QNFATSDTVT	62
453	AGGYSSTSNDT	63
375	QNNYSYNRYGAP	64
610	QNNYGFRSYGGA	65
578	QNVYLASTNGAN	66
534	QNNYDSGNNGFP	67
567	QNNAHYSTNGGT	68
509	QNNAHYSTNGGT	69
511	QANYAYSAGYGAA	70
Consenso	QNNYHYSSSTNGGT	71

- En un aspecto, la divulgación no reivindicada proporciona un inmunolígador que comprende al menos una CDR que tiene una similitud de al menos 75 %, preferentemente una identidad de al menos 75 %, más preferentemente una identidad de al menos 80 %, 85 %, 90 % 95 %, incluso más preferentemente de 100 %, con una secuencia consenso del grupo que consiste en SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 26, SEQ ID NO: 37, SEQ ID NO: 49, SEQ ID NO: 60 y SEQ ID NO: 71. Preferentemente, el VH de dicho inmunolígador comprende las CDR del grupo que consiste en SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 26 y/o SEQ ID NO: 37 y/o las CDR del VL de dicho inmunolígador comprende las CDR del grupo que consiste en SEQ ID NO: 49, SEQ ID NO: 60 y SEQ ID NO: 71. Preferentemente, la CDR se selecciona del grupo que consiste en SEQ ID NO: 2 a SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 15 a SEQ ID NO: 25, SEQ ID NO: 27 a SEQ ID NO: 36, SEQ ID NO: 38 a SEQ ID NO: 48, SEQ ID NO: 50 a SEQ ID NO: 59 y SEQ ID NO: 61 a SEQ ID NO: 70.
- En otro aspecto, la divulgación no reivindicada proporciona un inmunolígador que comprende al menos un CDR que tiene una similitud de al menos 75 %, preferentemente una identidad de al menos 75 %, más preferentemente una identidad de al menos 80 %, 85 %, 90 % 95 %, incluso más preferentemente de 100 %, con una secuencia consenso del grupo que consiste en SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 27, SEQ ID NO: 38, SEQ ID NO: 50 y SEQ ID NO: 61.
- Preferentemente, el VH de dicho inmunolígador comprende las CDR del grupo que consiste en SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 15 y SEQ ID NO: 27 y/o las CDR del VL de dicho inmunolígador comprende las CDR del grupo que consiste en SEQ ID NO: 38, SEQ ID NO: 50 y SEQ ID NO: 61. En otra realización preferida, el VH de dicho inmunolígador comprende las CDR del grupo que consiste en SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 15 y SEQ ID NO: 27 y/o las CDR del VL de dicho inmunolígador comprende las CDR del grupo que consiste en SEQ ID NO: 38, SEQ ID NO: 50 y SEQ ID NO: 61.

ID NO: 69. Como alternativa, el VH de dicho inmunolígador puede comprender las CDR del grupo que consiste en SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 25 y/o SEQ ID NO: 35 y/o las CDR del VL de dicho inmunolígador comprende las CDR del grupo que consiste en SEQ ID NO: 46, SEQ ID NO: 58 y SEQ ID NO: 69.

- 5 En otro aspecto, la divulgación no reivindicada proporciona un inmunolígador que comprende al menos un CDR que tiene una similitud de al menos 75 %, preferentemente una identidad de al menos 75 %, más preferentemente una identidad de al menos 80 %, 85 %, 90 % 95 %, incluso más preferentemente de 100 %, con una secuencia consenso del grupo que consiste en SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 24, SEQ ID NO: 36, SEQ ID NO: 47, SEQ ID NO: 48, SEQ ID NO: 59 y SEQ ID NO: 70. Preferentemente, el VH de dicho inmunolígador comprende las CDR del grupo que consiste en SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 24 y SEQ ID NO: 36. Adicionalmente o como alternativa, la VL de dicho inmunolígador comprende las CDR del grupo que consiste en SEQ ID NO: 47, SEQ ID NO: 48, SEQ ID NO: 59 y SEQ ID NO: 70, p. ej., SEQ ID NO: 47, SEQ ID NO: 59 y SEQ ID NO: 70; o SEQ ID NO: 48, SEQ ID NO: 59 y SEQ ID NO: 70.
- 10
- 15 En una realización muy preferida, el inmunolígador divulgado en la presente, neutraliza el VEGF humano y reacciona de forma cruzada con el VEGF de rata/ratón o con una parte del mismo.

El inmunolígador puede comprender un anticuerpo o cualquier soporte de unión alternativo capaz de albergar CDR. Las CDR expuestas en las SEQ ID No: 2-72 se pueden injertar en cualquier soporte de unión adecuado utilizando cualesquier métodos reconocidos en la técnica (véanse, por ejemplo, Riechmann, L. et al. (1998) *Nature* 332:323-327; Jones, P. et al. (1986) *Nature* 321:522-525; Queen, C. et al. (1989) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 86:10029-10033; la Patente de EE. UU. N.º 5 225 539 de Winter, y las Patentes de EE. UU. N.ºs 5 530 101, 5 585 089, 5 693 762 y 6 180 370 de Queen et al.). Sin embargo, se prefiere que los inmunolígadores que se dan a conocer en la presente estén humanizados y, por tanto, son adecuados para aplicaciones terapéuticas.

- 20
- 25 En el caso de anticuerpos, las CDR de conejo expuestas en las SEQ ID No: 2-72 se pueden injertar en las regiones de armazón de cualquier anticuerpo de cualquier especie. Sin embargo, se ha descubierto previamente que los anticuerpos o derivados de anticuerpo que comprenden los armazones identificados en el denominado cribado de «control de calidad» (documento WO0148017) se caracterizan por una estabilidad y/o solubilidad generalmente alta y, por tanto, también pueden ser útiles en el contexto de aplicaciones extracelulares tales como la neutralización de VEGF humano. Es más, se ha descubierto además que una combinación particular de estos armazones solubles y estables de VL (cadena ligera variable) y VH (cadena pesada variable) es particularmente adecuada para albergar CDR de conejo. Por consiguiente, en una realización, las CDR expuestas en las SEQ ID No: 2-72 se injertan en los marcos de anticuerpo humano obtenidos mediante el cribado de «control de calidad» divulgado en el documento EP1479694. Las secuencias de aminoácidos de marcos ilustrativos se exponen en las SEQ ID No: 172 a 174. Se descubrió sorprendentemente que al injertar en dicho armazón o sus derivados, se podía mantener por completo la conformación de bucle de una gran diversidad de CDR de conejo, con gran independencia de la secuencia del armazón donante. Es más, dicho armazón o sus derivados que contienen diferentes CDR de conejo se expresan y producen bien al contrario que las cadenas independientes naturales de conejo y siguen conservando casi por completo la afinidad de los anticuerpos de conejo donantes originales.
- 30
- 35
- 40

Por tanto, en una realización preferida, las CDR y/o los motivos de CDR que se divultan en el presente documento están presentes en una secuencia de armazón de la región variable de cadena pesada que tiene una identidad de secuencia de al menos 80 %, más preferentemente de al menos 85 %, 90 % 95 %, incluso más preferentemente una identidad de 100 % con la secuencia de SEQ ID NO: 169. En una realización preferida, la secuencia de armazón de la región variable de cadena pesada comprende SEQ ID NO: 170 o SEQ ID NO: 171.

- 45
- 50 En una realización preferida, las CDR y/o motivos de CDR divulgados en la presente, están presentes en una secuencia de armazón de la región variable de cadena ligera que tiene una identidad de secuencia de al menos 85 %, más preferentemente de al menos 90 %, 95 %, incluso más preferentemente una identidad de 100 %, con la secuencia de SEQ ID NO: 167, más preferentemente que comprende la SEQ ID NO: 167 o SEQ ID NO: 168.

- 55 En anticuerpos de conejo, las CDR pueden contener residuos de cisteína que se unen a través de puentes disulfuro a residuos de cisteína en el armazón del anticuerpo. Por consiguiente, puede ser necesario, a la hora de injertar CDR de conejo que contienen residuos de cisteína en regiones de armazón que no son de conejo, introducir residuos de cisteína en el armazón que no es de conejo mediante, por ejemplo, mutagénesis para facilitar la estabilización de CDR de conejo a través de una unión de disulfuro.

- 60 En otro aspecto, la divulgación no reivindicada proporciona un inmunolígador, que se une específicamente al VEGF, que comprende al menos una secuencia de aminoácidos de VH o de VL.

Las secuencias de aminoácidos de VH o VL ilustrativas para su uso en los inmunolígadores se exponen en las SEQ ID No: 72-106 y 107-166, respectivamente.

- En un aspecto preferido, la divulgación no reivindicada proporciona un inmunolígador que comprende una VH que tiene una identidad de al menos 80 %, más preferentemente de al menos 85 %, 90 %, 95 %, con la mayor preferencia una identidad de 100 %, con una secuencia seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 107, SEQ ID NO: 108, SEQ ID NO: 118, SEQ ID NO: 119, SEQ ID NO: 130 y SEQ ID NO: 131 (VH 60-11-4, VH 60-11-6, VH 60-11-4min, VH 60-11-6min, VH 60-11-4max y VH 60-11-6max, respectivamente);
- y/o una VL que tiene una identidad de al menos 80 %, más preferentemente de al menos 85 %, 90 %, 95 %, con la mayor preferencia una identidad de 100 %, con una secuencia seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 72, SEQ ID NO: 82 y SEQ ID NO: 93 (VL 60, VL 60min, VL 60max, respectivamente).
- En otro aspecto, la divulgación no reivindicada proporciona un inmunolígador que comprende una VH que tiene una identidad de al menos 80 %, más preferentemente de al menos 85 %, 90 %, 95 %, con la mayor preferencia una identidad de 100 %, con una secuencia seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 109, SEQ ID NO: 120 y SEQ ID NO: 132 (VH 435, VH 435min y VH 435max, respectivamente);
- y/o una VL que tiene una identidad de al menos 80 %, más preferentemente de al menos 85 %, 90 %, 95 %, con la mayor preferencia una identidad de 100 %, con una secuencia seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 73, SEQ ID NO: 83 y SEQ ID NO: 94 (VL 435, VL 435min y VL 435max, respectivamente).
- Preferentemente, dicho inmunolígador tiene una identidad de al menos 80 %, más preferentemente de al menos 85 %, 90 %, 95 %, con la mayor preferencia una identidad de 100 %, con la SEQ ID NO: 175 (435max).
- En otro aspecto, la divulgación no reivindicada proporciona un inmunolígador que comprende una VH que tiene una identidad de al menos 80 %, más preferentemente de al menos 85 %, 90 %, 95 %, con la mayor preferencia una identidad de 100 %, con una secuencia seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 110, SEQ ID NO: 121 y SEQ ID NO: 133 (VH 453, VH 453min y VH 453max, respectivamente);
- y/o una VL que tiene una identidad de al menos 80 %, más preferentemente de al menos 85 %, 90 %, 95 %, con la mayor preferencia una identidad de 100 %, con una secuencia seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 74, SEQ ID NO: 84 y SEQ ID NO: 95 (VL 453, VL 453min y VL 453max, respectivamente).
- En otro aspecto, la divulgación no reivindicada proporciona un inmunolígador que comprende una VH que tiene una identidad de al menos 80 %, más preferentemente de al menos 85 %, 90 %, 95 %, con la mayor preferencia una identidad de 100 %, con una secuencia seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 111, SEQ ID NO: 122 y SEQ ID NO: 134 (VH 375, VH 375min y VH 375max, respectivamente);
- y/o una VL que tiene una identidad de al menos 80 %, más preferentemente de al menos 85 %, 90 %, 95 %, con la mayor preferencia una identidad de 100 %, con una secuencia seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 75, SEQ ID NO: 85 y SEQ ID NO: 96 (VL 375, VL 375min y VL 375max, respectivamente).
- En otro aspecto, la divulgación no reivindicada proporciona un inmunolígador que comprende una VH que tiene una identidad de al menos 80 %, más preferentemente de al menos 85 %, 90 %, 95 %, con la mayor preferencia una identidad de 100 %, con una secuencia seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 112, SEQ ID NO: 123 y 135 (VH 610, VH 610min y VH 610max, respectivamente);
- y/o una VL que tiene una identidad de al menos 80 %, más preferentemente de al menos 85 %, 90 %, 95 %, con la mayor preferencia una identidad de 100 %, con una secuencia seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 76, SEQ ID NO: 86 y SEQ ID NO: 97 (VL 610, VL 610min y VL 610max, respectivamente).
- En otro aspecto, la divulgación no reivindicada proporciona un inmunolígador que comprende una VH que tiene una identidad de al menos 80 %, más preferentemente de al menos 85 %, 90 %, 95 %, con la mayor preferencia una identidad de 100 %, con una secuencia seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 113, SEQ ID NO: 124, SEQ ID NO: 129, SEQ ID NO: 136, SEQ ID NO: 142, SEQ ID NO: 144, SEQ ID NO: 146, SEQ ID NO: 147, SEQ ID NO: 148, SEQ ID NO: 149, SEQ ID NO: 150, SEQ ID NO: 151, SEQ ID NO: 152, SEQ ID NO: 153, SEQ ID NO: 154, SEQ ID NO: 155, SEQ ID NO: 156, SEQ ID NO: 157, SEQ ID NO: 158, SEQ ID NO: 159, SEQ ID NO: 160, SEQ ID NO: 161, SEQ ID NO: 162, SEQ ID NO: 163, SEQ ID NO: 164, SEQ ID NO: 165 y SEQ ID NO: 166 (VH 578 y sus variantes);
- y/o una VL que tiene una identidad de al menos 80 %, más preferentemente de al menos 85 %, 90 %, 95 %, con la mayor preferencia una identidad de 100 %, con una secuencia seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 77, SEQ ID NO: 87, SEQ ID NO: 92, SEQ ID NO: 98, SEQ ID NO: 103, SEQ ID NO: 104 y SEQ ID NO: 105 (VL 578 y sus variantes).

Preferentemente, dicho inmunolígador tiene una identidad de al menos 80 %, más preferentemente de al menos 85 %, 90 %, 95 %, con la mayor preferencia una identidad de 100 %, con la SEQ ID NO: 178 (578min), SEQ ID NO: 179 (578max) o SEQ ID NO: 180 (578minmax).

- 5 En otro aspecto, la divulgación no reivindicada proporciona un inmunolígador que comprende una VH que tiene una identidad de al menos 80 %, más preferentemente de al menos 85 %, 90 %, 95 %, con la mayor preferencia una identidad de 100 %, con una secuencia seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 114, SEQ ID NO: 125 y SEQ ID NO: 137 (VH 534, VH 534min y VH 534max, respectivamente);
- 10 y/o una VL que tiene una identidad de al menos 80 %, más preferentemente de al menos 85 %, 90 %, 95 %, con la mayor preferencia una identidad de 100 %, con una secuencia seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 78, SEQ ID NO: 88 y SEQ ID NO: 99 (VL 534, VL 534min y VL 534max, respectivamente).
- 15 En otro aspecto, la divulgación no reivindicada proporciona un inmunolígador que comprende una VH que tiene una identidad de al menos 80 %, más preferentemente de al menos 85 %, 90 %, 95 %, con la mayor preferencia una identidad de 100 %, con una secuencia seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 115, SEQ ID NO: 126, SEQ ID NO: 138 y SEQ ID NO: 143 (VH 567, VH 567min y VH 567max, respectivamente);
- 20 y/o una VL que tiene una identidad de al menos 80 %, más preferentemente de al menos 85 %, 90 %, 95 %, con la mayor preferencia una identidad de 100 %, con una secuencia seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 79, SEQ ID NO: 89 y SEQ ID NO: 100 (VL 567, VL 567min y VL 567max, respectivamente).
- 25 Preferentemente, dicho inmunolígador tiene una identidad de al menos 80 %, más preferentemente de al menos 85 %, 90 %, 95 %, con la mayor preferencia una identidad de 100 %, con la SEQ ID NO: 177 (567min).
- 30 En otro aspecto, la divulgación no reivindicada proporciona un inmunolígador que comprende una VH que tiene una identidad de al menos 80 %, más preferentemente de al menos 85 %, 90 %, 95 %, con la mayor preferencia una identidad de 100 %, con una secuencia seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 116, SEQ ID NO: 127, SEQ ID NO: 139 y SEQ ID NO: 140 (VH 509, VH 509min, VH 509max y VH 509maxII, respectivamente);
- 35 y/o una VL que tiene una identidad de al menos 80 %, más preferentemente de al menos 85 %, 90 %, 95 %, con la mayor preferencia una identidad de 100 %, con una secuencia seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 80, SEQ ID NO: 90 y SEQ ID NO: 101 (VL 509, VL 509min y VL 509max, respectivamente).
- 40 En otro aspecto, la divulgación no reivindicada proporciona un inmunolígador que comprende una VH que tiene una identidad de al menos 80 %, más preferentemente de al menos 85 %, 90 %, 95 %, con la mayor preferencia una identidad de 100 %, con una secuencia seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 117, SEQ ID NO: 128, SEQ ID NO: 141 y SEQ ID NO: 145 (VH 511, VH 511min, VH 511max y VH 511maxDHP, respectivamente);
- 45 y/o una VL que tiene una identidad de al menos 80 %, más preferentemente de al menos 85 %, 90 %, 95 %, con la mayor preferencia una identidad de 100 %, con una secuencia seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 81, SEQ ID NO: 91, SEQ ID NO: 102 y SEQ ID NO: 106 (VL 511, VL 511min, VL 511max y VL 511minC41L, respectivamente).
- 50 Preferentemente, dicho inmunolígador tiene una identidad de al menos 80 %, más preferentemente de al menos 85 %, 90 %, 95 %, con la mayor preferencia una identidad de 100 %, con la SEQ ID NO: 176 (511_max).
- 55 En determinados aspectos, la divulgación no reivindicada proporciona además un inmunolígador, que se une específicamente al VEGF, que comprende una secuencia de aminoácidos con una similitud sustancial respecto a una secuencia de aminoácidos expuesta en las SEQ ID No: 2-166 y en las SEQ ID No: 175-180, y en donde el inmunolígador conserva o mejora esencialmente las propiedades funcionales deseadas del inmunolígador anti-VEGF de la invención. Las similitudes porcentuales preferidas incluyen, pero sin limitación, una identidad de al menos 50 %, 60 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 % o 95 %.
- 60 En determinados aspectos, la divulgación no reivindicada proporciona además un inmunolígador, que se une específicamente al VEGF, que comprende una secuencia de aminoácidos con una identidad sustancial respecto a una secuencia de aminoácidos expuesta en las SEQ ID No: 2-166 y en las SEQ ID No. 175-180, y en donde el inmunolígador conserva o mejora las propiedades funcionales deseadas del inmunolígador anti-VEGF de la invención. Las identidades porcentuales preferidas incluyen, pero sin limitación, una identidad de al menos 50 %, 60 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 % o 95 %.

En determinados aspectos, la divulgación no reivindicada proporciona además un inmunolígador, que se une específicamente al VEGF, que comprende una secuencia de aminoácidos con sustituciones conservadoras respecto a una secuencia de aminoácidos expuesta en las SEQ ID No: 2-166 y en las SEQ ID No. 175-180, y en

donde el inmunolígador conserva o mejora las propiedades funcionales deseadas del inmunolígador anti-VEGF de la invención.

5 En algunos aspectos, la divulgación no reivindicada proporciona inmunolígadores que se unen específicamente al VEGF humano y que reaccionan de forma cruzada con moléculas de VEGF de otras especies, por ejemplo, VEGF de ratón, VEGF de rata, VEGF de conejo o VEGF de cobaya. En una realización particular, el inmunolígador anti-VEGF se puede unir específicamente a VEGF humano y/o de rata/ratón.

10 En algunos aspectos, la divulgación no reivindicada proporciona inmunolígadores que se unen específicamente al VEGF humano y que no reaccionan de forma cruzada con moléculas de VEGF de otras especies, por ejemplo, VEGF de ratón, VEGF de rata, VEGF de conejo o VEGF de cobaya.

15 En algunos aspectos, la divulgación no reivindicada proporciona inmunolígadores que se unen específicamente al VEGF humano y en donde los inmunolígadores están madurados por afinidad.

20 En una realización, los anticuerpos y fragmentos de anticuerpo de la presente invención son anticuerpos monocatenarios (scFv) o fragmentos Fab. En el caso de anticuerpos scFv, se puede unir un dominio VL seleccionado a un dominio VH seleccionado en cualquier orientación mediante un conector flexible. Un conector adecuado del estado de la técnica consiste en secuencias de aminoácidos GGGGS repetidas o variantes de estas.

25 En una realización preferida de la presente invención, un conector (GGGGS)₄ de la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 181, pero también son posibles variantes de 1-3 repeticiones (Holliger *et al.*, (1993), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:6444-6448). Otros conectores que pueden utilizarse en la presente invención se describen en Alfthan *et al.*, (1995), *Protein Eng.* 8:725-731, Choi *et al.*, (2001), *Eur. J. Immunol.* 31:94-106, Hu *et al.*, (1996), *Cancer Res.* 56:3055-3061, Kipriyanov *et al.*, (1999), *J. Mol. Biol.* 293:41-56 y Roovers *et al.*, (2001),

25 *Cancer Immunol. Immunother.* 50:51-59. La disposición puede ser bien VL-conector-VH o bien VH-conector-VL, siendo la primera orientación la preferida. Sin embargo, también se contemplan anticuerpos de dominio VL o VL único. En el caso de fragmentos Fab, se fusionan dominios variables de cadena ligera VL seleccionados con la región constante de una cadena kappa de Ig humana, mientras que los dominios variables de cadena pesada VH adecuados se fusionan con el primer dominio constante (aminoterminal) CH1 de una IgG humana. En el extremo

30 C del dominio constante o en otros sitios del dominio variable o constante, se puede formar un puente disulfuro intercatenario. Como alternativa, las dos cadenas también pueden unirse mediante un conector flexible para dar como resultado un anticuerpo Fab monocatenario.

35 Los anticuerpos o derivados de anticuerpo de la presente invención pueden tener afinidades por el VEGF humano con constantes de disociación K_d en un intervalo de $10^{-14}M$ a $10^{-5}M$. En una realización preferida de la presente invención, la K_d es $\leq 1 \text{ nM}$. La afinidad de un anticuerpo por un antígeno se puede determinar experimentalmente utilizando un método adecuado (Berzofsky *et al.*, «Antibody-Antigen Interactions», en *Fundamental Immunology*, Paul, W.E., Ed, Raven Press: Nueva York, NY (1992); Kuby, *J. Immunology*, W.H. Freeman and Company: Nueva York, NY) y métodos descritos en ellos.

40 40 La empresa Epitomics vende una anticuerpo anti-VEGF que es un anticuerpo monoclonal de conejo (VEGF (C-term) Rabbit Antibody, N.º de catálogo 1909-1). Dicho anticuerpo se dirige a residuos en el extremo C de VEGF humano y, por lo tanto, no es capaz de neutralizar VEGF. Por ende, dicho anticuerpo no es adecuado para aplicaciones terapéuticas. Es más, dicha IgG monoclonal no es un anticuerpo humanizado sino que es una inmunoglobulina completa de conejo natural. Además, se ha demostrado que este anticuerpo no reconoce la forma nativa de VEGF.

Inmunolígadores que se unen a los mismos epítopos en VEGF

50 50 En otro aspecto, la divulgación no reivindicada proporciona anticuerpos que se unen a un epítopo en VEGF reconocido por un anticuerpo que comprende una cualquiera de las secuencias de aminoácidos expuestas en las SEQ ID No 2-211. Tales anticuerpos se pueden identificar basándose en su capacidad de competir de forma cruzada con un anticuerpo que comprende una cualquiera o más de las secuencias de aminoácidos expuestas en las SEQ ID No 2-211 en ensayos de unión a VEGF estándar que incluyen, pero sin limitación, ELISA. La capacidad de un anticuerpo de ensayo para inhibir la unión al VEGF humano de un anticuerpo que comprende una cualquiera o más de las secuencias de aminoácidos expuestas en las SEQ ID No 2-211, demuestra que el anticuerpo de ensayo puede competir de forma cruzada, por tanto, interaccionar con un epítopo superpuesto en VEGF humano como un anticuerpo que comprende una cualquiera o más de las secuencias de aminoácidos expuestas en las SEQ ID No 2-211.

60 Adicionalmente o como alternativa, tales anticuerpos también se pueden identificar utilizando técnicas de mapeo epítópico estándar para determinar si se unen a los mismos inmunógenos peptídicos. También pueden emplearse técnicas de modelado estructural para definir adicionalmente los determinantes moleculares exactos de la interacción anticuerpo/VEGF, que incluyen, pero sin limitación, RMN, cristalografía de rayos X, modelado por

ordenador o tomografía de proteínas (Banyay *et al.*, 2004 *ASSAY and Drug Development Technologies* (2), 5, págs. 516-567). De hecho, la estructura cristalina de VEGF se ha resuelto y se conocen los residuos aminoácídicos de la superficie que participan en la unión a VEGFr (Fuh, *et al.*, 2006, *J. Biol. Chem.*, 281, 6625-6631). Por consiguiente, dada la secuencia de aminoácidos del inmunógeno peptídico y el conocimiento estructural del VEGF disponible en la técnica, identificar anticuerpos que se unen a un epítopo en VEGF reconocido por los anticuerpos que comprenden una cualquiera o más de las secuencias de aminoácidos expuestas en las SEQ ID No 2-211, entra dentro de las competencias de la técnica.

En algunas realizaciones, los anticuerpos que se unen a un epítopo en VEGF reconocido por un anticuerpo que comprende una cualquiera o más de las secuencias de aminoácidos expuestas en las SEQ ID No 2-211, pueden unirse al VEGF con una afinidad de al menos 10^7 M^{-1} , por ejemplo, al menos 10^7 M^{-1} , al menos 10^8 M^{-1} , al menos 10^9 M^{-1} , al menos 10^{10} M^{-1} , al menos 10^{11} M^{-1} , al menos 10^{12} M^{-1} o al menos 10^{13} M^{-1} .

En algunas realizaciones, los anticuerpos que se unen a un epítopo en VEGF reconocido por un anticuerpo que comprende una cualquiera o más de las secuencias de aminoácidos expuestas en las SEQ ID No 2-211, se unen específicamente al VEGF humano y no reaccionan de forma cruzada con moléculas de VEGF de otras especies, por ejemplo, VEGF de ratón, VGEF de rata, VEGF de conejo o VEGF de cobaya.

En algunas realizaciones, los anticuerpos que se unen a un epítopo en VEGF reconocido por un anticuerpo que comprende una cualquiera o más de las secuencias de aminoácidos expuestas en las SEQ ID No 2-211, reaccionan de forma cruzada con moléculas de VEGF de otras especies, por ejemplo, VEGF de ratón, VGEF de rata o VEGF de conejo.

Variantes optimizadas

Los anticuerpos desvelados, pero no reivindicados, pueden optimizarse además para que tengan propiedades funcionales mejoradas, p. ej., solubilidad y/o estabilidad mejoradas.

En determinadas realizaciones, los anticuerpos de la invención se optimizan de acuerdo con la metodología «consenso funcional». Por ejemplo, los inmunoligadores del VEGF se pueden comparar con una base de datos de scFv seleccionados funcionalmente para identificar posiciones de residuos de aminoácidos que sean más o menos tolerantes a la variabilidad que la posición o posiciones correspondientes en el inmunolígador del VEGF, con lo que se indica que este tipo de posición o posiciones de residuos identificadas puede ser adecuado para la modificación genética para mejorar la funcionalidad, tal como la estabilidad y/o solubilidad. Por ejemplo, en la región variable de cadena pesada de un inmunolígador pueden introducirse una o más de las siguientes sustituciones en una posición de aminoácido (se hace referencia a la numeración AHO de cada una de las posiciones de aminoácidos enumeradas a continuación)

- (a) Q o E en la posición de aminoácido 1;
- (b) Q o E en la posición de aminoácido 6;
- (c) T, S o A en la posición de aminoácido 7, más preferentemente T o A, incluso más preferentemente T;
- (d) A, T, P, V o D, más preferentemente T, P, V o D, en la posición de aminoácido 10,
- (e) L o V, más preferentemente L, en la posición de aminoácido 12,
- (f) V, R, Q, M o K, más preferentemente V, R, Q o M en la posición de aminoácido 13;
- (g) R, M, E, Q o K, más preferentemente R, M, E o Q, incluso más preferentemente R o E, en la posición de aminoácido 14;
- (h) L o V, más preferentemente L, en la posición de aminoácido 19;
- (i) R, T, K o N, más preferentemente R, T o N, incluso más preferentemente N, en la posición de aminoácido 20;
- (j) I, F, L o V, más preferentemente I, F o L, incluso más preferentemente I o L, en la posición de aminoácido 21;
- (k) R o K, más preferentemente K, en la posición de aminoácido 45;

- (l) T, P, V, A o R, más preferentemente T, P, V o R, incluso más preferentemente R, en la posición de aminoácido 47;
- 5 (m) K, Q, H o E, más preferentemente K, H o E, incluso más preferentemente K, en la posición de aminoácido 50;
- (n) M o I, más preferentemente I, en la posición de aminoácido 55;
- 10 (o) K o R, más preferentemente K, en la posición de aminoácido 77;
- (p) A, V, L o I, más preferentemente A, L o I, incluso más preferentemente A, en la posición de aminoácido 78;
- 15 (q) E, R, T o A, más preferentemente E, T o A, incluso más preferentemente E, en la posición de aminoácido 82;
- (r) T, S, I o L, más preferentemente T, S o L, incluso más preferentemente T, en la posición de aminoácido 86;
- 20 (s) D, S, N o G, más preferentemente D, N o G, incluso más preferentemente N, en la posición de aminoácido 87;
- (t) A, V, L o F, más preferentemente A, V o F, incluso más preferentemente V, en la posición de aminoácido 89;
- (u) F, S, H, D o Y, más preferentemente F, S, H o D, en la posición de aminoácido 90;
- 25 (v) D, Q o E, más preferentemente D o Q, incluso más preferentemente D, en la posición de aminoácido 92;
- (w) G, N, T o S, más preferentemente G, N o T, incluso más preferentemente G, en la posición de aminoácido 95;
- 30 (x) T, A, P, F o S, más preferentemente T, A, P o F, incluso más preferentemente F, en la posición de aminoácido 98;
- (y) R, Q, V, I, M, F o L, más preferentemente R, Q, I, M, F o L, incluso más preferentemente Y, incluso más preferentemente L, en la posición de aminoácido 103; y
- 35 (z) N, S o A, más preferentemente N o S, incluso más preferentemente N, en la posición de aminoácido 107.

Adicionalmente o como alternativa, en la región variable de cadena ligera de un inmunolígador pueden introducirse una o más de las siguientes sustituciones

- 40 (aa) Q, D, L, E, S o I, más preferentemente L, E, S o I, incluso más preferentemente L o E, en la posición de aminoácido 1;
- 45 (bb) S, A, Y, I, P o T, más preferentemente A, Y, I, P o T, incluso más preferentemente P o T, en la posición de aminoácido 2;
- (cc) Q, V, T o I, más preferentemente V, T o I, incluso más preferentemente V o T, en la posición de aminoácido 3;
- 50 (dd) V, L, I o M, más preferentemente V o L, en la posición de aminoácido 4;
- (ee) S, E o P, más preferentemente S o E, incluso más preferentemente S, en la posición de aminoácido 7;
- 55 (ff) T o I, más preferentemente I, en la posición de aminoácido 10;
- (gg) A o V, más preferentemente A, en la posición de aminoácido 11;
- (hh) S o Y, más preferentemente Y, en la posición de aminoácido 12;
- 60 (ii) T, S o A, más preferentemente T o S, incluso más preferentemente T, en la posición de aminoácido 14;
- (jj) S o R, más preferentemente S, en la posición de aminoácido 18;

- (kk) T o R, más preferentemente R, en la posición de aminoácido 20;
- (ll) R o Q, más preferentemente Q, en la posición de aminoácido 24;
- 5 (mm) H o Q, más preferentemente H, en la posición de aminoácido 46;
- (nn) K, R o I, más preferentemente R o I, incluso más preferentemente R, en la posición de aminoácido 47;
- 10 (oo) R, Q, K, E, T o M, más preferentemente Q, K, E, T o M, en la posición de aminoácido 50;
- (pp) K, T, S, N, Q o P, más preferentemente T, S, N, Q o P, en la posición de aminoácido 53;
- 15 (qq) I o M, más preferentemente M, en la posición de aminoácido 56;
- (rr) H, S, F o Y, más preferentemente H, S o F, en la posición de aminoácido 57;
- 20 (ss) I, V o T, más preferentemente V o T, R, incluso más preferentemente T, en la posición de aminoácido 74;
- (tt) R, Q o K, más preferentemente R o Q, incluso más preferentemente R, en la posición de aminoácido 82;
- 25 (uu) L o F, más preferentemente F, en la posición de aminoácido 91;
- (vv) G, D, T o A, más preferentemente G, D o T, incluso más preferentemente T, en la posición de aminoácido 92;
- 30 (xx) S o N, más preferentemente N, en la posición de aminoácido 94;
- (yy) F, Y o S, más preferentemente Y o S, incluso más preferentemente S, en la posición de aminoácido 101; y
- 35 (zz) D, F, H, E, L, A, T, V, S, G o I, más preferentemente H, E, L, A, T, V, S, G o I, incluso más preferentemente A o V, en la posición de aminoácido 103.

El sistema de numeración de AHo se describe además en Honegger, A. y Pluckthun, A. (2001) *J. Mol. Biol.* 309:657-670). Como alternativa, se puede utilizar el sistema de numeración de Kabat tal como se describe además en Kabat *et al.* (Kabat, E. A., *et al.*, (1991) *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, Quinta Edición, 40 Departamento de Salud y Servicios Humanos de Estados Unidos, Publicación de NIH N.º 91-3242). Se proporcionan tablas de conversión para los dos sistemas de numeración diferentes utilizados para identificar posiciones de residuos aminoacídicos en regiones variables de cadena pesada y ligera en A. Honegger, *J. Mol. Biol.* 309 (2001) 657-670.

45 En ciertas realizaciones preferidas, el inmunolígador comprende una mutación que mejora la solubilidad en una posición de aminoácido seleccionada del grupo de posiciones de aminoácido de cadena pesada que consiste en 12, 103 y 144 (convenio de numeración de AHo). En una realización preferida, el inmunolígador comprende una o más sustituciones seleccionadas del grupo que consiste en: (a) Serina (S) en la posición de aminoácido de cadena pesada 12; (b) Serina (S) o Treonina (T) en la posición de aminoácido de cadena pesada 103; y (c) Serina (S) o 50 Treonina (T) en la posición de aminoácido de cadena pesada 144. En otra realización, el inmunolígador comprende las siguientes sustituciones: (a) Serina (S) en la posición de aminoácido de cadena pesada 12; (b) Serina (S) o Treonina (T) en la posición de aminoácido de cadena pesada 103; y (c) Serina (S) o Treonina (T) en la posición de aminoácido de cadena pesada 144.

55 **Hibridomas que expresan anticuerpos anti-VEGF de conejo**

En otro aspecto, la divulgación no reivindicada proporciona un hibridoma que expresa un anticuerpo monoclonal que comprende una cualquiera o más de las secuencias de aminoácidos expuestas en las SEQ ID No 72-81 y 60 SEQ ID No 107-117. En la técnica se conocen bien métodos para generar hibridomas a partir de linfocitos B de conejo y éstos se desvelan, por ejemplo, en la solicitud de Patente de EE.UU. N.º 2005/0033031.

Producción de inmunolígadores anti-VEGF

- Los anticuerpos o derivados de anticuerpo pueden generarse utilizando técnicas rutinarias en el campo de la genética recombinante. Conociendo las secuencias de los polipéptidos, se pueden generar los ADNc que las codifican mediante síntesis génica (www.genscript.com). Estos ADNc se pueden clonar en plásmidos vectoriales adecuados. Una vez que se obtiene el ADN que codifica un dominio VL y/o un dominio VH, se puede realizar una mutagénesis dirigida al sitio, por ejemplo, mediante PCR utilizando cebadores mutagénicos, para obtener diferentes derivados. La mejor secuencia «de partida» se puede elegir dependiendo del número de alteraciones deseadas en las secuencias VL y/o VH.
- 5 Los métodos para incorporar o injertar CDR en regiones de armazón incluyen los presentados en, p. ej., Riechmann, L. *et al.*, (1998) *Nature* 332:323-327; Jones, P. *et al.*, (1986) *Nature* 321:522-525; Queen, C. *et al.*, (1989) *Proc. Natl. Acad. See. U.S.A.* 86:10029-10033; Patente de EE.UU. N.º 5.225.539 de Winter y Patentes de EE.UU. N.º 5.530.101; 5.585.089; 5.693.762 y 6.180.370 de Queen *et al.*
- 10 Se pueden utilizar técnicas de clonación y mutagénesis estándar muy conocidas por el experto en la técnica para acoplar conectores, reordenar dominios o construir fusiones para la producción de fragmentos Fab. Se describen protocolos básicos que dan a conocer los métodos generales de esta invención en *Molecular Cloning, A Laboratory Manual* (Sambrook y Russell, 3.^a ed. 2001) y en *Current Protocols in Molecular Biology* (Ausubel *et al.*, 1999).
- 15 La secuencia de ADN que alberga un gen que codifica un polipéptido de scFv, o en el caso de fragmentos Fab, que codifica bien dos genes separados o bien un operón bicistrónico que comprende los dos genes para las fusiones VL-Ck y VH-CH1 se clinan en un vector de expresión adecuada, preferentemente uno con un promotor inducible. Se debe procurar que delante de cada gen haya presente un sitio de unión al ribosoma apropiado que garantice la traducción. Debe entenderse que los anticuerpos desvelados, pero no reivindicados, comprenden las secuencias desveladas en lugar de consistir en ellas. Por ejemplo, las estrategias de clonación pueden requerir 20 que se prepare un constructo a partir del cual un anticuerpo con uno o unos pocos residuos adicionales en el extremo aminoterminal están presentes. Específicamente, la metionina derivada del codón iniciador puede estar presente en la proteína final en casos donde no se ha escindido postraduccionalmente. La mayoría de los constructos para anticuerpos scFv dan lugar a una alanina adicional en el extremo aminoterminal. En un aspecto preferido de la divulgación no reivindicada se elige un vector de expresión para la expresión periplásmina en *E. coli* (Krebber, 1997). Dicho vector comprende un promotor delante de una secuencia señal escindible. La secuencia codificante para el péptido de anticuerpo se fusiona entonces en el mismo marco de lectura con la secuencia señal escindible. Esto permite dirigir el polipéptido expresado al periplasma bacteriano donde la secuencia señal se escinde. Entonces el anticuerpo se pliega. En el caso de los fragmentos Fab, ambos péptidos de las fusiones VL-Ck y VH-CH1 deben estar unidos a una señal de exportación. El enlace S-S covalente se forma en las cisteínas carboxiterminales una vez que los péptidos han llegado al periplasma. Si se prefiere la expresión citoplásmina de anticuerpos, dichos anticuerpos normalmente se pueden obtener en rendimientos altos a partir de cuerpos de inclusión, que se pueden separar fácilmente de otros fragmentos celulares y proteína. En este caso, los cuerpos de inclusión se solubilizan en un agente desnaturizante tal como, p. ej., clorhidrato de guanidina (GndHCl) y a continuación se repliegan mediante procedimientos de renaturalización muy conocidos por los expertos en la 25 técnica.
- 30 Se introducen plásmidos que expresan los polipéptidos de scFv o Fab en un hospedador adecuado, preferentemente una célula bacteriana, de levadura o de mamífero, con la mayor preferencia una cepa de *E. coli* adecuada como, por ejemplo, JM83 para la expresión periplásmina o BL21 para la expresión en cuerpos de inclusión. El polipéptido se puede recoger ya sea a partir del periplasma o a partir de cuerpos de inclusión y purificar 35 utilizando técnicas estándar tales como cromatografía de intercambio iónico, cromatografía en fase inversa, cromatografía de afinidad y/o filtración en gel conocidas por el experto en la técnica.
- 40 Los anticuerpos o derivados de anticuerpos de la presente divulgación pueden caracterizarse con respecto al rendimiento, la solubilidad y la estabilidad *in vitro*. Las capacidades de unión respecto a VEGF, preferentemente respecto a VEGF humano, se pueden evaluar *in vitro* mediante ELISA o resonancia de plasmones superficiales (BIACore), utilizando VEGF humano recombinante tal como se describe en el documento WO9729131, permitiendo este último método determinar también la constante de velocidad k_{off} , que debe ser preferentemente de menos de $10^{-3}s^{-1}$. Se prefieren valores de $K_d \leq 10$ nM.
- 45 Aparte de anticuerpos con una fuerte afinidad de unión por VEGF humano, también es deseable seleccionar anticuerpos anti-VEGF que tengan otras propiedades beneficiosas desde una perspectiva terapéutica. Por ejemplo, el anticuerpo puede ser uno que inhiba el crecimiento de células HUVEC en respuesta a VEGF (véase el Ejemplo 3). En una realización, el anticuerpo puede ser capaz de inhibir la proliferación de células HUVEC en respuesta a 50 una concentración casi máximamente eficaz de VEGF (0,08 nM). Preferentemente, el anticuerpo tiene un valor de dosis eficaz 50 (DE50) de no más de aproximadamente 5 nM, preferentemente de no más de aproximadamente 1 nM, preferentemente de no más de aproximadamente 1 nM, preferentemente de no más de aproximadamente 0,5 nM y con la mayor preferencia de no más de aproximadamente 0,06 nM, para inhibir la proliferación inducida por VEGF de células endoteliales en este «ensayo de crecimiento de células endoteliales», es decir, a estas 55

concentraciones el anticuerpo es capaz de inhibir el crecimiento de células endoteliales inducido por VEGF *in vitro*, p. ej., un 50 % o más.

Moléculas biespecíficas

5 En otro aspecto, la divulgación no reivindicada presenta moléculas biespecíficas que comprenden un anticuerpo anti-VEGF, o un fragmento del mismo. Un anticuerpo o partes de unión a antígeno del mismo, puede derivatizarse o unirse a otra molécula funcional, p. ej., a otro péptido o proteína (p. ej., a otro anticuerpo o ligando de un receptor) para generar una molécula biespecífica que se une a al menos dos sitios de unión o moléculas diana diferentes.

10 10 El anticuerpo puede derivatizarse o unirse a más de una molécula funcional diferente para generar moléculas multiespecíficas que se unan a más de dos sitios de unión y/o moléculas diana diferentes; se pretende que tales moléculas multiespecíficas también estén englobadas en el término «molécula biespecífica» tal como se utiliza en la presente. Para crear una molécula biespecífica, un anticuerpo puede unirse funcionalmente (p. ej., mediante acoplamiento químico, fusión genética, asociación no covalente o de otro modo) a una o más moléculas de unión diferentes, tales como otro anticuerpo, fragmento de anticuerpo, antígenos específicos de un tumor o específicos de un patógeno, péptido o mimético de unión, de modo que se produzca una molécula biespecífica. Por consiguiente, la divulgación no reivindicada incluye moléculas biespecíficas que comprenden al menos una primera molécula de unión que tiene especificidad por VEGF y una segunda molécula de unión que tiene especificidad por uno o más epítopos diana adicionales.

20 20 En una realización, las moléculas biespecíficas comprenden una especificidad de unión con al menos un anticuerpo, o un fragmento de anticuerpo del mismo, que incluye, p. ej., un Fab, Fab', F(ab')₂, Fv o un Fv monocatenario. El anticuerpo también puede ser un dímero de cadena ligera o cadena pesada, o cualquiera de sus fragmentos mínimos tales como un Fv o un constructo monocatenario, como se describe en la Patente de EE.UU. N.º 4946778 de Ladner *et al.*

Aunque se prefieren los anticuerpos monoclonales humanos, otros anticuerpos que se pueden emplear en las moléculas biespecíficas son anticuerpos monoclonales murinos, quiméricos y humanizados.

30 30 Las moléculas biespecíficas pueden prepararse conjugando las especificidades de unión constituyentes usando métodos conocidos en la técnica. Por ejemplo, cada especificidad de unión de la molécula biespecífica se puede generar por separado y después conjugar entre sí. Cuando las especificidades de unión son proteínas o péptidos, puede utilizarse una diversidad de agentes de acoplamiento o de entrecruzamiento para la conjugación covalente. Como ejemplos de agentes de entrecruzamiento se incluyen la proteína A, carbodiimida, *N*-succinimidil-S-acetiltioacetato (SATA), 5,5'-ditiobis(ácido 2-nitrobenzoico) (DTNB), *o*-fenilendimaleimida (*o*PDM), *N*-succinimidil-3-(2-piridilditio)propionato (SPDP) y 4-(*N*-maleimidometil)ciclohexano-1-carboxilato de sulfosuccinimidilo (sulfo-SMCC) (véase, p. ej., Karpovsky *et al.*, (1984) *J. Exp. Med.* 160:1686; Liu, MA *et al.*, (1985) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82:8648). Otros métodos incluyen los descritos en Paulus (1985) *Behring Ins. Mitt.* N.º 78, 118-132; Brennan *et al.*, (1985) *Science* 229:81-83) y Glennie *et al.*, (1987) *J. Immunol.* 139: 2367-2375). Los agentes de conjugación preferidos son SATA y sulfo-SMCC, ambos disponibles en Pierce Chemical Co. (Rockford, IL).

40 40 Cuando las especificidades de unión son anticuerpos, se pueden conjugar mediante enlace sulfhidrilo, por ejemplo, a través de las regiones bisagra del extremo C de las dos cadenas pesadas u otros sitios, ya sean de origen natural o introducidos de forma artificial. En una realización particularmente preferida, la región bisagra se modifica para que contenga un número impar de residuos sulfhidrilo, preferentemente uno, antes de la conjugación.

45 45 Como alternativa, ambas especificidades de unión se pueden codificar en el mismo vector, y expresarse y ensamblarse en la misma célula hospedadora. Este método es particularmente útil cuando la molécula biespecífica es una proteína de fusión mAb x mAb, mAb x Fab, Fab x F(ab')₂ o ligando x Fab. Una molécula biespecífica puede ser una molécula monocatenaria que comprenda un anticuerpo monocatenario y un determinante de unión, o una molécula biespecífica monocatenaria que comprenda dos determinantes de unión. Las moléculas biespecíficas pueden comprender al menos dos moléculas monocatenarias. Además, una molécula biespecífica puede ser un scFv que se une específicamente a una primera diana, donde los VH y VL de dicho scFv están unidos con un conector flexible que comprende un dominio que proporciona unión específica a una segunda diana. Se describen conectores adecuados en la Solicitud Provisional Estadounidense N.º 60/937.820. Se describen métodos para preparar moléculas biespecíficas, por ejemplo, en la Patente Estadounidense Número 5.260.203; Patente Estadounidense Número 5.455.030; Patente Estadounidense Número 4.881.175; Patente Estadounidense Número 5.132.405; Patente Estadounidense Número 5.091.513; Patente Estadounidense Número 5.476.786; Patente Estadounidense Número 5.013.653; Patente Estadounidense Número 5.258.498; y Patente Estadounidense Número 5.482.858.

50 50 La unión de las moléculas biespecíficas a sus dianas específicas se puede confirmar, por ejemplo, mediante un ensayo de inmunoadsorción enzimática (ELISA), radioinmunoensayo (RIA), análisis FACS, bioensayo (p. ej., inhibición del crecimiento) o ensayo de inmunotransferencia. Cada uno de estos ensayos detecta generalmente la

- presencia de complejos de proteína-anticuerpo de interés particular empleando un reactivo marcado (por ejemplo, un anticuerpo) específico para el complejo de interés. Por ejemplo, los complejos de VEGF-anticuerpo se pueden detectar utilizando, p. ej., un anticuerpo, o fragmento de anticuerpo, unido a una enzima, que reconoce y se une específicamente a los complejos de anticuerpo-VEGF. Como alternativa, los complejos se pueden detectar utilizando cualquiera de una diversidad de inmunoensayos diferentes. Por ejemplo, el anticuerpo puede marcarse radioactivamente y utilizarse en un radioinmunoensayo (RIA) (véase, por ejemplo, Weintraub, B., *Principles of Radioimmunoassays*, Séptimo Curso de Formación sobre Técnicas de Ensayo con Radioligandos, Asociación de Endocrinología Estadounidense, marzo, 1986).
- 10 El isótopo radioactivo se puede detectar por medios tales como el uso de un contador de γ o un contador de centelleo o mediante autoradiografía.

Inmunoconjungados

- 15 En otro aspecto, la divulgación no reivindicada se refiere a un anticuerpo anti-VEGF, o a un fragmento del mismo, conjugado con un resto terapéutico, tal como una citotoxina, un fármaco (p. ej., un inmunosupresor) o una radiotoxina. En la presente, tales conjugados se denominan «inmunoconjungados». Los inmunoconjungados que incluyen una o más citotoxinas se denominan «inmunotoxinas». Una citotoxina o agente citotóxico incluye cualquier agente que sea perjudicial para las células (p. ej., que las destruya). Los ejemplos incluyen taxol, citocalasina B, gramicidina D, bromuro de etidio, emetina, mitomicina, etopósido, tenopósido, vincristina, vinblastina, colchicina, doxorubicina, daunorrubicina, dihidroxiantracindiona, mitoxantrona, mitramicina, actinomicina D, 1-deshidrotestosterona, glucocorticoides, procaína, tetracaína, lidocaína, propranolol y puromicina, y análogos u homólogos de estos. Los agentes terapéuticos también incluyen, por ejemplo, antimetabolitos (p. ej., metotrexato, 6-mercaptopurina, 6-tioguanina, citarabina, 5-fluorouracil dacarbazine), agentes alquilantes (p. ej., mecloretamina, tiotepa clorambucilo, melfalán, carmustina (BSNU) y lomustina (CCNU), ciclofosfamida, busulfán, dibromomanitol, estreptozotocina, mitomicina C y *cis*-dclorodiamina platino (II) (DDP) cisplatino), antraciclinas (p. ej., daunorrubicina (anteriormente daunomicina) y doxorubicina), antibióticos (p. ej., dactinomicina (anteriormente actinomicina), bleomicina, mitramicina y antramicina (AMC)) y agentes antimitóticos (p. ej., vincristina y vinblastina).
- 20 30 Otros ejemplos preferidos de citotoxinas terapéuticas que se pueden conjugar con un anticuerpo incluyen duocarmicinas, calicheamicinas, maitansinas y auristatinas, y derivados de estas. En el comercio se dispone de un ejemplo de un conjugado de anticuerpo con calicheamicina (Mylotarg™; Wyeth-Ayerst).
- 25 35 Las citotoxinas se pueden conjugar con anticuerpos utilizando la tecnología de conector disponible en la materia. Los ejemplos de tipos de conectores que se han utilizado para conjugar una citotoxina con un anticuerpo incluyen, pero no se limitan a, hidrazonas, tioéteres, ésteres, disulfuros y conectores que contienen péptidos. Se puede elegir un conector que sea, por ejemplo, susceptible de escisión por pH bajo dentro del compartimiento lisosómico o susceptible de escisión por proteasas, tales como proteasas expresadas preferentemente en tejido tumoral tal como catepsinas (p. ej., catepsinas B, C, D).
- 40 45 Para un análisis más profundo de los tipos de citotoxinas, conectores y métodos para conjugar agentes terapéuticos con anticuerpos, véanse también Saito, G. et al., (2003) *Adv. Drug Deliv. Rev.* 55:199-215; Trail, P.A. et al., (2003) *Cancer Immunol. Immunother.* 52:328-337; Payne, G. (2003) *Cancer Cell* 3:207-212; Allen, T.M. (2002) *Nat. Rev. Cancer* 2:750-763; Pastan, I. y Kreitman, R. J. (2002) *Curr. Opin. Investig. Drugs* 3:1089-1091; Senter, P.D. y Springer, C.J. (2001) *Adv. Drug Deliv. Rev.* 53:247-264.
- 50 Los anticuerpos también pueden conjugarse con un isótopo radiactivo para generar radiofármacos citotóxicos, también denominados radioinmunoconjungados. Los ejemplos de isótopos radioactivos que se pueden conjugar con anticuerpos para uso diagnóstico o terapéutico incluyen, pero no se limitan a, yodo¹³¹, indio¹¹¹, litio⁹⁰ y lutecio¹⁷⁷. Los métodos para preparar radioinmunoconjungados están consolidados en la técnica. En el comercio se dispone de ejemplos de radioinmunoconjungados, incluyendo Zevalin™ (IDEC Pharmaceuticals) y Bexxar™ (Corixa Pharmaceuticals), y utilizando los anticuerpos desvelados pero no reivindicados, pueden utilizarse métodos similares para preparar radioinmunoconjungados.
- 55 60 Los conjugados de anticuerpo pueden utilizarse para modificar una respuesta biológica dada, y no debe interpretarse que el resto farmacéutico se limite a agentes terapéuticos químicos clásicos. Por ejemplo, el resto farmacéutico puede ser una proteína o polipéptido que posea una actividad biológica deseada. Tales proteínas pueden incluir, por ejemplo, una toxina enzimáticamente activa o fragmento activo de esta, tal como abrina, ricina A, exotoxina de *Pseudomonas* o toxina diftérica; una proteína tal como el factor de necrosis tumoral o interferón- γ ; o modificadores de la respuesta biológica tales como, por ejemplo, linfocinas, interleucina-1 («IL-1»), interleucina-2 («IL-2»), interleucina-6 («IL-6»), factor estimulador de colonias de granulocitos-macrófagos («GM-CSF»), factor estimulador de colonias de granulocitos («G-CSF») u otros factores de crecimiento.

Las técnicas para conjugar un resto terapéutico de este tipo con anticuerpos son muy conocidas, véase, p. ej., Arnon *et al.*, «Monoclonal Antibodies For Immunotargeting Of Drugs In Cancer Therapy», en *Monoclonal Antibodies And Cancer Therapy*, Reisfeld *et al.* (eds.), págs. 243-56 (Alan R. Liss, Inc. 1985); Hellstrom *et al.*, «Antibodies For Drug Delivery», en *Controlled Drug Delivery* (2.^a Ed.), Robinson *et al.* (eds.), págs. 623-53 (Marcel Dekker, Inc. 1987); Thorpe, «Antibody Carriers Of Cytotoxic Agents In Cancer Therapy: A Review», en *Monoclonal Antibodies '84: Biological And Clinical Applications*, Pinchera *et al.* (eds.), págs. 475-506 (1985); «Analysis, Results, And Future Prospective Of The Therapeutic Use Of Radiolabeled Antibody In Cancer Therapy», en *Monoclonal Antibodies For Cancer Detection And Therapy*, Baldwin *et al.* (eds.), págs. 303-16 (Academic Press 1985), y Thorpe *et al.*, «The Preparation And Cytotoxic Properties Of Antibody-Toxin Conjugates», *Immunol. Rev.* 62:119-58 (1982).

10 *Usos de anticuerpos anti-VEGF*

Para aplicaciones terapéuticas, los anticuerpos anti-VEGF de la invención se administran a un mamífero, preferentemente un ser humano, en una forma farmacéutica farmacéuticamente aceptable tal como aquellas explicadas en la presente, que incluyen las que se pueden administrar a un ser humano por vía intravenosa, como un bolo o por infusión continua a lo largo de un periodo de tiempo, por vía tópica, intraocular, intramuscular, intraperitoneal, intracefalorraquídea, subcutánea, intraarticular, intrasinovial, intratecal, oral o inhalatoria. Los anticuerpos también se pueden administrar convenientemente por vía intratumoral, peritumoral, intralesional o perilesional, para ejercer efectos terapéuticos locales si como sistémicos. Cabe esperar que la vía intraperitoneal sea particularmente útil, por ejemplo, en el tratamiento de tumores ováricos.

Para la prevención o el tratamiento de una enfermedad, la dosificación apropiada de anticuerpo dependerá del tipo de enfermedad que se vaya a tratar, tal como se ha definido anteriormente, la gravedad y la evolución de la enfermedad, si el anticuerpo se administra a efectos preventivos o terapéuticos, la terapia previa, la anamnesis del paciente y la respuesta al anticuerpo, y el criterio del médico responsable. El anticuerpo se administra convenientemente al paciente una vez o a lo largo de una serie de tratamientos.

Los anticuerpos anti-VEGF son útiles en el tratamiento de enfermedades mediadas por VEGF tal como se describe en la presente. Por ejemplo, la degeneración macular senil (AMD) es una de las causas principales de la pérdida de visión grave en la población anciana. La forma exudativa de AMD se caracteriza por la neovascularización coroidea y el desprendimiento de células epiteliales del pigmento retiniano. Debido a que la neovascularización coroidea se asocia con un empeoramiento drástico en el pronóstico, los anticuerpos contra VEGF de la presente invención son especialmente útiles en la reducción de la gravedad de AMD. La evolución de esta terapia se monitoriza fácilmente mediante técnicas convencionales, que incluyen oftalmoscopia, microscopia del fondo de ojo y tomografía computarizada ocular.

De acuerdo con otra realización de la invención, la efectividad del anticuerpo en la prevención o el tratamiento de la enfermedad se puede mejorar administrando el anticuerpo en serie o junto con otro agente que sea eficaz para esos fines, tal como el factor de necrosis tumoral (TNF, por sus siglas en inglés), un anticuerpo capaz de inhibir o neutralizar la actividad angiogénica del factor de crecimiento fibroblástico (FGF) ácido o básico o el factor de crecimiento de hepatocitos (HGF), un anticuerpo capaz de inhibir o neutralizar las actividades coagulantes del factor tisular, proteína C o proteína S (véase Esmon *et al.*, Publicación de Patente de PCT N.º WO 91/01753, publicada el 21 de febrero de 1991), un anticuerpo capaz de unirse al receptor de HER2 (véase Hudziak *et al.*, Publicación de Patente de PCT N.º WO 89/06692, publicada el 27 de julio de 1989), o uno o más agentes terapéuticos convencionales tales como, por ejemplo, agentes alquilantes, fotocoagulantes (tales como verteporfina), antagonistas del ácido fólico, anti-metabolitos del metabolismo de ácidos nucleicos, antibióticos, análogos de pirimidina, 5-fluorouracilo, cisplatino, nucleósidos purínicos, aminas, aminoácidos, nucleósidos triazólicos o corticosteroides. Estos otros agentes pueden estar presentes en la composición que se está administrando o se pueden administrar por separado. Además, el anticuerpo se puede administrar convenientemente en serie o en combinación con tratamientos radiológicos, ya sea que impliquen irradiación o la administración de sustancias radioactivas.

Los anticuerpos de la invención se pueden utilizar como agentes de purificación por afinidad. En este proceso, los anticuerpos se inmovilizan en una fase sólida tal como una resina Sephadex o papel de filtro, utilizando métodos muy conocidos en la técnica. El anticuerpo inmovilizado se pone en contacto con una muestra que contiene la proteína VEGF (o fragmento de esta) que se desea purificar, y posteriormente el soporte se lava con un disolvente adecuado que eliminará sustancialmente todo el material en la muestra salvo la proteína VEGF, que está unida al anticuerpo inmovilizado. Por último, el soporte se lava con otro disolvente adecuado, tal como un tampón de glicina, pH 5,0, que liberará la proteína VEGF del anticuerpo.

60 Los anticuerpos anti-VEGF también pueden ser útiles en ensayos de diagnóstico para la proteína VEGF, p. ej., detectando su expresión en células, tejidos o suero específicos. Tales métodos de diagnóstico pueden ser útiles en el diagnóstico del cáncer.

Para aplicaciones de diagnóstico, el anticuerpo se marcará normalmente con un resto detectable. Existen numerosos marcadores disponibles que se pueden agrupar generalmente en las siguientes categorías:

5 (a) Radioisótopos, tales como ^{111}In , ^{99}Tc , ^{14}C , ^{131}I , ^{125}I , ^3H , ^{32}P o ^{35}S . El anticuerpo se puede marcar con el radioisótopo utilizando las técnicas descritas en *Current Protocols in Immunology*, Tomos 1 y 2, Coligen *et al.*, Ed. Wiley-Interscience, Nueva York, N.Y., Pubs. (1991), por ejemplo, y la radioactividad se puede medir utilizando conteo de centelleo.

10 (b) Marcadores fluorescentes tales como quelatos de tierras raras (quelatos de europio) o fluoresceína y sus derivados, rodamina y sus derivados, dansilo, Lisamina, ficoeritrina y Rojo Texas. Los marcadores fluorescentes se pueden conjugar con el anticuerpo utilizando las técnicas desveladas, por ejemplo, en *Current Protocols in Immunology*, citado anteriormente. La fluorescencia se puede cuantificar utilizando un fluorímetro.

15 (c) Existen diversos marcadores de enzima-sustrato disponibles y la Pat. Estadounidense N.º 4.275.149 proporciona un análisis de estos. La enzima generalmente cataliza una alteración química del sustrato cromogénico que se puede medir utilizando varias técnicas. Por ejemplo, la enzima puede catalizar un cambio de color en un sustrato, que se puede medir espectrofotométricamente. Como alternativa, la enzima puede alterar la fluorescencia o quimioluminiscencia del sustrato. Anteriormente se han descrito técnicas para cuantificar un cambio en la fluorescencia. El sustrato quimioluminiscente pasa a un estado electrónico excitado mediante una reacción química y puede emitir entonces luz que se puede medir (utilizando un quimioluminómetro, por ejemplo) o dona energía a un aceptor fluorescente. Los ejemplos de marcadores enzimáticos incluyen luciferasas (p. ej., luciferasa de luciérnaga y luciferasa bacteriana; Patente de EE.UU. N.º 4.737.456), luciferina, 2,3-dihidrofotalazinodionas, malato·deshidrogenasa, ureasa, peroxidasa tal como peroxidasa de rábano picante (HRPO), fosfatasa alcalina, beta-galactosidasa, glucoamilasa, lisozima, oxidasa de sacáridos (p. ej., glucosa oxidasa, galactosa oxidasa y glucosa-6-fosfato·deshidrogenasa), oxidasa heterocíclicas (tales como uricasa y xantina oxidasa), lactoperoxidasa, microperoxidasa y similares. Se describen técnicas de conjugación de enzimas con anticuerpos en O'Sullivan *et al.*, *Methods for the Preparation of Enzyme-Antibody Conjugates for use in Enzyme Immunoassay*, en *Methods in Enzym.* (ed J. Langone & H. Van Vunakis), Academic press, Nueva York, 73:147-166 (1981). Los ejemplos de combinaciones de enzima-sustrato incluyen, por ejemplo:

35 (i) peroxidasa de rábano picante (HRPO) con hidrógeno·peroxidasa como sustrato, en donde la hidrógeno·peroxidasa oxida un precursor colorante (por ejemplo, *ortho*-fenilendiamina (OPD) o clorhidrato de 3,3',5,5'-tetrametilbenzidina (TMB));

(ii) fosfatasa alcalina (AP) con *para*-nitrofenilfosfato como sustrato cromógeno; y

40 (iii) beta-D-galactosidasa (beta-D-Gal) con un sustrato cromogénico (por ejemplo, P-nitrofenil-beta-D-galactosidasa) o sustrato fluorogénico 4-metilumbeliferyl-beta-D-galactosidasa.

En otra realización de la invención, no es necesario marcar el anticuerpo anti-VEGF y su presencia se puede detectar utilizando un anticuerpo marcado que se une al anticuerpo contra VEGF.

45 Los anticuerpos de la presente invención se pueden emplear en cualquier método de ensayo conocido, tal como ensayos de unión competitiva, ensayos de tipo sándwich y ensayos de immunoprecipitación. Zola, *Monoclonal Antibodies: A Manual of Techniques*, págs.147-158 (CRC Press, Inc. 1987).

50 Los ensayos de unión competitiva se basan en la capacidad de un patrón marcado para competir con el analito de la muestra de prueba por la unión con una cantidad limitada de anticuerpo. La cantidad de proteína VEGF en la muestra de prueba es inversamente proporcional a la cantidad de patrón que se llega a unir a los anticuerpos. Para facilitar la determinación de la cantidad de patrón que se llega a unir, los anticuerpos generalmente se insolubilizan antes o después de la competición, de modo que el patrón y el analito que están unidos a los anticuerpos se puedan separar convenientemente del patrón y el analito que quedan sin unirse.

55 Los ensayos de tipo sándwich implican el uso de dos anticuerpos, cada uno capaz de unirse a una porción inmunógena o epítopo diferente, de la proteína que se ha de detectar. En un ensayo de tipo sándwich, un primer anticuerpo que está inmovilizado en un soporte sólido se une al analito de la muestra de prueba, y después un segundo anticuerpo se une al analito, para formar así un complejo de tres partes insoluble. Véanse, p. ej., las patentes de los EE. UU. N.º 4.376.110. El segundo anticuerpo puede estar de por sí marcado con un resto detectable (ensayos de tipo sándwich directos) o se puede medir utilizando un anticuerpo anti-inmunoglobulina que está marcado con un resto detectable (ensayo de tipo sándwich indirecto). Por ejemplo, un tipo de ensayo de tipo sándwich es un ensayo ELISA, en cuyo caso el resto detectable es una enzima.

Para la inmunohistoquímica, la muestra tumoral puede ser fresca o estar congelada, o puede estar embebida en parafina o fijada con un conservante tal como formalina, por ejemplo.

5 Los anticuerpos también se pueden utilizar para ensayos de diagnóstico *in vivo*. Generalmente, el anticuerpo está marcado con un radionúclido (tal como ^{111}In , ^{99}Tc , ^{14}C , ^{131}I , ^{125}I , ^3H , ^{32}P o ^{35}S) de tal modo que el tumor se pueda localizar utilizando inmunogammagrafía.

10 El anticuerpo de la presente invención se puede proporcionar en un kit, una combinación envasada de reactivos en cantidades predeterminadas con instrucciones para realizar el ensayo de diagnóstico. Cuando el anticuerpo está marcado con una enzima, el kit incluirá sustratos y cofactores requeridos por la enzima (por ejemplo, un precursor de sustrato que proporcione el cromóforo o fluoróforo detectable). Además, se pueden incluir otros aditivos tales como estabilizantes, tampones (por ejemplo, un tampón de bloqueo o tampón de lisis) y similares. Las cantidades relativas de los diferentes reactivos se pueden variar mucho para proporcionar concentraciones en disolución de los reactivos que optimicen sustancialmente la sensibilidad del ensayo. Particularmente, los reactivos 15 se pueden proporcionar como polvos secos, habitualmente liofilizados, que incluyen excipientes que al disolverse proporcionarán una disolución de los reactivos con la concentración apropiada.

Preparados farmacéuticos

20 En un aspecto, la invención proporciona formulaciones farmacéuticas que comprenden anticuerpos anti-VEGF para el tratamiento de enfermedades mediadas por VEGF. El término «formulación farmacéutica» se refiere a preparados que están en una forma tal que permite que la actividad biológica del anticuerpo o derivado de anticuerpo sea inequívocamente eficaz, y que no contienen componentes adicionales que sean tóxicos para los sujetos a los que se les administraría la formulación. Los excipientes (vehículos, aditivos) «farmacéuticamente 25 aceptables» son aquellos que se pueden administrar razonablemente a un sujeto que es un mamífero para proporcionar una dosis eficaz del principio activo empleado.

30 Una formulación «estable» es una en la que el anticuerpo o derivado de anticuerpo de esta conserva esencialmente su estabilidad física y/o estabilidad química y/o actividad biológica tras su almacenamiento. En la técnica se dispone de varias técnicas analíticas para medir la estabilidad de proteínas y se explican en *Peptide and Protein Drug Delivery*, 247-301, Vincent Lee Ed., Marcel Dekker, Inc., Nueva York, N.Y., Pubs. (1991) y Jones, A. *Adv. Drug Delivery Rev.* 10: 29-90 (1993), por ejemplo. La estabilidad se puede medir a una temperatura seleccionada durante un periodo de tiempo seleccionado. Preferentemente, la formulación es estable a temperatura ambiente (aproximadamente 30° C) o a 40° C durante al menos 1 semana y/o estable a aproximadamente 2-8° C durante 35 de al menos 3 meses a 2 años. Además, la formulación es preferentemente estable después de congelar (por ejemplo, a -70°C) y descongelar la formulación.

40 Un anticuerpo o derivado de anticuerpo «conserva su estabilidad física» en una formulación farmacéutica si cumple las especificaciones de liberación definidas para la agregación, degradación, precipitación y/o desnaturización tras la inspección visual del color y/o la transparencia, o según se mide por dispersión de la luz UV o por cromatografía de exclusión por tamaño, u otros métodos reconocidos en la técnica adecuados.

45 Un anticuerpo o derivado de anticuerpo «conserva su estabilidad química» en una formulación farmacéutica, si la estabilidad química en un momento dado es tal que se considera que la proteína sigue conservando su actividad biológica tal como se define a continuación. La estabilidad química se puede evaluar detectando y cuantificando químicamente formas alteradas de la proteína. La alteración química puede implicar la modificación del tamaño (p. ej., recorte) que se puede evaluar utilizando cromatografía de exclusión por tamaño, SDS-PAGE y/o ionización/desorción mediante láser asistida por matriz/espectrometría de masas de tiempo de vuelo y (MALDI/TOF MS), por ejemplo. Otros tipos de alteración química incluyen la alteración de la carga (p. ej., que tiene lugar como resultado de la desamidación) que se puede evaluar mediante cromatografía de intercambio iónico, por ejemplo.

55 Un anticuerpo o derivado de anticuerpo «conserva su actividad biológica» en una formulación farmacéutica, si la actividad biológica del anticuerpo en un momento dado difiere como máximo en aproximadamente un 10% (dentro de los márgenes de error del ensayo) respecto a la actividad biológica presentada en el momento en el que se preparó la formulación farmacéutica según se determina en un ensayo de unión a antígeno, por ejemplo. Otros ensayos de «actividad biológica» para anticuerpo se explican detalladamente más adelante en la presente.

60 Por «isotónica» se entiende que la formulación de interés tiene esencialmente la misma presión osmótica que la sangre humana. Las formulaciones isotónicas generalmente tendrán una presión osmótica de aproximadamente 250 a 350 mOsm. La isotonicidad se puede medir utilizando un osmómetro de tipo presión de vapor o congelación de hielo, por ejemplo.

Un «poliol» es una sustancia con múltiples grupos hidroxilo, e incluye azúcares (azúcares reductores y no reductores), alcoholos de azúcar y ácidos de azúcar. Los polioles preferidos en la presente tienen un peso

molecular que es menor de aproximadamente 600 kD (p. ej., en el intervalo de aproximadamente 120 a aproximadamente 400 kD). Un «azúcar reductor» es aquel que contiene un grupo hemiacetal que puede reducir iones metálicos o reaccionar covalentemente con lisina y otros grupos amino en proteínas y un «azúcar no reductor» es aquel que no tiene estas propiedades de un azúcar reductor. Son ejemplos de azúcares reductores

5 la fructosa, manosa, maltosa, lactosa, arabinosa, xilosa, ribosa, ramnosa, galactosa y glucosa. Los azúcares no reductores incluyen sacarosa, trehalosa, sorbosa, melecitosa y rafinosa. El manitol, xilitol, eritritol, treitol, sorbitol y glicerol son ejemplos de alcoholes de azúcar. En lo que respecta a ácidos de azúcar, estos incluyen *L*-gluconato y sus sales metálicas. Cuando se desea que la formulación sea estable a la congelación-descongelación, el poliol es preferentemente uno que no cristalice a temperaturas de congelación (por ejemplo, -20°C) de tal modo que desestabilice el anticuerpo en la formulación. Los azúcares no reductores tales como sacarosa y trehalosa son los polioles preferidos en la presente, con preferencia por la trehalosa frente a la sacarosa, debido a la superior estabilidad en disolución de la trehalosa.

10 Tal como se utiliza en la presente, «tampón» se refiere a una disolución tamponada que resiste cambios en el pH por la acción de sus componentes de conjugado ácido-base. El tampón de esta invención tiene un pH en el intervalo de aproximadamente 4,5 a aproximadamente 8,0; preferentemente de aproximadamente 5,5 a aproximadamente 7. Como ejemplos de tampones que controlen el pH en este intervalo se incluyen tampones de acetato (p. ej., acetato de sodio), succinato (tal como succinato de sodio), gluconato, histidina, citrato y otros ácidos orgánicos. Cuando se desea una formulación estable a la congelación-descongelación, preferentemente el tampón no es 15 fosfato.

20 En un sentido farmacológico, en el contexto de la presente invención, una "cantidad terapéuticamente eficaz" de un anticuerpo o derivado de anticuerpo se refiere a una cantidad eficaz en la prevención o el tratamiento de un trastorno para cuyo tratamiento el anticuerpo o derivado de anticuerpo es eficaz. Una «enfermedad/trastorno» es 25 cualquier afección que se beneficiaría del tratamiento con el anticuerpo o derivado de anticuerpo. Esto incluye trastornos o enfermedades crónicas y agudas que incluyen aquellas afecciones patológicas que predisponen al mamífero al trastorno en cuestión.

30 Un «conservante» es un compuesto que se puede incluir en la formulación para reducir esencialmente la acción bacteriana en esta, lo cual facilita así la producción de una formulación multiuso, por ejemplo. Los ejemplos de conservantes potenciales incluyen cloruro de octadecildimetilbencilmonio, cloruro de hexametonio, cloruro de benzalconio (una mezcla de cloruros de alquilbencildimetilamonio en la que los grupos alquilo son compuestos de cadena larga) y cloruro de bencetonio. Otros tipos de conservantes incluyen alcoholes aromáticos tales como fenol, alcohol butílico y bencílico, alquilparabenos tales como metil- o propilparabeno, catecol, resorcinol, ciclohexanol, 35 3-pentanol y *m*-cresol. El conservante más preferido en la presente es el alcohol bencílico.

40 La presente invención también proporciona composiciones farmacéuticas que comprenden uno o más anticuerpos o compuestos derivados de anticuerpo, junto con al menos un portador o excipiente fisiológicamente aceptable. Las composiciones farmacéuticas pueden comprender, por ejemplo, uno o más de agua, tampones (por ejemplo, solución salina tamponada neutra o solución salina tamponada con fosfato), etanol, aceite mineral, aceite vegetal, sulfóxido de dimetilo, hidratos de carbono, (por ejemplo, glucosa, manosa, sacarosa o dextranos), manitol, 45 proteínas, adyuvantes, polipéptidos o aminoácidos tales como glicina, antioxidantes, agentes quelantes tales como EDTA o glutatión y/o conservantes. Tal como se ha indicado anteriormente, otros principios activos se pueden incluir (pero no es necesario) en las composiciones farmacéuticas proporcionadas en la presente.

50 Un portador es una sustancia que se puede asociar con un anticuerpo o derivado de anticuerpo antes de la administración a un paciente, a menudo a fin de controlar la estabilidad o biodisponibilidad del compuesto. Los portadores para su uso dentro de tales formulaciones son generalmente biocompatibles y también pueden ser biodegradables. Los portadores incluyen, por ejemplo, moléculas monovalentes o multivalentes tales como seroalbúmina (p. ej., humana o bovina), albúmina de huevo, péptidos, polilisina y polisacáridos tales como aminodextrano y poliamidoaminas. Los portadores también incluyen materiales de soporte sólidos tales como perlas y micropartículas que comprenden, por ejemplo, polilactato poliglicolato, poli(láctido-co-glicólico), poliacrilato, látex, almidón, celulosa o dextrano. Un portador puede portar los compuestos de diversas formas, que incluyen enlace covalente (ya sea directamente o a través de un grupo conector), interacción no covalente o mezcla.

55 Las composiciones farmacéuticas se pueden formular para cualquier forma apropiada de administración, que incluye, por ejemplo, la administración tópica, intraocular, oral, nasal, rectal o parenteral. En ciertas realizaciones, se prefieren composiciones en una forma adecuada para el uso tópico, por ejemplo, como colirio. Otras formas incluyen, por ejemplo, pastillas, comprimidos, sellos, grageas, suspensiones acuosas u oleosas, polvos o gránulos dispersables, emulsión, cápsulas duras o blandas, o jarabes o elixires. En otras realizaciones más, las 60 composiciones proporcionadas en la presente se pueden formular como un liofilizado. El término parenteral, tal como se utiliza en la presente, incluye inyección subcutánea, intradérmica, intravascular (por ejemplo, intravenosa), intramuscular, raquídea, intracraneal, intratecal e intraperitoneal, así como cualquier técnica de inyección o infusión similar.

La composición farmacéutica se puede preparar como una suspensión acuosa u oleaginosa inyectable estéril en la que el modulador, dependiendo del vehículo y la concentración utilizados, está bien suspendido o bien disuelto en el vehículo. Una composición de este tipo se puede formular de acuerdo con la técnica conocida utilizando dispersantes, agentes humectantes y/o agentes de suspensión adecuados tales como los mencionados anteriormente. Entre los vehículos y disolventes aceptables que se pueden emplear están el agua, 1,3-butanodiol, disolución de Ringer y disolución de cloruro de sodio isotónica. Además, se pueden emplear aceites fijos, estériles como un medios de suspensión o disolvente. A este efecto, se puede emplear cualquier aceite fijo insípido, incluidos mono- o diglicéridos sintéticos. Además, se pueden utilizar ácidos grasos tales como el ácido oleico en la preparación de composiciones inyectables, y se pueden disolver adyuvantes tales como anestésicos locales, conservantes y/o agentes tamponantes en el vehículo.

Las composiciones farmacéuticas pueden formularse como formulaciones de liberación sostenida (es decir, una formulación tal como una cápsula que efectúa una liberación lenta del modulador después de su administración). Tales formulaciones se pueden preparar generalmente utilizando tecnología muy conocida y administrar mediante, por ejemplo, implantación oral, rectal o subcutánea, o mediante implantación en el sitio diana deseado. Los portadores para su uso dentro de tales formulaciones son biocompatibles, y también pueden ser biodegradables; preferentemente la formulación proporciona un nivel relativamente constante de liberación del modulador. La cantidad de un anticuerpo o derivado de anticuerpo contenida dentro de una formulación de liberación sostenida depende de, por ejemplo, el sitio de implantación, la velocidad y la duración esperada de la liberación y la naturaleza de la enfermedad/trastorno que se ha de tratar o prevenir.

El anticuerpo o derivados de anticuerpo proporcionados en la presente se administran generalmente en una cantidad que consigue una concentración en un líquido corporal (p. ej., sangre, plasma, suero, LCR, líquido sinovial, linfa, líquido intersticial celular, lágrimas u orina) que es suficiente para unirse de forma detectable al VEGF y prevenir o inhibir enfermedades/trastornos mediados por VEGF. Una dosis se considera que es eficaz si da como resultado un beneficio perceptible para el paciente tal como se describe en la presente. Las dosis sistémicas preferidas varían de aproximadamente 0,1 mg a aproximadamente 140 mg por kilogramo de peso corporal al día (de aproximadamente 0,5 mg a aproximadamente 7 g por paciente al día), multiplicándose las dosis orales generalmente por 5-20 respecto a las dosis intravenosas. La cantidad de anticuerpo o derivado de anticuerpo que se puede combinar con los materiales portadores para producir una única forma farmacéutica variará dependiendo del hospedador tratado y el modo particular de administración. Las formas farmacéuticas unitarias generalmente contendrán entre aproximadamente 1 mg a aproximadamente 500 mg de un principio activo.

Las composiciones farmacéuticas se pueden envasar para tratar afecciones que responden a un anticuerpo o derivado de anticuerpo dirigido a VEGF. Las composiciones farmacéuticas envasadas pueden incluir un recipiente que contenga una cantidad eficaz de al menos un anticuerpo o derivado de anticuerpo, como se describe en la presente, e instrucciones (p. ej. etiquetado) que indiquen que la composición contenida se utilizará para tratar una enfermedad/trastorno que responde a un anticuerpo o derivado de anticuerpo después de su administración al paciente.

Los anticuerpos o derivados de anticuerpo de la presente invención también se pueden modificar químicamente. Los grupos modificadores preferidos son polímeros, por ejemplo, un polímero de polialqueno, polialquenileno o polioxialquieno de cadena lineal o ramificada sustituido opcionalmente, o un polisacárido ramificado o no ramificado. Tal grupo efector puede incrementar la semivida del anticuerpo *in vivo*. Los ejemplos particulares de polímeros sintéticos incluyen poli(etilenglicol) (PEG), poli(propilenglicol), poli(alcohol vinílico) de cadena lineal o ramificada sustituido opcionalmente, o derivados de estos. Los polímeros de origen natural particulares incluyen lactosa, amilosa, dextrano, glucógeno o derivados de estos. El tamaño del polímero se puede variar como se desee, pero generalmente estará en un intervalo de peso molecular promedio de 500 Da a 50 000 Da. Para una aplicación local donde el anticuerpo se diseña para entrar en el tejido, un peso molecular preferido del polímero es de aproximadamente 5000 Da. Como se describe en el documento WO0194585, la molécula polimérica se puede unir al anticuerpo, en particular al extremo carboxiterminal de la cadena pesada del fragmento Fab a través un péptido bisagra unido de manera covalente. En lo que respecta al acoplamiento de restos de PEG, se hace referencia a «Poly(ethyleneglycol) Chemistry, Biotechnological and Biomedical Applications», 1992, J. Milton Harris (ed), Plenum Press, Nueva York y «Bioconjugation Protein Coupling Techniques for the Biomedical Sciences», 1998, M. Aslam y A. Dent, Editorial Grove, Nueva York.

Después de preparar el anticuerpo o derivado de anticuerpo de interés, como se ha descrito anteriormente, se prepara la formulación farmacéutica que lo comprende. El anticuerpo que se ha de formular no se ha sometido a liofilización previa y la formulación de interés de la presente es una formulación acuosa. Preferentemente, el anticuerpo o derivado de anticuerpo de la formulación es un fragmento de anticuerpo, tal como un scFv. La cantidad terapéuticamente eficaz de anticuerpo presente en la formulación se determina teniendo en cuenta los volúmenes de dosis y el modo o modos de administración deseados, por ejemplo. De aproximadamente 0,1 mg/ml a aproximadamente 50 mg/ml, preferentemente de aproximadamente 0,5 mg/ml a aproximadamente 40 mg/ml y con

la mayor preferencia de aproximadamente 10 mg/ml a aproximadamente 20 mg/ml es una concentración de anticuerpo a modo de ejemplo en la formulación.

Se prepara una formulación acuosa que comprende el anticuerpo o derivado de anticuerpo en una disolución reguladora del pH. El tampón de esta invención tiene un pH en el intervalo de aproximadamente 4,5 a 15) aproximadamente 8,0, preferentemente de aproximadamente 5,5 a aproximadamente 7. Como ejemplos de tampones que controlarán el pH en este intervalo se incluyen tampones de acetato (por ejemplo, de acetato de sodio), succinato (tal como succinato de sodio), gluconato, histidina, citrato y otros ácidos orgánicos. La concentración de tampón puede ser de aproximadamente 1 mM a aproximadamente 50 mM, preferentemente de 20) aproximadamente 5 mM a aproximadamente 30 mM, dependiendo, por ejemplo, del tampón y la isotonicidad deseada de la formulación.

Se incluye un poliol, que actúa como un tonificador y puede estabilizar el anticuerpo, en la formulación. En realizaciones preferidas, la formulación no contiene una cantidad tonificante de una sal tal como cloruro de sodio, ya que esto puede hacer que el anticuerpo o derivado de anticuerpo precipite y/o puede provocar la oxidación a pH bajo. En realizaciones preferidas, el poliol es un azúcar no reductor, tal como sacarosa o trehalosa. El poliol se añade a la formulación en una cantidad que puede variar con respecto a la isotonicidad deseada de la formulación. Preferentemente la formulación acuosa es isotónica, en cuyo caso las concentraciones adecuadas del poliol en la formulación están en el intervalo de aproximadamente un 1% a aproximadamente un 15% p/v, preferentemente en el intervalo de aproximadamente un 2% a aproximadamente un 10% p/v, por ejemplo. Sin embargo, las formulaciones hipertónicas o hipotónicas también pueden ser adecuadas. La cantidad de poliol añadida también puede variar con respecto al peso molecular del poliol. Por ejemplo, se puede añadir una menor cantidad de un monosacárido (p. ej., manitol), en comparación con un disacárido (tal como trehalosa).

25) También se añade un tensioactivo a la formulación de anticuerpo o derivado de anticuerpo. Como tensioactivos ilustrativos se incluyen tensioactivos no iónicos tales como polisorbatos (p. ej., polisorbatos 20, 80 etc) o poloxámeros (p. ej., poloxámero 188). La cantidad de tensioactivo añadida es tal que reduce la agregación del anticuerpo/derivado de anticuerpo formulado y/o minimiza la formación de particulados en la formulación y/o reduce la adsorción. Por ejemplo, el tensioactivo puede estar presente en la formulación en una cantidad de 30) aproximadamente un 0,001% a aproximadamente un 0,5%, preferentemente de aproximadamente un 0,005% a aproximadamente un 0,2% y con la mayor preferencia de aproximadamente un 0,01% a aproximadamente un 0,1%.

En una realización, la formulación contiene los agentes identificados anteriormente (es decir, anticuerpo o derivado 35) de anticuerpo, tampón, poliol y tensioactivo) y está esencialmente exenta de uno o más conservantes, tales como alcohol bencílico, fenol, *m*-cresol, clorobutanol y bencetonio Cl. En otra realización, se puede incluir un conservante en la formulación, particularmente cuando la formulación es una formulación multidosis. La concentración de conservante puede estar en el intervalo de aproximadamente un 0,1% a aproximadamente un 2%, con la mayor preferencia de aproximadamente un 0,5% a aproximadamente un 1%. Se pueden incluir uno o más portadores, excipientes o estabilizadores farmacéuticamente aceptables diferentes tales como los descritos en *Remington's 40) Pharmaceutical Sciences* 21.^a edición, Osol, A. Ed. (2006) en la formulación siempre que no afecten de forma adversa a las características deseadas de la formulación. Los portadores, excipientes o estabilizadores aceptables no son tóxicos para los receptores a las dosificaciones y concentraciones empleadas e incluyen: agentes tamponantes adicionales, codisolventes, antioxidantes que incluyen ácido ascórbico y metionina, agentes quelantes tales como EDTA, complejos metálicos (p. ej., complejos de proteína-Zn), polímeros biodegradables 45) tales como poliésteres, y/o contraiones formadores de sales tales como sodio.

Las formulaciones que se vayan a utilizar para la administración *in vivo* deben ser estériles. Esto se consigue 50) fácilmente mediante filtración a través de membranas de filtración estériles, antes de, o después de, la preparación de la formulación.

La formulación se administra a un mamífero que necesita tratamiento con el anticuerpo, preferentemente un ser humano, de acuerdo con métodos conocidos, tales como la administración intravenosa como un bolo o mediante infusión continua a lo largo de un periodo de tiempo, por vía intramuscular, intraperitoneal, intracefalorraquídea, subcutánea, intraarticular, intrasinovial, intratecal, oral, tópica o inhalatoria. En realizaciones preferidas, la formulación se administra al mamífero mediante la aplicación tópica de colirio a la superficie ocular. A tales efectos, la formulación se puede aplicar utilizando un aplicador de colirio, por ejemplo.

60) La dosificación apropiada («cantidad terapéuticamente eficaz») del anticuerpo dependerá, por ejemplo, de la enfermedad que se vaya a tratar, la gravedad y la evolución de la afección, si el anticuerpo se administra a efectos preventivos o terapéuticos, la terapia previa, la anamnesis del paciente y la respuesta al anticuerpo, el tipo de anticuerpo utilizado y el criterio del médico responsable. El anticuerpo o derivado de anticuerpo se administra convenientemente al paciente una vez o a lo largo de una serie de tratamientos y se puede administrar al paciente en cualquier momento a partir del diagnóstico. El anticuerpo o derivado de anticuerpo se puede administrar como tratamiento único o junto con otros fármacos o terapias útiles en el tratamiento de la afección en cuestión.

Como propuesta general, la cantidad terapéuticamente eficaz del anticuerpo o derivado de anticuerpo administrada estará en el intervalo de aproximadamente 0,1 a aproximadamente 50 mg/kg de peso corporal del paciente ya sea mediante una o más administraciones, siendo el intervalo típico de anticuerpo utilizado de aproximadamente 0,3 a aproximadamente 20 mg/kg, más preferentemente de aproximadamente 0,3 a aproximadamente 15 mg/kg, administrados a diario, por ejemplo. Sin embargo, otras pautas posológicas pueden ser útiles. La evolución de esta terapia se monitorea fácilmente mediante técnicas convencionales.

Artículos de fabricación

En otro aspecto de la divulgación que no se reivindica, se proporciona un artículo de fabricación que comprende un recipiente que contiene la formulación farmacéutica acuosa de la presente invención y que opcionalmente proporciona instrucciones para su uso. Los recipientes adecuados incluyen, por ejemplo, botellas, viales, aplicadores de colirio y jeringas. El recipiente puede estar formado por diversidad de materiales tales como vidrio o plástico. Un recipiente a modo de ejemplo es un vial de virio o plástico desechable de 3-20 cc. Como alternativa, para una formulación multidosis, el recipiente puede ser un vial de vidrio de 3-100 cc. El recipiente contiene la formulación, y la etiqueta sobre el mismo, o asociada al mismo, puede indicar el modo de empleo. El artículo de fabricación puede incluir además otros materiales deseables desde un punto de vista comercial y del usuario, que incluyen otros tampones, diluyentes, filtros, agujas, jeringas y prospectos del envase con instrucciones de uso.

Ejemplificación

La presente divulgación se ilustra además mediante los siguientes ejemplos, los cuales no se deben interpretar como más limitantes.

A lo largo de los ejemplos, se utilizan los siguientes materiales y métodos a menos que se indique lo contrario.

Materiales y métodos generales

En general, la puesta en práctica de la presente invención emplea, a menos que se indique lo contrario, técnicas convencionales de química, biología molecular, tecnología de ADN recombinante, inmunología (especialmente, por ejemplo, tecnología de anticuerpos) y técnicas estándar de preparación de polipéptidos. Véanse, p. ej., Sambrook, Fritsch y Maniatis, *Molecular Cloning: Cold Spring Harbor Laboratory Press* (1989); *Antibody Engineering Protocols (Methods in Molecular Biology)*, 510, Paul, S., Humana Pr (1996); *Antibody Engineering: A Practical Approach (Practical Approach Series*, 169), McCafferty, Ed., Irl Pr (1996); *Antibodies: A Laboratory Manual*, Harlow *et al.*, C.S.H.L. Press, Pub. (1999); y *Current Protocols in Molecular Biology*, eds. Ausubel *et al.*, John Wiley & Sons (1992).

Mediciones de la termoestabilidad

Se obtuvieron espectros de IR por transformada de Fourier en reflectancia total atenuada (FTIR-ATR) para diferentes cadenas independientes y moléculas derivadas utilizando la celda para FT-IR de Bio-ATR en un Tensor de Bruker. Las moléculas se concentraron hasta 3mg/ml y se dializaron durante la noche a 4°C frente a PBS, pH 6,5 y se recogió el caudal de tampón como blanco. Los perfiles de desnaturización se obtuvieron termoestimulando las moléculas con un intervalo amplio de temperaturas en incrementos de 5°C (de 25 a 95°C). Todas las manipulaciones de los espectros se realizaron utilizando el programa informático OPUS. La señal de fondo atmosférico transitorio (CO₂ y H₂O) y del tampón principal se sustrajeron del espectro de la proteína. El espectro de la proteína resultante se corrigió entonces respecto a la línea basal y los espectros de amida I de la proteína se determinaron a partir de la anchura del pico resoluble más ancho en la región esperada. Se obtuvieron espectros de la segunda derivada para los espectros de la banda de amida I utilizando una función polinómica de tercer grado con una función de suavizado. Se estimaron los cambios en la estructura de la proteína mediante un análisis de la segunda derivada de la amida I utilizando una curva de calibrado lineal para los cálculos de ajuste a la curva inicial suponiendo un 0% de desnaturización para las 3 mediciones más bajas y un 100% de desnaturización para las 3 mediciones más altas. Se utilizaron los perfiles de desnaturización para aproximar los puntos medios de las transiciones de despliegamiento térmicas (TM) para cada variante aplicando el modelo sigmoidal de Boltzmann.

Mediciones de solubilidad

Se midió la solubilidad relativa de diversas moléculas de scFv después de fomentar la agregación y precipitación de la proteína en presencia de sulfato de amonio. Se añadió sulfato de amonio a la proteína en disoluciones acuosas para conseguir incrementos de un 5% de la saturación en la mezcla de sal-proteína final. La precipitación en el intervalo dinámico se determinó empíricamente y los intervalos de saturación se redujeron en este intervalo a intervalos de saturación de un 2.5% en la mezcla final. Después de la adición de sulfato de amonio, se mezclaron

las muestras cuidadosamente y centrifugaron 30 minutos a 6000rpm. Se recuperó la proteína restante en los sobrenadantes para cada porcentaje de saturación de sulfato de amonio. Las curvas de solubilidad se determinaron midiendo la concentración de proteína en el sobrenadante mediante mediciones de UV-VIS utilizando un espectrofotómetro NanoDropTM 1000. Las mediciones de la proteína soluble remanente en los sobrenadantes se normalizaron y se utilizaron para estimar los puntos medios de solubilidad relativa para cada variante aplicando el modelo sigmoidal de Boltzmann.

Prueba de solubilidad a corto plazo

- 5 10 Las moléculas de scFv se examinaron después de dos semanas de incubación a 40°C para determinar la presencia de productos de degradación y agregados solubles. Se dializaron proteínas con una concentración de 10 mg/ml durante la noche a 4°C frente a PBS con un intervalo amplio de pH (3,5, 4,5, 5,5, 6,5, 7,0, 7,5 y 8,5). Se almacenaron moléculas de control con la misma concentración en tampón PBS estándar (pH 6,5) a -80°C durante el periodo de 2 semanas. La determinación de las bandas de degradación mediante SDS-PAGE se realizó en los puntos de tiempo t=0 y t=14d, y se evaluaron los agregados solubles en el SEC-HPLC. La determinación de la actividad remanente después de 2 semanas a 40°C se realizó utilizando Biacore.

EJEMPLO 1

20 **ESTRATEGIA DE INMUNIZACIÓN PARA GENERAR ANTICUERPOS ANTI-VEGF.**

En este ejemplo, se describe una estrategia de inmunización que utilizó un péptido derivado de VEGF antigénico novedoso, para generar anticuerpos capaces de reconocer VEGFA humano, de ratón y conejo.

- 25 30 A partir de estudios de mutagénesis por barrido de alanina realizados en Genentech, se conocen los residuos de VEGFA que son cruciales para una interacción de alta afinidad con VEGFr (Fuh, G. et al., (2006) *J. Biol. Chem.* 281, 6625-6631). Aunque el sitio de unión al receptor probablemente constituye un epítopo conformacional, la mayoría de los residuos cruciales se encuentran en una hélice alfa, en los 10 primeros aminoácidos de VEGFA maduro.
- 35 El VEGFA de conejo contiene tres cambios de aminoácido en esta hélice alfa, cuando se compara con la secuencia humana; en cambio, el VEGFA de ratón es idéntico al humano en esta región. Por tanto, para la generación de anticuerpos de reacción cruzada ratón-humano, el conejo representa una especie adecuada para la inmunización. Además, la inmunización de conejo puede conducir a Ab que tengan mayor afinidad que la inmunización de ratón.

40 45 Tal como se ha indicado anteriormente, la interacción con residuos en la hélice alfa aminoterminal de VEGFA parece ser el factor más crucial para la unión a VEGFR1. Por lo tanto, este tramo con una longitud de 10 aminoácidos se puede utilizar como epítopo para la inmunización. Como alternativa, se puede inyectar el VEGFA completo, sin embargo, otros tramos peptídicos de VEGFA son más inmunógenos, lo cual se reduce así la probabilidad de generar anticuerpos neutralizantes. Esta hipótesis está respaldada por el hecho de que dos péptidos diferentes, encontrándose ambos próximos al extremo C de VEGFA, son potencialmente inmunógenos según predice el método de Johnson y Wolf. Este método predice únicamente un leve potencial inmunogénico de la hélice alfa aminoterminal. Por lo tanto, la inmunización con el péptido que constituye la hélice alfa solamente, puede ser más sencilla que la inmunización con el VEGFA completo. La probabilidad de desencadenar una respuesta inmunitaria fuerte se puede incrementar aún más mediante la fusión o el acoplamiento químico del péptido a hemocianina de lapa californiana (KLH, por sus siglas en inglés).

50 Se realizaron cuatro estrategias de inmunización tal como se indica a continuación

- 55 60 1. A. Preinmunización de conejos con VEGFA₁₋₆₅ humano completo para incrementar la probabilidad de obtener ligadores conformacionales. Segundo refuerzo con péptido del tramo de aa 16-KFMDVYQRSYCHP-28 (subrayado: interacción con el receptor; doble subrayado, divergente en conejo, Cys participa en el enlace disulfuro de acuerdo con su estructura cristalina). La Cys contenida en la secuencia peptídica se podría utilizar para el acoplamiento con KLH y, por lo tanto, no estaría expuesta como Cys libre. El péptido final tendría el siguiente aspecto: KFMDVYQRSY-Cys-KLH.
2. B. Preinmunización de ratones con VEGFA₁₋₆₅ completo para incrementar la probabilidad de obtener ligadores conformacionales. Segundo refuerzo con péptido del tramo de aa 16-KFMDVYQRSYCHP-28 (Cys participa en el enlace disulfuro de acuerdo con su estructura cristalina). La Cys contenida en la secuencia peptídica se puede utilizar para el acoplamiento con KLH y, por lo tanto, no se expondría como Cys libre. El péptido final tendría el siguiente aspecto: KFMDVYQRSY-Cys-KLH.

3. C. Preinmunización de conejos/ratones con péptido del tramo de aa 16-KFMDVYQRSYCHP -28 (péptido final: KFMDVYQRSY-Cys-KLH). Segundo refuerzo con VEGFA₁₆₅ completo para incrementar la probabilidad de obtener ligadores conformacionales.
- 5 4. D. Inmunización con VEGFA₁₆₅ completo en conejos.

EJEMPLO 2

Injerto de CDR y humanización funcional de anticuerpos anti-VEGF de conejo monoclonales.

Injerto de CDR de conejo

A diferencia de los métodos de humanización tradicionales que emplean el armazón aceptor de anticuerpo humano que comparte la mayor homología secuencial con el anticuerpo donante no humano, las CDR de conejo se injertaron ya sea en el armazón FW1.4 (SEQ ID No. 172) para generar un Min-injerto o en el armazón «conejizado» rFW1.4 (SEQ ID No. 173) o su variante rFW1.4(v2) (SEQ ID No. 174) para generar un Max-injerto. Ambos armazones se seleccionaron fundamentalmente en función de propiedades funcionales deseables (solubilidad y estabilidad), idoneidad estructural para albergar una gran variedad de CDR de conejo y homología razonable con la secuencia consenso de dominio variable de conejo. El armazón rFW1.4 es un derivado de FW1.4 que se diseñó además con el objetivo de servir como armazón aceptor universal para prácticamente cualquier conjunto de CDR de conejo. Aunque la secuencia de armazón estable y soluble FW1.4 presenta una alta homología con anticuerpos de conejo, no es la secuencia más homóloga disponible.

Identificación de residuos involucrados potencialmente en la unión

Para cada secuencia de dominio variable de conejo, se identificó la parte complementaria de la línea germinal de conejo más cercana. Si no se pudo determinar la línea germinal más próxima, la secuencia se comparó frente al consenso de un subgrupo o el consenso de secuencias de conejo con un porcentaje de similitud alto. Los residuos de armazón inusuales se consideraron como resultado posible de la hipermutación somática y, por lo tanto, que desempeñan una función en la unión a antígeno. Por consiguiente, tales residuos se tuvieron en cuenta para el injerto en el armazón aceptor rFW1.4 o rFW1.4(v2) a fin de generar Max-injertos. Particularmente, se injertaron los residuos involucrados potencialmente en contacto directo con el antígeno o que afectaban a la disposición de VL y VH. En caso necesario, se sustituyeron residuos adicionales descritos como influyentes sobre la estructura de CDR. No se realizaron sustituciones de armazón cuando se injertaron CDR en FW1.4 (Min-injertos). Por ejemplo, para generar 578minmax, se mutó el residuo VH 94 (H94) de rFW1.4 al residuo correspondiente en la secuencia donante. El anticuerpo 578 de conejo contiene Gly en H94 mientras que tanto la línea germinal más homóloga como el consenso de conejo contienen Arg en la posición H94. Gly tiene una flexibilidad excepcional (ángulos *phi* positivos) que no se encuentra en otros aminoácidos. Esto sugiere que desempeña un papel en el ángulo de torsión de la cadena principal y una posible influencia fuerte de la conformación de bucle con repercusiones sobre la actividad. Se pueden identificar otros ejemplos de posiciones de armazón que se injertaron para obtener los Max-injertos tal como se dan a conocer en la presente realizando una alineación de secuencias de las regiones de armazón de rFW1.4, rFW1.4(v2) y las secuencias scFv de interés proporcionadas en la presente. Con tal fin se pueden utilizar, por ejemplo, herramientas en línea como las conocidas en la técnica (p. ej., ClustalW según su disponibilidad el 23 de junio de 2009 en <http://www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw2/index.html> o MultiAlin según su disponibilidad el 23 de junio de 2009 en <http://bioinfo.genotoul.fr/multalin>). Todas las posiciones de armazón en las que rFW1.4 y rFW1.4(v2) contienen el mismo residuo y en las que el scFv de interés revela un residuo diferente, son posiciones de armazón que se injertaron para obtener los Max-injertos.

Reordenamiento de dominios

Se combinaron cadenas ligeras variables de Min-injertos con Max-injertos de cadena pesada variable para identificar combinaciones óptimas en términos de propiedades biofísicas (solubilidad y estabilidad) y actividad.

Clonación y expresión de scFv

Los scFv descritos y caracterizados en la presente se produjeron tal como se indica a continuación. Las secuencias de VL humanizadas (SEQ ID NO:82-106) se conectaron con las secuencias de VH humanizadas (SEQ ID NO:118-166) a través del conector de SEQ ID NO:181 para producir un scFv de la siguiente orientación: NH₂-VL-conector-VH-COOH. En muchos casos, se sintetizaron *de novo* secuencias de ADN que codificaban los diferentes scFv en el proveedor de servicios Entelechon GmbH (www.entelechon.com). Las inserciones de ADN resultantes se clonaron en el vector de expresión bacteriano pGMP002 a través de sitios de restricción Ncol y HindIII introducidos en el extremo 5' y 3' de la secuencia de ADN de scFv, respectivamente. Entre la secuencia de ADN del dominio VL y el dominio VH, se localiza un sitio de restricción BamHI. En algunos casos, el ADN que codificaba scFv no se sintetizó *de novo*, sino que los constructos que expresaban scFv se clonaron mediante reordenación de dominios.

Por consiguiente, los dominios VL se escindieron y se introdujeron en los nuevos constructos a través de los sitios de restricción Ncol y BamHI y los dominios VH a través de los sitios de restricción BamHI y HindIII. En otros casos, se introdujeron mutaciones puntuales en el dominio VH y/o VL utilizando métodos de ensamblaje por PCR del estado de la técnica. La clonación de GMP002 se describe en el Ejemplo 1 del documento WO2008006235. La producción de los scFv se realizó de forma análoga a la de ESBA105, como se describe en el Ejemplo 1 del documento WO2008006235.

EXAMPLE3

10 ANÁLISIS DE UNIÓN POR BIACORE DE LOS SCFV ANTI-VEGF

En este ejemplo, se evaluó la capacidad de unión por Biacore de los scFv y se midió la afinidad de unión utilizando el método ilustrativo de resonancia de plasmón superficial con BIACore™-T100. Las proteínas VEGF, probadas para determinar la unión a estos scFv candidatos, en este ejemplo y en ejemplos posteriores, incluyen VEGF₁₆₅ humano recombinante (PeproTech EC Ltd.), VEGF₁₂₁ humano recombinante (PeproTech EC Ltd.), VEGF₁₁₀ humano recombinante (ESBA Tech AG), VEGF₁₆₄ murino recombinante (PeproTech EC Ltd.), VEGF₁₆₄ de rata recombinante (Biovision), VEGF₁₁₀ de conejo recombinante (ESBATech AG) y PLGF humano recombinante (PeproTech EC Ltd.) purificados y expresados en *Escherichia coli*. Para el experimento de resonancia de plasmones superficiales, se activaron chips biosensores de dextrano carboximetilado (CM4, GE Healthcare) con clorhidrato de *N*-etil-*N'*-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida y *N*-hidroxisuccinimida de acuerdo con las instrucciones del proveedor. Cada una de las 6 formas de VEGF diferentes, tal como se ejemplificaron anteriormente, se acopló con 1 de las 4 cubetas de lectura diferentes en un chip sensor CM4 utilizando un procedimiento de acoplamiento amílico estándar. La diversidad de respuestas obtenidas con estas moléculas de VEGF inmovilizadas después del acoplamiento y bloqueo fueron -250-500 unidades de respuesta (UR) para hVEGF₁₆₅, -200 UR para hVEGF₁₁₀, hVEGF₁₂₁, VEGF₁₆₄ murino, VEGF₁₆₄ de rata y VEGF₁₁₀ de conejo y ~400 UR para PLGF. La 4.^a cubeta de lectura de cada chip se trató de forma similar salvo que no se inmovilizaron proteínas antes del bloqueo, y la cubeta de lectura se utilizó como referencia en línea. Se inyectaron varias concentraciones de scFv anti-VEGF (p. ej., 90 nM, 30 nM, 10 nM, 3,33 nM, 1,11 nM, 0,37 nM, 0,12 nM y 0,04 nM) en tampón HBS-EP (HEPES 0,01 M, pH 7,4 o 5, NaCl 0,15 M, EDTA 3 mM, tensioactivo P20 al 0,005 %) en las cubetas de lectura a un caudal de 30 µl/min durante 20 min. Se permitió que la disociación del scFv anti-VEGF del VEGF en el chip CM4 transcurriera durante 10 min a 25°C. Se generaron sensogramas de cada muestra de scFv anti-VEGF después de la corrección de la cubeta de referencia en línea seguido de la sustracción de la muestra de tampón. La constante de la velocidad de disociación aparente (k_d), la constante de la velocidad de asociación aparente (k_a) y la constante de equilibrio de disociación aparente (K_D), se calcularon utilizando el modelo de unión de Langmuir único con el programa informático de evaluación BIACore T100, versión 1.1.

Como un resultado ilustrativo, algunos candidatos de scFv anti-VEGF principales se enumeran en la Tabla 7 que muestra su afinidad de unión a hVEGF₁₆₅. Su potencia como inhibidores de VEGF, que se mide utilizando ELISA de competición y/o ensayo con HUVEC para VEGFR y que se describe en ejemplos posteriores, también se muestra en la Tabla 7. En la Figura 1 se ilustran las curvas cinéticas de algunos candidatos principales ilustrativos, p. ej., 511max y 578max, con respecto a su unión a hVEGF₁₆₅. También se determinaron sus constantes de afinidad (k_d , k_a y K_D). Algunos candidatos principales también presentan especificidad de especie en su unión a diferentes proteínas de VEGF de fuentes diferentes. Por ejemplo, algunos datos de afinidad medidas a un pH de 5 utilizando VEGF₁₆₄ de ratón y de rata como compañero de unión, se muestran en las Tablas 8 a y b. Un candidato de scFv principal ilustrativo, 578minmax, tiene una K_D de 5,76E-10 M y 7,48E-10 M en su unión a VEGF₁₆₄ de ratón y de rata, respectivamente a un pH de 5 (Tablas 8 a y b) y de 2,73E-11 y 2,19E-11 a un pH de 7,4 (datos no mostrados). Esta especificidad de especie se ilustra además en la Figura 4 en las curvas cinéticas y los datos de afinidad para la unión entre 578minmax y las proteínas VEGF humana, de ratón y de rata.

50 Aparte de la especificidad de especie en su unión a VEGF de organismos diferentes, muchos candidatos de scFv principales también presentan afinidades de unión diferenciadas hacia diversas isoformas de VEGF. Por ejemplo, los datos de afinidad medidas a pH 5,0 para algunos scFv candidatos que se unen a VEGF₁₆₅, VEGF₁₂₁ y VEGF₁₁₀ humanos se comparan en la Tabla 9. En los mismos experimentos, también se utilizó la proteína PIGF como control negativo sin capacidad de unión a esos scFv candidatos. Además, las curvas cinéticas y los datos de afinidad diferenciados para la unión entre 578Max e isoformas de VEGF, como ejemplo, se ilustran en la Figura 3.

60 La presente invención también desvela derivados que se originan a partir de los candidatos de scFv anti-VEGF principales, que se mencionan anteriormente. Se ilustran algunos derivados principales de candidato 578 y 511, tal como se enumeran en la Tabla 10, con respecto a su afinidad y potencia (medidas a un pH de 5,0). En este experimento, se utilizó medición con Biacore para determinar la afinidad de estos derivados hacia hVEGF₁₆₅, mientras que se utilizó el ensayo ELISA de competición y/o el ensayo con HUVEC para hVEGFR2, para definir su potencia con respecto a la inhibición de los VEGF (Tabla 10). Tres derivados, 578max, 578minmax y 578 wt-His, se ejemplifican además en sus curvas cinéticas y datos de afinidad para la unión a hVEGF₁₆₅ en la Figura 4.

5

Para los derivados de los candidatos principales, se determinaron sus caracterizaciones biofísicas y se ilustraron en las Figuras 5-7 y en la tabla 11. Estas características incluyen, tal como se ilustra en la tabla 11, la T_m determinada por FTIR, el porcentaje de pérdida de proteína o lamina β después de una incubación a 60°C durante 30 min, la solubilidad determinada por precipitación con sulfato de amonio, el rendimiento de replegamiento durante el proceso de producción y los niveles de expresión en *E. coli*. Tres derivados, 578max, 578minmax y 578minmax_DHP, se caracterizaron por su estabilidad térmica en sus curvas de despliegamiento frente a diferentes temperaturas medidas por FT-IR (Figura 5).

Tabla 7: revisión general de la afinidad y potencia de los candidatos principales

ID	Proteína N. ^o	Actividad rel. en ELISA comp. para hVEGR2 (CE50 _{Luc} [nM]/CE50 _{prueba} [nM])	Actividad rel. en ELISA comp. para hVEGR1 (CE50 _{Luc} [nM]/CE50 _{prueba} [nM])	Actividad rel. en ensayo con HUVEC (CE50 _{Luc} [nM]/CE50 _{prueba} [nM])
375-min	857	0,3	ND	ND
375-max	873	0,6	ND	ND
509-min	854	1,0	2,9	ND
509-max	855	4,1	13	0,003
509-max II	856	0,6	0,09	0,0009
511-min	801	4,9	0,7	0,0011
511-max	802	8,7	8	0,0179
534-min C-His	807	0,1	ND	ND
534-max	793	1,1	ND	0,0014
567-min	884	9,7	14,9/57	ND
567-max	874	4,1	15,7/154,5	0,0086
578-min	820	4,1	4,8	0,1001
578-max	821	9,6	35,5/ 51,6	1,483
610-min	882	0,1	ND	ND
610-max	883	0,4	ND	ND
435-min	944	0,03	ND	ND
435-max	945	7,6	0,00039	ND
ID		Mediciones de Biacore (pH 5)	Mediciones de Biacore (pH 7,4)	
		hVEGF ₁₆₅	hVEGF ₁₆₅	

ID	Proteína N. ^º	Actividad rel. en ELISA comp. para hVEGR2 (CE50 _{Luc} [nM]/CE50 _{prueba} [nM])		Actividad rel. en ELISA comp. para hVEGR1 (CE50 _{Luc} [nM]/CE50 _{prueba} [nM])		Actividad rel. en ensayo con HUVEC (CE50 _{Luc} [nM]/CE50 _{prueba} [nM])	
		ka (1/Ms)	kd (1/s)	KD (M)	ka (1/Ms)	kd (1/s)	KD (M)
375-min		9,27E+05	5,01 E-03	5,41E-09	> E+08	3,86E+00	NA
375-max		2,44E+06	6,55 E-03	2,68E-09	5,09E+07	2,42E-01	4,74E-09
509-min		6,23E+05	1,14 E-03	1,82E-09	3,52E+06	1,08E-02	3,06E-09
509-max		2,26E+06	2,72 E-03	1,21E-09	1,42E+06	5,37E-04	3,78E-10
509-maxII		8,38E+05	2,82 E-03	3,37E-09	7,59E+06	1,98E-02	2,61E-09
511-min		5,05E+05	1,28 E-03	2,53E-09	6,75E+05	8,85E-04	1,31E-09
511-max		6,59E+05	4,40 E-05	6,67E-11	8,00E+05	6,85E-05	8,56E-11
534-min	C-His	2,71E+05	9,21 E-03	3,41E-08	ND	ND	ND
534-max		1,88E+06	1,73 E-02	9,21E-09	1,06E+06	2,62E-03	2,47E-09
567-min		2,01E+06	4,61 E-04	2,30E-10	1,11E+06	7,00E-04	6,31E-10
567-max		1,20E+06	2,26 E-04	1,88E-10	1,17E+06	1,67E-04	1,43E-10
578-min		1,14E+06	1,03 E-02	9,01E-09	1,11E+06	2,02E-04	1,81E-10
578-max		7,00E+05	3,07 E-04	4,39E-10	1,58E+06	3,76E-05	2,37E-11
610-min		2,51E+05	2,65 E-03	1,06E-08	Sin unión	Sin unión	Sin unión
610-max		5,09E+05	6,01 E-04	1,18E-09	> E+08	3,57E+01	NA
435-min		Sin unión	Sin unión	Sin unión	4,95E+05	1,43E-02	2,89E-08
435-max		1,67E+05	7,55 E-04	4,53E-09	1,13E+06	1,04E-04	9,22E-11

Tabla 8a: especificidad de especie de candidatos principales seleccionados (VEGF 164 de ratón y de rata)

ID	Proteína N. ^º	VEGF ₁₆₄ de ratón			VEGF de rata		
		ka (1/Ms)	kd (1/s)	KD (M)	ka (1/Ms)	kd (1/s)	KD (M)
509-min	854	6,14E+05	1,00E-03	1,63E-09	3,51E+05	8,44E-04	2,41E-09
509-max	855	4,09E+06	5,90E-03	1,45E-09	3,90E+06	6,45E-03	1,65E-09
509-maxII	856	3,47E+07	6,01E-02	1,73E-09	1,47E+07	2,66E-02	1,81E-09
511-min	801	6,25E+05	1,03E-03	1,64E-09	5,50E+05	1,12E-03	2,04E-09
511-max	802	7,53E+05	4,61E-05	6,13E-11	6,26E+05	6,63E-05	1,06E-10

ID	Proteína N. ^o	VEGF ₁₆₄ de ratón			VEGF de rata		
		ka (1/Ms)	kd (1/s)	KD (M)	ka (1/Ms)	kd (1/s)	KD (M)
567-min	884	2,06E+06	3,50E-04	1,70E-10	1,72E+06	4,80E-04	2,79E-10
567-max	874	1,64E+06	1,52E-04	9,29E-11	1,36E+06	2,03E-04	1,49E-10
578-min	820	1,40E+06	1,51E-02	1,07E-08	1,70E+06	1,82E-02	1,07E-08
578-max	821	1,03E+06	4,40E-04	4,29E-10	8,83E+05	5,28E-04	5,98E-10

Tabla 8b: especificidad de especie de los candidatos de desarrollo seleccionados

ID	Proteína N. ^o	Mediciones Biacore de VEGF ₁₆₄ de ratón			Valores relativos de VEGF ₁₆₄ de ratón	
		ka (1/Ms)	kd (1/s)	KD (M)	(kd _{hVEGF165} /kd _{mVEGF164})	(Kd _{hVEGF165} /Kd _{mVEGF164})
578minmax	903	1,14E+06	6,57E-04	5,67E-10	0,8	1,1
578 minmax_FW1.4:DHP	961	1,10E+06	6,69E-04	6,08E-10	0,6	0,9
578minmaxT84N_V89L	1008	1,23E+06	1,88E-03	1,53E-09	1,0	1,0
578min_max					1,4	1,8
T84N_V89L_DHP	1017	1,47E+06	2,16E-03	1,46E-09		
ID	Proteína N. ^o	Mediciones Biacore de VEGF ₁₆₄ de rata			Valores relativos de VEGF ₁₆₄ de rata	
		ka (1/Ms)	kd (1/s)	KD (M)	(kd _{hVEGF165} /kd _{mVEGF164})	(Kd _{hVEGF165} /Kd _{mVEGF164})
578minmax	903	8,58E+05	6,41E-04	7,48E-10	0,8	0,8
578 minmax_FW1.4:DHP	961	8,00E+05	6,76E-04	8,45E-10	0,6	0,7
578minmaxT84N_V89L	1008	8,02E+05	1,52E-03	1,89E-09	1,2	0,8
578min_max					1,6	1,5
T84N_V89L_DHP	1017	1,04E+05	1,90E-03	1,82E-09		

Tabla 9: Unión de candidatos principales seleccionados a isoformas de VEGF (VEGF121 y hVEGF110 humanos)

ID	Proteína N. ^o	hVEGF ₁₆₅			hVEGF ₁₁₀		
		ka (1/Ms)	kd (1/s)	KD (M)	ka (1/Ms)	kd (1/s)	KD (M)
509-min	854	6,23E+05	1,14E-03	1,82E-09	2,87E+05	4,74E-04	1,65E-09
509-max	855	2,26E+06	2,72E-03	1,21E-09	6,48E+05	2,35E-04	3,63E-10
509-maxII	856	8,38E+05	2,82E-03	3,37E-09	9,01E+05	1,33E-03	1,48E-09
511-min	801	5,05E+05	1,28E-03	2,53E-09	6,19E+05	8,98E-04	1,45E-09
511-max	802	6,59E+05	4,40E-05	6,67E-11	4,05E+05	7,96E-05	1,97E-10
567-min	884	2,01E+06	4,61E-04	2,30E-10	1,52E+06	3,82E-05	2,51E-11
567-max	874	1,20E+06	2,26E-04	1,88E-10	1,00E+06	3,27E-05	3,27E-11
578-min	820	1,14E+06	1,03E-02	9,01E-09	9,15E+05	1,04E-02	1,14E-08
578-max	821	7,00E+05	3,07E-04	4,39E-10	5,23E+05	7,22E-04	1,38E-09

(continuación)

ID	hVEGF ₁₂₁			PIGF
	ka (1/Ms)	kd (1/s)	KD (M)	
509-min	3,54E+05	4,53E-04	1,28E-09	sin unión

ID	hVEGF ₁₂₁			PIGF
	ka (1/Ms)	kd (1/s)	KD (M)	
509-max	7,42E+05	2,49E-04	3,35E-10	sin unión
509-maxII	8,97E+05	1,23E-03	1,37E-09	sin unión
511-min	7,78E+05	9,63E-04	1,24E-09	sin unión
511-max	4,67E+05	9,97E-05	2,14E-10	sin unión
567-min	1,89E+06	4,54E-05	2,41E-11	sin unión
567-max	1,13E+06	5,76E-05	5,11E-11	sin unión
578-min	9,61E+05	8,80E-03	9,16E-09	sin unión
578-max	5,87E+05	5,58E-04	9,50E-10	sin unión

Tabla 10: Revisión general sobre la afinidad y potencia de derivados principales (578 y 511)

ID	Proteín a nº.	Actividad rel. en ELISA comp. para hVEGR2 (CE50 _{Luc} [nM]/CE50 _{prueba} [nM])	Actividad rel. en ensayo con HUVEC (CE50 _{Luc} [nM]/CE50 _{prueba} [nM]) para hVEGF	Mediciones de Biacore para hVEGF ₁₆₅		
				ka (1/Ms)	kd (1/s)	KD (M)
578 wildtype C-His	798	ND	ND	8,34E+05	1,69E-04	2,00E-10
578-min	820	4,1	0,1001	1,14E+06	1,03E-02	9,01E-09
578-max	821	9,6	0,94/1,0/1,2/1,2 (nueva disposición)	7,00E+05	3,07E-04	4,39E-10
578-max FW1.4_DHP	960	ND	ND	9,30E+05	2,48E-04	2,66E-10
578-minmax	903	8,4	1,6/1,4 (nueva disposición)	8,06E+05	5,04E-04	6,25E-10
578minmax FW1.4_DHP	961	16,5	0,78/1,9	7,11E+05	4,09E-04	5,76E-10
578-max-min	902	6,5	ND	1,35E+06	8,83E-03	6,55E-09
578min_max T84N	991	ND	ND	7,21E+05	7,00E-04	9,71E-10
578min_max V89A	978	ND	ND	5,09E+05	6,12E-04	1,20E-09
578min_max V89L	980	ND	ND	8,75E+05	1,87E-03	2,13E-09
578min_max T84N_V89L	1008	8,4	ND	1,13E+06	1,80E-03	1,59E-09
578min_max T84N_V89A	1009	7,5	ND	8,01E+05	4,93E-04	6,15E-10
578min_max T84N_V89L_DHP	1017	ND	ND	ND	ND	ND
578min_max		ND	ND	ND	ND	ND
T84N_V89A_DHP 578max sint FW opt	950	ND	ND	1,35E+06	5,86E-04	4,33E-10
578min_max_sintFW	997	7,2	ND	1,23E+06	9,89E-04	8,03E-10

ID	Proteín a nº.	Actividad rel. en ELISA comp. para hVEGR2 (CE50 _{Luc} [nM]/CE50 _{prueba} [nM])	Actividad rel. en ensayo con HUVEC (CE50 _{Luc} [nM]/CE50 _{prueba} [nM]) para hVEGF	Mediciones de Biacore para hVEGF ₁₆₅		
				ka (1/Ms)	kd (1/s)	KD (M)
578max_min_sintFW	990	ND	ND	1,55E+06	5,31E-03	3,42E-09
578min_max_FW1. sint	1016	ND	ND	7,08E+05	7,02E-04	9,91E-10
511-min	801	4,9	0,0011	5,05E+05	1,28E-03	2,53E-09
511-max	802	8,7	0,0179	6,59E+05	4,40E-05	6,67E-11
511min_max	904	5,4	ND	3,66E+05	1,02E-04	2,78E-10
511max_min	905	ND	ND	5,11E+05	7,54E-04	1,48E-09

Tabla 11: Revisión general de la caracterización biofísica de derivados principales (578 y 511)

ID	Proteína N.º	TM en Bio-ATR [°C]	% de pérdida de lámina beta (Aquaspec 60°C)	% de pérdida de proteína (precipitación a 60°C)
578-min	820	66,85	ND	ND
578-max	821	70,36	-1,93%	16,20%
578-max FW1.4_DHP	960	ND	ND	ND
578-minmax	903	71,12	-0,52%	10,99%
578minmax FW1.4_DHP	961	70,18	-0,15%	14,82%
578-max-min	902	ND	ND	ND
578min_max T84N	991	70,78	0,11%	20,30%
578min_max V89A	978	63,23	-2,28%	48,22%
578min_max V89L	980	68,15	-0,79%	38,99%
578min_max T84N_V89L	1008	69	-0,80%	28,30%
578min_max T84N_V89A	1009	ND	ND	ND
578min_max T84N_V89L_DHP	1017	67,8	ND	ND
578min_max T84N_V89A_DHP	1080	66,3	ND	ND
578max sint FW opt	950	63,62	54,06%	97,85%
578min_max_sintFW	997	63,25	50,89%	98,02%
578max_min_sintFW	990	ND	ND	ND
578min_max_FW1. sint	1016	65,7	-0,20%	21,30%
511-min	801	ND	ND	ND
511-max	802	70,5	-1,53%	4,50%
511min_max	904	ND	ND	ND
511max_min	905	ND	ND	ND
567min	884	54	100,00%	100,00%

(continuación)

ID	Solubilidad por precipitación con sulfato de amonio [CE ₅₀ en % de saturación de NH ₄ (SO ₄) ₂]	Producción: Rendimiento de replegamiento [mg/l]	Nivel de expresión en <i>E. coli</i> [unidades arbitrarias]
578-min	ND	1,5	++
578-max	27,24	12,5	+
578-max FW1.4_DHP	ND	11,6	+
578-minmax	28,13	23,93	+++
578minmax_FW1.4_DHP	32,36	50,5	+++
578-max-min	ND	4,5	+
578min_max T84N	ND	7,5	+++
578min_max V89A	ND	16	+++
578min_max V89L	ND	30	+++
578min_max T84N_V89L	27,88	24	+++
578min_max T84N_V89A	ND	22	+++
578min_max T84N_V89L_DHP	30,80	36	+++
578min_max T84N_V89A_DHP	30,70	30	+++
578max sint FW opt	28,30	19,4	++
578min_max_sintFW	30,05	24	+++
578max_min_sintFW	ND	0,5	++
578min_max_FW1. sint	25,10	28	+++
511-min	ND	13,5	+++
511-max	8,62	6,47	+++
511min_max	ND	3,75	+++
511max_min	ND	7	+++
567min	20,70	16,5	+++

Algunos derivados, como los que se enumeran en la Figura 6, se compararon con respecto a su desnaturización y precipitación después de estrés térmico (p. ej., a 50°C, 60°C o 70°C) durante 30 minutos. 578max, 578minmax y 578minmax_DHP se ejemplificaron además por su solubilidad, que se determinó mediante precipitación con sulfato de amonio. Como en la Figura 7, el porcentaje de proteínas solubles de estos derivados en diferentes concentraciones de sulfato de amonio se compararon.

Tabla 12a: ligadores anti-VEGF después de incubación durante 30 min a 50°C

Nombre de la muestra	% de lámina beta	Nanodrop (mg/ml)
950	100,8	81,2
978	100,9	85,1
980	99,9	100,3
991	99,4	99,2
802	100,4	96,7
821	100,6	93,5

Nombre de la muestra	% de lámina beta	Nanodrop (mg/ml)
903	99,5	99,4
961	98,7	101,7
997	99,9	76,39

Tabla 12a: ligadores anti-VEGF después de incubación durante 30 min a 60°C

Nombre de la muestra	% de lámina beta	Nanodrop (mg/ml)
950	45,9	2
978	102,3	52
980	100,8	61
991	99,9	80
802	101,5	96
821	101,9	84
903	100,5	89
961	100,1	85
997	49,1	2

Tabla 12a: ligadores anti-VEGF después de incubación durante 30 min a 70°C

Nombre de la muestra	% de lámina beta	Nanodrop (mg/ml)
950	43,1	1,0
978	13,4	2,7
980	4,5	0,2
991	21,5	1,4
802	100,4	80,8
821	58,4	3,3
903	81,9	0,7
961	46,3	1,1
997	0,0	0,3

5 EJEMPLO 4

ENSAYOS DE BLOQUEO DEL RECEPTOR DE VEGF

Para candidatos de scFv anti-VEGF o sus derivados, también se midió su potencia como inhibidores de VEGF además de su afinidad de unión a VEGF en el Ejemplo 3. Los métodos para medir su potencia incluyen, por ejemplo, el ELISA de competición para VEGFR, tal como se ejemplifica en este ejemplo, y ensayos con HUVEC (Figura 8).

Los ensayos ELISA de competición para VEGFR incluyen, por ejemplo, ensayos de bloqueo del receptor VEGFR2 y ensayos de bloqueo del receptor VEGFR1. Para el ensayo de bloqueo del receptor VEGFR2, una placa de ELISA

Maxisorp de 96 pocillos (Nunc) at 0,05 µg/ml se recubrió con VEGF₁₆₅ humano en PBS y se bloqueó utilizando PBS con BSA al 0,1 % y Tween 20 al 0,2 % (PBST). 500 ng/ml de quimera de VEGFR2 humano recombinante/Fc (R&D Systems Inc.), que consistía en los residuos aminoacídicos 1-764 del dominio extracelular de VEGFR2 humano fusionados con un Fc de IgG₁ humana marcado con 6x histidina, se incubó primero con scFv anti-VEGF diluidos en serie 1:3 en PBST. Despues de 30-60 min de incubación a temperatura ambiente, las mezclas se

transfirieron a la placa con VEGF₁₆₅ humano inmovilizado y se incubaron durante 90 min. La unión de la quimera de VEGFR2/Fc al VEGF₁₆₅ inmovilizado se detectó con Fcy de cabra anti-IgG humana (Fab₂) acoplado a peroxidasa de rábano picante (Jackson ImmunoResearch) seguido de sustrato (sustrato BM Blue POD, Roche Diagnostics). Se midió la densidad óptica a 450 nm (DO 450 nm) utilizando un lector de microplacas Sunrise (Tecan). Los datos se analizaron utilizando un ajuste de curva logística de 4 parámetros, y se calcularon los valores de CE₅₀ a partir de las curvas de respuesta a la dosis de los scFv. La potencia de los candidatos principales, o de

sus derivados, ilustrativos, medida a través de un ensayo de bloqueo del receptor VEGFR2, se enumera en las Tablas 7 y 9.

Para el ensayo de bloqueo del receptor VEGFR1, una placa de ELISA Maxisorp de 96 pocillos (Nunc) se recubrió con VEGF₁₆₅ humano a 0,0125 µg/ml en PBS y se bloqueó utilizando PBS con BSA al 0,4 % y Tween 20 al 0,1 %. En primer lugar, 100 ng/ml de quimera de VEGFR1 humano recombinante/Fc (R&D Systems Inc.), que consistía en los residuos aminoacídicos 1-687 del dominio extracelular de VEGFR1 humano fusionados a un Fc de IgG₁ humana marcado con 6x histidina, se incubaron con scFv anti-VEGF diluidos en serie 1:3 en PBST. Después de 30-60 min de incubación a temperatura ambiente, las mezclas se transfirieron a la placa con VEGF₁₆₅ humano inmovilizado y se incubaron durante 90 min. La unión de la quimera de VEGFR1/Fc al VEGF₁₆₅ inmovilizado se detectó con Fcγ de cabra anti-IgG humana (Fab₂) acoplado a peroxidasa de rábano picante (Jackson ImmunoResearch) seguido de sustrato (sustrato BM Blue POD, Roche Diagnostics). Se midió la densidad óptica a 450 nm (DO 450 nm) utilizando un lector de microplacas Sunrise (Tecan). Los datos se analizaron al igual que antes, y se calcularon los valores de CE₅₀ a partir de las curvas de respuesta a la dosis de los scFv. La potencia de los candidatos principales ilustrativos, medida a través de un ensayo de bloqueo del receptor VEGFR1, se enumera en la Tabla 7.

EJEMPLO 5

20 ENSAYO CON HUVEC DE LA INHIBICIÓN DE VEGF

Este ejemplo ejemplifica ensayos con HUVEC como otro método para medir la potencia de los scFv anti-VEGF candidatos, o sus derivados, que se dan a conocer como inhibidores de VEGF.

25 Se utilizaron células endoteliales de cordón umbilical humano (HUVEC) (Promocell), mezcladas de varios donantes, en del pase 2 al pase 14. Las células se sembraron con una densidad de 1000 células/pocillo en 50 µl de medio completo de crecimiento de células endoteliales (ECGM) (Promocell), que contenía un 0,4% de ECGS/H, un 2% de suero fetal bovino, 0,1 ng/ml de factor de crecimiento epidérmico, 1 µg/ml de Hidrocortisona, 1 ng/ml de factor fibroblástico básico y un 1% de penicilina/estreptomicina (Gibco). Entre 7 y 8 h después, a las células se añadieron 30 50 µl de medio de privación de nutrientes (ECGM sin complementos que contenía FCS termoinactivado al 0,5 % y penicilina/estreptomicina al 1 %) y las células se privaron de nutrientes durante 15 a 16 horas. Se prepararon diluciones en serie 1:3 de los scFv anti-VEGF (0,023-150 nM) y de uno de los siguientes VEGF₁₆₅ humano recombinante (0,08 nM), VEGF₁₆₄ de ratón recombinante (0,08 nM) o VEGF₁₆₄ de rata recombinante (0,3 nM) en medio de privación de nutrientes y se preincubarón durante 30-60 min a temperatura ambiente. Las diferentes 35 concentraciones de VEGF se utilizaron para compensar sus actividades biológicas relativas diferentes. Se utilizaron concentraciones que estimulan la proliferación inducida por VEGF submáxima (CE₉₀). Se añadieron 100 µl de las mezclas a las placas de cultivo tisular de 96 pocillos que contenían la suspensión de HUVEC y se incubaron durante 4 días en una estufa de incubación humidificada a 37 °C/5% de CO₂. La proliferación de las HUVEC se evaluó midiendo la absorbancia a 450 nm (como longitud de onda de referencia se utilizó 620 nm) 40 después de la adición de 20 µl/pocillo de reactivo de proliferación celular WST-1 (Roche) utilizando un lector de microplacas Sunrise (Tecan). Los datos se analizaron utilizando un ajuste de curva logística de 4 parámetros, y la concentración de scFv anti-VEGF requerida para inhibir la proliferación de HUVEC en un 50% (CE₅₀) se dedujo a partir de curvas de inhibición.

45 La potencia de los candidatos principales, o de sus derivados, ilustrativos, medida a través de análisis con HUVEC se enumera en la Tabla 7. Además, la inhibición de la proliferación de HUVEC inducida por hVEGF₁₆₅ por un derivado de candidatos principales, 578minmax, se ilustra en la Figura 9. La CE₅₀ de 578minmax para la inhibición de la proliferación celular inducida por hVEGF₁₆₅ se determina que es 0,06 nM (Figura 9). La potencia de 578minmax como inhibidor de VEGF es aproximadamente 1,6 veces mejor en comparación con Lucentis. La 50 inhibición de la proliferación de HUVEC inducida por VEGF₁₆₄ de ratón o de rata por parte de 578minmax también se ejemplifica en la Figura 10. La CE₅₀ de 578minmax para la inhibición de la proliferación celular inducida por VEGF₁₆₄ de ratón y de rata se determina que es 0,06 nM y 0,07 nM, respectivamente (Figura 10). Por tanto, los VEGF de ratón y de rata son equipotentes a la VEGF humana al ser inhibidos por el derivado a modo de ejemplo (578minmax). También en este experimento, Lucentis no inhibe la proliferación inducida por VEGF de roedor.

55 EJEMPLO 6

60 EFECTOS DE SCFV ANTI-VEGF SOBRE LA PERMEABILIDAD VASCULAR INDUCIDA POR HVEGF₁₆₅ EN COBAYAS LAMPIÑAS

En este ejemplo, se evaluó el efecto de scFv anti-VEGF sobre la permeabilidad vascular inducida por VEGF₁₆₅ humano en cobayas utilizando el ensayo de Miles. Se marcaron treinta sitios de aplicación por animal en la espalda de cobayas macho lampiñas utilizando un rotulador permanente. El día del tratamiento, se administró a cada animal por vía intravenosa 1 ml de una disolución de colorante azul de Evans al 1 % con anestesia general. Una hora

después de la inyección del tinte, se injectó 0,1 ml de la disolución de prueba que contenía VEGF₁₆₅ humano recombinante 2,61 nM (PeproTech EC Ltd.) y diferentes concentraciones de scFv anti-VEGF (0 nM, 0,085 nM, 0,256 nM, 0,767 nM, 2,3 nM, 6,9 nM, 20,7 nM, 62,1 nM; n = 7 animales por elemento de prueba) por triplicado en las marcas sobre la espalda (3 inyecciones por concentración de elemento de prueba). Se utilizaron inyecciones de PBS como control negativo en todos los animales. Como control adicional, se injectó Lucentis 6,9 nM (Novartis) en todos los animales.

Una hora después de la inyección de las disoluciones de prueba, los animales se sacrificaron y sus pieles se recogieron, se lavaron y se fotografiaron digitalmente utilizando luz incidente y transmitida. La zona de colorante azul de Evans que se extravasó a los sitios de inyección se evaluó utilizando ImageJ. Para cada animal, se analizó la concentración de scFv anti-VEGF frente a la zona de extravasación de tinte utilizando un ajuste de curva logística de 4 parámetros. La concentración de scFv anti-VEGF requerida para inhibir la extravasación vascular en un 50% (CE₅₀) se dedujo a partir de las curvas de inhibición.

El protocolo del experimento se ejemplifica en la Figura 11. Además, la eficacia de los candidatos de scFv, ESBA903 (578minmax) y 802 (511max), en la inhibición del hVEGF, se ilustró en la Figura 11, representada por diferentes tamaños de zonas que contenían el colorante azul de Evans extravasado desde el sistema vascular en la piel. Los datos de eficacia para 903 y 802 se muestran en la Figura 12. A una concentración de 6,9 nM, 903 y 802 mostraron una inhibición más fuerte de la extravasación vascular inducida por VEGF en la piel en comparación con Lucentis en todos los animales analizados (Figura 12).

EJEMPLO 7

EFFECTOS DEL TRATAMIENTO CON SCFV ANTI-VEGF TÓPICO SOBRE LA EXTRAVASACIÓN VASCULAR RETINARIA INDUCIDA POR HVEGF₁₆₅ EN RATAS

En este ejemplo, la eficacia tópica de 578minmax se demuestra utilizando un ensayo de Miles modificado. Estas modificaciones incluyen, por ejemplo, el estudio premezclado con inyecciones intravítreas y la aplicación tópica de scFv.

Se aplicaron diferentes concentraciones premezcladas de scFv anti-VEGF (exceso molar multiplicado por 10, 3 y 1 respecto a VEGF) y VEGF (500 ng) a través de una única inyección intravítreas. Se utilizó Avastin (Roche) (exceso molar multiplicado por 10, 3 y 1 respecto a VEGF) como control positivo. Se utilizó vehículo para 578minmax (tampón de citrato, Na-Citrato 20 mM, NaCl 125 mM, pH 7) como control negativo. Tal como se ilustra en la Figura 13, premezclar con hVEGF₁₆₅ facilitó 578minmax (ESBA903) para inhibir completamente la permeabilidad vascular retinaria inducida por hVEGF. En este experimento, el efecto inhibitorio de 578minmax (ESBA903) fue más significativo en comparación con Avastin.

Para la aplicación tópica, cinco días antes de la estimulación con VEGF, ratas Sprague-Dawley adultas recibieron 578minmax (1% = 10 mg/ml) mediante dosificación tópica bilateral cuatro veces al día (4 gotas/día) hasta el día de la perfusión (Día 6). Se utilizaron el vehículo para 578minmax (dosificación tópica) y RTKi de Alcon (10 mg/kg/d, alimentación forzada oral) como controles negativo y positivo. El Día 5, las ratas se anestesieron y sus pupilas se dilataron. Todos los animales recibieron inyecciones intravítreas de 500 ng de hrVEGF (10 µl) en ambos ojos. 24 horas después de la inyección de VEGF, se realiza una infusión intravenosa de colorante azul de Evans al 3 % en todos los animales durante la anestesia general. Una vez que el tinte ha circulado durante 90 minutos, las ratas se sacrifican. Se extraen muestras de sangre, a continuación las ratas se perfunden con disolución salina estéril, entonces se enuclean de inmediato ambos ojos de cada rata y se obtienen las retinas utilizando un microscopio quirúrgico. Para las muestras de retina y plasma, se utilizan 60 µl de sobrenadante para medir la absorbancia (ABS) del colorante azul de Evans con un espectrofotómetro a 620/740 nm. La destrucción de la barrera hematorretiniana y la posterior permeabilidad vascular retinaria tal como se mide por la absorbancia de tinte se calculan como medias ± s.e.m. (error estándar de la media) de ABS neta/peso húmedo/ABS plasmática. Se utiliza ANOVA unidireccional para determinar una diferencia global entre las medias de tratamiento, donde P ≤ 0,05 se considera significativo. Tal como se ejemplifica en la Figura 14, la administración tópica (5 días antes del tratamiento, 4 gotas al día) de 578minmax (903) inhibió significativamente la permeabilidad vascular retinaria inducida por hVEGF. Esta es la primera demostración de un anticuerpo eficaz por vía tópica útil para el tratamiento de la enfermedad intraocular.

LISTADO DE SECUENCIAS

SEQ ID NO: 1

Inmunógeno peptídico

KFMDVYQRSY

ES 2 998 307 T3

Secuencias de VL:

SEQ ID NO. 72: 60

EVVMAQTPASVEAAVGGTVTIKCQASQSISYLSWYQQKPGQPPKLLIYKASTLASGVPSRFKGSRSGTEYTLTISDLECADAATYYCQSNYGGSSDYGNPFGGGTEAVVK

5

SEQ ID NO. 73: 435

AFFELTQTPSSVEAAVGGTVTIKCQASQSISYLSWYQQKPGQPPKLLIYTAANLASGVPSRFGRGSRGAAFTLTISDLECADAATYYCQNFAFATSDTVTEGGGTEVVWT

10

SEQ ID NO. 74: 453

AVVLTQTPSPVSAAVGGTVSJCQSSQSIVNNRLAWFQQKSGQPPKLLIYASTLASGVPSRFKGSGSGSGSGTEFTLTISDVCDDAATYYCAGGYSSTDNTFGGGTEVVVK

15

SEQ ID NO. 75: 375

DIVMTQTPASVEATVGGTITINCQASENINIWLWYQQKPGQPPKLLIYQASKLASGVPSRFKGSGSGTQFTLTISDLECADAATYYCQNNSYNRYGAPFGGGTEVVVK

20

SEQ ID NO. 76: 610

DVVMTQTPASVSEPVGGTVTIKCQASQSISWLSWYQQKPGQPPKLLIYQASTLASGVPPRSGSGSGTEYTLTISDLECADAATYFCQNNYGRSYGGAFGGGTEVVVK

25

SEQ ID NO. 77: 578

DVVMTQTPSSVSAAVGDTVTINCQASEIHSWLAWSYQQKPGQPPKLLIYLASTLASGVPSRFKGSGSGTQFTLTISDLECADAIIYYCQNVLASTNGANFGGGTEVVVK

30

SEQ ID NO. 78: 534

DVVMTQTPSSVSAAVGDTVTINCQADQSIYIWLWYQQKPGQPPKLLIYKESTLASGVPSRFGRSGSGTQFTLTISDLECADAATYYCQNNDSGNNNGPFGGGTEVVVK

35

SEQ ID NO. 79: 567

DVVMTQTPSSVSAAVGDTVTINCQADQSIYIWLWYQQKPGQPPKLLIYKASTLESGVPSRFKGSGSGTQFTLTISDLECADAATYYCQNAHYSTNGGTFGGGTEVVVK

40

SEQ ID NO. 80: 509

DVVMTQTPSSVSAAVGDTVTIKCQASQNIWLWYQQKPGQPPKLLIYKASTLESGVPSRFKGSGSGTFTLTISDLECADAATYYCQNAHYSTNGGTFGGGTEVVVK

45

SEQ ID NO. 81: 511

EVVMTQTPASVEAAVGGTVTIKCQASQSISYLSWYQQKPGHPPKLLIYRASTLASGVSSRFKGSGSGTEFTLTISDLECADAATYYCQANYAYSAGYGAFFGGGTEVVVK

50

SEQ ID NO. 82: 60min

EIVMTQSPSTLSASVGDRVIITCQASQSISYLSWYQQKPGKAPKLLIYKASTLASGVPSRFSGSGSGAEFTLTISLQPDDFATYYCQSNYGGSSDYGNPFGQGTKLTVLG

SEQ ID NO. 83: 435min

EIVMTQSPSTLSASVGDRVIITCQASQSISYLSWYQQKPGKAPKLLIYTAANLASGVPSRFSGSGSGAEFTLTISLQPDDFATYYCQNFAFATSDTVTFGQGTKLTVLG

SEQ ID NO. 84: 453min

5 EIVMTQSPSTLSASVGDRVITCQSSQSVWNNNRLAWYQQKPGKAPKLIYYASTLASGVPSRSGSG
GSGAEFTLTISLQPDDFATYYCAGGYSTSNTFGQGTKLTVLG

SEQ ID NO. 85: 375min

10 EIVMTQSPSTLSASVGDRVITCQASENINIWSWYQQKPGKAPKLIYQASKLASGVPSRSGSGSG
AEFTLTISLQPDDFATYYCQNNYSYNRYGAPFGQGTKLTVLG

SEQ ID NO. 86: 610min

15 EIVMTQSPSTLSASVGDRVITCQASQSISSWLSWYQQKPGKAPKLIYQASTLASGVPSRSGSGSG
EFTLTISLQPDDFATYYCQNNYGRSYGGAFGQGTKLTVLG

SEQ ID NO. 87: 578min

20 EIVMTQSPSTLSASVGDRVITCQASEIIHSWLAWSWYQQKPGKAPKLIYLASTLASGVPSRSGSGA
EFTLTISLQPDDFATYYCQNNYDGSNNNGPFGQGTKLTVLG

SEQ ID NO. 88: 534min

25 EIVMTQSPSTLSASVGDRVITCQASQSIWSWYQQKPGKAPKLIYKESTLASGVPSRSGSGSGA
EFTLTISLQPDDFATYYCQNNYHSTNGTFQGTKLTVLG

SEQ ID NO. 89: 567min

30 EIVMTQSPSTLSASVGDRVITCQADQSIYIWSWYQQKPGKAPKLIYKASTLESGVPSRSGSGSG
EFTLTISLQPDDFATYYCQNNAHYSTNGTFQGTKLTVLG

SEQ ID NO. 90: 509min

35 EIVMTQSPSTLSASVGDRVITCQASQNIWSWYQQKPGKAPKLIYKASTLESGVPSRSGSGSG
AEFTLTISLQPDDFATYYCQNNAHYSTNGTFQGTKLTVLG

SEQ ID NO. 91: 511min

40 EIVMTQSPSTLSASVGDRVITCQASQSIWCWSWYQQKPGKAPKLIYRASTLASGVPSRSGSGSG
AEFTLTISLQPDDFATYYCQANYAYSAGYGAFFGQGTKLTVLG

SEQ ID NO. 92: 578min_Sust pref

45 EIVLTQSPSSLASVGDRVTITCQASEIIHSWLAWSWYQQRPKGAPKLLISLASTLASGVPSRSGSGSGT
DFTLTISLQPEDFAVYYCQNVYLASTNGANFGQGTKEIKR

SEQ ID NO. 93: 60max

EIVMTQSPSTLSASVGDRVITCQASQSISSYLSWYQQKPGKAPKLIYKASTLASGVPSRSGSGSGT
EFTLTISLQPDDFATYYCQSNYGGSSDYGNPFGQGTKLTVLG

SEQ ID NO. 94: 435max

EIVMTQSPSTLSASVGDRVIICKQASQSIGSSLAWYQQKPGKAPKLIYTAANLASGVPSRSGSGSG
AEFTLTISLQPDDFATYYCQNFATSDTVTFQGTKLTVLG

SEQ ID NO. 95: 453max

EIVMTQSPSTLSASVGDRVITCQSSQSVWNNNRLAWYQQKPGKAPKLIYYASTLASGVPSRSGSG
GSGTEFTLTISLQPDDFATYYCAGGYSTSNTFGQGTKLTVLG

SEQ ID NO. 96: 375max

50 EIVMTQSPSTLSASVGDRVITCQASENINIWSWYQQKPGKAPKLIYQASKLASGVPSRSGSGSG
TQFTLTISLQPDDFATYYCQNNYSYNRYGAPFGQGTKLTVLG

SEQ ID NO. 97: 610max

EIVMTQSPSTLSASVGDRVHTCQASQSISWLSWYQQKPGKAPKLLIYQASTLASGVPSRFSGGSG
TEFTLTISSLQPDDFATYYCQNNYGRSYYGAFGQQGTKLTVLG

5

SEQ ID NO. 98: 578max

EIVMTQSPSTLSASVGDRVIIITCQASEIIHSWLAWYQQKPGKAPKLLIYLASTLASGVPSRFSGGSG
QTFTLTISSLQPDDFATYYCQNVYLASTNGANFGQQGTKLTVLG

10

SEQ ID NO. 99: 534max

EIVMTQSPSTLSASVGDRVIIITCQASQSINIWLSWYQQKPGKAPKLLIYKESTLASGVPSRFSGGSG
EFTLTISSLQPDDFATYYCQNNYDSGNNGFPFGQQGTKLTVLG

15

SEQ ID NO. 100: 567max

EIVMTQSPSTLSASVGDRVIIITCQADQSIIWLSWYQQKPGKAPKLLIYKASTLESGVPSRFSGGSG
QTFTLTISSLQPDDFATYYCQNNAHYSTNGGTFGQQGTKLTVLG

20

SEQ ID NO. 101: 509max

EIVMTQSPSTLSASVGDRVIIITCQASQNIRIWLSWYQQKPGKAPKLLIYKASTLESGVPSRFSGGSG
EFTLTISSLQPDDFATYYCQNNAHYSTNGGTFGQQGTKLTVLG

25

SEQ ID NO. 102: 511max

EIVMTQSPSTLSASVGDRVIIITCQASQSINIWLSWYQQKPGKAPKLLIYRASTLASGVPSRFSGGSG
EFTLTISSLQPDDFATYYCQANYAYAGYGAAGFQQGTKLTVLG

30

SEQ ID NO. 103: 578max_Sust pref

EIVMTQSPSSLSASVGDRVIIITCQASEIIHSWLAWYQQRPGKAPKLLIYLASTLASGVPSRFSGGSG
QTFTLTISSLQPDDFATYYCQNVYLASTNGANFGQQGTKLVEIKR

35

SEQ ID NO. 104: 578min VL: E1D

DIVMTQSPSTLSASVGDRVIIITCQASEIIHSWLAWYQQKPGKAPKLLIYLASTLASGVPSRFSGGSG
EFTLTISSLQPDDFATYYCQNVYLASTNGANFGQQGTKLTVLG

40

SEQ ID NO. 105: 578min VL: I2V

EVVMTQSPSTLSASVGDRVIIITCQASEIIHSWLAWYQQKPGKAPKLLIYLASTLASGVPSRFSGGSG
AEFTLTISSLQPDDFATYYCQNVYLASTNGANFGQQGTKLTVLG

45

SEQ ID NO. 106: 511min VL: C41L

EIVMTQSPSTLSASVGDRVIIITCQASQSINIWLSWYQQKPGKAPKLLIYRASTLASGVPSRFSGGSG
AEFTLTISSLQPDDFATYYCQANYAYAGYGAAGFQQGTKLTVLG

Secuencias de VH:

SEQ ID NO. 107: 60-11-4

50

QSLEESGGDLVKPGASLTCTASGFSSGYWVCVRQAPGKGLEWIACIYAGSSGSTYYASWAK
GRFTISKTSSTTVTLQMTSLTAADTATYFCARGNNYYIYTDDGYAYAGLELWGPGLTVSS

SEQ ID NO. 108: 60-11-6

55

QSLEESGGDLVKPGASLTCTASGFSSGYWICVVRQAPGKGLEWIACIYAGSSGSTYYASWAKG
RFTISKTSSTTVTLQMTSLTAADTATYFCARGNNYYIYTDDGYAYAGLELWGPGLTVSS

ES 2 998 307 T3

SEQ ID NO. 109: 435

QSLEESGGDLVQPGASLTLCVKSGFSLNTNYWMCWVRQAPGKGLEWIGCMYTGSYNRAYASW
AKGRFTSSKTSSTTVTLEMTSLTAADTATYFCAKGSNWYSDLWGPGLTVSS

5 SEQ ID NO. 110: 453

QERLVEGGGLVQPEGSLTLCKASGFSRSYYIWVRQAPGKGLEWIGACIDAGSSGILVYANWAK
GRFTISKSSTTVLQMTSLTAADTATYFCARGDASYGVDSFMLPLWGPGLTVSS

10 SEQ ID NO. 111: 375

QSLEESGGGLVQPEGSLTLCKASGFSFTTDYMCWVRQAPGKGLEWIGCILAGDGSTYYANWAK
GRFTGSKTSSTTVDLKMTGLTAADTATYFCARSDPASSWSFALWGPGLTVSS

15 SEQ ID NO. 112: 610

QSLEESGGRLVTPTGPTPLTLCTASGIDFSGAYYMGMWVRQAPGKGLEWIGYIDYDGDRYYASWAKG
RFTISKTSTTVDLKITSPTTEDTATYFCARSDYSSGWGTDIWGPGLTVSL

20 SEQ ID NO. 113: 578

QSVEESGGRLVTPTGPTPLTLCTASGFSLDYYMTWVRLAPGKGLEWIGFIDPDDDPYYATWAKGRF
TISRTSTTVNLKMTSPTTEDTATYFCAGGDHNSGWGLDIWGPGLTVSL

25 SEQ ID NO. 114: 534

QSLEESGGRLVTPTGPTPLTLCTASGFSLSYYYMSWVVRQAPGKGLEWIGIIGPGDYTDYASWAKGRF
ISKTSTTVDLKITSPTTEDTATYFCGRGDDNSGWGEDIWGPGLTVSL

30 SEQ ID NO. 115: 567

QSVEESGGRLVTPTGAPLTLCVSGFSLSDYYMCWVRQAPGKGLQWIGCLDYFGSTDASWAKGR
FTISKTSTAVDLKITSPTTEDTATYFCARTDDSRGWLNIWGPGLTVSL

35 SEQ ID NO. 116: 509

QSLEESGGRLVTPTGPTPLTLCTASGFSLSYYMCWVRQAPGKGLEWIGCLDYGDTDYASWAKGRF
TISKASTTVDLKITSLTTEDTATYFCARTDDSRGWLNIWGPGLTVSL

40 SEQ ID NO. 117: 511

QSVEESGGRLVTPTGPTPLTLCTVSGFSLNTYYMNWVRQAPGKGLEWIGIIAPDDTTYYASWAKSRST
ITRDTNENTVTLKMTSLTTEDTATYFCARSGDTTAWGADIWGPGLTVSL

45 SEQ ID NO. 118: 60-11-4min

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFPSSGYWCWVRQAPGKGLEWVSCIYAGSSGSTYYASW
AKGRFTISRDNSKNTIYLQMNSLRAEDTAVYYCAKGNNYYIYTDGGYAYAGLELWGQGTLTVSS

50 SEQ ID NO. 119: 60-11-6min

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFSNTNYWMCWVRQAPGKGLEWVSCIYAGSSGSTYYASW
AKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKGSNWYSDLWGPGLTVSS

55 SEQ ID NO. 120: 435min

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFSNTNYWMCWVRQAPGKGLEWVSCIYAGSSGSTYYASW
SWAKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKGSNWYSDLWGPGLTVSS

60 SEQ ID NO. 121: 453min

ES 2 998 307 T3

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFSRSYYIYWVRQAPGKGLEWVSCIDAGSSGILVYANWA
KGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKGDASYGVDSFMLPLWGQGTIVTVSS

SEQ ID NO. 122: 375min

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFSFTTDYMCWVRQAPGKGLEWVSCILAGDGSTYYANW
AKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKSDPASSWSFALWGQGTIVTVSS

5 SEQ ID NO. 123: 610min

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGIDFGAYYMGWVRQAPGKGLEWVSYIDYGDRYYASWA
KGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKSDYSSGWGTDIWGQGTIVTVSS

10 SEQ ID NO. 124: 578min

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFSLTDDYYMTWWRQAPGKGLEWVSFIDPDDDPYYATWAK
GRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKGDHNSGWGLDIWGQGTIVTVSS

15 SEQ ID NO. 125: 534min

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFSLSYYYMSWVRQAPGKGLEWVSIIGPDYTDYASWAKG
RFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKGDDNSGWGEDIWGQGTIVTVSS

20 SEQ ID NO. 126: 567min

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFSLDYYMCWVRQAPGKGLEWVSCLDYFGSTDASWAK
GRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKTDDSRGWGLNIWGQGTIVTVSS

SEQ ID NO. 127: 509min

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFSLSYYYMCWVRQAPGKGLEWVSCLDYVGDTDYASWAK
GRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKTDDSRGWGLNIWGQGTIVTVSS

25 SEQ ID NO. 128: 511min

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFSLNTYYMNWVRQAPGKGLEWVSIAPDDTTYYASWAKS
RFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKSGDTTAWGADIWGQGTIVTVSS

30 SEQ ID NO. 129: 578min_Sust pref

substQVQLVQTGGGLVQPGGSLRLSCAASGFSLTDDYYMTWWRQAPGKGLEWVSFIDPDDDPYY
ATWAKGRFTISRDNSKNTVYLQMNSLRAEDTALYYCAKGDHNSGWGLDIWGQGTIVTVSS

35 SEQ ID NO. 130: 60-11-4max

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCTASGFPFSSGYWVCWVRQAPGKGLEWVGCIYAGSSGSTYYASW
AKGRFTISKDTSKNTVYLQMNSLRAEDTAVYYCARGNNYYIYDGGYAYAGLELWGQGTIVTVSS

40 SEQ ID NO. 131: 60-11-6max

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCTASGFSFSSGYWICWVRQAPGKGLEWVGCIYAGSSGSTYYASW
AKGRFTISKDTSKNTVYLQMNSLRAEDTAVYYCARGNNYYIYDGGYAYAGLELWGQGTIVTVSS

45 SEQ ID NO. 132: 435max

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCKVSGFSLNTNYWMCWVRQAPGKGLEWVGCMYTGSYNRAYA
SWAKGRFTSSKDTSKNTVYLQMNSLRAEDTAVYYCAKGSNWYSDLWGQGTIVTVSS

50 SEQ ID NO. 133: 453max

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCASGFSRSYYIYWVRQAPGKGLEWVGCIDAGSSGILVYANWA
KGRFTISKDTSKNTVYLQMNSLRAEDTAVYYCARGDASYGVDSFMLPLWGQGTIVTVSS

SEQ ID NO. 134: 375max

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCKASGFSTTDYMCWVRQAPGKGLEWVGCILAGDGSTYYANW
AKGRFTGSKDTSKNTVYLQMNSLRAEDTAVYYCARSDPASSWSFALWGQGTIVTVSS

5 SEQ ID NO. 135: 610max

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCTASGFIDFGAYMGMWVRQAPGKGLEWVGYIDYGDRYYASWA
KGRFTISKDTSKNTVYLQMNSLRAEDTAVYYCARSDYSSGWGTDIWGQGTIVTVSS

10 SEQ ID NO. 136: 578max

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCTASGFSLTDYYMTWVRQAPGKGLEWVGFIIDPDDDPYYATWA
KGRFTISRDTSKNTVYLQMNSLRAEDTAVYYCAGGDHNSGWGLDIWGQGTIVTVSS

15 SEQ ID NO. 137: 534max

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCTASGFSLSDYYMCWVRQAPGKGLEWVGNGPDYTDYASWAKG
RFTISKDTSKNTVYLQMNSLRAEDTAVYYCARGDDNSGWGEDIWGQGTIVTVSS

20 SEQ ID NO. 138: 567max

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCSGFSLSDYYMCWVRQAPGKGLEWVGCLDYFGSTDASWAK
GRFTISKDTSKNTVYLQMNSLRAEDTAVYYCARTDDSRGWGLNIW/GQGTIVTVSS

25 SEQ ID NO. 139: 509max

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCTASGFSLSSYYMCWVRQAPGKGLEWVGCLDYVGDTDYASWAK
GRFTISKDASKNTVYLQMNSLRAEDTAVYYCARTDDSRGWGLNIW/GQGTIVTVSS

30 SEQ ID NO. 140: 509maxII

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCTASGFSLSSYYMSWVRQAPGKGLEWVGILDYVGDTDYASWAKG
RFTISKDASKNTVYLQMNSLRAEDTAVYYCARTDDSRGWGLNIWGQGTIVTVSS

35 SEQ ID NO. 141: 511max

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCTVSGFSINTYYMNWVRQAPGKGLEWVGIIAPDDTTYYASWAKS
RSTISRDTSKNTVYLQMNSLRAEDTAVYYCARSQDTTAWGADIWGQGTIVTVSS

40 SEQ ID NO. 142: 578max_Sust pref

substQVQLVQTGGGLVQPGGSLRLSCTASGFSLTDYYMTWVRQAPGKGLEWVGFIIDPDDDPYY
ATWAKGRFTISRDTSKNTVYLQMNSLRAEDTALYYCAGGDHNSGWGLDIWGQGTIVTVSS

45 SEQ ID NO. 143: 567minDHP

EVQLVESGGGSVQPGGSLRLSCTASGFSLSDYYMCWVRQAPGKGLEWVSCLDYFGSTDASWAK
GRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTATYYCAKTDDSRGWGLNIWQGQTTIVTVSS

50 SEQ ID NO. 144: 578maxDHP

EVQLVESGGGSVQPGGSLRLSCTVSGFSINTYYMNWVRQAPGKGLEWVGIIAPDDTTYYASWAKS
RSTISRDTSKNTVYLQMNSLRAEDTATYYCARSQDTTAWGADIWGQGTIVTVSS

55 SEQ ID NO. 146: 578max_Sust pref_DHP

ES 2 998 307 T3

QVQLVQTGGG5VQPGGSLRLSCTASGFSLTDYYYYMTWVRQAPGKGLEWVGFIIDPDDDPYYATWA
KGRFTISRDTSKNTVYLQMNSLRAEDTATYYCAGGDHNSGWGLDIWGQGTTVTSS

SEQ ID NO. 147: 578max VH: E1_

VQLVESGGGLVQPGGSLRLSCTASGFSLTDYYYYMTWVRQAPGKGLEWVGFIIDPDDDPYYATWA
KGRFTISRDTSKNTVYLQMNSLRAEDTAVYYCAGGDHNSGWGLDIWGQGTLVTSS

5 SEQ ID NO. 148: 578max VH: V2Q

EQQLVESGGGLVQPGGSLRLSCTASGFSLTDYYYYMTWVRQAPGKGLEWVGFIIDPDDDPYYATWA
KGRFTISRDTSKNTVYLQMNSLRAEDTAVYYCAGGDHNSGWGLDIWGQGTLVTSS

10 SEQ ID NO. 149: 578max VH: Q46L

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCTASGFSLTDYYYYMTWVRQAPGKGLEWVGFIIDPDDDPYYATWA
KGRFTISRDTSKNTVYLQMNSLRAEDTAVYYCAGGDHNSGWGLDIWGQGTLVTSS

15 SEQ ID NO. 150: 578max VH: W54Y

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCTASGFSLTDYYYYMTWVRQAPGKGLEWVGFIIDPDDDPYYATWA
KGRFTISRDTSKNTVYLQMNSLRAEDTAVYYCAGGDHNSGWGLDIWGQGTLVTSS

20 SEQ ID NO. 151: 578max VH: V55I

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCTASGFSLTDYYYYMTWVRQAPGKGLEWVGFIIDPDDDPYYATWA
KGRFTISRDTSKNTVYLQMNSLRAEDTAVYYCAGGDHNSGWGLDIWGQGTLVTSS

25 SEQ ID NO. 152: 578max VH: D83A

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCTASGFSLTDYYYYMTWVRQAPGKGLEWVGFIIDPDDDPYYATWA
KGRFTISRATSNTVYLQMNSLRAEDTAVYYCAGGDHNSGWGLDIWGQGTLVTSS

30 SEQ ID NO. 153: 578max VH: N87A

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCTASGFSLTDYYYYMTWVRQAPGKGLEWVGFIIDPDDDPYYATWA
KGRFTISRDTSKNTVYLQMNSLRAEDTAVYYCAGGDHNSGWGLDIWGQGTLVTSS

35 SEQ ID NO. 154: 578max VH: Y105F

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCTASGFSLTDYYYYMTWVRQAPGKGLEWVGFIIDPDDDPYYATWA
KGRFTISRDTSKNTVYLQMNSLRAEDTAVYYCAGGDHNSGWGLDIWGQGTLVTSS

40 SEQ ID NO. 155: 578max VH: D83_

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCTASGFSLTDYYYYMTWVRQAPGKGLEWVGFIIDPDDDPYYATWA
KGRFTISRTSKNTVYLQMNSLRAEDTAVYYCAGGDHNSGWGLDIWGQGTLVTSS

45 SEQ ID NO. 156: 578max VH: N87_

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCTASGFSLTDYYYYMTWVRQAPGKGLEWVGFIIDPDDDPYYATWA
KGRFTISRDTSKTVYLQMNSLRAEDTAVYYCAGGDHNSGWGLDIWGQGTLVTSS

50 SEQ ID NO. 157: 578max VH: T84N

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCTASGFSLTDYYYYMTWVRQAPGKGLEWVGFIIDPDDDPYYATWA
KGRFTISRDNSKNTVYLQMNSLRAEDTAVYYCAGGDHNSGWGLDIWGQGTLVTSS

SEQ ID NO. 158: 578max VH: V89L

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCTASGFSLTDYYYYMTWVRQAPGKGLEWVGFIIDPDDDPYYATWA
KGRFTISRDTSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAGGDHNSGWGLDIWGQGTLVTSS

ES 2 998 307 T3

SEQ ID NO. 159: 578max VH: V89A

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCTASGFS LTDYYMTWVRQAPGKGLEWVGFI DPDDDPYYATWA
KGRFTISRDT SKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCAGGDHNSGWGLDIWGQGT LTVSS

5 SEQ ID NO. 160: 578maxDHP VH: T84N

EVQLVESGGGSVQPGGSLRLSCTASGFS LTDYYMTWVRQAPGKGLEWVGFI DPDDDPYYATWA
KGRFTISRDN SKNTVYLQMNSLRAEDTATYYCAGGDHNSGWGLDIWGQGT LTVSS

10 SEQ ID NO. 161: 578maxDHP VH: V89L

EVQLVESGGGSVQPGGSLRLSCTA5GFS LTDYYMTWVRQAPGKGLEWVGFI DPDDDPYYATWA
KGRFTISRDT SKNTLYLQMNSLRAEDTATYYCAGGDHNSGWGLDIWGQGT LTVSS

15 SEQ ID NO. 162: 578maxDHP VH: V89A

EVQLVESGGGSVQPGGSLRLSCTA5GFS LTDYYMTWVRQAPGKGLEWVGFI DPDDDPYYATWA
KGRFTISRDN SKNTAYLQMNSLRAEDTATYYCAGGDHNSGWGLDIWGQGT LTVSS

20 SEQ ID NO. 163: 578max VH:T84N, V89A

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCTASGFS LTDYYMTWVRQAPGKGLEWVGFI DPDDDPYYATWA
KGRFTISRDN SKNTVYLQMNSLRAEDTAVYYCAGGDHNSGWGLDIWGQGT LTVSS

25 SEQ ID NO. 164: 578max VH:T84N, V89L

EVQLVESGGGSVQPGGSLRLSCTASGFS LTDYYMTWVRQAPGKGLEWVGFI DPDDDPYYATWA
KGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTATYYCAGGDHNSGWGLDIWGQGT LTVSS

30 SEQ ID NO. 165: 578maxDHP VH: T84N, V89A

EVQLVESGGGSVQPGGSLRLSCTASGFS LTDYYMTWVRQAPGKGLEWVGFI DPDDDPYYATWA
KGRFTISRDN SKNTAYLQMNSLRAEDTATYYCAGGDHNSGWGLDIWGQGT LTVSS

35 SEQ ID NO. 166: 578maxDHP VH: T84N, V89L

EVQLVESGGGSVQPGGSLRLSCTASGFS LTDYYMTWVRQAPGKGLEWVGFI DPDDDPYYATWA
KGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTATYYCAGGDHNSGWGLDIWGQGT LTVSS

secuencias marco (los residuos X son sitios de inserción de CDR y pueden ser cualquier aminoácido natural. Puede haber al menos 3 y hasta 50 aminoácidos):

35 SEQ ID NO. 167: Cadena ligera variable de FW1.4 y rFW1.4

EIVMTQSPSTLSASVGDRVII TC(X)_{n=3-50} WYQQKPGKAPKLLI Y(X)_{n=3-50}
GVPSRFSGSGSAEFTLTSSLQPODFATYYC(X)_{n=3-50} FGQGTKLT VLG

40 SEQ ID NO. 168: Cadena ligera variable de rFW1.4 variante 2 (v2)

EIVMTQSPSTLSASVGDRVII TC(X)_{n=3-50} WYQQKPGKAPKLLI Y(X)_{n=3-50}
GVPSRFSGSGSAEFTLTSSLQPODFATYYC(X)_{n=3-50} FGQGTKLT VLG

45 SEQ ID NO. 169: Cadena pesada variable de FW1.4

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS(X)_{n=3-50} WVRQAPGKGLEWVS (X)_{n=3-50}
RFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAK(X)_{n=3-50} WGQGT LTVSS

50 SEQ ID NO. 170: Cadena pesada variable de rFW1.4

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCTAS(X)_{n=3-50} WVRQAPGKGLEWVG(X)_{n=3-50}
RFTISRDT SKNTVYLQMNSLRAEDTAVYYCAR(X)_{n=3-50} WGQGT LV TVS

SEQ ID NO. 171: Cadena pesada variable de rFW1.4 variante 2 (v2)

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCTVS(X)_{n=3-50} WVRQAPGKGLEWVG(X)_{n=3-50}
RFTISKDTSKNTVYLQMNSLRAEDTAVYYCAR(X)_{n=3-50} WGQGTlTVSS

5 Secuencias de marco de ScFv:

SEQ ID NO. 172: FW1,4

EIVMTQSPSTLSASVGDRVIITC(X)_{n=3-50} WYQQKPGKAPKLLIY(X)_{n=3-50}
GVPSRFSGSGSGAFTLTISLQPDDFATYYC(X)_{n=3-50} FGQGTlTVLG
GGGGSGGGGGGGGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS(X)_{n=3-50}
WVRQAPGKGLEWVG(X)_{n=3-50} RFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTA VYYCAK(X)_{n=3-50}
WGQGTlTVSS

10

SEQ ID NO. 173: rFW1,4

EIVMTQSPSTLSASVGDRVIITC(X)_{n=3-50} WYQQKPGKAPKLLIY(X)_{n=3-50}
GVPSRFSGSGSGTEFTLTISLQPDDFATYYC(X)_{n=3-50} FGQGTlTVLG
GGGGSGGGGGGGGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS(X)_{n=3-50}
WVRQAPGKGLEWVG(X)_{n=3-50} RFTISRDTSKNTVYLQMNS LRAEDTAVYYCAR(X)_{n=3-50}
WGQGTlTVSS

15

SEQ ID NO. 174: rFW1.4 variante 2 (v2)

EIVMTQSPSTLSASVGDRVIITC(X)_{n=3-50} WYQQKPGKAPKLLIY(X)_{n=3-50}
GVPSRFSGSGSGTEFTLTISLQPDDFATYYC(X)_{n=3-50} FGQGTlTVLG
GGGGSGGGGGGGGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS(X)_{n=3-50}
WVRQAPGKGLEWVG(X)_{n=3-50} RFTISKDTSKNTVYLQMNSLRAEDTAVYYCAR(X)_{n=3-50}
WGQGTlTVSS

Secuencias de ScFv anti-VEGF:

20

SEQ ID NO. 175: 435_max

EIVMTQSPSTLSASVGDRVIITCQASQSIGSSLAWYQQKPGKAPKLLIYTAANLASGVPSRFSGSRSG
AEFTLTISLQPDDFATYYCQNFATSDTFTGQGTlTVLGGGGGGGGGGGGGGGGGSEVQL
VESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFSLNTNYWMCWVRQAPGKGLEWVGCMYTGSYNRAYASWA
KGRFTSSKDTSKNTVYLQMNSLRAEDTAVYYCAKGSNWYSDLWGQGTlTVSS

25

SEQ ID NO. 176: 511_max

EIVMTQSPSTLSASVGDRVIITCQASQSINIWLSWYQQKPGKAPKLLIYRASTLASGVPSRFSGSGSGT
EFTLTISLQPDDFATYYCQANYAYSAGYGAAGFGQGTlTVLGGGGGGGGGGGGGGGSEV
QLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFSLNTYYMNWVRQAPGKGLEWVGIIAPDITTYASWAKRS
TISRDTSKNTVYLQMNSLRAEDTAVYYCARSGDTTAWGADIWGQGTlTVSS

30

SEQ ID NO. 177: 567_min

EIVMTQSPSTLSASVGDRVIITCQADQSIYIWLWYQQKPGKAPKLLIYKASTLESGVPSRFSGSGSGA
EFTLTISLQPDDFATYYCQNAHYSTNGTFTGQGTlTVLGGGGGGGGGGGGGGGGGSEVQ
LVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFSLTDYYMCWVRQAPGKGLEWVSCIDYFGSTDASWAKGRFT
TISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKGDHNSGWGLDIWGQGTlTVSS

SEQ ID NO. 178: 578min

EIVMTQSPSTLSASVGDRVIITCQASEIIHSWLAWYQQKPGKAPKLLIYLASTLASGVPSRFSGSGSGA
EFTLTISLQPDDFATYYCQNYYLASTNGANFGQGTlTVLGGGGGGGGGGGGGGGGGSEVQ
LVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFSLTDYYMTWVRQAPGKGLEWVSCIDPDDDPYYATWAKGRF
TISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKGDHNSGWGLDIWGQGTlTVSS

35

SEQ ID NO. 179: 578max

EIVMTQSPSTLSASVGDRVIIITCQASEIIHSWLAWYQQKPGKAPKLLIYLASTLASGVPSRFSGSGSGT
QFTLISSLQPDDFATYYCQNVLASTNGANFGQGTKLTVLGGGGSGGGSGGGSGGGSEVQ
LVESGGGLVQPGGSLRLSCTASGFSLTDYMMTWVRQAPGKLEWVGFIIDPDDDPMYYATWAKGRF
TISRDTSKNTVYLQMNSLRAEDTAVYYCAGGDHNSGWGLDIWGQGTLVTVSS

5 SEQ ID NO. 180: 578minmax (ESBA903)

EIVMTQSPSTLSASVGDRVIIITCQASEIIHSWLAWYQQKPGKAPKLLIYLASTLASGVPSRFSGSGSA
EFTLISSLQPDDFATYYCQNVLASTNGANFGQGTKLTVLGGGGSGGGSGGGSGGGSEVQ
LVESGGGLVQPGGSLRLSCTASGFSLTDYMMTWVRQAPGKLEWVGFIIDPDDDPMYYATWAKGRF
TISRDTSKNTVYLQMNSLRAEDTAVYYCAGGDHNSGWGLDIWGQGTLVTVSS

10 SEQ ID No. 181 conector

GGGGSGGGGSGGGGSGGGGS

LISTA DE SECUENCIAS

<110> Novartis AG
 5 <120> Stable and soluble antibodies inhibiting VEGF
 <130> EP79169II-FZRPpau
 <140> 20158159,2
 10 <141> 2009-06-25
 <150> EP17151756.8
 <151> 2009-06-25
 15 <150> EP09768693.5
 <151> 2009-06-25
 <150> PCT/CH2009/000220
 <151> 2009-06-25
 20 <150> US61/133,212
 <151> 2008-06-25
 <160> 184
 25 <170> BiSSAP 1.3.6
 <210> 1
 <211> 11
 30 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 1
 35 Lys Phe Met Asp Val Tyr Gln Arg Ser Tyr Cys
 1 5 10
 <210> 2
 <211> 11
 40 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 45 <223> CDR procedente de anticuerpo de conejo
 <400> 2
 Gly Phe Pro Phe Ser Ser Gly Tyr Trp Val Cys
 1 5 10
 50 <210> 3
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

55

<220>
<223> CDR procedente de anticuerpo de conejo

5 <400> 3
Gly Phe Ser Phe Ser Ser Gly Tyr Trp Ile Cys
1 5 10

10 <210> 4
<211> 11
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

15 <220>
<223> CDR procedente de anticuerpo de conejo

20 <400> 4
Gly Phe Ser Leu Asn Thr Asn Tyr Trp Met Cys
1 5 10

25 <210> 5
<211> 11
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

30 <220>
<223> CDR procedente de anticuerpo de conejo

35 <400> 5
Gly Phe Ser Phe Ser Arg Ser Tyr Tyr Ile Tyr
1 5 10

40 <210> 6
<211> 11
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

45 <220>
<223> CDR procedente de anticuerpo de conejo

50 <400> 6
Gly Phe Ser Phe Thr Thr Thr Asp Tyr Met Cys
1 5 10

55 <210> 7
<211> 11
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> CDR procedente de anticuerpo de conejo

<400> 7
Gly Ile Asp Phe Ser Gly Ala Tyr Tyr Met Gly

1 5 10

5 <210> 8
 <211> 11
 5 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 10 <223> CDR procedente de anticuerpo de conejo

15 <400> 8
 Gly Phe Ser Leu Thr Asp Tyr Tyr Tyr Met Thr
 1 5 10

20 <210> 9
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

25 <220>
 <223> CDR procedente de anticuerpo de conejo

30 <400> 9
 Gly Phe Ser Leu Ser Tyr Tyr Tyr Met Ser
 1 5 10

35 <210> 10
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

40 <220>
 <223> CDR procedente de anticuerpo de conejo

45 <400> 10
 Gly Phe Ser Leu Ser Asp Tyr Tyr Met Cys
 1 5 10

50 <210> 11
 <211> 10
 <212> PRT
 45 <213> Secuencia artificial

55 <220>
 <223> CDR procedente de anticuerpo de conejo

60 <400> 11
 Gly Phe Ser Leu Ser Ser Tyr Tyr Met Cys
 1 5 10

65 <210> 12
 <211> 10
 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

5 <220>
5 <223> CDR procedente de anticuerpo de conejo

10 <400> 12
Gly Phe Ser Leu Asn Thr Tyr Tyr Met Asn
1 5 10

15 <210> 13
<211> 10
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

15 <220>
<223> CDR procedente de anticuerpo de conejo

20 <400> 13
Gly Phe Ser Leu Ser Ser Tyr Tyr Met Ser
1 5 10

25 <210> 14
<211> 11
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

30 <220>
<223> CDR procedente de anticuerpo de conejo

35 <400> 14
Gly Phe Ser Leu Ser Ser Gly Tyr Tyr Met Cys
1 5 10

40 <210> 15
<211> 18
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

45 <220>
<223> CDR procedente de anticuerpo de conejo

45 <400> 15
Cys Ile Tyr Ala Gly Ser Ser Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Ser Trp Ala
1 5 10 15
Lys Gly

50 <210> 16
<211> 18
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> CDR procedente de anticuerpo de conejo

5 <400> 16
Cys Met Tyr Thr Gly Ser Tyr Asn Arg Ala Tyr Tyr Ala Ser Trp Ala
1 5 10 15
Lys Gly

10 <210> 17
<211> 18
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

15 <220>
<223> CDR procedente de anticuerpo de conejo

20 <400> 17
Cys Ile Asp Ala Gly Ser Ser Gly Ile Leu Val Tyr Ala Asn Trp Ala
1 5 10 15
Lys Gly

25 <210> 18
<211> 17
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

30 <220>
<223> CDR procedente de anticuerpo de conejo

35 <400> 18
Cys Ile Leu Ala Gly Asp Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asn Trp Ala Lys
1 5 10 15
Gly

40 <210> 19
<211> 16
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

45 <220>
<223> CDR procedente de anticuerpo de conejo

50 <400> 19
Tyr Ile Asp Tyr Asp Gly Asp Arg Tyr Tyr Ala Ser Trp Ala Lys Gly
1 5 10 15

55 <210> 20
<211> 16
<212> PRT

<213> Secuencia artificial

5 <220>
<223> CDR procedente de anticuerpo de conejo

<400> 20
Phe Ile Asp Pro Asp Asp Asp Pro Tyr Tyr Ala Thr Trp Ala Lys Gly
1 5 10 15

10

15 <210> 21
<211> 16
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

20 <220>
<223> CDR procedente de anticuerpo de conejo

<400> 21
Ile Ile Gly Pro Gly Asp Tyr Thr Asp Tyr Ala Ser Trp Ala Lys Gly
1 5 10 15

25

30 <210> 22
<211> 16
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

35 <220>
<223> CDR procedente de anticuerpo de conejo

<400> 22
Cys Leu Asp Tyr Phe Gly Ser Thr Asp Asp Ala Ser Trp Ala Lys Gly
1 5 10 15

40

45 <210> 23
<211> 16
<212> PRT
<213> Artifical Sequence

50 <220>
<223> Péptido sintético

<400> 23
Cys Leu Asp Tyr Val Gly Asp Thr Asp Tyr Ala Ser Trp Ala Lys Gly
1 5 10 15

55

<210> 24
<211> 16
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

5

<220>
<223> CDR procedente de anticuerpo de conejo

10 <400> 24
Ile Ile Ala Pro Asp Asp Thr Thr Tyr Tyr Ala Ser Trp Ala Lys Ser
1 5 10 15

15 <210> 25
<211> 16
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

20

<220>
<223> CDR procedente de anticuerpo de conejo

25 <400> 25
Ile Leu Asp Tyr Val Gly Asp Thr Asp Tyr Ala Ser Trp Ala Lys Gly
1 5 10 15

30 <210> 26
<211> 18
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

35

<220>
<223> CDR procedente de anticuerpo de conejo

40 <400> 26
Cys Ile Asp Ala Gly Ser Asp Gly Asp Thr Tyr Tyr Ala Ser Trp Ala
1 5 10 15
Lys Gly

45 <210> 27
<211> 19
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

50

<220>
<223> CDR procedente de anticuerpo de conejo

55 <400> 27
Gly Asn Asn Tyr Tyr Ile Tyr Thr Asp Gly Gly Tyr Ala Tyr Ala Gly
1 5 10 15

Leu Glu Leu

5 <210> 28
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> CDR procedente de anticuerpo de conejo
 <400> 28
 Gly Ser Asn Trp Tyr Ser Asp Leu
 1 5

15 <210> 29
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <223> CDR procedente de anticuerpo de conejo
 <400> 29
 Gly Asp Ala Ser Tyr Gly Val Asp Ser Phe Met Leu Pro Leu
 1 5 10

25 <210> 30
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

30 <220>
 <223> CDR procedente de anticuerpo de conejo
 <400> 30
 Ser Asp Pro Ala Ser Ser Trp Ser Phe Ala Leu
 1 5 10

35 <210> 31
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

40 <220>
 <223> CDR procedente de anticuerpo de conejo
 <400> 31
 Ser Asp Tyr Ser Ser Gly Trp Gly Thr Asp Ile
 1 5 10

45 <210> 32
 <211> 11

50 <220>
 <223> CDR procedente de anticuerpo de conejo
 <400> 32
 Ser Asp Tyr Ser Ser Gly Trp Gly Thr Asp Ile
 1 5 10

55 <210> 32
 <211> 11

<212> PRT
<213> Secuencia artificial

5 <220>
<223> CDR procedente de anticuerpo de conejo

<400> 32
Gly Asp His Asn Ser Gly Trp Gly Leu Asp Ile
10 1 5 10

<210> 33
<211> 11
<212> PRT
15 <213> Secuencia artificial

<220>
<223> CDR procedente de anticuerpo de conejo
20 <400> 33
Gly Asp Asp Asn Ser Gly Trp Gly Glu Asp Ile
1 5 10

25 <210> 34
<211> 11
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

30 <220>
<223> CDR procedente de anticuerpo de conejo

<400> 34
35 Thr Asp Asp Ser Arg Gly Trp Gly Leu Asn Ile
1 5 10

<210> 35
<211> 11
40 <212> PRT
<213> Secuencia artificial

45 <220>
<223> CDR procedente de anticuerpo de conejo

<400> 35
Thr Asp Asp Ser Arg Gly Trp Gly Leu Asn Ile
1 5 10

50 <210> 36
<211> 11
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

55 <220>

<223> CDR procedente de anticuerpo de conejo
<400> 36
5 Ser Gly Asp Thr Thr Ala Trp Gly Ala Asp Ile
1 5 10

<210> 37
<211> 19
<212> PRT
10 <213> Secuencia artificial

<220>
15 <223> CDR procedente de anticuerpo de conejo
<400> 37
Gly Asp Asp Ser Ser Gly Tyr Thr Asp Gly Gly Tyr Ala Tyr Trp Gly
1 5 10 15
Leu Asp Ile
20

<210> 38
<211> 11
<212> PRT
25 <213> Secuencia artificial

<220>
30 <223> CDR procedente de anticuerpo de conejo
<400> 38
Gln Ala Ser Gln Ser Ile Ser Ser Tyr Leu Ser
1 5 10

35 <210> 39
<211> 11
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

40 <220>
45 <223> CDR procedente de anticuerpo de conejo
<400> 39
Gln Ala Ser Gln Ser Ile Gly Ser Ser Leu Ala
1 5 10

50 <210> 40
<211> 13
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

55 <220>
<223> CDR procedente de anticuerpo de conejo
<400> 40

Gln Ser Ser Gln Ser Val Trp Asn Asn Asn Arg Leu Ala
1 5 10

5 <210> 41
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> CDR procedente de anticuerpo de conejo

 <400> 41
 Gln Ala Ser Glu Asn Ile Asn Ile Trp Leu Ser
15 1 5 10

20 <210> 42
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

25 <220>
 <223> CDR procedente de anticuerpo de conejo

 <400> 42
 Gln Ala Ser Gln Ser Ile Ser Ser Trp Leu Ser
1 5 10

30 <210> 43
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

35 <220>
 <223> CDR procedente de anticuerpo de conejo

 <400> 43
 Gln Ala Ser Glu Ile Ile His Ser Trp Leu Ala
1 5 10

40 <210> 44
 <211> 11
 45 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

50 <220>
 <223> CDR procedente de anticuerpo de conejo

 <400> 44
 Gln Ala Ser Gln Ser Ile Asn Ile Trp Leu Ser
1 5 10

55 <210> 45
 <211> 11

<212> PRT
<213> Secuencia artificial

5 <220>
<223> CDR procedente de anticuerpo de conejo

<400> 45
Gln Ala Asp Gln Ser Ile Tyr Ile Trp Leu Ser
10 1 5 10

<210> 46
<211> 11
<212> PRT
15 <213> Secuencia artificial

<220>
<223> CDR procedente de anticuerpo de conejo
20 <400> 46
Gln Ala Ser Gln Asn Ile Arg Ile Trp Leu Ser
1 5 10

25 <210> 47
<211> 11
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

30 <220>
<223> CDR procedente de anticuerpo de conejo

<400> 47
35 Gln Ala Ser Gln Ser Ile Asn Ile Trp Cys Ser
1 5 10

<210> 48
<211> 11
40 <212> PRT
<213> Secuencia artificial

45 <220>
<223> CDR procedente de anticuerpo de conejo

<400> 48
Gln Ala Ser Gln Ser Ile Asn Ile Trp Leu Ser
50 1 5 10

<210> 49
<211> 13
<212> PRT
55 <213> Secuencia artificial

55 <220>

<223> CDR procedente de anticuerpo de conejo
<400> 49
Gln Ala Ser Gln Ser Ile Asn Ile Asn Asn Trp Leu Ser
5 1 5 10

<210> 50
<211> 7
<212> PRT
10 <213> Secuencia artificial

<220>
<223> CDR procedente de anticuerpo de conejo
15 <400> 50
Lys Ala Ser Thr Leu Ala Ser
1 5

20 <210> 51
<211> 7
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

25 <220>
<223> CDR procedente de anticuerpo de conejo
<400> 51
30 Thr Ala Ala Asn Leu Ala Ser
1 5

35 <210> 52
<211> 7
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

40 <220>
<223> CDR procedente de anticuerpo de conejo
<400> 52
Tyr Ala Ser Thr Leu Ala Ser
1 5

45 <210> 53
<211> 7
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

50 <220>
<223> CDR procedente de anticuerpo de conejo
<400> 53
Gln Ala Ser Lys Leu Ala Ser
1 5

5 <210> 54
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> CDR procedente de anticuerpo de conejo
 <400> 54
 Gln Ala Ser Thr Leu Ala Ser
 1 5

15 <210> 55
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <223> CDR procedente de anticuerpo de conejo
 <400> 55
 Leu Ala Ser Thr Leu Ala Ser
 1 5

25 <210> 56
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

30 <220>
 <223> CDR procedente de anticuerpo de conejo
 <400> 56
 Lys Glu Ser Thr Leu Ala Ser
 1 5

35 <210> 57
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

40 <220>
 <223> CDR procedente de anticuerpo de conejo
 <400> 57
 Lys Ala Ser Thr Leu Glu Ser
 1 5

45 <210> 58
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

50 <400> 57
 Lys Ala Ser Thr Leu Glu Ser
 1 5

55 <210> 58
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

5 <220>
5 <223> CDR procedente de anticuerpo de conejo
<400> 58
Lys Ala Ser Thr Leu Glu Ser
1 5

10 <210> 59
<211> 7
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

15 <220>
<223> CDR procedente de anticuerpo de conejo
<400> 59
20 Arg Ala Ser Thr Leu Ala Ser
1 5

<210> 60
<211> 7
25 <212> PRT
<213> Secuencia artificial

30 <220>
<223> CDR procedente de anticuerpo de conejo
<400> 60
Lys Ala Ser Thr Leu Ala Ser
1 5

35 <210> 61
<211> 14
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

40

45 <220>
<223> CDR procedente de anticuerpo de conejo
<400> 61
Gln Ser Asn Tyr Gly Gly Ser Ser Ser Asp Tyr Gly Asn Pro
1 5 10

50 <210> 62
<211> 10
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

55 <220>
<223> CDR procedente de anticuerpo de conejo

<400> 62
Gln Asn Phe Ala Thr Ser Asp Thr Val Thr
1 5 10

5 <210> 63
<211> 11
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

10 <220>
<223> CDR procedente de anticuerpo de conejo

<400> 63
15 Ala Gly Gly Tyr Ser Ser Thr Ser Asp Asn Thr
1 5 10

15 <210> 64
<211> 12
20 <212> PRT
<213> Secuencia artificial

25 <220>
<223> CDR procedente de anticuerpo de conejo

<400> 64
Gln Asn Asn Tyr Ser Tyr Asn Arg Tyr Gly Ala Pro
1 5 10

30 <210> 65
<211> 12
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

35 <220>
<223> CDR procedente de anticuerpo de conejo

40 <400> 65
Gln Asn Asn Tyr Gly Phe Arg Ser Tyr Gly Gly Ala
1 5 10

45 <210> 66
<211> 12
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

50 <220>
<223> CDR procedente de anticuerpo de conejo

<400> 66
55 Gln Asn Val Tyr Leu Ala Ser Thr Asn Gly Ala Asn
1 5 10

<210> 67

<211> 12
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

5
<220>
<223> CDR procedente de anticuerpo de conejo

<400> 67
10 Gln Asn Asn Tyr Asp Ser Gly Asn Asn Gly Phe Pro
1 5 10

<210> 68
<211> 12
15 <212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
20 <223> CDR procedente de anticuerpo de conejo

<400> 68
Gln Asn Asn Ala His Tyr Ser Thr Asn Gly Gly Thr
1 5 10

25 <210> 69
<211> 12
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

30 <220>
<223> CDR procedente de anticuerpo de conejo

<400> 69
35 Gln Asn Asn Ala His Tyr Ser Thr Asn Gly Gly Thr
1 5 10

<210> 70
40 <211> 13
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

45 <220>
<223> CDR procedente de anticuerpo de conejo

<400> 70
50 Gln Ala Asn Tyr Ala Tyr Ser Ala Gly Tyr Gly Ala Ala
1 5 10

<210> 71
<211> 14
<212> PRT
55 <213> Secuencia artificial

ES 2 998 307 T3

<220>

<223> CDR procedente de anticuerpo de conejo

<400> 71

5 Gln Asn Asn Tyr His Tyr Ser Ser Ser Thr Asn Gly Gly Thr
1 5 10

<210> 72

<211> 112

10 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

15 <223> secuencia VL-scFv recombinante

<400> 72

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

35 <210> 73

<211> 108

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

40

<220>

<223> secuencia VL-scFv recombinante

<400> 73

45 Ala Phe Glu Leu Thr Gln Thr Pro Ser Ser Val Glu Ala Ala Val Gly
1 5 10 15
Gly Thr Val Thr Ile Lys Cys Gln Ala Ser Gln Ser Ile Gly Ser Ser
20 25 30
Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Arg Pro Lys Leu Leu Ile
50 35 40 45
Tyr Thr Ala Ala Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Arg Gly
50 55 60
Ser Arg Ser Gly Ala Ala Phe Thr Leu Thr Ile Ser Asp Leu Glu Cys
65 70 75 80
55 Ala Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Asn Phe Ala Thr Ser Asp Thr
85 90 95
Val Thr Phe Gly Gly Thr Glu Val Val Val Thr
69

	100	105	
	<210> 74		
	<211> 111		
5	<212> PRT		
	<213> Secuencia artificial		
	<220>		
10	<223> secuencia VL-scFv recombinante		
	<400> 74		
	Ala Val Val Leu Thr Gln Thr Pro Ser Pro Val Ser Ala Ala Val Gly		
	1	5	10
	15	Gly Thr Val Ser Ile Ser Cys Gln Ser Ser Gln Ser Val Trp Asn Asn	15
	20	25	30
	Asn Arg Leu Ala Trp Phe Gln Gln Lys Ser Gly Gln Pro Pro Lys Leu		
	35	40	45
	Leu Ile Tyr Tyr Ala Ser Thr Leu Ala Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe		
20	50	55	60
	Lys Gly Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Asp Val		
	65	70	75
	80		
	Gln Cys Asp Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Ala Gly Gly Tyr Ser Ser		
	85	90	95
25	Thr Ser Asp Asn Thr Phe Gly Gly Thr Glu Val Val Val Lys		
	100	105	110
	<210> 75		
	<211> 110		
30	<212> PRT		
	<213> Secuencia artificial		
	<220>		
35	<223> secuencia VL-scFv recombinante		
	<400> 75		
	Asp Ile Val Met Thr Gln Thr Pro Ala Ser Val Glu Ala Thr Val Gly		
	1	5	10
	15		
40	Gly Thr Ile Thr Ile Asn Cys Gln Ala Ser Glu Asn Ile Asn Ile Trp		
	20	25	30
	Leu Ser Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro Lys Leu Ile		
	35	40	45
	Tyr Gln Ala Ser Lys Leu Ala Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Lys Gly		
	50	55	60
	65		
	Ser Gly Ser Gly Thr Gln Phe Thr Leu Thr Ile Ser Asp Leu Glu Cys		
	70	75	80
	Ala Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Asn Asn Tyr Ser Tyr Asn Arg		
	85	90	95
50	Tyr Gly Ala Pro Phe Gly Gly Thr Glu Val Val Val Lys		
	100	105	110
	<210> 76		
	<211> 110		
55	<212> PRT		
	<213> Secuencia artificial		

ES 2 998 307 T3

<220>

<223> secuencia VL-scFv recombinante

5 <400> 76
Asp Val Val Met Thr Gln Thr Pro Ala Ser Val Ser Glu Pro Val Gly
1 5 10 15
Gly Thr Val Thr Ile Lys Cys Gln Ala Ser Gln Ser Ile Ser Ser Trp
20 25 30
10 Leu Ser Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro Lys Leu Ile
35 40 45
Tyr Gln Ala Ser Thr Leu Ala Ser Gly Val Pro Pro Arg Ser Ser Gly
50 55 60
Ser Gly Ser Gly Thr Glu Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Asp Leu Glu Cys
65 70 75 80
15 Ala Asp Ala Ala Thr Tyr Phe Cys Gln Asn Asn Tyr Gly Phe Arg Ser
85 90 95
Tyr Gly Gly Ala Phe Gly Gly Thr Glu Val Val Val Lys
100 105 110

20

<210> 77

<211> 110

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

25

<220>

<223> secuencia VL-scFv recombinante

30 <400> 77
Asp Val Val Met Thr Gln Thr Pro Ser Ser Val Ser Ala Ala Val Gly
1 5 10 15
Asp Thr Val Thr Ile Asn Cys Gln Ala Ser Glu Ile Ile His Ser Trp
20 25 30
35 Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45
Tyr Leu Ala Ser Thr Leu Ala Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Lys Gly
50 55 60
Ser Gly Ser Gly Thr Gln Phe Thr Leu Thr Ile Ser Asp Leu Glu Cys
65 70 75 80
40 Ala Asp Ala Ala Ile Tyr Tyr Cys Gln Asn Val Tyr Leu Ala Ser Thr
85 90 95
Asn Gly Ala Asn Phe Gly Gly Thr Glu Val Val Val Lys
100 105 110

45

<210> 78

<211> 110

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

50

<220>

<223> secuencia VL-scFv recombinante

55 <400> 78

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

ES 2 998 307 T3

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

<210> 79
15 <211> 110
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

20 <220>
<223> secuencia VL-scFv recombinante

<400> 79
Asp Val Val Met Thr Gln Thr Pro Ser Ser Val Ser Ala Ala Val Gly
25 1 5 10 15
Asp Thr Val Thr Ile Asn Cys Gln Ala Asp Gln Ser Ile Tyr Ile Trp
20 25 30
Leu Ser Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45
30 Tyr Lys Ala Ser Thr Leu Glu Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Lys Gly
50 55 60
Ser Gly Ser Gly Thr Gln Phe Thr Leu Thr Ile Ser Asp Leu Glu Cys
65 70 75 80
Ala Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Asn Asn Ala His Tyr Ser Thr
35 85 90 95
Asn Gly Gly Thr Phe Gly Gly Thr Glu Val Val Val Lys
100 105 110

<210> 80
40 <211> 110
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

45 <220>
<223> secuencia VL-scFv recombinante

<400> 80
Asp Val Val Met Thr Gln Thr Pro Ser Ser Val Ser Ala Ala Val Gly
50 1 5 10 15
Asp Thr Val Thr Ile Lys Cys Gln Ala Ser Gln Asn Ile Arg Ile Trp
20 25 30
Leu Ser Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45
55 Tyr Lys Ala Ser Thr Leu Glu Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Lys Gly
50 55 60
Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Asp Leu Glu Cys
72

ES 2 998 307 T3

	65	70	75	80
	Ala	Asp	Ala	Ala
	Thr	Tyr	Tyr	Cys
	Gln	Asn	Asn	Ala
	His	Tyr	Ser	Thr
	85	90		95
	Asn	Gly	Gly	Thr
	Phe	Gly	Gly	Gly
	Thr	Glu	Val	Val
	100	105		110
	Lys			
5				
	<210> 81			
	<211> 111			
	<212> PRT			
10	<213> Secuencia artificial			
	<220>			
	<223> secuencia VL-scFv recombinante			
15	<400> 81			
	Glu	Val	Val	Met
	Thr	Gln	Thr	Pro
	Ala	Ser	Val	Glu
	Ala	Ala	Val	Gly
	1	5	10	15
	Gly	Thr	Val	Thr
	Ile	Lys	Cys	Gln
	Ala	Ser	Gln	Ser
	Ile	Asn	Ile	Trp
20	20	25		30
	Cys	Ser	Trp	Tyr
	Tyr	Gln	Gln	Lys
	Pro	Gly	His	Pro
	Pro	Pro	Lys	Leu
	35	40		45
	Tyr	Arg	Ala	Ser
	Thr	Leu	Ala	Ser
	Gly	Val	Gly	Val
	Ser	Ser	Ser	Ser
	Arg	Phe	Lys	Gly
25	50	55		60
	Ser	Gly	Ser	Gly
	Thr	Glu	Phe	Thr
	Leu	Thr	Ile	Ser
	Gly	Asp	Leu	Asp
	65	70		75
	Ala	Asp	Ala	Ala
	Thr	Tyr	Tyr	Cys
	Gln	Ala	Asn	Tyr
	85	90		95
	Gly	Tyr	Gly	Ala
	Ala	Ala	Phe	Gly
	100	105		110
30	Lys			
	<210> 82			
	<211> 113			
	<212> PRT			
35	<213> Secuencia artificial			
	<220>			
	<223> secuencia VL-scFv recombinante			
40	<400> 82			
	Glu	Ile	Val	Met
	Thr	Gln	Ser	Pro
	Ser	Thr	Leu	Ser
	Ala	Ser	Val	Gly
	1	5	10	15
	Asp	Arg	Val	Ile
	Ile	Ile	Thr	Cys
	Gln	Ala	Ser	Gln
	Ser	Ile	Ser	Ser
	Tyr			Tyr
45	20	25		30
	Leu	Ser	Trp	Tyr
	Gln	Gln	Lys	Pro
	Lys	Pro	Gly	Lys
	Ala	Gly	Ala	Pro
	35	40		45
	Tyr	Lys	Ala	Ser
	Thr	Leu	Ala	Ser
	Gly	Val	Gly	Val
	50	55		60
	Ser	Gly	Ser	Gly
	Ala	Glu	Phe	Thr
	65	70		75
	Asp	Asp	Phe	Ala
	Thr	Tyr	Tyr	Cys
	Gln	Ser	Asn	Tyr
	85	90		95
	Ser	Asp	Tyr	Gly
	Gly	Asn	Pro	Phe
	100	105		110
55	Gly			

ES 2 998 307 T3

5 <210> 83
 <211> 109
 <212> PRT
 5 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> secuencia VL-scFv recombinante
10 <400> 83
 Glu Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ser Thr Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15
 Asp Arg Val Ile Ile Thr Cys Gln Ala Ser Gln Ser Ile Gly Ser Ser
15 20 25 30
 Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
 35 40 45
 Tyr Thr Ala Ala Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60
20 Ser Gly Ser Gly Ala Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80
 Asp Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Asn Phe Ala Thr Ser Asp Thr
 85 90 95
 Val Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly
25 100 105

30 <210> 84
 <211> 112
 <212> PRT
 30 <213> Secuencia artificial

35 <220>
 <223> secuencia VL-scFv recombinante
35 <400> 84
 Glu Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ser Thr Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15
 Asp Arg Val Ile Ile Thr Cys Gln Ser Ser Gln Ser Val Trp Asn Asn
40 20 25 30
 Asn Arg Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu
 35 40 45
 Leu Ile Tyr Tyr Ala Ser Thr Leu Ala Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe
 50 55 60
45 Ser Gly Ser Gly Ser Gly Ala Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu
 65 70 75 80
 Gln Pro Asp Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Ala Gly Gly Tyr Ser Ser
 85 90 95
 Thr Ser Asp Asn Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly
50 100 105 110

55 <210> 85
 <211> 111
 <212> PRT
 55 <213> Secuencia artificial

5 <220>
 <223> secuencia VL-scFv recombinante
 10 <400> 85
 Glu Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ser Thr Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15
 Asp Arg Val Ile Ile Thr Cys Gln Ala Ser Glu Asn Ile Asn Ile Trp
 15 20 25 30
 Leu Ser Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
 20 35 40 45
 Tyr Gln Ala Ser Lys Leu Ala Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 25 50 55 60
 Ser Gly Ser Gly Ala Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 30 65 70 75 80
 Asp Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Asn Asn Tyr Ser Tyr Asn Arg
 35 85 90 95
 Tyr Gly Ala Pro Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly
 40 100 105 110
 45 <210> 86
 <211> 111
 <212> PRT
 50 <213> Artifical Sequence

55 <220>
 <223> secuencia VL-scFv recombinante
 60 <400> 86
 Glu Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ser Thr Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15
 Asp Arg Val Ile Ile Thr Cys Gln Ala Ser Gln Ser Ile Ser Ser Trp
 65 20 25 30
 Leu Ser Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
 70 35 40 45
 Tyr Gln Ala Ser Thr Leu Ala Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 75 50 55 60
 Ser Gly Ser Gly Ala Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 80 65 70 75 80
 Asp Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Asn Asn Tyr Gly Phe Arg Ser
 85 85 90 95
 Tyr Gly Gly Ala Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly
 90 100 105 110
 95 <210> 87
 <211> 111
 <212> PRT
 100 <213> Secuencia artificial

105 <220>
 <223> secuencia VL-scFv recombinante
 110 <400> 87
 Glu Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ser Thr Leu Ser Ala Ser Val Gly
 115 75

ES 2 998 307 T3

1	5	10	15
Asp Arg Val Ile Ile Thr Cys Gln Ala Ser Glu Ile Ile His Ser Trp			
20	25	30	
Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile			
35	40	45	
Tyr Leu Ala Ser Thr Leu Ala Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly			
50	55	60	
Ser Gly Ser Gly Ala Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro			
65	70	75	80
10 Asp Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Asn Val Tyr Leu Ala Ser Thr			
85	90	95	
Asn Gly Ala Asn Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly			
100	105	110	
15 <210> 88			
<211> 111			
<212> PRT			
<213> Secuencia artificial			
20			
<220>			
<223> secuencia VL-scFv recombinante			
25 <400> 88			
Glu Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ser Thr Leu Ser Ala Ser Val Gly			
1 5 10 15			
Asp Arg Val Ile Ile Thr Cys Gln Ala Ser Gln Ser Ile Asn Ile Trp			
20 25 30			
Leu Ser Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile			
35 40 45			
Tyr Lys Glu Ser Thr Leu Ala Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly			
50 55 60			
Ser Gly Ser Gly Ala Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro			
65 70 75 80			
35 Asp Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Asn Asn Tyr Asp Ser Gly Asn			
85 90 95			
Asn Gly Phe Pro Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly			
100 105 110			
40 <210> 89			
<211> 111			
<212> PRT			
<213> Secuencia artificial			
45			
<220>			
<223> secuencia VL-scFv recombinante			
50 <400> 89			
Glu Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ser Thr Leu Ser Ala Ser Val Gly			
1 5 10 15			
Asp Arg Val Ile Ile Thr Cys Gln Ala Asp Gln Ser Ile Tyr Ile Trp			
20 25 30			
Leu Ser Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile			
55 35 40 45			
Tyr Lys Ala Ser Thr Leu Glu Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly			
50 55 60			

ES 2 998 307 T3

Ser Gly Ser Gly Ala Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80
 Asp Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Asn Asn Ala His Tyr Ser Thr
 85 90 95
 5 Asn Gly Gly Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly
 100 105 110

 <210> 90
 <211> 111
 10 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 15 <223> secuencia VL-scFv recombinante

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

 <210> 91
 <211> 112
 35 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 40 <223> secuencia VL-scFv recombinante

 <400> 91
 Glu Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ser Thr Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15
 45 Asp Arg Val Ile Ile Thr Cys Gln Ala Ser Gln Ser Ile Asn Ile Trp
 20 25 30
 Cys Ser Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
 35 40 45
 Tyr Arg Ala Ser Thr Leu Ala Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 50 55 60
 Ser Gly Ser Gly Ala Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80
 Asp Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Ala Asn Tyr Ala Tyr Ser Ala
 85 90 95
 55 Gly Tyr Gly Ala Ala Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly
 100 105 110

5 <210> 92
 <211> 111
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> secuencia VL-scFv recombinante

<400> 92
 Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15
 15 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Gln Ala Ser Glu Ile Ile His Ser Trp
 20 25 30
 Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Arg Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
 35 40 45
 Ser Leu Ala Ser Thr Leu Ala Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 20 50 60
 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Phe Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80
 Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Asn Val Tyr Leu Ala Ser Thr
 85 90 95
 25 Asn Gly Ala Asn Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
 100 105 110

30 <210> 93
 <211> 113
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

35 <220>
 <223> secuencia VL-scFv recombinante

<400> 93
 Glu Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ser Thr Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15
 40 Asp Arg Val Ile Ile Thr Cys Gln Ala Ser Gln Ser Ile Ser Ser Tyr
 20 25 30
 Leu Ser Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
 35 40 45
 Tyr Lys Ala Ser Thr Leu Ala Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 45 50 60
 Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80
 Asp Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Ser Asn Tyr Gly Gly Ser Ser
 85 90 95
 50 Ser Asp Tyr Gly Asn Pro Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu
 100 105 110
 Gly

55 <210> 94
 <211> 109
 <212> PRT

ES 2 998 307 T3

<213> Secuencia artificial

<220>

5 <223> secuencia VL-scFv recombinante

<400> 94

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

<210> 95

<211> 112

25 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

30 <223> secuencia VL-scFv recombinante

<400> 95

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

50 <210> 96

<211> 111

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

55

<220>

<223> secuencia VL-scFv recombinante

ES 2 998 307 T3

<400> 96
Glu Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ser Thr Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15
5 Asp Arg Val Ile Ile Thr Cys Gln Ala Ser Glu Asn Ile Asn Ile Trp
20 25 30
Leu Ser Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45
Tyr Gln Ala Ser Lys Leu Ala Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
10 50 55 60
Ser Gly Ser Gly Thr Gln Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80
Asp Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Asn Asn Tyr Ser Tyr Asn Arg
85 90 95
15 Tyr Gly Ala Pro Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly
100 105 110

<210> 97
<211> 111
20 <212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
25 <223> secuencia VL-scFv recombinante

<400> 97
Glu Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ser Thr Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15
30 Asp Arg Val Ile Ile Thr Cys Gln Ala Ser Gln Ser Ile Ser Ser Trp
20 25 30
Leu Ser Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45
Tyr Gln Ala Ser Thr Leu Ala Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60
Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80
Asp Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Asn Asn Tyr Gly Phe Arg Ser
85 90 95
40 Tyr Gly Gly Ala Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly
100 105 110

<210> 98
<211> 111
45 <212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
50 <223> secuencia VL-scFv recombinante

<400> 98
Glu Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ser Thr Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15
55 Asp Arg Val Ile Ile Thr Cys Gln Ala Ser Glu Ile Ile His Ser Trp
20 25 30
Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
80

ES 2 998 307 T3

	35	40	45
	Tyr Leu Ala Ser Thr Leu Ala Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly		
	50	55	60
5	Ser Gly Ser Gly Thr Gln Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro		
	65	70	75
	Asp Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Asn Val Tyr Leu Ala Ser Thr		
	85	90	95
	Asn Gly Ala Asn Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly		
	100	105	110
10	<210> 99		
	<211> 111		
	<212> PRT		
	<213> Secuencia artificial		
15	<220>		
	<223> secuencia VL-scFv recombinante		
20	<400> 99		
	Glu Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ser Thr Leu Ser Ala Ser Val Gly		
	1	5	10
	Asp Arg Val Ile Ile Thr Cys Gln Ala Ser Gln Ser Ile Asn Ile Trp		
	20	25	30
25	Leu Ser Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile		
	35	40	45
	Tyr Lys Glu Ser Thr Leu Ala Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly		
	50	55	60
	Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro		
30	65	70	75
	Asp Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Asn Asn Tyr Asp Ser Gly Asn		
	85	90	95
	Asn Gly Phe Pro Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly		
	100	105	110
35	<210> 100		
	<211> 111		
	<212> PRT		
	<213> Secuencia artificial		
40	<220>		
	<223> secuencia VL-scFv recombinante		
45	<400> 100		
	Glu Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ser Thr Leu Ser Ala Ser Val Gly		
	1	5	10
	Asp Arg Val Ile Ile Thr Cys Gln Ala Asp Gln Ser Ile Tyr Ile Trp		
	20	25	30
50	Leu Ser Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile		
	35	40	45
	Tyr Lys Ala Ser Thr Leu Glu Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly		
	50	55	60
	Ser Gly Ser Gly Thr Gln Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro		
55	65	70	75
	Asp Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Asn Asn Ala His Tyr Ser Thr		
	85	90	95

ES 2 998 307 T3

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

5 <210> 101
 <211> 111
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> secuencia VL-scFv recombinante

<400> 101
 Glu Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ser Thr Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15

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

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

20 Tyr Lys Ala Ser Thr Leu Glu Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60

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

25 Asp Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Asn Asn Ala His Tyr Ser Thr
 85 90 95

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

30 <210> 102
 <211> 112
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

35 <220>
 <223> secuencia VL-scFv recombinante

<400> 102
 Glu Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ser Thr Leu Ser Ala Ser Val Gly
 40 1 5 10 15

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

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

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

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

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

Gly Tyr Gly Ala Ala Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly
 100 105 110

55 <210> 103
 <211> 111

<212> PRT
<213> Secuencia artificial

5 <220>
<223> secuencia VL-scFv recombinante

<400> 103
Glu Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15
Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Gln Ala Ser Glu Ile Ile His Ser Trp
20 25 30
Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Arg Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45
Ser Leu Ala Ser Thr Leu Ala Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60
Ser Gly Ser Gly Thr Gln Phe Thr Phe Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80
Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Asn Val Tyr Leu Ala Ser Thr
85 90 95
Asn Gly Ala Asn Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
100 105 110

<210> 104
25 <211> 111
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

30 <220>
<223> secuencia VL-scFv recombinante

<400> 104
Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ser Thr Leu Ser Ala Ser Val Gly
35 1 5 10 15
Asp Arg Val Ile Ile Thr Cys Gln Ala Ser Glu Ile Ile His Ser Trp
20 25 30
Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45
Tyr Leu Ala Ser Thr Leu Ala Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60
Ser Gly Ser Gly Ala Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80
Asp Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Asn Val Tyr Leu Ala Ser Thr
85 90 95
Asn Gly Ala Asn Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly
100 105 110

<210> 105
50 <211> 111
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

55 <220>
<223> secuencia VL-scFv recombinante

ES 2 998 307 T3

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

<210> 106
 <211> 112
 <212> PRT
 20 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> secuencia VL-scFv recombinante

25 <400> 106
 Glu Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ser Thr Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15
 Asp Arg Val Ile Ile Thr Cys Gln Ala Ser Gln Ser Ile Asn Ile Trp
 30 20 25 30
 Leu Ser Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
 35 40 45
 Tyr Arg Ala Ser Thr Leu Ala Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60
 35 Ser Gly Ser Gly Ala Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80
 Asp Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Ala Asn Tyr Ala Tyr Ser Ala
 85 90 95
 Gly Tyr Gly Ala Ala Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly
 40 100 105 110

45 <210> 107
 <211> 128
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

50 <220>
 <223> secuencia VH-scFv recombinante

<400> 107
 Gln Ser Leu Glu Glu Ser Gly Gly Asp Leu Val Lys Pro Gly Ala Ser
 55 1 5 10 15
 Leu Thr Leu Thr Cys Thr Ala Ser Gly Phe Pro Phe Ser Ser Gly Tyr
 20 25 30

ES 2 998 307 T3

Trp Val Cys Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45
Ala Cys Ile Tyr Ala Gly Ser Ser Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Ser Trp
50 55 60
5 Ala Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Lys Thr Ser Ser Thr Thr Val Thr
65 70 75 80
Leu Gln Met Thr Ser Leu Thr Ala Ala Asp Thr Ala Thr Tyr Phe Cys
85 90 95
Ala Arg Gly Asn Asn Tyr Tyr Ile Tyr Thr Asp Gly Gly Tyr Ala Tyr
10 100 105 110
Ala Gly Leu Glu Leu Trp Gly Pro Gly Ile Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120 125

15
<210> 108
<211> 128
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

20
<220>
<223> secuencia VH-scFv recombinante

25 <400> 108
Gln Ser Leu Glu Glu Ser Gly Gly Asp Leu Val Lys Pro Gly Ala Ser
1 5 10 15
Leu Thr Leu Thr Cys Thr Ala Ser Gly Phe Ser Phe Ser Ser Gly Tyr
20 25 30
30 Trp Ile Cys Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45
Ala Cys Ile Tyr Ala Gly Ser Ser Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Ser Trp
50 55 60
Ala Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Lys Thr Ser Ser Thr Thr Val Thr
35 65 70 75 80
Leu Gln Met Thr Ser Leu Thr Ala Ala Asp Thr Ala Thr Tyr Phe Cys
85 90 95
Ala Arg Gly Asn Asn Tyr Tyr Ile Tyr Thr Asp Gly Gly Tyr Ala Tyr
100 105 110
40 Ala Gly Leu Glu Leu Trp Gly Pro Gly Ile Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120 125

45 <210> 109
<211> 117
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

50
<220>
<223> secuencia VH-scFv recombinante

<400> 109
55 Gln Ser Leu Glu Glu Ser Gly Gly Asp Leu Val Gln Pro Gly Ala Ser
1 5 10 15
Leu Thr Leu Thr Cys Lys Val Ser Gly Phe Ser Leu Asn Thr Asn Tyr
85

ES 2 998 307 T3

	20	25	30
5	Trp Met Cys Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile		
	35	40	45
	Gly Cys Met Tyr Thr Gly Ser Tyr Asn Arg Ala Tyr Tyr Ala Ser Trp		
	50	55	60
	Ala Lys Gly Arg Phe Thr Ser Ser Lys Thr Ser Ser Thr Thr Val Thr		
	65	70	75
10	Leu Glu Met Thr Ser Leu Thr Ala Ala Asp Thr Ala Thr Tyr Phe Cys		
	85	90	95
	Ala Lys Gly Ser Asn Trp Tyr Ser Asp Leu Trp Gly Pro Gly Thr Leu		
	100	105	110
	Val Thr Val Ser Ser		
	115		
15	<210> 110		
	<211> 124		
	<212> PRT		
	<213> Secuencia artificial		
20	<220>		
	<223> secuencia VH-scFv recombinante		
	<400> 110		
25	Gln Glu Arg Leu Val Glu Ser Gly Gly Leu Val Gln Pro Glu Gly		
	1	5	10
	Ser Leu Thr Leu Thr Cys Lys Ala Ser Gly Phe Ser Phe Ser Arg Ser		
	20	25	30
30	Tyr Tyr Ile Tyr Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp		
	35	40	45
	Ile Ala Cys Ile Asp Ala Gly Ser Ser Gly Ile Leu Val Tyr Ala Asn		
	50	55	60
	Trp Ala Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Lys Thr Ser Ser Thr Thr Val		
	65	70	75
35	80		
	Thr Leu Gln Met Thr Ser Leu Thr Ala Ala Asp Thr Ala Thr Tyr Phe		
	85	90	95
	Cys Ala Arg Gly Asp Ala Ser Tyr Gly Val Asp Ser Phe Met Leu Pro		
	100	105	110
	Leu Trp Gly Pro Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser		
40	115	120	
	<210> 111		
	<211> 119		
	<212> PRT		
45	<213> Secuencia artificial		
	<220>		
	<223> secuencia VH-scFv recombinante		
50	<400> 111		
	Gln Ser Leu Glu Glu Ser Gly Gly Leu Val Gln Pro Glu Gly Ser		
	1	5	10
	Leu Thr Leu Thr Cys Lys Ala Ser Gly Phe Ser Phe Thr Thr Asp		
55	20	25	30
	Tyr Met Cys Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile		
	35	40	45

ES 2 998 307 T3

Gly Cys Ile Leu Ala Gly Asp Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asn Trp Ala
50 55 60
Lys Gly Arg Phe Thr Gly Ser Lys Thr Ser Ser Thr Thr Val Asp Leu
65 70 75 80
5 Lys Met Thr Gly Leu Thr Ala Ala Asp Thr Ala Thr Tyr Phe Cys Ala
85 90 95
Arg Ser Asp Pro Ala Ser Ser Trp Ser Phe Ala Leu Trp Gly Pro Gly
100 105 110
Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
10 115

<210> 112
<211> 117
<212> PRT
15 <213> Secuencia artificial

<220>
<223> secuencia VH-scFv recombinante
20
<400> 112
Gln Ser Leu Glu Glu Ser Gly Gly Arg Leu Val Thr Pro Gly Thr Pro
1 5 10 15
Leu Thr Leu Thr Cys Thr Ala Ser Gly Ile Asp Phe Ser Gly Ala Tyr
25 20 25 30
Tyr Met Gly Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45
Gly Tyr Ile Asp Tyr Asp Gly Asp Arg Tyr Tyr Ala Ser Trp Ala Lys
50 55 60
30 Gly Arg Phe Thr Ile Ser Lys Thr Ser Thr Thr Val Asp Leu Lys Ile
65 70 75 80
Thr Ser Pro Thr Thr Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Phe Cys Ala Arg Ser
85 90 95
Asp Tyr Ser Ser Gly Trp Gly Thr Asp Ile Trp Gly Pro Gly Thr Leu
35 100 105 110
Val Thr Val Ser Leu
115

<210> 113
40 <211> 117
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

45 <220>
<223> secuencia VH-scFv recombinante

<400> 113
Gln Ser Val Glu Glu Ser Gly Gly Arg Leu Val Thr Pro Gly Thr Pro
50 1 5 10 15
Leu Thr Leu Thr Cys Thr Ala Ser Gly Phe Ser Leu Thr Asp Tyr Tyr
20 25 30
Tyr Met Thr Trp Val Arg Leu Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Tyr Ile
35 40 45
55 Gly Phe Ile Asp Pro Asp Asp Pro Tyr Tyr Ala Thr Trp Ala Lys
50 55 60
Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Thr Ser Thr Thr Val Asn Leu Lys Met
87

ES 2 998 307 T3

65 70 75 80
Thr Ser Pro Thr Thr Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Phe Cys Ala Gly Gly
85 90 95
Asp His Asn Ser Gly Trp Gly Leu Asp Ile Trp Gly Pro Gly Thr Leu
5 100 105 110
Val Thr Val Ser Leu
 115

10 <210> 114
<211> 116
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

15 <220>
<223> secuencia VH-scFv recombinante

20 <400> 114
Gln Ser Leu Glu Glu Ser Gly Gly Arg Leu Val Thr Pro Gly Thr Pro
1 5 10 15
Leu Thr Leu Thr Cys Thr Ala Ser Gly Phe Ser Leu Ser Tyr Tyr Tyr
20 25 30
Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile Gly
35 40 45

25 Ile Ile Gly Pro Gly Asp Tyr Thr Asp Tyr Ala Ser Trp Ala Lys Gly
50 55 60
Arg Phe Thr Ile Ser Lys Thr Ser Thr Thr Val Asp Leu Lys Ile Thr
65 70 75 80
Ser Pro Thr Thr Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Phe Cys Gly Arg Gly Asp
30 85 90 95
Asp Asn Ser Gly Trp Gly Glu Asp Ile Trp Gly Pro Gly Thr Leu Val
100 105 110
Thr Val Ser Leu
 115

35 <210> 115
<211> 116
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

40

45 <220>
<223> secuencia VH-scFv recombinante

50 <400> 115
Gln Ser Val Glu Glu Ser Gly Gly Arg Leu Val Thr Pro Gly Ala Pro
1 5 10 15
Leu Thr Leu Thr Cys Ser Val Ser Gly Phe Ser Leu Ser Asp Tyr Tyr
20 25 30
Met Cys Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Gln Trp Ile Gly
35 40 45
Cys Leu Asp Tyr Phe Gly Ser Thr Asp Asp Ala Ser Trp Ala Lys Gly
50 55 60
Arg Phe Thr Ile Ser Lys Thr Ser Thr Ala Val Asp Leu Lys Ile Thr
55 65 70 75 80
Ser Pro Thr Thr Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Phe Cys Ala Arg Thr Asp
85 90 95

ES 2 998 307 T3

115

<210> 118

<211> 130

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

10 <223> secuencia VH-scFv recombinante

<400> 118

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly

1 5 10 15

15 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Pro Phe Ser Ser Gly
20 25 30Tyr Trp Val Cys Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp
35 40 45Val Ser Cys Ile Tyr Ala Gly Ser Ser Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Ser
50 55 60Trp Ala Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr
65 70 75 80Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr
85 90 9525 Tyr Cys Ala Lys Gly Asn Asn Tyr Tyr Ile Tyr Thr Asp Gly Gly Tyr
100 105 110Ala Tyr Ala Gly Leu Glu Leu Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val
115 120 125

Ser Ser

30 130

<210> 119

<211> 130

<212> PRT

35 <213> Secuencia artificial

<220>

40 <223> secuencia VH-scFv recombinante

<400> 119

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly

1 5 10 15

45 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Ser Phe Ser Ser Gly
20 25 30Tyr Trp Ile Cys Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp
35 40 45Val Ser Cys Ile Tyr Ala Gly Ser Ser Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Ser
50 55 6050 Trp Ala Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr
65 70 75 80Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr
85 90 9555 Tyr Cys Ala Lys Gly Asn Asn Tyr Tyr Ile Tyr Thr Asp Gly Gly Tyr
100 105 110Ala Tyr Ala Gly Leu Glu Leu Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val
115 120 125

90

Ser Ser
 130

5 <210> 120
 <211> 119
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> secuencia VH-scFv recombinante

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

30

<210> 121
 <211> 125
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

35

<220>
 <223> secuencia VH-scFv recombinante

40 <400> 121
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Ser Phe Ser Arg Ser
 20 25 30
 45 Tyr Tyr Ile Tyr Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp
 35 40 45
 Val Ser Cys Ile Asp Ala Gly Ser Ser Gly Ile Leu Val Tyr Ala Asn
 50 55 60
 Trp Ala Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr
 50 65 70 75 80
 Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr
 85 90 95
 Tyr Cys Ala Lys Gly Asp Ala Ser Tyr Gly Val Asp Ser Phe Met Leu
 100 105 110
 55 Pro Leu Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120 125

```

<210> 122
<211> 121
<212> PRT
<213> Secuencia artificial
5

<220>
<223> secuencia VH-scFv recombinante

10 <400> 122
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Ser Phe Thr Thr Thr
20 25 30
15 Asp Tyr Met Cys Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp
35 40 45
Val Ser Cys Ile Leu Ala Gly Asp Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asn Trp
50 55 60
Ala Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu
20 65 70 75 80
Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr
85 90 95
Cys Ala Lys Ser Asp Pro Ala Ser Ser Trp Ser Phe Ala Leu Trp Gly
100 105 110
25 Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 123
<211> 120
30 <212> PRT
<213> Secuencia artificial

55 <220>
35 <223> secuencia VH-scFv recombinante

<400> 123
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15
40 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Ile Asp Phe Ser Gly Ala
20 25 30
Tyr Tyr Met Gly Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp
35 40 45
Val Ser Tyr Ile Asp Tyr Asp Gly Asp Arg Tyr Tyr Ala Ser Trp Ala
45 50 55 60
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95
50 Ala Lys Ser Asp Tyr Ser Ser Gly Trp Gly Thr Asp Ile Trp Gly Gln
100 105 110
Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

55 <210> 124
<211> 120
<212> PRT

```

<213> Secuencia artificial

<220>

5 <223> secuencia VH-scFv recombinante

<400> 124

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

25 <210> 125

<211> 119

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

30

<220>

<223> secuencia VH-scFv recombinante

<400> 125

Glu	Val	Gln	Leu	Val	Glu	Ser	Gly	Gly	Gly	Leu	Val	Gln	Pro	Gly	Gly	
35					1			5			10		15			
Ser	Leu	Arg	Leu	Ser	Cys	Ala	Ala	Ser	Gly	Phe	Ser	Leu	Ser	Tyr	Tyr	
					20			25			30					
Tyr	Met	Ser	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu	Glu	Trp	Val	
40					35			40			45					
Ser	Ile	Ile	Gly	Pro	Gly	Asp	Tyr	Thr	Asp	Tyr	Ala	Ser	Trp	Ala	Lys	
					50			55			60					
Gly	Arg	Phe	Thr	Ile	Ser	Arg	Asp	Asn	Ser	Lys	Asn	Thr	Leu	Tyr	Leu	
65					65			70			75		80			
45	Gln	Met	Asn	Ser	Leu	Arg	Ala	Glu	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	Ala
					85			90			95					
Lys	Gly	Asp	Asp	Asn	Ser	Gly	Trp	Gly	Glu	Asp	Ile	Trp	Gly	Gln	Gly	
					100			105			110					
Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser										
50					115											

<210> 126

<211> 119

<212> PRT

55 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> secuencia VH-scFv recombinante

<400> 126

5 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Ser Leu Ser Asp Tyr
 20 25 30
 10 Tyr Met Cys Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ser Cys Leu Asp Tyr Phe Gly Ser Thr Asp Asp Ala Ser Trp Ala Lys
 50 55 60
 Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu
 65 70 75 80
 15 Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
 85 90 95
 Lys Thr Asp Asp Ser Arg Gly Trp Gly Leu Asn Ile Trp Gly Gln Gly
 100 105 110
 Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 20 115

<210> 127

<211> 119

<212> PRT

25 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> secuencia VH-scFv recombinante

30 <400> 127
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Ser Leu Ser Ser Tyr
 20 25 30
 35 Tyr Met Cys Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ser Cys Leu Asp Tyr Val Gly Asp Thr Asp Tyr Ala Ser Trp Ala Lys
 50 55 60
 40 Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu
 65 70 75 80
 Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
 85 90 95
 Lys Thr Asp Asp Ser Arg Gly Trp Gly Leu Asn Ile Trp Gly Gln Gly
 45 100 105 110
 Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115

<210> 128

50 <211> 119

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

55 <223> secuencia VH-scFv recombinante

ES 2 998 307 T3

<400> 128
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Ser Leu Asn Thr Tyr
5 20 25 30
Tyr Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45
Ser Ile Ile Ala Pro Asp Asp Thr Thr Tyr Tyr Ala Ser Trp Ala Lys
50 55 60
10 Ser Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu
65 70 75 80
Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
85 90 95
Lys Ser Gly Asp Thr Thr Ala Trp Gly Ala Asp Ile Trp Gly Gln Gly
15 100 105 110
Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115

20 <210> 129
<211> 120
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

25 <220>
<223> secuencia VH-scFv recombinante

<400> 129
Gln Val Gln Leu Val Gln Thr Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
30 1 5 10 15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Ser Leu Thr Asp Tyr
20 25 30
Tyr Tyr Met Thr Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp
35 40 45
35 Val Ser Phe Ile Asp Pro Asp Asp Pro Tyr Tyr Ala Thr Trp Ala
50 55 60
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Val Tyr
65 70 75 80
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Leu Tyr Tyr Cys
40 85 90 95
Ala Lys Gly Asp His Asn Ser Gly Trp Gly Leu Asp Ile Trp Gly Gln
100 105 110
Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

45 <210> 130
<211> 130
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

50 <220>
<223> secuencia VH-scFv recombinante

55 <400> 130
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15
95

ES 2 998 307 T3

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Thr Ala Ser Gly Phe Pro Phe Ser Ser Gly
20 25 30
Tyr Trp Val Cys Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp
35 40 45
5 Val Gly Cys Ile Tyr Ala Gly Ser Ser Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Ser
50 55 60
Trp Ala Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Lys Asp Thr Ser Lys Asn Thr
65 70 75 80
Val Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr
10 85 90 95
Tyr Cys Ala Arg Gly Asn Asn Tyr Tyr Ile Tyr Thr Asp Gly Gly Tyr
100 105 110
Ala Tyr Ala Gly Leu Glu Leu Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val
115 120 125
15 Ser Ser
130

<210> 131
<211> 130
20 <212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
25 <223> secuencia VH-scFv recombinante

<400> 131
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15
30 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Thr Ala Ser Gly Phe Ser Phe Ser Ser Gly
20 25 30
Tyr Trp Ile Cys Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp
35 40 45
Val Gly Cys Ile Tyr Ala Gly Ser Ser Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Ser
35 50 55 60
Trp Ala Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Lys Asp Thr Ser Lys Asn Thr
65 70 75 80
Val Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr
85 90 95
40 Tyr Cys Ala Arg Gly Asn Asn Tyr Tyr Ile Tyr Thr Asp Gly Gly Tyr
100 105 110
Ala Tyr Ala Gly Leu Glu Leu Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val
115 120 125
45 Ser Ser
130

<210> 132
<211> 119
<212> PRT
50 <213> Secuencia artificial

<220>
<223> secuencia VH-scFv recombinante
55
<400> 132
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
96

ES 2 998 307 T3

1 5 10 15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Lys Val Ser Gly Phe Ser Leu Asn Thr Asn
20 25 30
Tyr Trp Met Cys Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp
5 35 40 45
Val Gly Cys Met Tyr Thr Gly Ser Tyr Asn Arg Ala Tyr Tyr Ala Ser
50 55 60
Trp Ala Lys Gly Arg Phe Thr Ser Ser Lys Asp Thr Ser Lys Asn Thr
65 70 75 80
10 Val Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr
85 90 95
Tyr Cys Ala Lys Gly Ser Asn Trp Tyr Ser Asp Leu Trp Gly Gln Gly
100 105 110
Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
15 115

20 <210> 133
<211> 125
<212> PRT
20 <213> Secuencia artificial

25 <220>
<223> secuencia VH-scFv recombinante
<400> 133
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Lys Ala Ser Gly Phe Ser Phe Ser Arg Ser
30 20 25 30
Tyr Tyr Ile Tyr Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp
35 35 40 45
Val Gly Cys Ile Asp Ala Gly Ser Ser Gly Ile Leu Val Tyr Ala Asn
50 55 60
35 Trp Ala Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Lys Asp Thr Ser Lys Asn Thr
65 70 75 80
Val Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr
85 90 95
40 Tyr Cys Ala Arg Gly Asp Ala Ser Tyr Gly Val Asp Ser Phe Met Leu
100 105 110
Pro Leu Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120 125

45 <210> 134
<211> 121
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

50 <220>
<223> secuencia VH-scFv recombinante
<400> 134
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
55 5 10 15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Lys Ala Ser Gly Phe Ser Phe Thr Thr Thr
20 25 30

ES 2 998 307 T3

Asp Tyr Met Cys Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp
35 40 45
Val Gly Cys Ile Leu Ala Gly Asp Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asn Trp
50 55 60
5 Ala Lys Gly Arg Phe Thr Gly Ser Lys Asp Thr Ser Lys Asn Thr Val
65 70 75 80
Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr
85 90 95
Cys Ala Arg Ser Asp Pro Ala Ser Ser Trp Ser Phe Ala Leu Trp Gly
10 100 105 110
Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 135
15 <211> 120
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

20 <220>
<223> secuencia VH-scFv recombinante

<400> 135
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
25 1 5 10 15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Thr Ala Ser Gly Ile Asp Phe Ser Gly Ala
20 25 30
Tyr Tyr Met Gly Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp
35 40 45
30 Val Gly Tyr Ile Asp Tyr Asp Gly Asp Arg Tyr Tyr Ala Ser Trp Ala
50 55 60
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Lys Asp Thr Ser Lys Asn Thr Val Tyr
65 70 75 80
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
35 85 90 95
Ala Arg Ser Asp Tyr Ser Ser Gly Trp Gly Thr Asp Ile Trp Gly Gln
100 105 110
Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

40 <210> 136
<211> 120
<212> PRT
<213> Secuencia artificial
45

<220>
<223> secuencia VH-scFv recombinante

50 <400> 136
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Thr Ala Ser Gly Phe Ser Leu Thr Asp Tyr
20 25 30
55 Tyr Tyr Met Thr Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp
35 40 45
Val Gly Phe Ile Asp Pro Asp Asp Asp Pro Tyr Tyr Ala Thr Trp Ala
98

ES 2 998 307 T3

50 55 60
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Thr Ser Lys Asn Thr Val Tyr
65 70 75 80
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
5 85 90 95
Ala Gly Gly Asp His Asn Ser Gly Trp Gly Leu Asp Ile Trp Gly Gln
100 105 110
Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

10 <210> 137
<211> 119
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

15 <220>
<223> secuencia VH-scFv recombinante

20 <400> 137
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Thr Ala Ser Gly Phe Ser Leu Ser Tyr Tyr
20 25 30
25 Tyr Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45
Gly Ile Ile Gly Pro Gly Asp Tyr Thr Asp Tyr Ala Ser Trp Ala Lys
50 55 60
Gly Arg Phe Thr Ile Ser Lys Asp Thr Ser Lys Asn Thr Val Tyr Leu
30 <210> 138
65 70 75 80
Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
85 90 95
Arg Gly Asp Asp Asn Ser Gly Trp Gly Glu Asp Ile Trp Gly Gln Gly
100 105 110

35 Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115

40 <210> 138
<211> 119
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

45 <220>
<223> secuencia VH-scFv recombinante

50 <400> 138
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15
55 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ser Val Ser Gly Phe Ser Leu Ser Asp Tyr
20 25 30
Tyr Met Cys Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45
Gly Cys Leu Asp Tyr Phe Gly Ser Thr Asp Asp Ala Ser Trp Ala Lys
50 55 60
Gly Arg Phe Thr Ile Ser Lys Asp Thr Ser Lys Asn Thr Val Tyr Leu
65 70 75 80
99

ES 2 998 307 T3

Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
85 90 95
Arg Thr Asp Asp Ser Arg Gly Trp Gly Leu Asn Ile Trp Gly Gln Gly
100 105 110
5 Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 139
<211> 119
10 <212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
15 <223> secuencia VH-scFv recombinante

<400> 139
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15
20 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Thr Ala Ser Gly Phe Ser Leu Ser Ser Tyr
20 25 30
Tyr Met Cys Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45
Gly Cys Leu Asp Tyr Val Gly Asp Thr Asp Tyr Ala Ser Trp Ala Lys
25 50 55 60
Gly Arg Phe Thr Ile Ser Lys Asp Ala Ser Lys Asn Thr Val Tyr Leu
65 70 75 80
Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
85 90 95
30 Arg Thr Asp Asp Ser Arg Gly Trp Gly Leu Asn Ile Trp Gly Gln Gly
100 105 110
Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115

35 <210> 140
<211> 119
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

40 <220>
<223> secuencia VH-scFv recombinante

<400> 140
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
45 1 5 10 15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Thr Ala Ser Gly Phe Ser Leu Ser Ser Tyr
20 25 30
Tyr Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
50 35 40 45
Gly Ile Leu Asp Tyr Val Gly Asp Thr Asp Tyr Ala Ser Trp Ala Lys
50 55 60
Gly Arg Phe Thr Ile Ser Lys Asp Ala Ser Lys Asn Thr Val Tyr Leu
65 70 75 80
55 Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
85 90 95
Arg Thr Asp Asp Ser Arg Gly Trp Gly Leu Asn Ile Trp Gly Gln Gly
100

ES 2 998 307 T3

	100	105	110														
Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser											
							115										
5	<210>	141															
	<211>	119															
	<212>	PRT															
	<213>	Secuencia artificial															
10																	
	<220>																
	<223>	secuencia VH-scFv recombinante															
	<400>	141															
15	Glu	Val	Gln	Leu	Val	Glu	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly						
	1					5			10			15					
	Ser	Leu	Arg	Leu	Ser	Cys	Thr	Val	Ser	Gly	Phe	Ser	Leu	Asn	Thr	Tyr	
													20	25	30		
20	Tyr	Met	Asn	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu	Glu	Trp	Val	
													35	40	45		
	Gly	Ile	Ile	Ala	Pro	Asp	Asp	Thr	Thr	Tyr	Tyr	Tyr	Ala	Ser	Trp	Ala	Lys
													50	55	60		
	Ser	Arg	Ser	Thr	Ile	Ser	Arg	Asp	Thr	Ser	Lys	Asn	Thr	Val	Tyr	Leu	
													65	70	75	80	
25	Gln	Met	Asn	Ser	Leu	Arg	Ala	Glu	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	Ala	
													85	90	95		
	Arg	Ser	Gly	Asp	Thr	Thr	Ala	Trp	Gly	Ala	Asp	Ile	Trp	Gly	Gln	Gly	
													100	105	110		
	Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser										
30													115				
	<210>	142															
	<211>	120															
	<212>	PRT															
35	<213>	Secuencia artificial															
	<220>																
	<223>	secuencia VH-scFv recombinante															
40																	
	<400>	142															
	Gln	Val	Gln	Leu	Val	Gln	Thr	Gly	Gly	Leu	Val	Gln	Pro	Gly	Gly		
	1												5	10	15		
45	Ser	Leu	Arg	Leu	Ser	Cys	Thr	Ala	Ser	Gly	Phe	Ser	Leu	Thr	Asp	Tyr	
													20	25	30		
	Tyr	Tyr	Met	Thr	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu	Glu	Trp	
													35	40	45		
	Val	Gly	Phe	Ile	Asp	Pro	Asp	Asp	Asp	Pro	Tyr	Tyr	Ala	Thr	Trp	Ala	
													50	55	60		
50	Lys	Gly	Arg	Phe	Thr	Ile	Ser	Arg	Asp	Thr	Ser	Lys	Asn	Thr	Val	Tyr	
													65	70	75	80	
	Leu	Gln	Met	Asn	Ser	Leu	Arg	Ala	Glu	Asp	Thr	Ala	Leu	Tyr	Tyr	Cys	
													85	90	95		
	Ala	Gly	Gly	Asp	His	Asn	Ser	Gly	Trp	Gly	Leu	Asp	Ile	Trp	Gly	Gln	
55													100	105	110		
	Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser						115	120		

```

<210> 143
<211> 119
<212> PRT
5 <213> Secuencia artificial

<220>
<223> secuencia VH-scFv recombinante
10
<400> 143
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Ser Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Ser Leu Ser Asp Tyr
15 20 25 30
Tyr Met Cys Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45
Ser Cys Leu Asp Tyr Phe Gly Ser Thr Asp Asp Ala Ser Trp Ala Lys
50 55 60
20 Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu
65 70 75 80
Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys Ala
85 90 95
Lys Thr Asp Asp Ser Arg Gly Trp Gly Leu Asn Ile Trp Gly Gln Gly
25 100 105 110
Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 144
30 <211> 120
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

35 <220>
<223> secuencia VH-scFv recombinante

<400> 144
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Ser Val Gln Pro Gly Gly
40 1 5 10 15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Thr Ala Ser Gly Phe Ser Leu Thr Asp Tyr
20 25 30
Tyr Tyr Met Thr Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp
35 40 45
45 Val Gly Phe Ile Asp Pro Asp Asp Pro Tyr Tyr Ala Thr Trp Ala
50 55 60
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Thr Ser Lys Asn Thr Val Tyr
65 70 75 80
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys
50 85 90 95
Ala Gly Gly Asp His Asn Ser Gly Trp Gly Leu Asp Ile Trp Gly Gln
100 105 110
Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115 120

55 <210> 145
<211> 119

```

<212> PRT
 <213> Secuencia artificial

5 <220>
 <223> secuencia VH-scFv recombinante

 <400> 145
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Ser Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Thr Val Ser Gly Phe Ser Leu Asn Thr Tyr
 20 25 30
 Tyr Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 15 Gly Ile Ile Ala Pro Asp Asp Thr Thr Tyr Tyr Ala Ser Trp Ala Lys
 50 55 60
 Ser Arg Ser Thr Ile Ser Arg Asp Thr Ser Lys Asn Thr Val Tyr Leu
 65 70 75 80
 Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys Ala
 20 85 90 95
 Arg Ser Gly Asp Thr Thr Ala Trp Gly Ala Asp Ile Trp Gly Gln Gly
 100 105 110
 Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
 115

25
 <210> 146
 <211> 120
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

30

 <220>
 <223> secuencia VH-scFv recombinante

35 <400> 146
 Gln Val Gln Leu Val Gln Thr Gly Gly Ser Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Thr Ala Ser Gly Phe Ser Leu Thr Asp Tyr
 20 25 30
 40 Tyr Tyr Met Thr Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp
 35 40 45
 Val Gly Phe Ile Asp Pro Asp Asp Pro Tyr Tyr Ala Thr Trp Ala
 50 55 60
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Thr Ser Lys Asn Thr Val Tyr
 45 65 70 75 80
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Gly Gly Asp His Asn Ser Gly Trp Gly Leu Asp Ile Trp Gly Gln
 100 105 110
 50 Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
 115 120

55 <210> 147
 <211> 119
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> secuencia VH-scFv recombinante

5 <400> 147
 Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser
 1 5 10 15
 Leu Arg Leu Ser Cys Thr Ala Ser Gly Phe Ser Leu Thr Asp Tyr Tyr
 20 25 30
 10 Tyr Met Thr Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Gly Phe Ile Asp Pro Asp Asp Pro Tyr Tyr Ala Thr Trp Ala Lys
 50 55 60
 Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Thr Ser Lys Asn Thr Val Tyr Leu
 15 65 70 75 80
 Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
 85 90 95
 Gly Gly Asp His Asn Ser Gly Trp Gly Leu Asp Ile Trp Gly Gln Gly
 100 105 110
 20 Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115

<210> 148
 <211> 120
 25 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

30 <220>
 <223> secuencia VH-scFv recombinante
 <400> 148
 Glu Gln Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 35 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Thr Ala Ser Gly Phe Ser Leu Thr Asp Tyr
 20 25 30
 Tyr Tyr Met Thr Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp
 35 40 45
 Val Gly Phe Ile Asp Pro Asp Asp Pro Tyr Tyr Ala Thr Trp Ala
 40 50 55 60
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Thr Ser Lys Asn Thr Val Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 45 Ala Gly Gly Asp His Asn Ser Gly Trp Gly Leu Asp Ile Trp Gly Gln
 100 105 110
 Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120

50 <210> 149
 <211> 120
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

55 <220>
 <223> secuencia VH-scFv recombinante

ES 2 998 307 T3

<400> 149
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15
5 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Thr Ala Ser Gly Phe Ser Leu Thr Asp Tyr
20 25 30
Tyr Tyr Met Thr Trp Val Arg Leu Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp
35 40 45
Val Gly Phe Ile Asp Pro Asp Asp Pro Tyr Tyr Ala Thr Trp Ala
10 50 55 60
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Thr Ser Lys Asn Thr Val Tyr
65 70 75 80
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95
15 Ala Gly Gly Asp His Asn Ser Gly Trp Gly Leu Asp Ile Trp Gly Gln
100 105 110
Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

20 <210> 150
<211> 120
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

25
<220>
<223> secuencia VH-scFv recombinante

<400> 150
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15
30 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Thr Ala Ser Gly Phe Ser Leu Thr Asp Tyr
20 25 30
Tyr Tyr Met Thr Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Tyr
35 40 45
Val Gly Phe Ile Asp Pro Asp Asp Pro Tyr Tyr Ala Thr Trp Ala
50 55 60
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Thr Ser Lys Asn Thr Val Tyr
65 70 75 80
40 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95
Ala Gly Gly Asp His Asn Ser Gly Trp Gly Leu Asp Ile Trp Gly Gln
100 105 110
Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
45 115 120

<210> 151
<211> 120
<212> PRT
50 <213> Secuencia artificial

<220>
<223> secuencia VH-scFv recombinante

55
<400> 151
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
105

ES 2 998 307 T3

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

<210> 152
<211> 120
<212> PRT
20 <213> Secuencia artificial

<220>
<223> secuencia VH-scFv recombinante
25
<400> 152
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Thr Ala Ser Gly Phe Ser Leu Thr Asp Tyr
30 20 25 30
Tyr Tyr Met Thr Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp
35 35 40 45
Val Gly Phe Ile Asp Pro Asp Asp Pro Tyr Tyr Ala Thr Trp Ala
50 55 60
35 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Ala Thr Ser Lys Asn Thr Val Tyr
65 70 75 80
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
40 85 90 95
Ala Gly Gly Asp His Asn Ser Gly Trp Gly Leu Asp Ile Trp Gly Gln
100 105 110
Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 153
45 <211> 120
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

50 <220>
<223> secuencia VH-scFv recombinante

<400> 153
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
55 1 5 10 15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Thr Ala Ser Gly Phe Ser Leu Thr Asp Tyr
20 25 30
106

ES 2 998 307 T3

Tyr Tyr Met Thr Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp
35 40 45
Val Gly Phe Ile Asp Pro Asp Asp Asp Pro Tyr Tyr Ala Thr Trp Ala
50 55 60
5 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Thr Ser Lys Ala Thr Val Tyr
65 70 75 80
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95
Ala Gly Gly Asp His Asn Ser Gly Trp Gly Leu Asp Ile Trp Gly Gln
10 100 105 110
Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 154
15 <211> 120
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

20 <220>
<223> secuencia VH-scFv recombinante

<400> 154
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
25 1 5 10 15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Thr Ala Ser Gly Phe Ser Leu Thr Asp Tyr
20 25 30
Tyr Tyr Met Thr Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp
35 40 45
30 Val Gly Phe Ile Asp Pro Asp Asp Asp Pro Tyr Tyr Ala Thr Trp Ala
50 55 60
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Thr Ser Lys Asn Thr Val Tyr
65 70 75 80
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Phe Cys
35 85 90 95
Ala Gly Gly Asp His Asn Ser Gly Trp Gly Leu Asp Ile Trp Gly Gln
100 105 110
Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

40 <210> 155
<211> 119
<212> PRT
<213> Secuencia artificial
45

<220>
<223> secuencia VH-scFv recombinante

50 <400> 155
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Thr Ala Ser Gly Phe Ser Leu Thr Asp Tyr
20 25 30
55 Tyr Tyr Met Thr Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp
35 40 45
Val Gly Phe Ile Asp Pro Asp Asp Asp Pro Tyr Tyr Ala Thr Trp Ala
107

ES 2 998 307 T3

50 55 60
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Thr Ser Lys Asn Thr Val Tyr Leu
65 70 75 80
Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
5 85 90 95
Gly Gly Asp His Asn Ser Gly Trp Gly Leu Asp Ile Trp Gly Gln Gly
100 105 110
Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115
10 <210> 156
<211> 119
<212> PRT
<213> Secuencia artificial
15
<220>
<223> secuencia VH-scFv recombinante
20 <400> 156
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Thr Ala Ser Gly Phe Ser Leu Thr Asp Tyr
20 25 30
25 Tyr Tyr Met Thr Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp
35 40 45
Val Gly Phe Ile Asp Pro Asp Asp Pro Tyr Tyr Ala Thr Trp Ala
50 55 60
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Thr Ser Lys Thr Val Tyr Leu
30 65 70 75 80
Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
85 90 95
Gly Gly Asp His Asn Ser Gly Trp Gly Leu Asp Ile Trp Gly Gln Gly
100 105 110
35 Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115
40 <210> 157
<211> 120
<212> PRT
<213> Secuencia artificial
45
<220>
<223> secuencia VH-scFv recombinante
50 <400> 157
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15
55 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Thr Ala Ser Gly Phe Ser Leu Thr Asp Tyr
20 25 30
Tyr Tyr Met Thr Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp
35 40 45
Val Gly Phe Ile Asp Pro Asp Asp Pro Tyr Tyr Ala Thr Trp Ala
50 55 60
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Val Tyr
65 70 75 80
 108

ES 2 998 307 T3

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95
Ala Gly Gly Asp His Asn Ser Gly Trp Gly Leu Asp Ile Trp Gly Gln
100 105 110
5 Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 158
<211> 120
10 <212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
15 <223> secuencia VH-scFv recombinante

<400> 158
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15
20 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Thr Ala Ser Gly Phe Ser Leu Thr Asp Tyr
20 25 30
Tyr Tyr Met Thr Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp
35 40 45
Val Gly Phe Ile Asp Pro Asp Asp Pro Tyr Tyr Ala Thr Trp Ala
25 50 55 60
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Thr Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95
30 Ala Gly Gly Asp His Asn Ser Gly Trp Gly Leu Asp Ile Trp Gly Gln
100 105 110
Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

35 <210> 159
<211> 120
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

40 <220>
<223> secuencia VH-scFv recombinante

<400> 159
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15
45 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Thr Ala Ser Gly Phe Ser Leu Thr Asp Tyr
20 25 30
Tyr Tyr Met Thr Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp
50 35 40 45
Val Gly Phe Ile Asp Pro Asp Asp Pro Tyr Tyr Ala Thr Trp Ala
50 55 60
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Thr Ser Lys Asn Thr Ala Tyr
65 70 75 80
55 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95
Ala Gly Gly Asp His Asn Ser Gly Trp Gly Leu Asp Ile Trp Gly Gln
109

ES 2 998 307 T3

	100	105	110
	Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser		
	115	120	
5	<210> 160		
	<211> 120		
	<212> PRT		
	<213> Secuencia artificial		
10			
	<220>		
	<223> secuencia VH-scFv recombinante		
	<400> 160		
15	Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Ser Val Gln Pro Gly Gly		
	1	5	10
	Ser Leu Arg Leu Ser Cys Thr Ala Ser Gly Phe Ser Leu Thr Asp Tyr		
	20	25	30
20	Tyr Tyr Met Thr Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp		
	35	40	45
	Val Gly Phe Ile Asp Pro Asp Asp Asp Pro Tyr Tyr Ala Thr Trp Ala		
	50	55	60
	Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Val Tyr		
	65	70	75
25	Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys		
	85	90	95
	Ala Gly Gly Asp His Asn Ser Gly Trp Gly Leu Asp Ile Trp Gly Gln		
	100	105	110
	Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser		
30	115	120	
	<210> 161		
	<211> 120		
	<212> PRT		
35	<213> Secuencia artificial		
	<220>		
	<223> secuencia VH-scFv recombinante		
40			
	<400> 161		
	Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Ser Val Gln Pro Gly Gly		
	1	5	10
	Ser Leu Arg Leu Ser Cys Thr Ala Ser Gly Phe Ser Leu Thr Asp Tyr		
	45	20	25
	Tyr Tyr Met Thr Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp		
	35	40	45
	Val Gly Phe Ile Asp Pro Asp Asp Asp Pro Tyr Tyr Ala Thr Trp Ala		
	50	55	60
50	Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Thr Ser Lys Asn Thr Leu Tyr		
	65	70	75
	Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys		
	85	90	95
	Ala Gly Gly Asp His Asn Ser Gly Trp Gly Leu Asp Ile Trp Gly Gln		
55	100	105	110
	Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser		
	115	120	

```

<210> 162
<211> 120
<212> PRT
5 <213> Secuencia artificial

<220>
<223> secuencia VH-scFv recombinante
10
<400> 162
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Ser Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Thr Ala Ser Gly Phe Ser Leu Thr Asp Tyr
15 20 25 30
Tyr Tyr Met Thr Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp
35 40 45
Val Gly Phe Ile Asp Pro Asp Asp Pro Tyr Tyr Ala Thr Trp Ala
50 55 60
20 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Thr Ser Lys Asn Thr Ala Tyr
65 70 75 80
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys
85 90 95
Ala Gly Gly Asp His Asn Ser Gly Trp Gly Leu Asp Ile Trp Gly Gln
25 100 105 110
Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 163
30 <211> 120
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

35 <220>
<223> secuencia VH-scFv recombinante

<400> 163
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
40 1 5 10 15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Thr Ala Ser Gly Phe Ser Leu Thr Asp Tyr
20 25 30
Tyr Tyr Met Thr Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp
35 40 45
45 Val Gly Phe Ile Asp Pro Asp Asp Pro Tyr Tyr Ala Thr Trp Ala
50 55 60
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Ala Tyr
65 70 75 80
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
50 85 90 95
Ala Gly Gly Asp His Asn Ser Gly Trp Gly Leu Asp Ile Trp Gly Gln
100 105 110
Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

55 <210> 164
<211> 120

```

<212> PRT
 <213> Secuencia artificial

5 <220>
 <223> secuencia VH-scFv recombinante
 <400> 164
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Thr Ala Ser Gly Phe Ser Leu Thr Asp Tyr
 20 25 30
 Tyr Tyr Met Thr Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp
 35 40 45
 15 Val Gly Phe Ile Asp Pro Asp Asp Pro Tyr Tyr Ala Thr Trp Ala
 50 55 60
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 20 85 90 95
 Ala Gly Gly Asp His Asn Ser Gly Trp Gly Leu Asp Ile Trp Gly Gln
 100 105 110
 Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120
 25

<210> 165
 <211> 120
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 30

<220>
 <223> secuencia VH-scFv recombinante
 35 <400> 165
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Ser Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Thr Ala Ser Gly Phe Ser Leu Thr Asp Tyr
 20 25 30
 Tyr Tyr Met Thr Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp
 40 35 40 45
 Val Gly Phe Ile Asp Pro Asp Asp Pro Tyr Tyr Ala Thr Trp Ala
 50 55 60
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Ala Tyr
 45 65 70 75 80
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Gly Gly Asp His Asn Ser Gly Trp Gly Leu Asp Ile Trp Gly Gln
 100 105 110
 50 Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 166
 <211> 120
 55 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
<223> secuencia VH-scFv recombinante

```

5 <400> 166
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Ser Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Thr Ala Ser Gly Phe Ser Leu Thr Asp Tyr
20 25 30
10 Tyr Tyr Met Thr Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp
35 40 45
Val Gly Phe Ile Asp Pro Asp Asp Asp Pro Tyr Tyr Ala Thr Trp Ala
50 55 60
15 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys
85 90 95
Ala Gly Gly Asp His Asn Ser Gly Trp Gly Leu Asp Ile Trp Gly Gln
100 105 110
20 Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115 120

```

<210> 167
<211> 231
25 <212> PRT
<213> Artificial

30 <223> secuencia aceptora VL-scFv recombinante

<220>
<221> VARIANTE
<222> (24)..(73)
35 <223> Xaa can be any naturally occurring amino acid. At least three and up to 50
amino acids can be present

<220>
<221> VARIANTE
40 <222> (89)..(138)
<223> Xaa can be any naturally occurring amino acid. At least three and up to 50
amino acids can be present

45 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> (171)..(220)
 <223> Xaa can be any naturally occurring amino acid. At least three and up to 50
 amino acids can be present

```

50 <400> 167
      Glu Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ser Thr Leu Ser Ala Ser Val Gly
      1           5                  10                   15
      Asp Arg Val Ile Ile Thr Cys Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
      20          25                  30
55 Xaa Xaa
      35          40                  45
      Xaa Xaa
      50          55                  60

```

50 55 60
 Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly
 65 70 75 80
 Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
 5 85 90 95
 Xaa
 100 105 110
 Xaa
 115 120 125
 10 Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Gly Val Pro Ser Arg Phe
 130 135 140
 Ser Gly Ser Gly Ser Gly Ala Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu
 145 150 155 160
 Gln Pro Asp Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
 15 165 170 175
 Xaa
 180 185 190
 Xaa
 195 200 205
 20 Xaa Phe Gly Gln Gly
 210 215 220
 Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly
 225 230

 25 <210> 168
 <211> 231
 <212> PRT
 <213> Artificial

 30 <220>
 <223> secuencia aceptora VL-scFv recombinante

 <220>
 35 <221> VARIANTE
 <222> (24)..(73)
 <223> Xaa can be any naturally occurring amino acid. At least three and up to 50
 amino acids can be present

 40 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> (89)..(138)
 <223> Xaa can be any naturally occurring amino acid. At least three and up to 50
 amino acids can be present

 45 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> (171)..(220)
 <223> Xaa can be any naturally occurring amino acid. At least three and up to 50
 amino acids can be present

 50 <400> 168
 Glu Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ser Thr Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15
 55 Asp Arg Val Ile Ile Thr Cys Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
 20 25 30
 Xaa Xaa

ES 2 998 307 T3

35 40 45
Xaa
50 55 60
Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly
5 70 75 80
Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
85 90 95
Xaa
100 105 110
10 Xaa
115 120 125
Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Gly Val Pro Ser Arg Phe
130 135 140
Ser Gly Ser Gly Ser Gly Ala Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu
15 145 150 155 160
Gln Pro Asp Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
165 170 175
Xaa
180 185 190
20 Xaa
195 200 205
Xaa Phe Gly Gln Gly
210 215 220
Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly
25 225 230

<210> 169
<211> 232
<212> PRT
30 <213> Artificial

35 <220>
<223> secuencia aceptora VH-scFv recombinante

40 <220>
<221> VARIANTE
<222> (26)..(75)
<223> Xaa can be any naturally occurring amino acid. At least three and up to 50
45 amino acids can be present

50 <220>
<221> VARIANTE
<222> (90)..(139)
<223> Xaa can be any naturally occurring amino acid. At least three and up to 50
55 amino acids can be present

55 <220>
<221> VARIANTE
<222> (172)..(221)
<223> Xaa can be any naturally occurring amino acid. At least three and up to 50
amino acids can be present

<400> 169
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
115

	20	25	30
5	Xaa		
	35	40	45
	Xaa		
	50	55	60
	Xaa Trp Val Arg Gln Ala		
	65	70	75
	Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ser Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa		
	85	90	95
10	Xaa		
	100	105	110
	Xaa		
	115	120	125
15	Xaa Arg Phe Thr Ile Ser		
	130	135	140
	Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg		
	145	150	155
	Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Lys Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa		
	165	170	175
20	Xaa		
	180	185	190
	Xaa		
	195	200	205
25	Xaa Trp Gly Gln		
	210	215	220
	Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser		
	225	230	
	 <210> 170		
30	<211> 231		
	<212> PRT		
	<213> Artificial		
	 <220>		
35	<223> secuencia aceptora VH-scFv recombinante		
	 <220>		
	<221> VARIANTE		
40	<222> (26)..(75)		
	<223> Xaa can be any naturally occurring amino acid. At least three and up to 50 amino acids can be present		
	 <220>		
45	<221> VARIANTE		
	<222> (90)..(139)		
	<223> Xaa can be any naturally occurring amino acid. At least three and up to 50 amino acids can be present		
	 <220>		
50	<221> VARIANTE		
	<222> (172)..(221)		
	<223> Xaa can be any naturally occurring amino acid. At least three and up to 50 amino acids can be present		
55	 <400> 170		
	Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly		

1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Thr Ala Ser Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
 20 25 30
 Xaa
 35 40 45
 Xaa
 50 55 60
 Xaa Trp Val Arg Gln Ala
 65 70 75 80
 10 Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Gly Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
 85 90 95
 Xaa
 100 105 110
 Xaa
 115 120 125
 Xaa Arg Phe Thr Ile Ser
 130 135 140
 Arg Asp Thr Ser Lys Asn Thr Val Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg
 145 150 155 160
 20 Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Xaa Xaa Xaa Xaa
 165 170 175
 Xaa
 180 185 190
 Xaa
 195 200 205
 25 Xaa Trp Gly Gln
 210 215 220
 Gly Thr Leu Val Thr Val Ser
 225 230
 30
 <210> 171
 <211> 232
 <212> PRT
 <213> Artificial
 35
 <220>
 <223> secuencia aceptora VH-scFv recombinante
 40 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> (26)..(75)
 <223> Xaa can be any naturally occurring amino acid. At least three and up to 50
 amino acids can be present
 45
 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> (90)..(139)
 <223> Xaa can be any naturally occurring amino acid. At least three and up to 50
 amino acids can be present
 50
 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> (172)..(221)
 55 <223> Xaa can be any naturally occurring amino acid. At least three and up to 50
 amino acids can be present

<400> 171
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Thr Val Ser Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
 5 20 25 30
 Xaa
 35 40 45
 Xaa
 50 55 60
 10 Xaa Trp Val Arg Gln Ala
 65 70 75 80
 Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Gly Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
 85 90 95
 Xaa
 15 100 105 110
 Xaa
 115 120 125
 Xaa Arg Phe Thr Ile Ser
 130 135 140
 20 Lys Asp Thr Ser Lys Asn Thr Val Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg
 145 150 155 160
 Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
 165 170 175
 Xaa
 25 180 185 190
 Xaa
 195 200 205
 Xaa Trp Gly Gln
 210 215 220
 30 Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 225 230

<210> 172
 <211> 483
 35 <212> PRT
 <213> Artificial

40 <220>
 <223> secuencia aceptora -scFv recombinante

<220>
 <221> VARIANTE
 <222> (24)..(73)

45 <223> Xaa can be any naturally occurring amino acid. At least three and up to 50
 amino acids can be present

<220>
 <221> VARIANTE
 50 <222> (89)..(138)
 <223> Xaa can be any naturally occurring amino acid. At least three and up to 50
 amino acids can be present

55 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> (171)..(220)

<223> Xaa can be any naturally occurring amino acid. At least three and up to 50 amino acids can be present

5 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> 277..326
 <223> Xaa can be any naturally occurring amino acid. At least three and up to 50
 amino acids can be present

10 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> (341)..(390)
 <223> Xaa can be any naturally occurring amino acid. At least three and up to 50
 amino acids can be present

15 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> (423)..(472)
 <223> Xaa can be any naturally occurring amino acid. At least three and up to 50
 amino acids can be present

20 <400> 172
 Glu Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ser Thr Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15
 25 Asp Arg Val Ile Ile Thr Cys Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
 20 25 30
 Xaa
 35 40 45
 Xaa
 50 55 60
 Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly
 65 70 75 80
 Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
 85 90 95
 30 Xaa
 100 105 110
 Xaa
 115 120 125
 Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Gly Val Pro Ser Arg Phe
 40 130 135 140
 Ser Gly Ser Gly Ser Gly Ala Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu
 145 150 155 160
 Gln Pro Asp Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
 165 170 175
 45 Xaa
 180 185 190
 Xaa
 195 200 205
 Xaa Phe Gly Gln Gly
 50 210 215 220
 Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly
 225 230 235 240
 Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Glu Val Gln Leu Val
 245 250 255
 55 Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser
 260 265 270
 Cys Ala Ala Ser Xaa
 119

	275	280	285
	Xaa		
	290	295	300
5	Xaa		
	305	310	315
	Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu		
	325	330	335
	Glu Trp Val Ser Xaa		
10	340	345	350
	Xaa		
	355	360	365
	Xaa		
	370	375	380
15	Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys		
	385	390	395
	Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala		
	405	410	415
	Val Tyr Tyr Cys Ala Lys Xaa		
	420	425	430
20	Xaa		
	435	440	445
	Xaa		
	450	455	460
25	Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr		
	465	470	475
	Val Ser Ser		480

30 <210> 173
 <211> 483
 <212> PRT
 <213> Artificial

35 <220>
 <223> secuencia aceptora -scFv recombinante

40 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> (24)..(73)
 <223> Xaa can be any naturally occurring amino acid. At least three and up to 50 amino acids can be present

45 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> (89)..(138)
 <223> Xaa can be any naturally occurring amino acid. At least three and up to 50 amino acids can be present

50 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> (171)..(220)
 <223> Xaa can be any naturally occurring amino acid. At least three and up to 50 amino acids can be present

55 <220>
 <221> VARIANTE

<222> (277)...(326)

<223> Xaa can be any naturally occurring amino acid. At least three and up to 50 amino acids can be present

5 <220>
<221> VARIANTE
<222> (341)..(390)
<223> Xaa can be any naturally occurring amino acid. At least three and up to 50
amino acids can be present

10 <220>
<221> VARIANTE
<222> (423)..(472)
<223> Xaa can be any naturally occurring amino acid. At least three and up to 50
15 amino acids can be present

<400> 173

20 Asp Arg Val Ile Ile Thr Cys Xaa Xaa

35 40 45
 Xaa
 25 50 55 60

50 55 60
Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly
65 70 75 80

Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
 85 90 95

Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu
145 150 155 160

Gln Pro Asp Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
165 170 175

40 Xaa
 180 185 190
 Xaa Xaa

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
 195 200 205
 Xaa Dha Gly Gly Gly

Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly
225 230 235 240
Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Glu Val Gln Leu Val

50 Glu Ser Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser

275	280	285
Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa	Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa	Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu
 325 330 335
 Glu Trp Val Gly Xaa
 340 345 350
 5 Xaa
 355 360 365
 Xaa
 370 375 380
 Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Thr Ser Lys
 10 385 390 395 400
 Asn Thr Val Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala
 405 410 415
 Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
 420 425 430
 15 Xaa
 435 440 445
 Xaa
 450 455 460
 Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr
 20 465 470 475 480
 Val Ser Ser

25 <210> 174
 <211> 483
 <212> PRT
 <213> Artificial

30 <220>
 <223> secuencia aceptora -scFv recombinante

35 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> (24)..(73)
 <223> Xaa can be any naturally occurring amino acid. At least three and up to 50
 amino acids can be present

40 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> (89)..(138)
 <223> Xaa can be any naturally occurring amino acid. At least three and up to 50
 amino acids can be present

45 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> (171)..(220)
 <223> Xaa can be any naturally occurring amino acid. At least three and up to 50
 amino acids can be present

50 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> (277)..(326)
 <223> Xaa can be any naturally occurring amino acid. At least three and up to 50
 amino acids can be present

55 <220>

ES 2 998 307 T3

	355	360	365
5	Xaa		
	370	375	380
	Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Arg Phe Thr Ile Ser Lys Asp Thr Ser Lys		
5	385	390	395
	Asn Thr Val Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala		
	405	410	415
	Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Xaa		
10	420	425	430
	Xaa		
	435	440	445
	Xaa		
15	450	455	460
	Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr		
	465	470	475
	Val Ser Ser		

20 <210> 175
 <211> 248
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

25 <220>
 <223> scFv recombinante

	<400> 175		
30	Glu Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ser Thr Leu Ser Ala Ser Val Gly		
	1	5	10
	Asp Arg Val Ile Ile Thr Cys Gln Ala Ser Gln Ser Ile Gly Ser Ser		
	20	25	30
	Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile		
	35	40	45
35	Tyr Thr Ala Ala Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly		
	50	55	60
	Ser Arg Ser Gly Ala Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro		
	65	70	75
	Asp Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Asn Phe Ala Thr Ser Asp Thr		
40	85	90	95
	Val Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly Gly Gly		
	100	105	110
	Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly		
	115	120	125
45	Ser Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly		
	130	135	140
	Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Lys Ala Ser Gly Phe Ser Leu Asn Thr		
	145	150	155
	Asn Tyr Trp Met Cys Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Leu Glu		
50	165	170	175
	Trp Val Gly Cys Met Tyr Thr Gly Ser Tyr Asn Arg Ala Tyr Tyr Ala		
	180	185	190
	Ser Trp Ala Lys Gly Arg Phe Thr Ser Ser Lys Asp Thr Ser Lys Asn		
	195	200	205
55	Thr Val Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val		
	210	215	220
	Tyr Tyr Cys Ala Lys Gly Ser Asn Trp Tyr Ser Asp Leu Trp Gly Gln		
	124		

	225	230	235	240														
	Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser										
									245									
5	<210>	176																
	<211>	251																
	<212>	PRT																
	<213>	Secuencia artificial																
10																		
	<220>																	
	<223>	scFv recombinante																
	<400>	176																
15	Glu	Ile	Val	Met	Thr	Gln	Ser	Pro	Ser	Thr	Leu	Ser	Ala	Ser	Val	Gly		
	1					5					10					15		
	Asp	Arg	Val	Ile	Ile	Thr	Cys	Gln	Ala	Ser	Gln	Ser	Ile	Asn	Ile	Trp		
											20			25		30		
20	Leu	Ser	Trp	Tyr	Gln	Gln	Lys	Pro	Gly	Lys	Ala	Pro	Lys	Leu	Leu	Ile		
											35			40		45		
	Tyr	Arg	Ala	Ser	Thr	Leu	Ala	Ser	Gly	Val	Pro	Ser	Arg	Phe	Ser	Gly		
											50			55		60		
	Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Glu	Phe	Thr	Leu	Thr	Ile	Ser	Ser	Leu	Gln	Pro		
											65			70		75		80
25	Asp	Asp	Phe	Ala	Thr	Tyr	Tyr	Cys	Gln	Ala	Asn	Tyr	Ala	Tyr	Ser	Ala		
											85			90		95		
	Gly	Tyr	Gly	Ala	Ala	Phe	Gly	Gln	Gly	Thr	Lys	Leu	Thr	Val	Leu	Gly		
											100			105		110		
30	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly			
											115			120		125		
	Gly	Gly	Gly	Ser	Glu	Val	Gln	Leu	Val	Glu	Ser	Gly	Gly	Gly	Leu	Val		
											130			135		140		
	Gln	Pro	Gly	Gly	Ser	Leu	Arg	Leu	Ser	Cys	Thr	Val	Ser	Gly	Phe	Ser		
											145			150		155		160
35	Leu	Asn	Thr	Tyr	Tyr	Met	Asn	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Lys	Gly		
											165			170		175		
	Leu	Glu	Trp	Val	Gly	Ile	Ile	Ala	Pro	Asp	Asp	Thr	Thr	Tyr	Tyr	Ala		
											180			185		190		
40	Ser	Trp	Ala	Lys	Ser	Arg	Ser	Thr	Ile	Ser	Arg	Asp	Thr	Ser	Lys	Asn		
											195			200		205		
	Thr	Val	Tyr	Leu	Gln	Met	Asn	Ser	Leu	Arg	Ala	Glu	Asp	Thr	Ala	Val		
											210			215		220		
	Tyr	Tyr	Cys	Ala	Arg	Ser	Gly	Asp	Thr	Thr	Ala	Trp	Gly	Ala	Asp	Ile		
											225			230		235		240
45	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser							
											245			250				
50	<210>	177																
	<211>	250																
	<212>	PRT																
	<213>	Secuencia artificial																
55																		
	<220>																	
	<223>	scFv recombinante																
	<400>	177																

ES 2 998 307 T3

Glu Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ser Thr Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15
 Asp Arg Val Ile Ile Thr Cys Gln Ala Asp Gln Ser Ile Tyr Ile Trp
 20 25 30
 5 Leu Ser Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
 35 40 45
 Tyr Lys Ala Ser Thr Leu Glu Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60
 Ser Gly Ser Gly Ala Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 10 65 70 75 80
 Asp Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Asn Asn Ala His Tyr Ser Thr
 85 90 95
 Asn Gly Gly Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly Gly
 100 105 110
 15 Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly
 115 120 125
 Gly Gly Ser Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Leu Val Gln
 130 135 140
 Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Ser Leu
 20 145 150 155 160
 Ser Asp Tyr Tyr Met Cys Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu
 165 170 175
 Glu Trp Val Ser Cys Leu Asp Tyr Phe Gly Ser Thr Asp Asp Ala Ser
 180 185 190
 25 Trp Ala Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr
 195 200 205
 Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr
 210 215 220
 Tyr Cys Ala Lys Thr Asp Asp Ser Arg Gly Trp Gly Leu Asn Ile Trp
 30 225 230 235 240
 Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 245 250

<210> 178
 35 <211> 251
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

40 <220>
 <223> scFv recombinante

<400> 178
 Glu Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ser Thr Leu Ser Ala Ser Val Gly
 45 1 5 10 15
 Asp Arg Val Ile Ile Thr Cys Gln Ala Ser Glu Ile Ile His Ser Trp
 20 25 30
 Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
 35 40 45
 50 Tyr Leu Ala Ser Thr Leu Ala Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 55 55 60
 Ser Gly Ser Gly Ala Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80
 Asp Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Asn Val Tyr Leu Ala Ser Thr
 55 85 90 95
 Asn Gly Ala Asn Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly Gly
 100 105 110

ES 2 998 307 T3

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly
115 120 125
Gly Gly Ser Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln
130 135 140
5 Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Ser Leu
145 150 155 160
Thr Asp Tyr Tyr Met Thr Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly
165 170 175
Leu Glu Trp Val Ser Phe Ile Asp Pro Asp Asp Asp Pro Tyr Tyr Ala
10 180 185 190
Thr Trp Ala Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn
195 200 205
Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val
210 215 220
15 Tyr Tyr Cys Ala Lys Gly Asp His Asn Ser Gly Trp Gly Leu Asp Ile
225 230 235 240
Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
245 250

20 <210> 179
<211> 251
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

25
<220>
<223> scFv recombinante

<400> 179
30 Glu Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ser Thr Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15
Asp Arg Val Ile Ile Thr Cys Gln Ala Ser Glu Ile Ile His Ser Trp
20 25 30
Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
35 35 40 45
Tyr Leu Ala Ser Thr Leu Ala Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60
Ser Gly Ser Gly Thr Gln Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80
40 Asp Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Asn Val Tyr Leu Ala Ser Thr
85 90 95
Asn Gly Ala Asn Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly Gly
100 105 110
Gly Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly
45 115 120 125
Gly Gly Ser Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Leu Val Gln
130 135 140
Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Thr Ala Ser Gly Phe Ser Leu
145 150 155 160
50 Thr Asp Tyr Tyr Met Thr Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly
165 170 175
Leu Glu Trp Val Gly Phe Ile Asp Pro Asp Asp Asp Pro Tyr Tyr Ala
180 185 190
Thr Trp Ala Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Thr Ser Lys Asn
55 195 200 205
Thr Val Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val
210 215 220
127

Tyr Tyr Cys Ala Gly Gly Asp His Asn Ser Gly Trp Gly Leu Asp Ile
 225 230 235 240
 Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 245 250

5 <210> 180
 <211> 251
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> scFv recombinante

15 <400> 180
 Glu Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ser Thr Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15
 Asp Arg Val Ile Ile Thr Cys Gln Ala Ser Glu Ile Ile His Ser Trp
 20 25 30
 Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
 35 40 45
 Tyr Leu Ala Ser Thr Leu Ala Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60
 Ser Gly Ser Gly Ala Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 25 65 70 75 80
 Asp Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Asn Val Tyr Leu Ala Ser Thr
 85 90 95
 Asn Gly Ala Asn Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly Gly
 100 105 110
 30 Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly
 115 120 125
 Gly Gly Ser Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Leu Val Gln
 130 135 140
 Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Thr Ala Ser Gly Phe Ser Leu
 35 145 150 155 160
 Thr Asp Tyr Tyr Met Thr Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly
 165 170 175
 Leu Glu Trp Val Gly Phe Ile Asp Pro Asp Asp Pro Tyr Tyr Ala
 180 185 190
 40 Thr Trp Ala Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Thr Ser Lys Asn
 195 200 205
 Thr Val Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val
 210 215 220
 Tyr Tyr Cys Ala Gly Gly Asp His Asn Ser Gly Trp Gly Leu Asp Ile
 45 225 230 235 240
 Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 245 250

50 <210> 181
 <211> 20
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

55 <220>
 <223> synthetic linker sequence

<400> 181
Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly
1 5 10 15
Gly Gly Gly Ser
5 20

<210> 182
<211> 5
<212> PRT
10 <213> Secuencia artificial

<220>
<223> péptido sintético
15

<400> 182
Gly Gly Gly Gly Ser
1 5

20 <210> 183
<211> 13
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

25 <220>
<223> péptido sintético

<400> 183
30 Lys Phe Met Asp Val Tyr Gln Arg Ser Tyr Cys His Pro
1 5 10

<210> 184
<211> 11
35 <212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
40 <223> synthetic peptide; Keyhole Limpet Hemocyanin (KLH) coupled to the C-terminal

<400> 184
Lys Phe Met Asp Val Tyr Gln Arg Ser Tyr Cys
1 5 10

REIVINDICACIONES

- 5 1. Una inmunoglobulina o un fragmento de la misma, que comprende una cadena pesada variable (VH) y una cadena ligera variable (VL), en donde la cadena pesada variable (VH) comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 164; y la cadena pesada variable (VL) comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 87.
- 10 2. La inmunoglobulina o fragmento de la misma según la reivindicación 1, en donde la inmunoglobulina o fragmento de la misma es un scFv, un fragmento Fab, un fragmento Fab' o un fragmento F(ab')₂.
- 15 3. La inmunoglobulina o fragmento de la misma según la reivindicación 1 o 2, en donde la cadena ligera variable de la inmunoglobulina o fragmento de la misma tiene un residuo de metionina aminoterminal en la proteína final derivado del codón iniciador.
- 20 4. La inmunoglobulina o fragmento de la misma según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en donde la inmunoglobulina o fragmento de la misma es un scFv, y la cadena pesada variable y la cadena ligera variable están unidas por la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 181.
- 25 5. Una composición farmacéutica que comprende la inmunoglobulina o fragmento de la misma según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4.
- 30 6. La composición farmacéutica de la reivindicación 5, para su uso en el tratamiento de una enfermedad mediada por VEGF.
- 35 7. Uso de la composición farmacéutica de la reivindicación 5, para la producción de un medicamento para el tratamiento de una enfermedad mediada por VEGF humano.
- 40 8. La composición farmacéutica para el uso según la reivindicación 6, o el uso según la reivindicación 7, en donde la enfermedad mediada por VEGF se selecciona del grupo que consiste en degeneración macular senil, glaucoma neovascular, retinopatía diabética y retinopatía de la prematuridad.
- 45 9. La composición farmacéutica para el uso según la reivindicación 6, o el uso según la reivindicación 7, en donde la enfermedad mediada por VEGF se selecciona del grupo que consiste en fibroplasia retrolenticular, carcinomas de mama, carcinomas de pulmón, carcinomas gástricos, carcinomas esofágicos, carcinomas colorrectales, carcinomas hepáticos, carcinomas ováricos, sarcomas, arrenoblastomas, carcinomas cervicouterinos, carcinoma endometrial, hiperplasia endometrial, endometriosis, fibrosarcomas, coriocarcinoma, cáncer de cabeza y cuello, carcinoma nasofaríngeo, carcinomas laríngeos, hepatoblastoma, sarcoma de Kaposi, melanoma, carcinomas de piel, hemangioma, hemangioma cavernoso, hemangioblastoma, carcinomas pancreáticos, retinoblastoma, astrocitoma, glioblastoma, schwannoma, oligodendroglioma, meduloblastoma, neuroblastomas, rhabdomiosarcoma, sarcoma osteogénico, leiomiosarcomas, carcinomas de las vías urinarias, carcinomas de tiroides, tumor de Wilms, carcinoma de células renales, carcinoma prostático, proliferación vascular anómala asociada con facomatosis, edema (tal como el asociado con tumores cerebrales), síndrome de Meigs, artritis reumatoide, psoriasis y ateroesclerosis.
- 50 10. La composición farmacéutica para el uso según una cualquiera de las reivindicaciones 6, 8 y 9, o para el uso según una cualquiera de las reivindicaciones 7 a 9, en donde la inmunoglobulina o fragmento de la misma se formula para administración tópica, intraocular, oral, nasal, rectal o parenteral.
- 55 11. Un kit para su uso en un método de diagnóstico de una enfermedad mediada por VEGF, comprendiendo el kit la inmunoglobulina o fragmento de la misma según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, o la composición farmacéutica de la reivindicación 5.

DIBUJOS

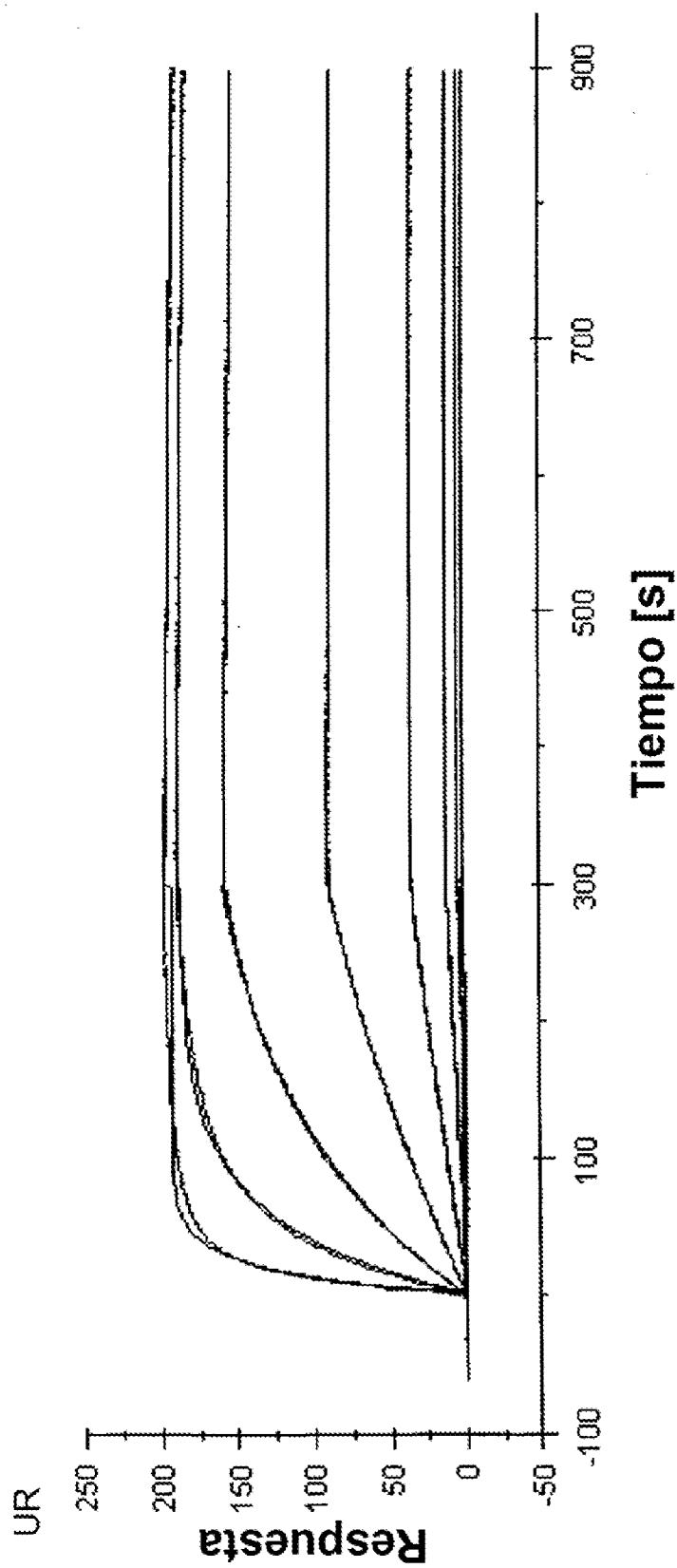


Fig. 1a

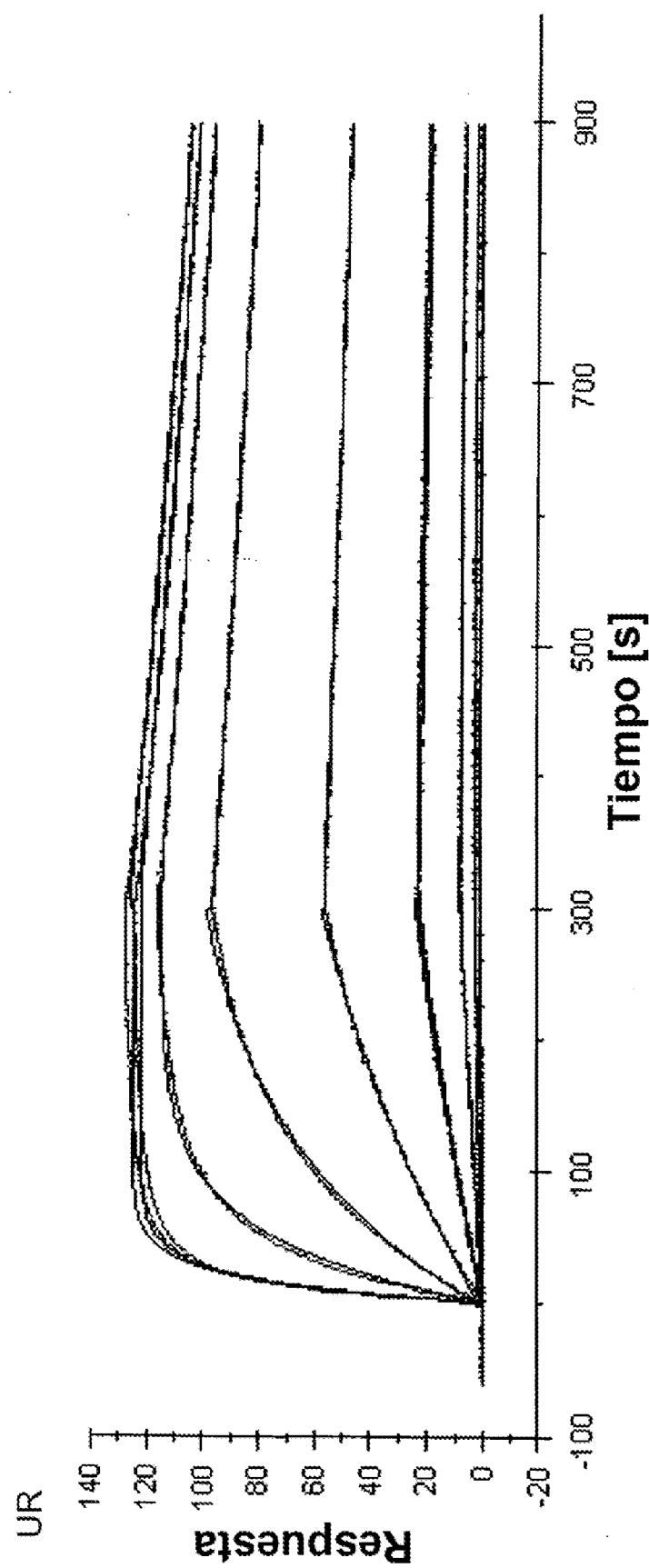
Fig. 1b

Fig. 2a

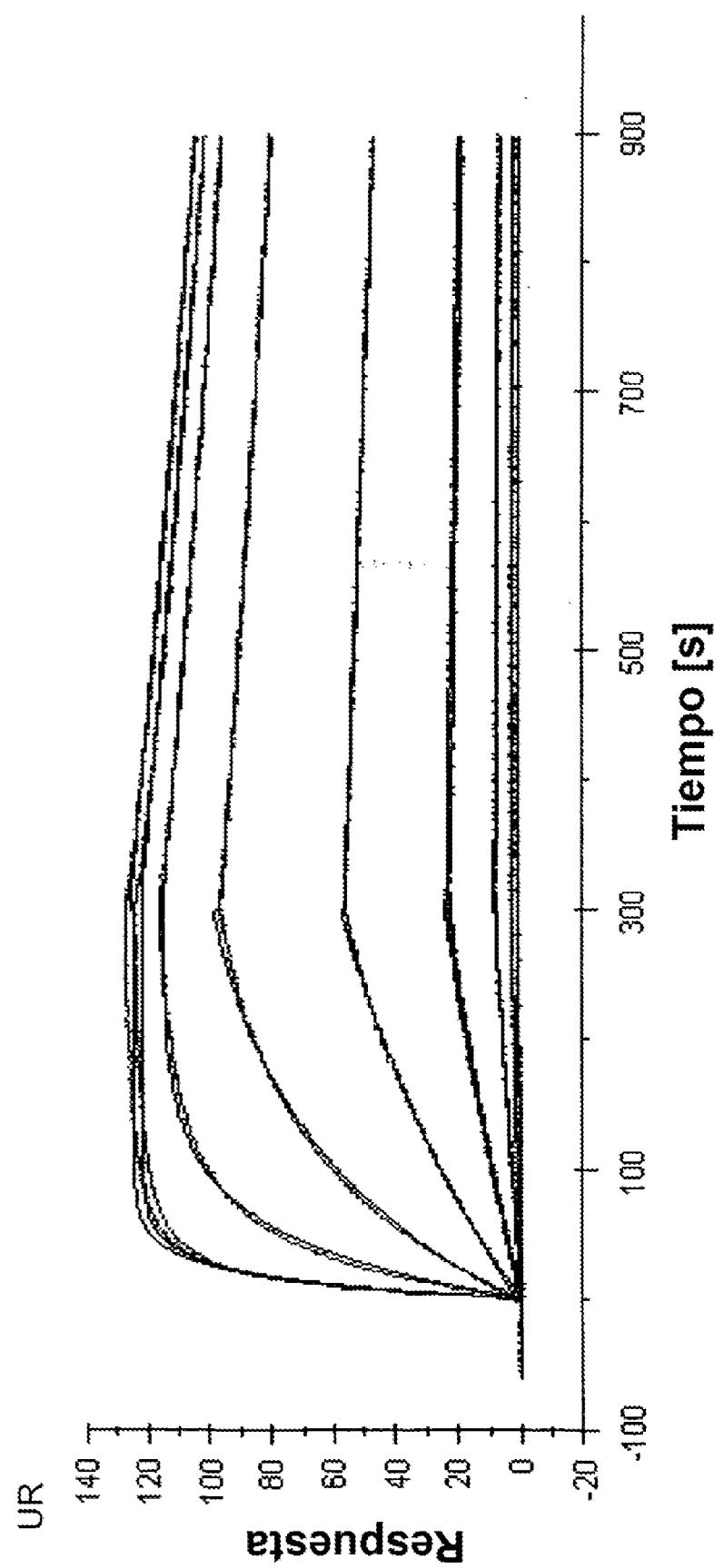


Fig. 2b

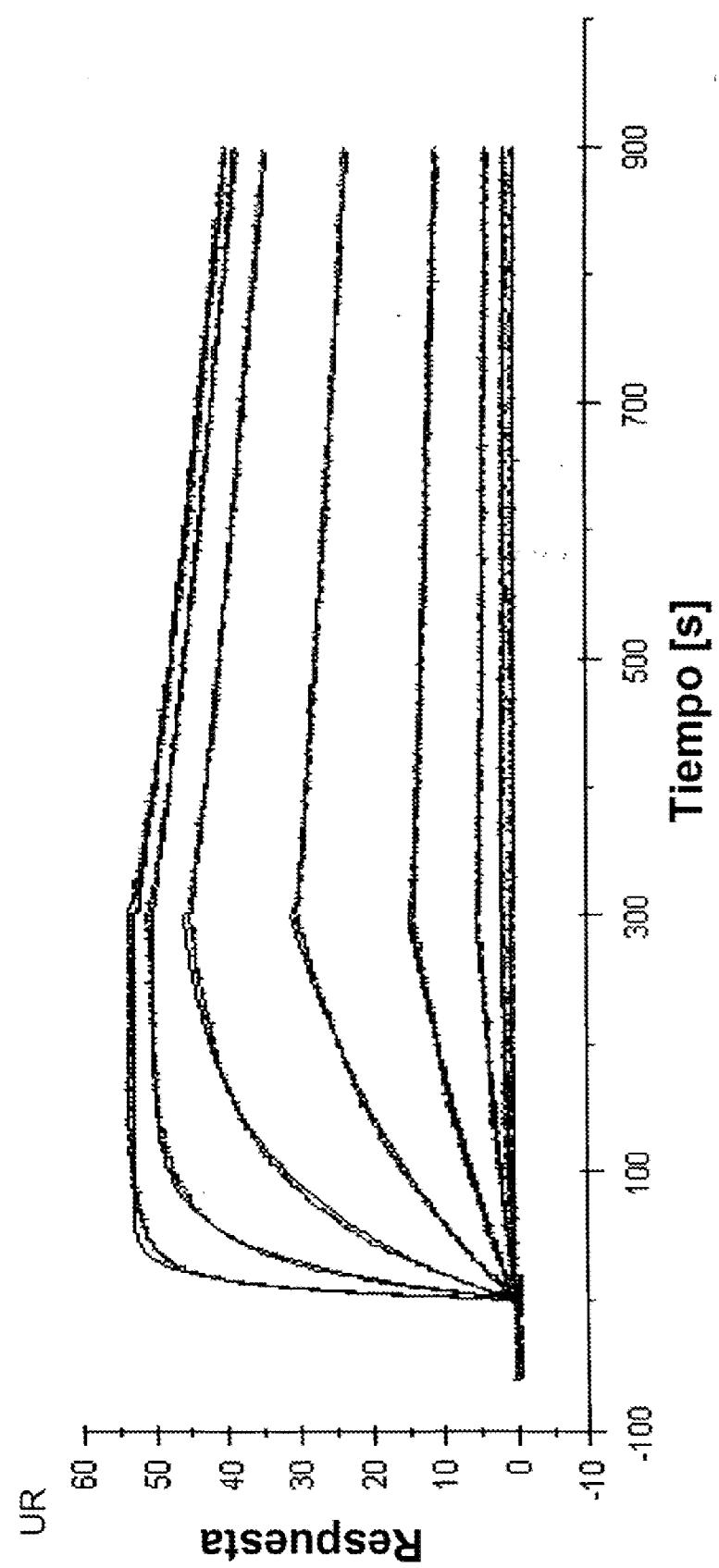


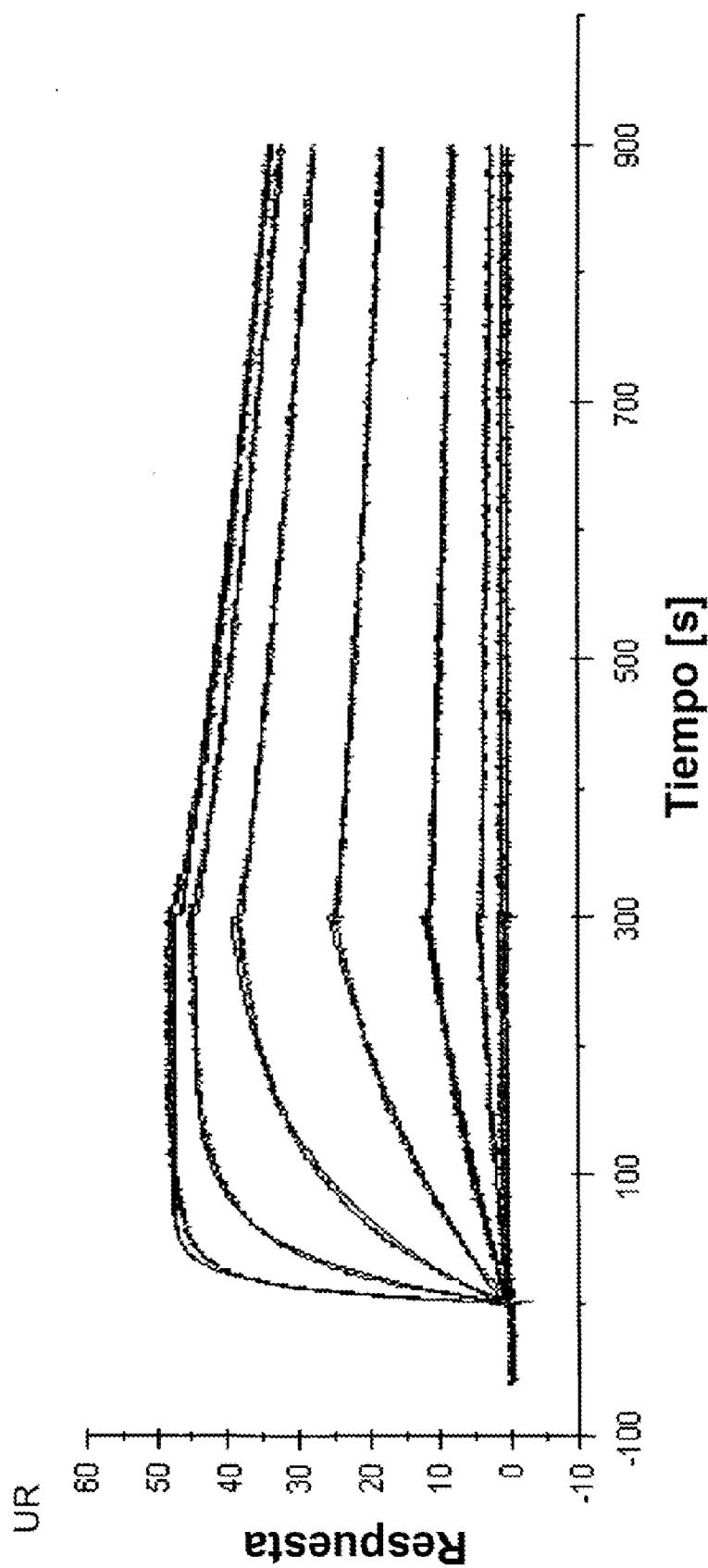
Fig. 2c

Fig. 3a

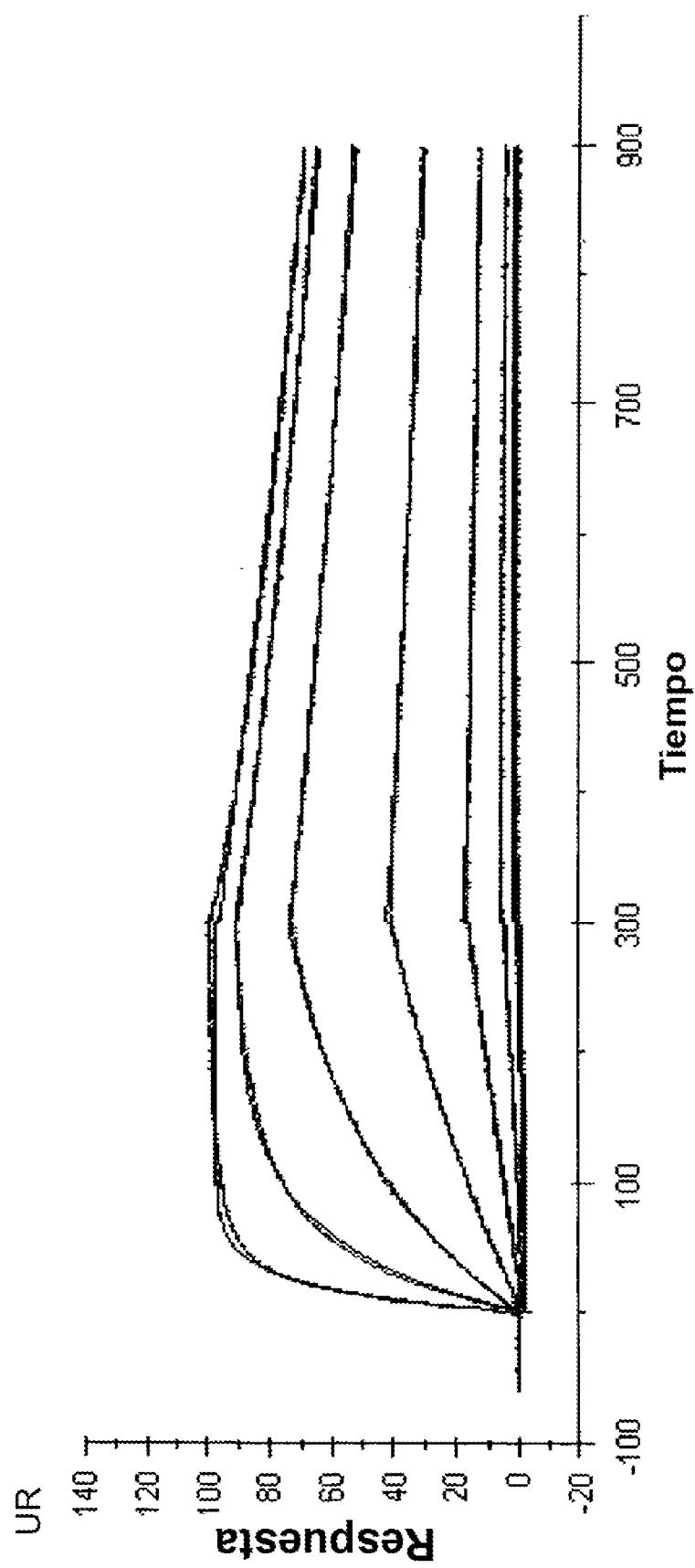


Fig. 3b

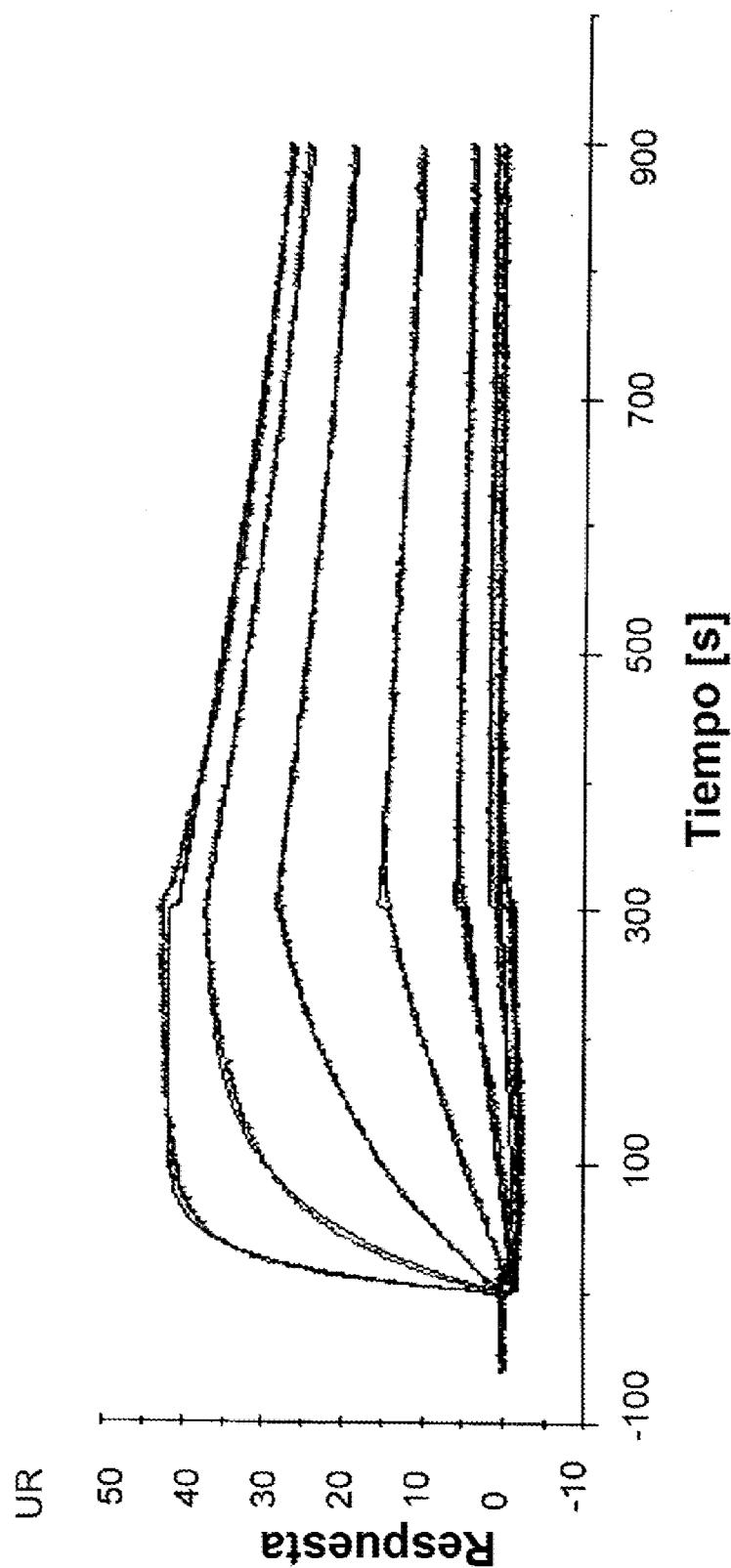


Fig. 4a

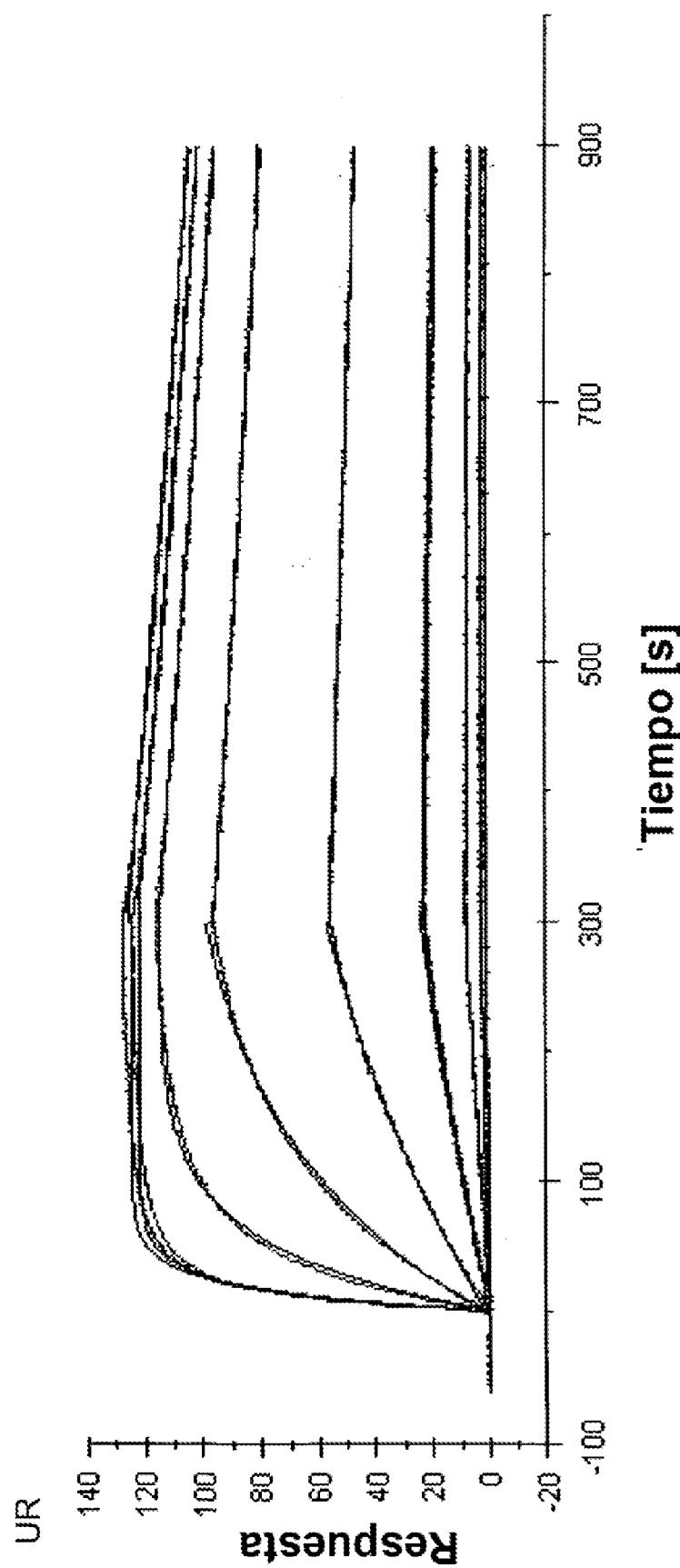


Fig. 4b

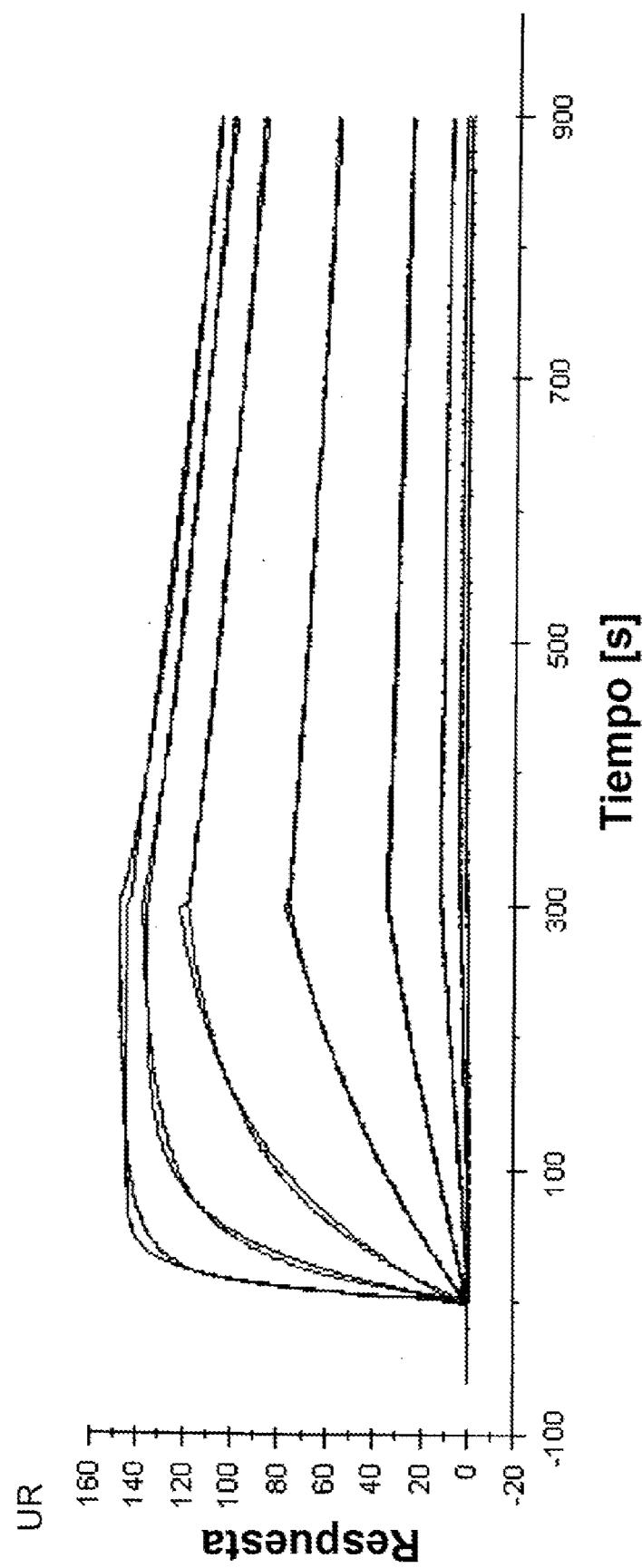


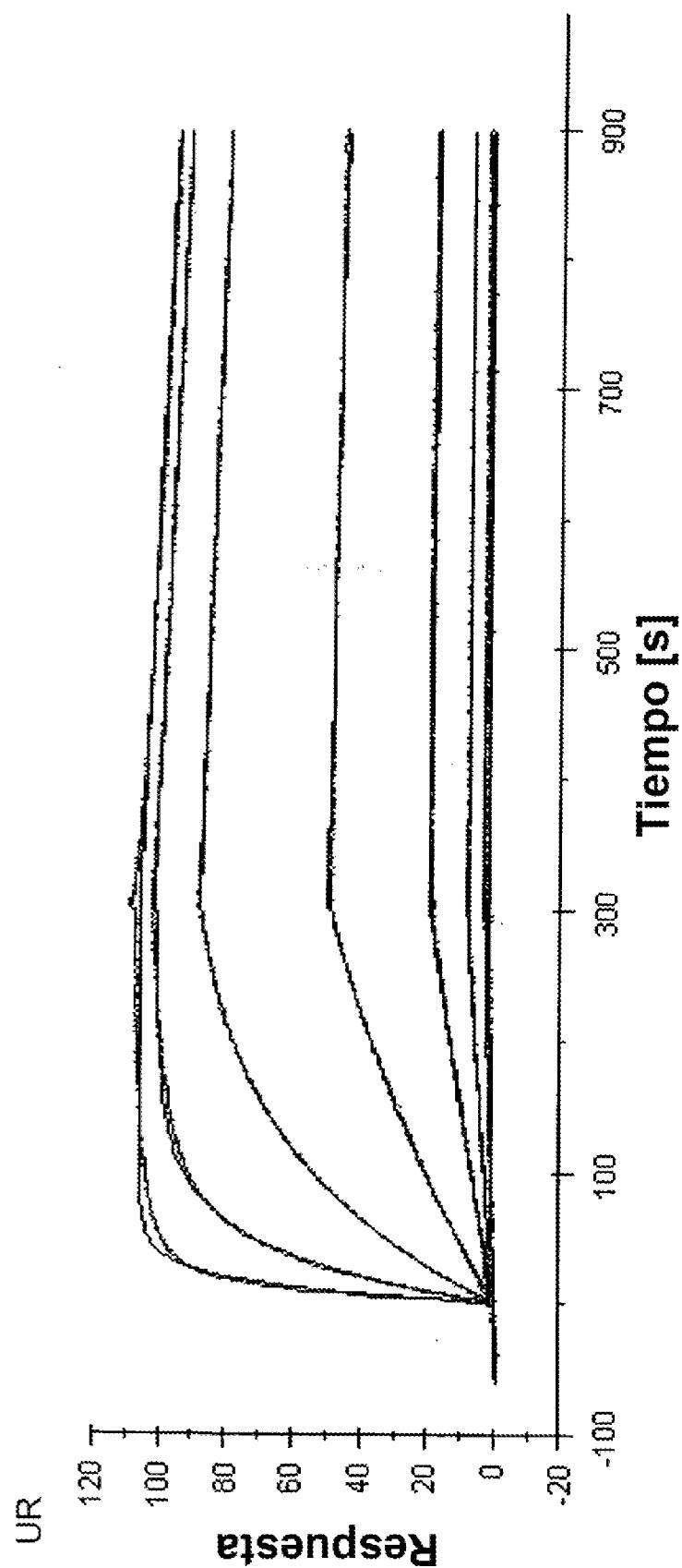
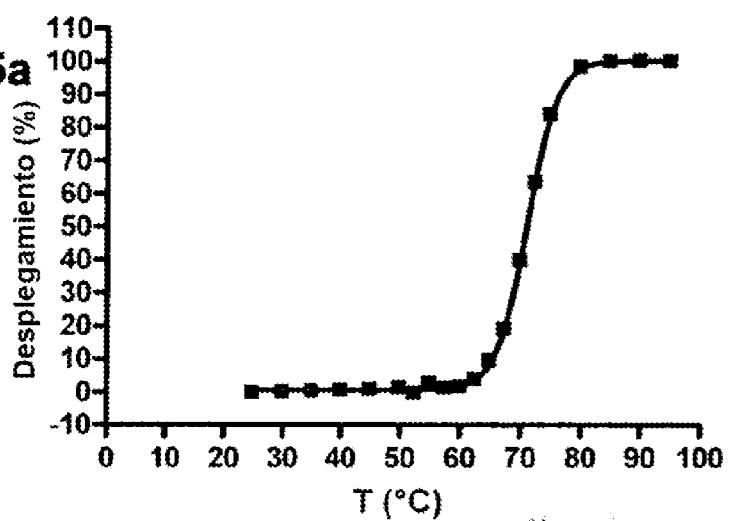
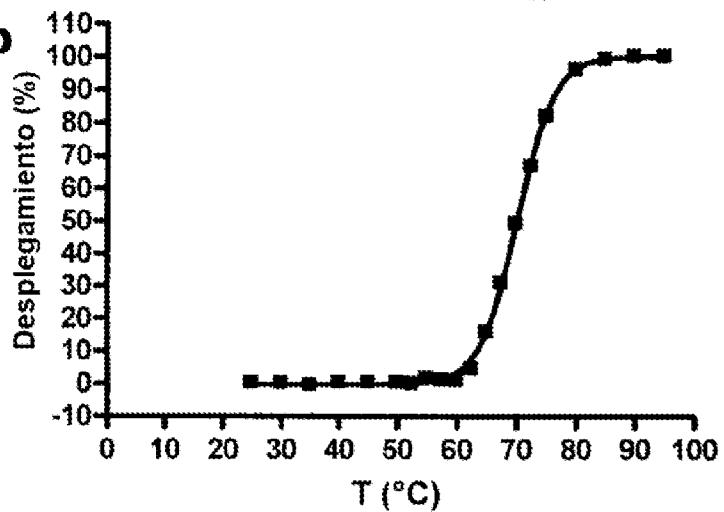
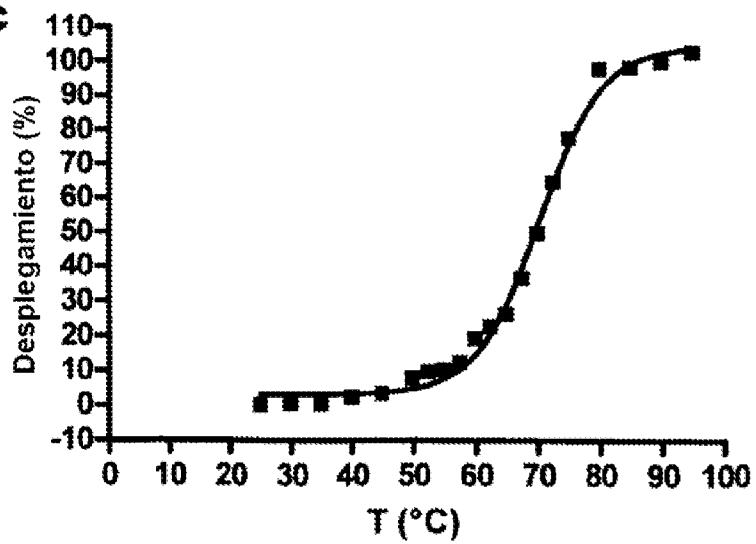
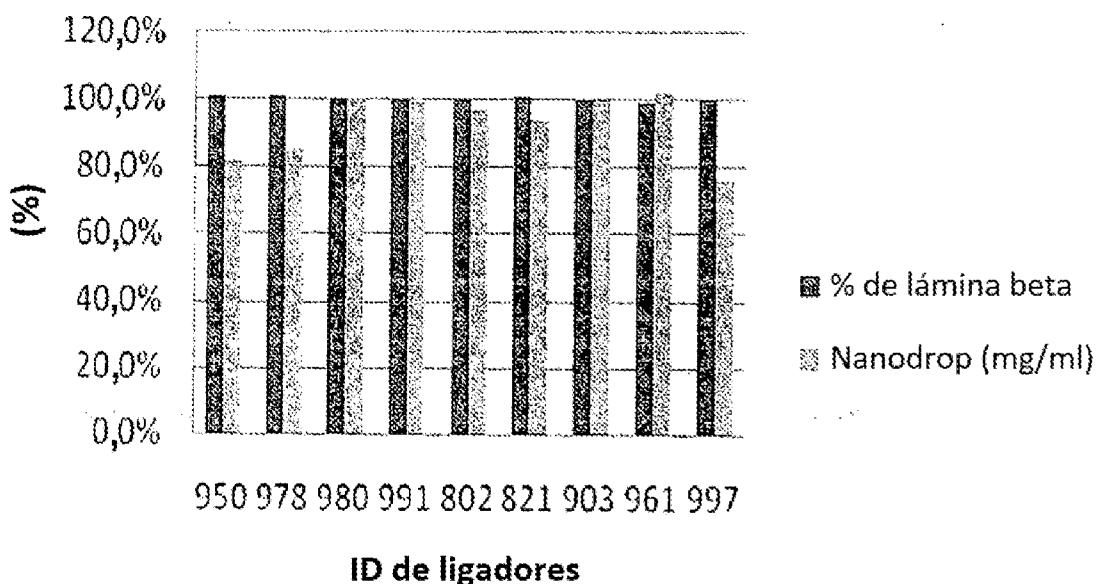
Fig. 4c

Fig. 5a**Fig. 5b****Fig. 5c**

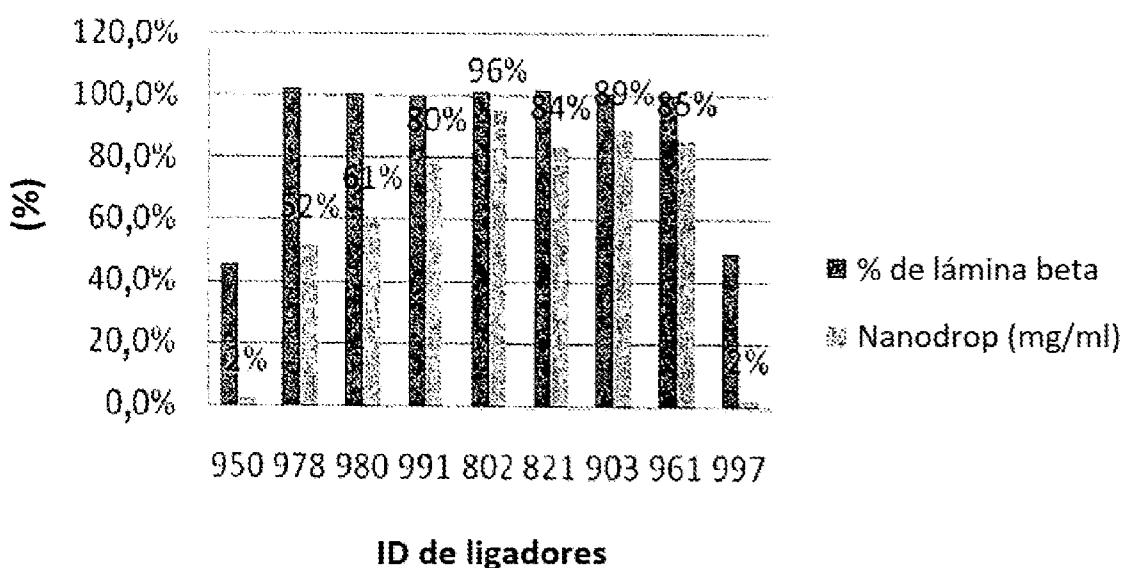
Valores normalizados a la prot. nativa

Fig. 6a



Valores normalizados a la prot. nativa

Fig. 6b



Valores normalizados a la prot. nativa

Fig. 6c

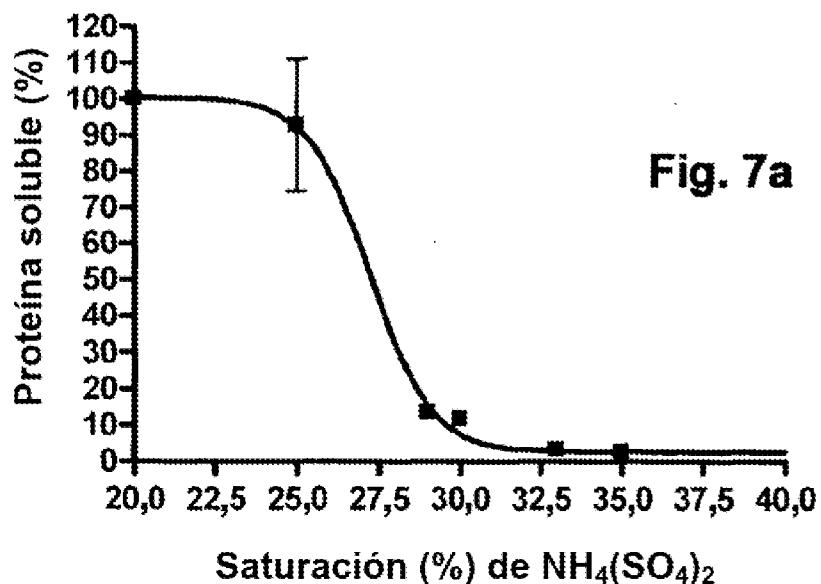
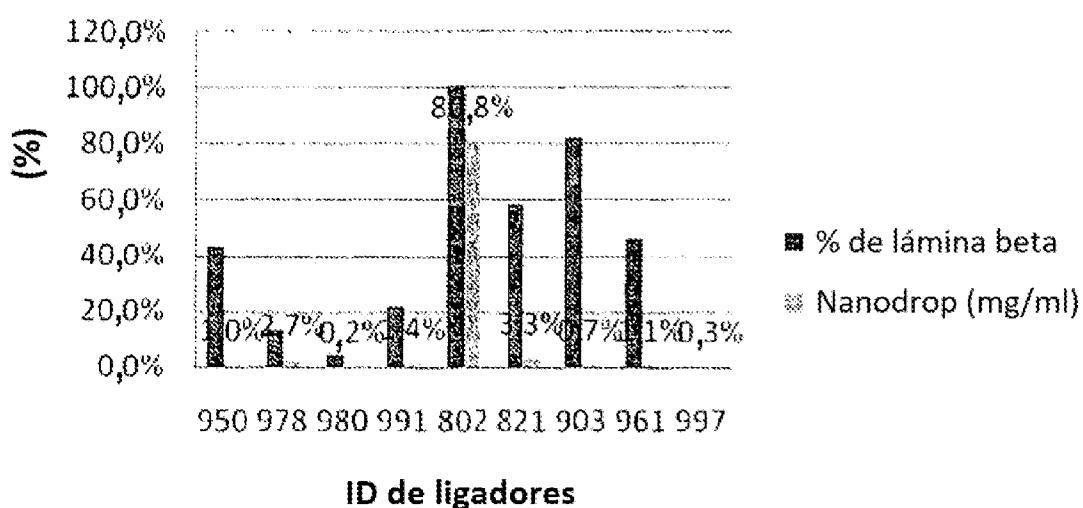


Fig. 7a

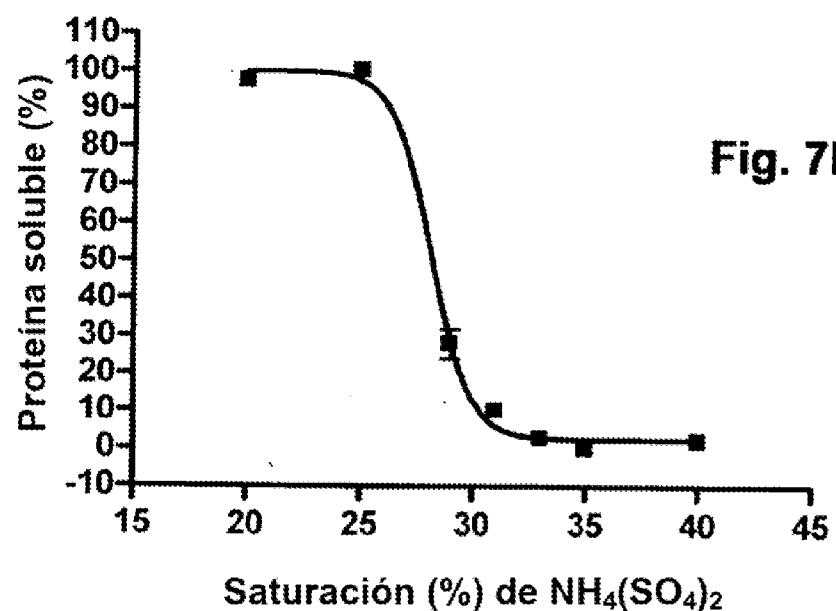


Fig. 7b

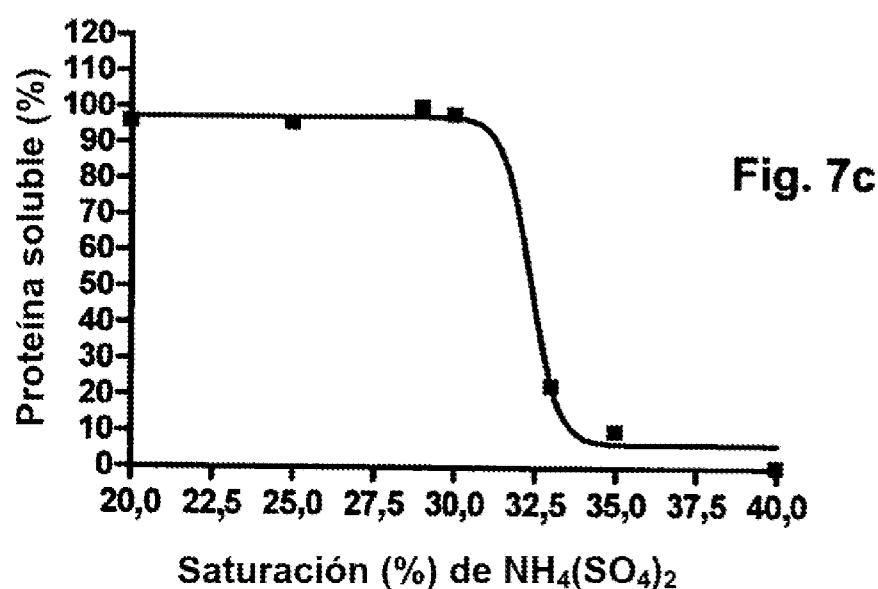
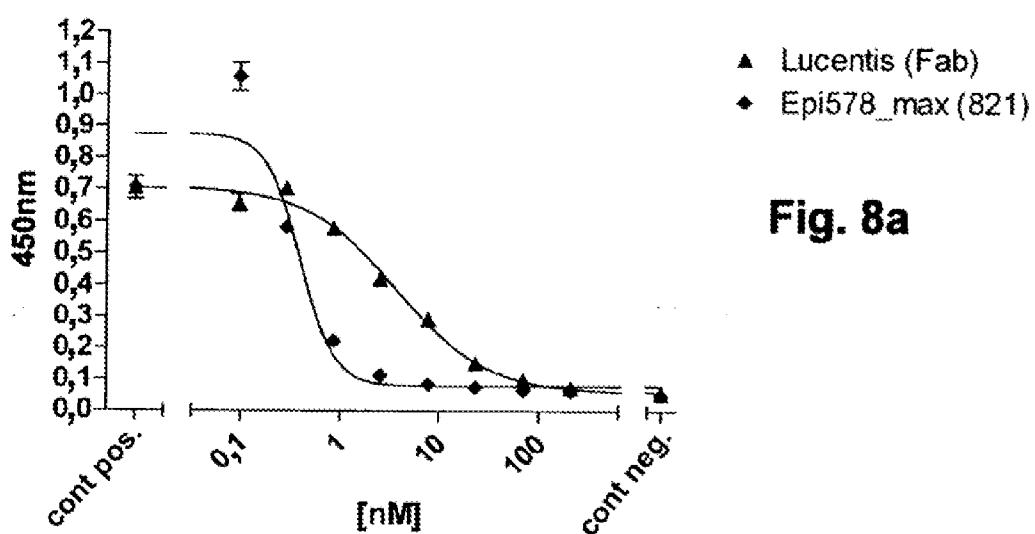
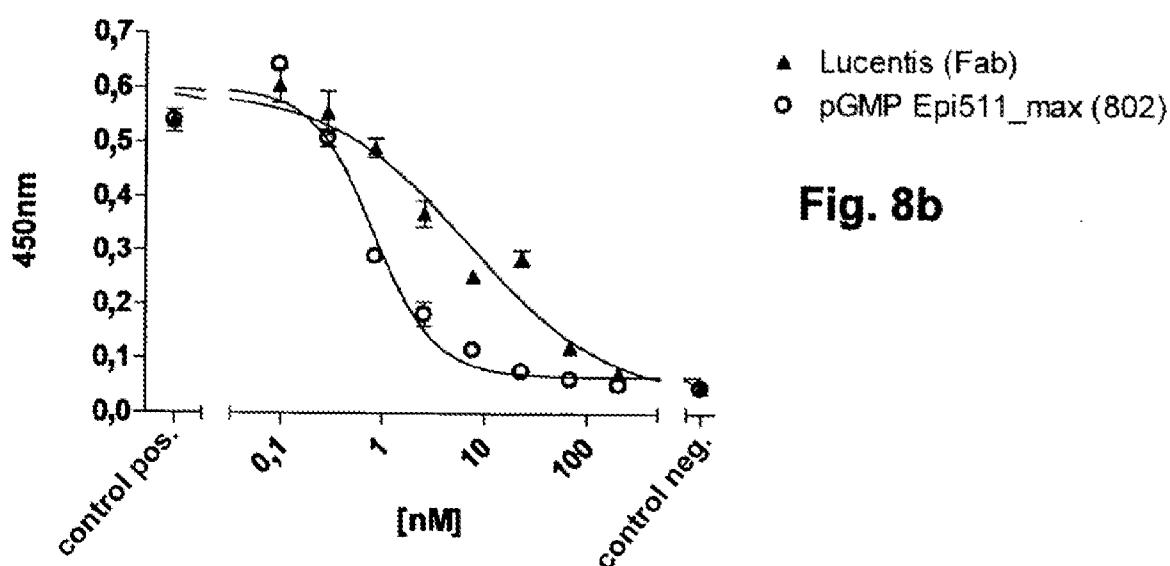
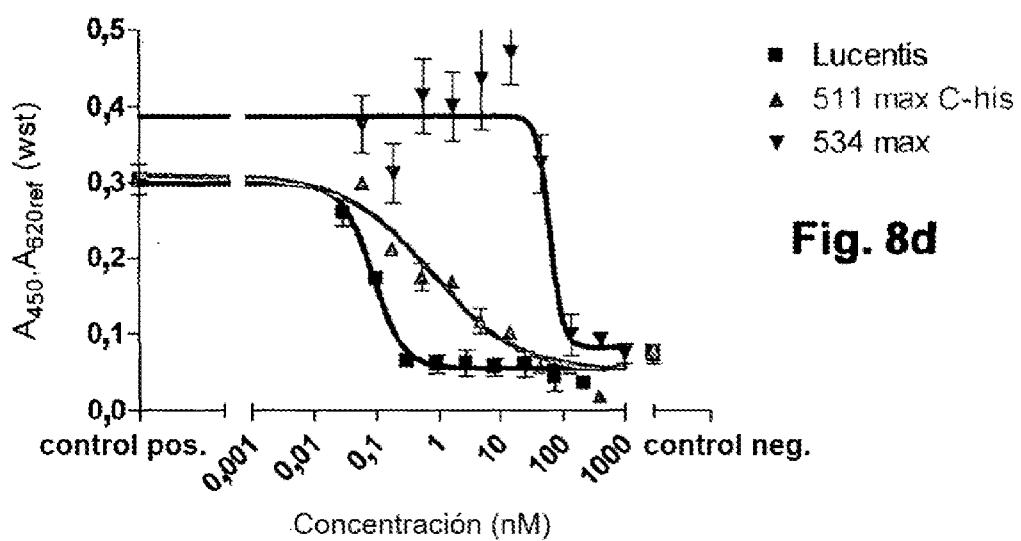
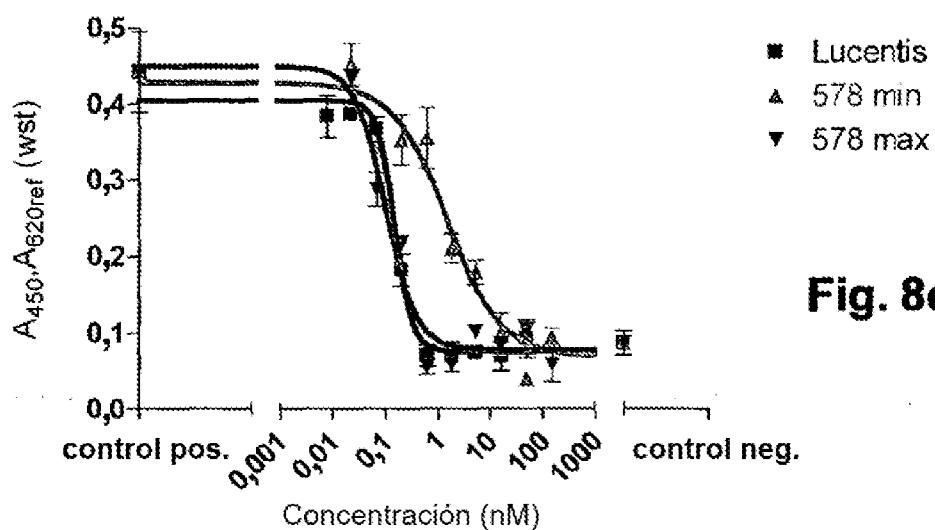
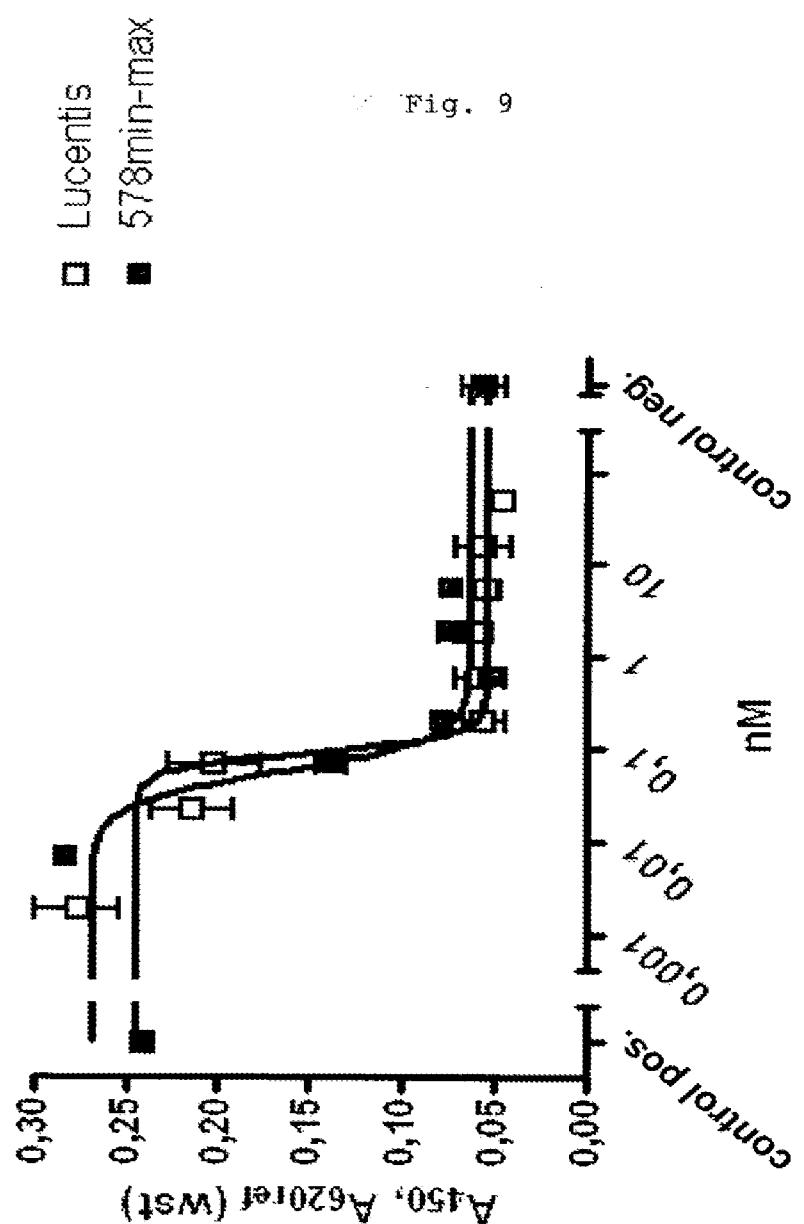


Fig. 7c

**Fig. 8a****Fig. 8b**





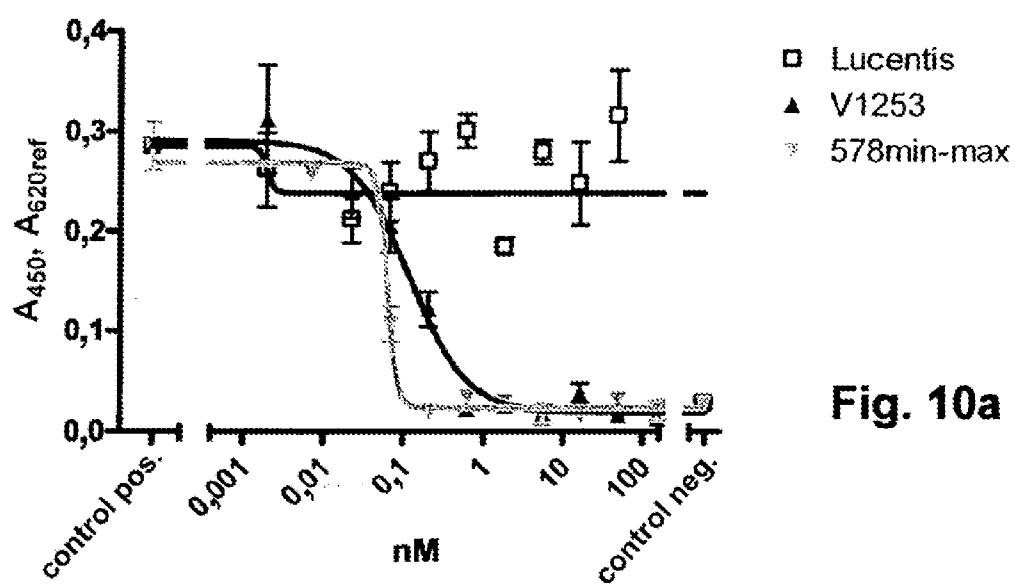


Fig. 10a

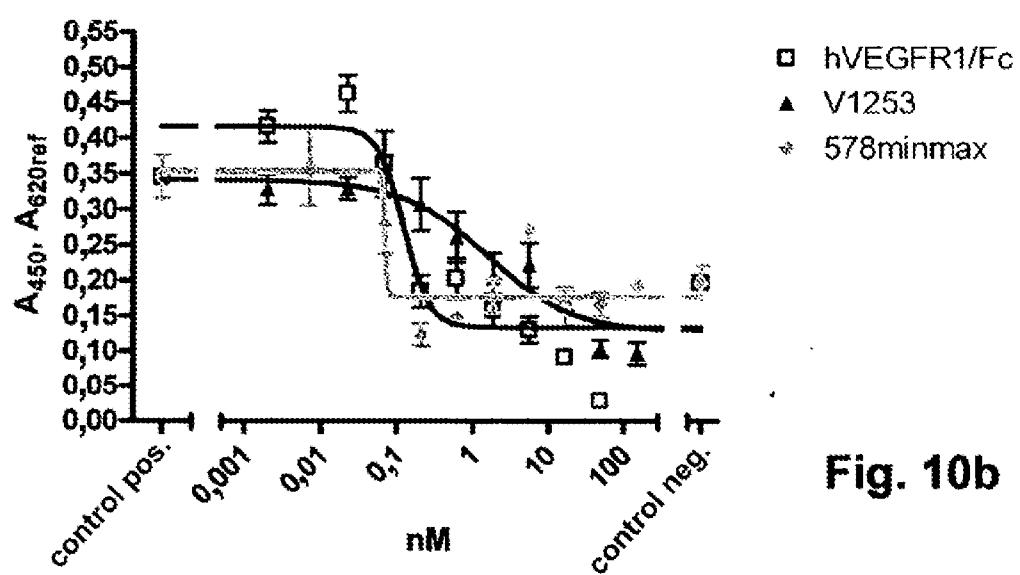


Fig. 10b

Fig. 10

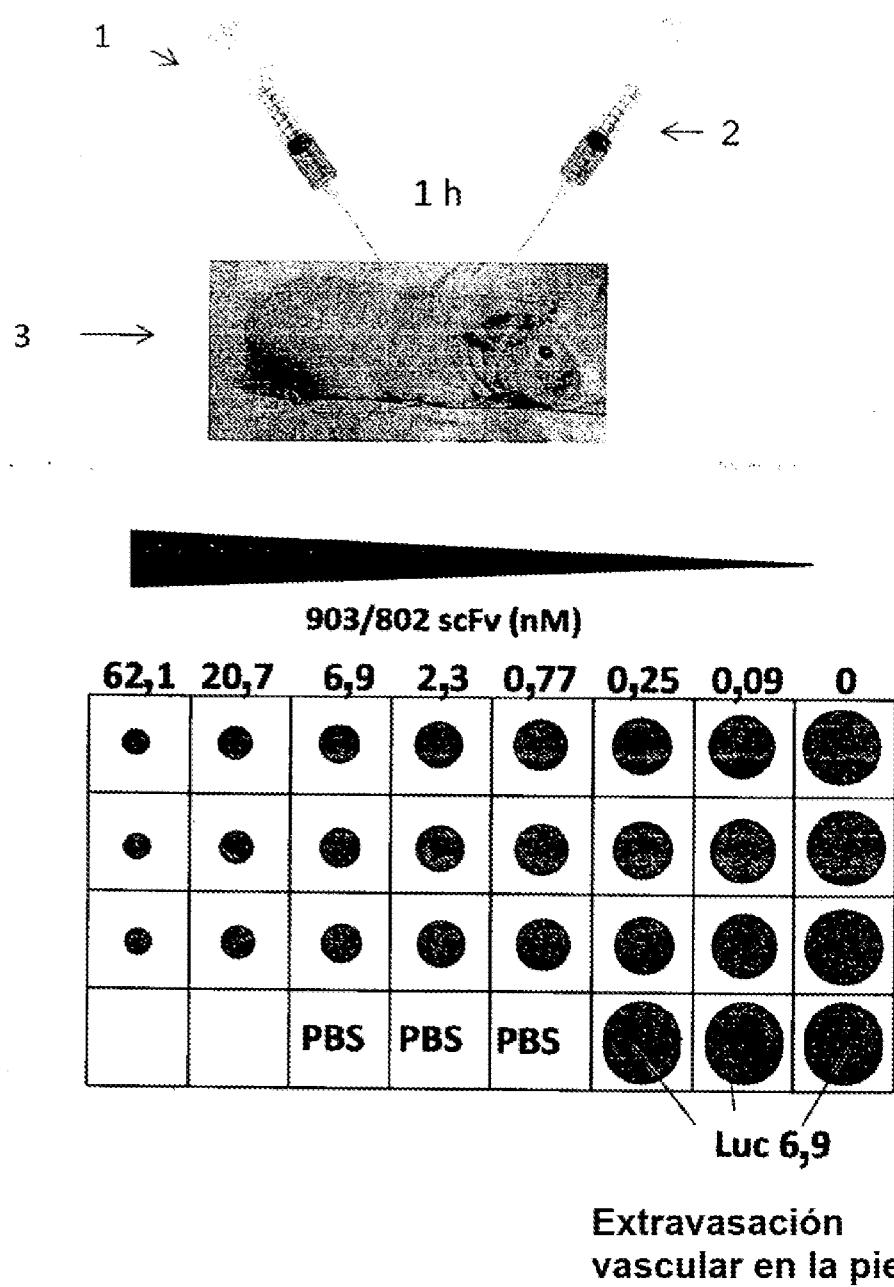


Fig. 11

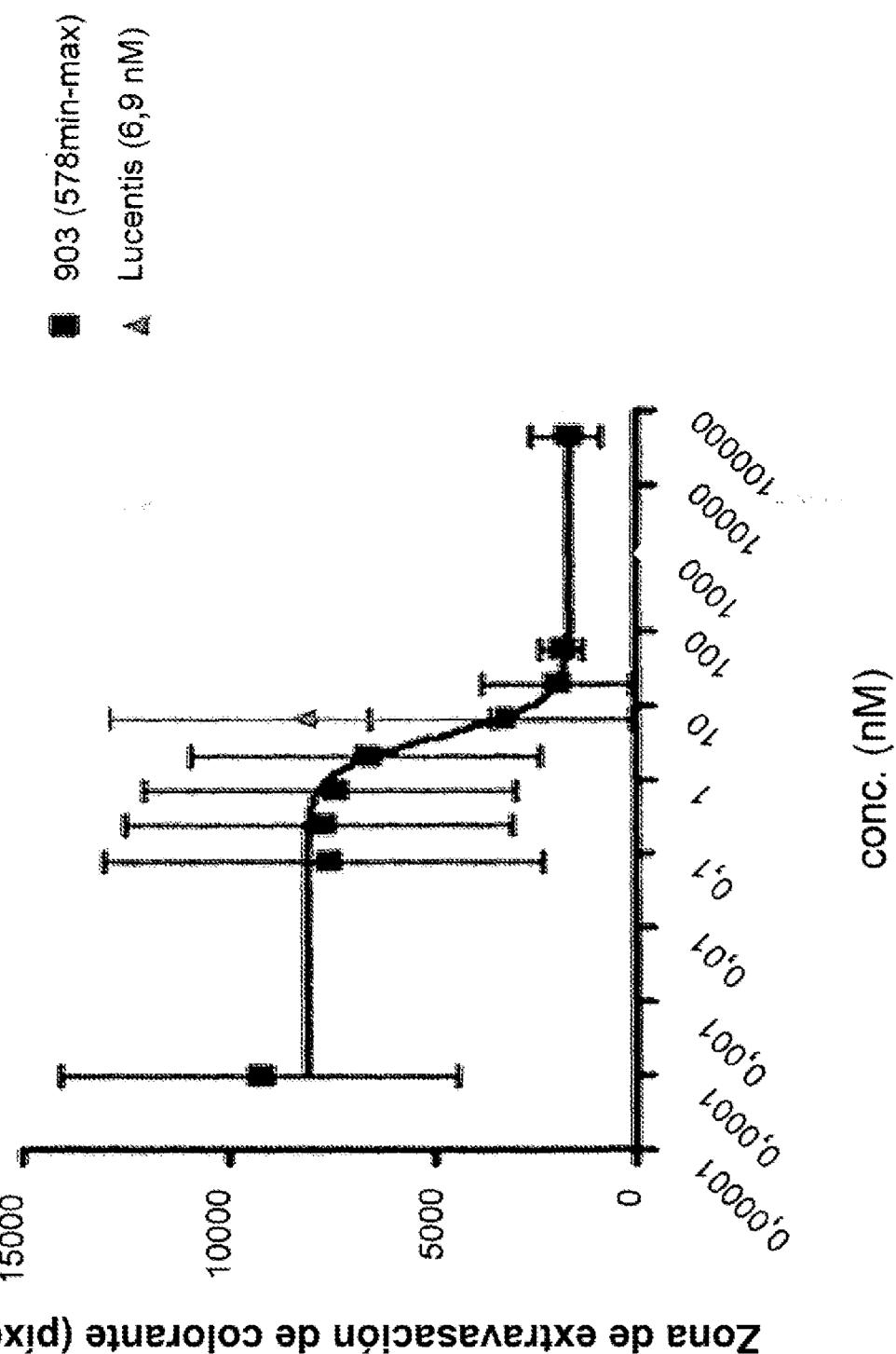
Fig. 12a

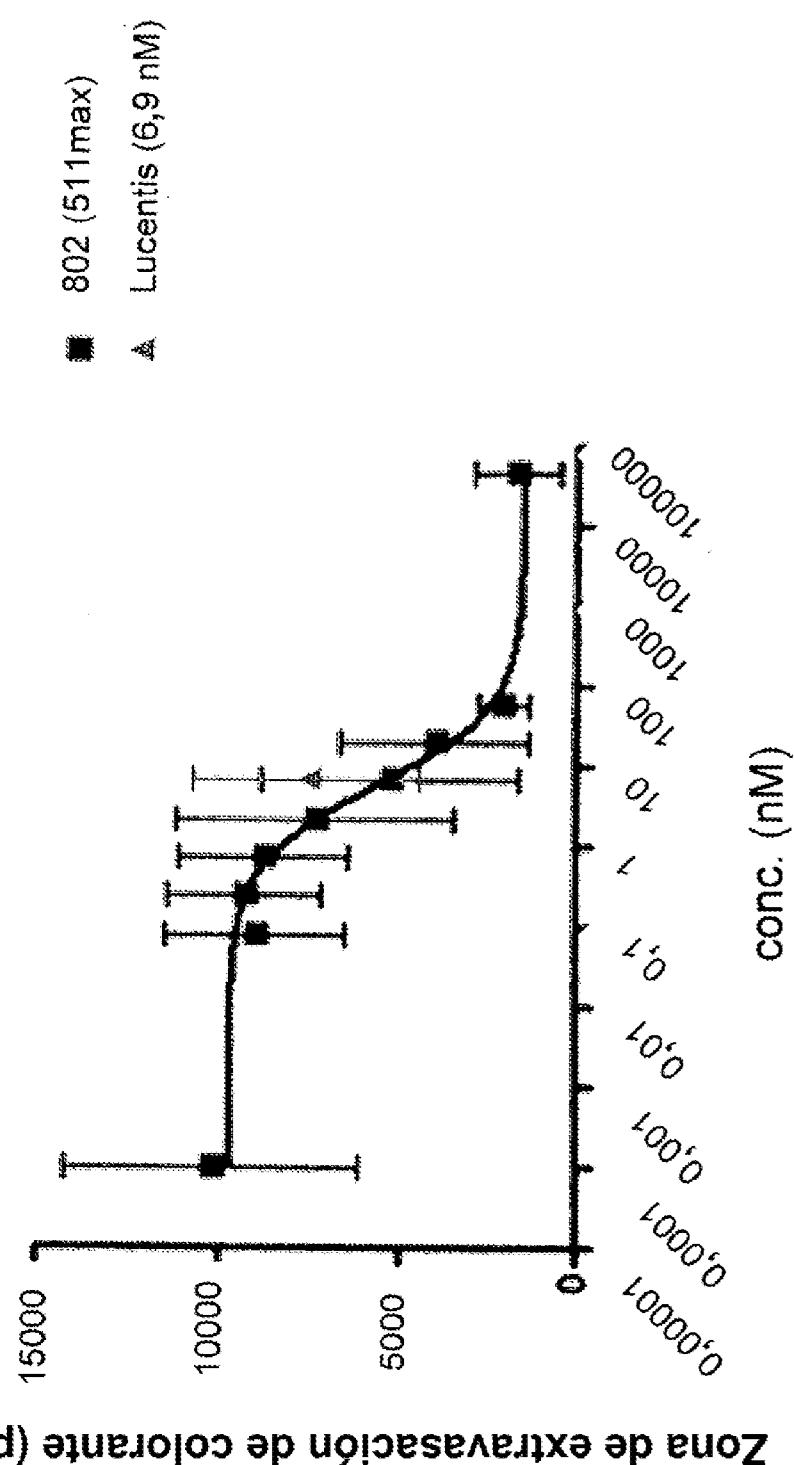
Fig. 12b

Fig. 12c

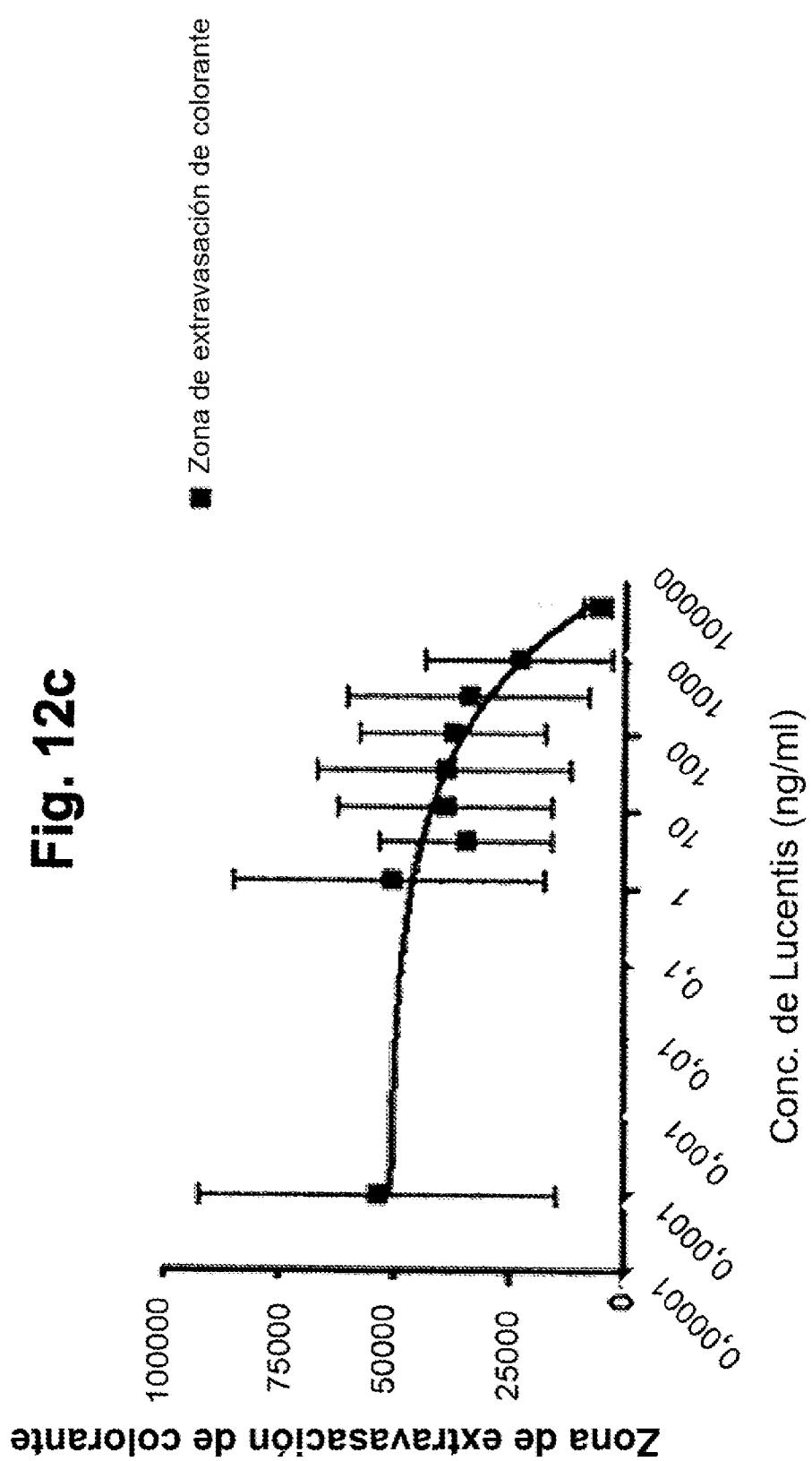


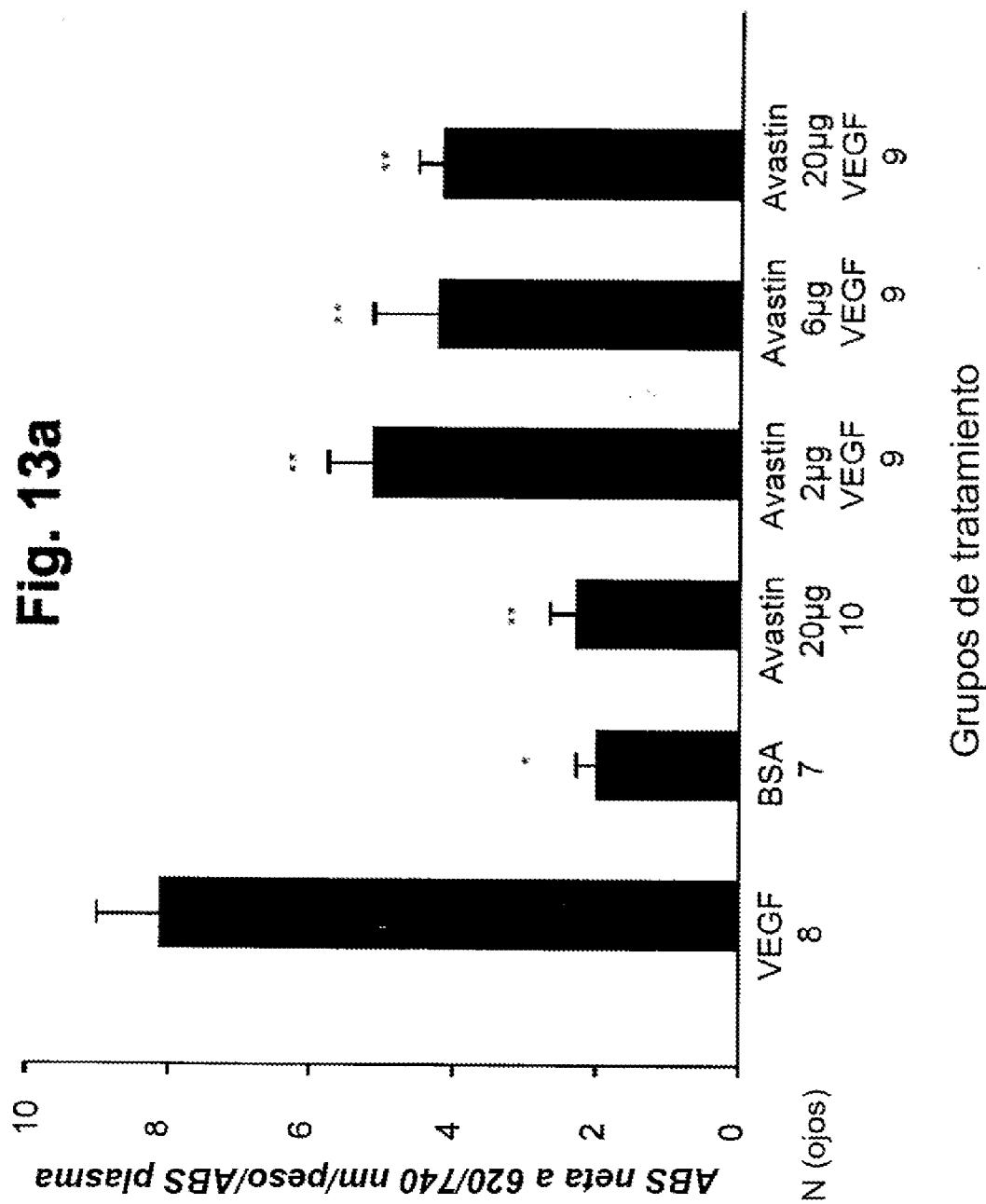
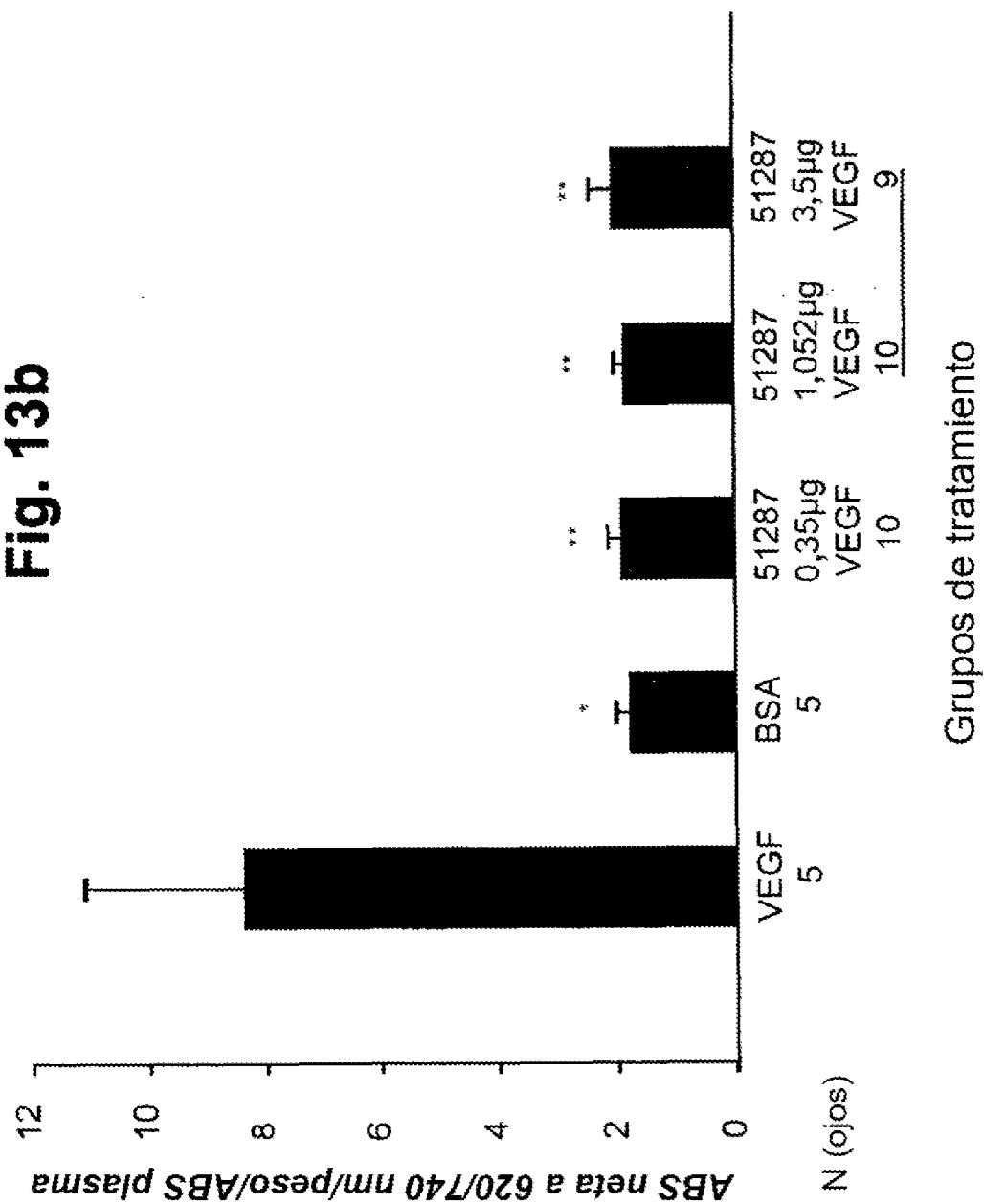
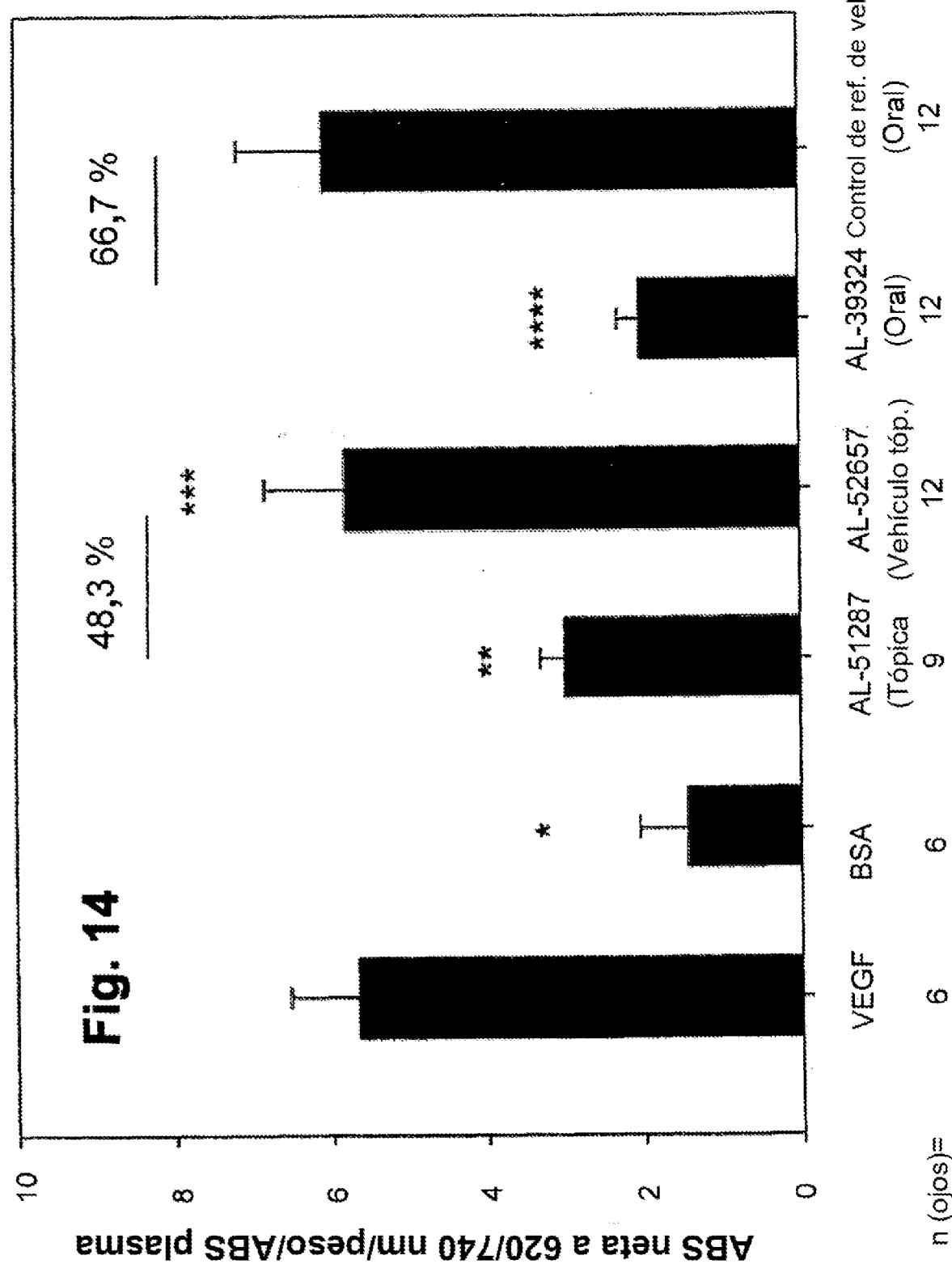
Fig. 13a

Fig. 13b



Definición de cada ESBAT

Figura 15