



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS
ESPAÑA



⑪ Número de publicación: **2 793 008**

⑮ Int. Cl.:

C07K 16/22 (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01)

⑫

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

⑯ Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **25.06.2009** **E 17151756 (8)**

⑯ Fecha y número de publicación de la concesión europea: **11.03.2020** **EP 3216803**

⑭ Título: **Anticuerpos estables y solubles que inhiben VEGF**

⑩ Prioridad:

25.06.2008 US 75697 P
25.06.2008 US 75692 P
25.06.2008 US 133212 P
24.02.2009 US 155041 P

⑮ Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
12.11.2020

⑬ Titular/es:

NOVARTIS AG (100.0%)
Lichtstrasse 35
4056 Basel, CH

⑭ Inventor/es:

BORRAS, LEONARDO;
URECH, DAVID y
GUNDE, TEA

⑭ Agente/Representante:

CARVAJAL Y URQUIJO, Isabel

ES 2 793 008 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 que inhiben VEGF

5 **Antecedentes de la invención**

La angiogénesis está involucrada en la patogénesis de 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)).

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. Oftalmo. 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 lampíos (p. ej., Liang W-C *et al.* (JBC, Vol. 281(2):951-961) se refiere al anticuerpo anti-VEGF, Avastin®, que bloquea tanto la acción de VEGF humano como murino lo cual inhibe de este modo los xenoinjertos de tumor humano en ratones) 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 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

La invención se refiere a inmunoligadores anti-VEGF solubles y estables que comprenden CDR de anticuerpos monoclonales de conejo. Dichos anticuerpos están diseñados para el diagnóstico y/o el tratamiento de trastornos mediados por VEGF. También se dan a conocer los hibridomas, ácidos nucleicos, vectores y células hospedadoras para la expresión de los anticuerpos recombinantes, métodos para aislarlos y el uso de dichos anticuerpos en medicina.

45 La presente invención se define mediante las reivindicaciones adjuntas. En particular, la presente invención proporciona:

1. Un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno de este para su uso en terapia o el diagnóstico *in vivo*, comprendiendo el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno de este una cadena pesada variable que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 164 y una cadena ligera variable que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 87.
2. El anticuerpo o fragmento de unión a antígeno de este para su uso de acuerdo con el punto 1, donde el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno de este se une específicamente a VEGF humano, de rata y de ratón.
3. El anticuerpo o fragmento de unión a antígeno de este para su uso de acuerdo con los puntos 1 o 2, donde el fragmento de unión a antígeno es un scFv, un fragmento Fab, un fragmento Fab' o un fragmento F(ab')2.
4. El anticuerpo o fragmento de unión a antígeno de este para su uso de acuerdo con uno cualquiera de los puntos precedentes, donde el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno de este se formula para la administración tópica, intraocular, oral, nasal, rectal o parenteral.
5. El anticuerpo o fragmento de unión a antígeno de este para su uso de acuerdo con de uno cualquiera de los puntos precedentes, donde la cadena ligera variable del anticuerpo o fragmento de unión a antígeno de este tiene un residuo de metionina aminoterminal.

6. El anticuerpo o fragmento de unión a antígeno de este para su uso de acuerdo con uno cualquiera de los puntos precedentes, donde el fragmento de unión a antígeno es un scFv, y la región variable de cadena pesada y la región variable de cadena ligera están unidas por la secuencia de la SEQ ID NO: 181.
- 5 7. El anticuerpo o fragmento de unión a antígeno de este para su uso de acuerdo con uno cualquiera de los puntos precedentes para su uso en el tratamiento de una enfermedad mediada por VEGF.
8. El anticuerpo o fragmento de unión a antígeno de este para su uso de acuerdo con el punto 7, donde la enfermedad 10 mediada por VEGF se selecciona del grupo que consiste en la degeneración macular senil, glaucoma neovascular, retinopatía diabética, retinopatía de la prematuridad.
9. El anticuerpo o fragmento de unión a antígeno de este para su uso de acuerdo con el punto 7, donde la enfermedad 15 mediada por VEGF se selecciona del grupo que consiste en fibroplasia retrolenticular, carcinomas de mama, carcinomas broncopulmonares, 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, oligodendrogloma, meduloblastoma, neuroblastomas, rabdomiosarcoma, sarcoma osteogénico, leiomiosarcomas, 20 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.
10. Uso de un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno de este en la producción de un medicamento para el tratamiento 25 de una enfermedad mediada por VEGF, donde el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno de este comprende una cadena pesada variable que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 164 y una cadena ligera variable que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 87.
11. El uso del punto 10, donde el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno de este se une específicamente a VEGF 30 humano, de rata y de ratón.
12. El uso del punto 10 o 11, donde el fragmento de unión a antígeno es un scFv, un fragmento Fab, un fragmento Fab' o un fragmento F(ab')2.
13. El uso de uno cualquiera de los puntos 10 a 12, donde el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno de este se 35 formula para la administración tópica, intraocular, oral, nasal, rectal o parenteral.
14. El uso de uno cualquiera de los puntos 10 a 12, donde la cadena ligera variable del anticuerpo o fragmento de unión a antígeno de este tiene un residuo de metionina aminoterminal.
- 40 15. El uso de uno cualquiera de los puntos 10 a 14, donde el fragmento de unión a antígeno es un scFv, y la región variable de cadena pesada y la región variable de cadena ligera están unidas por la secuencia de la SEQ ID NO: 181.
16. El uso de uno cualquiera de los puntos 10 a 14, donde el sujeto padece una enfermedad mediada por VEGF 45 seleccionada del grupo que consiste en la degeneración macular senil, glaucoma neovascular, retinopatía diabética, retinopatía de la prematuridad.
17. El uso de uno cualquiera de los puntos 10 a 14, donde el sujeto padece una enfermedad mediada por VEGF 50 seleccionada del grupo que consiste en fibroplasia retrolenticular, carcinomas de mama, carcinomas broncopulmonares, 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, oligodendrogloma, meduloblastoma, neuroblastomas, rabdomiosarcoma, sarcoma osteogénico, leiomiosarcomas, 55 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.

60 Descripción breve de los dibujos

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(1/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.

- 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 VEGF165 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 VEGF164 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.
- 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 VEGF165 humano: Ka (1/Ms): 7,00E+05; SE (ka): 1,4E+03; kd(1/s): 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 VEGF110 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.
- 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.
- 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; Fig. 5b: 578minmax_DHP (#961): Tm=70,2°C; Fig. 5c: 578max (#821): Tm = 70,4°C.
- La *Figura 6* ilustra la desnaturalización 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.
- 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 %.
- 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.
- 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 hVEGF165: 0,08nM (3ng/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.
- La *Figura 10* ilustra los efectos de 578minmax sobre la proliferación de HUVEC inducida por VEGF164 de ratón y VEGF164 de rata. Los parámetros del ensayo fueron los siguientes: concentración de VEGF164 de ratón: 0,08nM (3ng/ml); concentración de VEGF164 de rata: 0,3nM (11,3ng/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.
- 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 inyectó 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, se lavaron y se fotografiaron digitalmente utilizando luz incidente y transmitida. La zona de tinte azul Evans que se extravasó a los sitios de inyección se evaluó utilizando Image J y se representó gráficamente la retención de la dosis-zona.
- 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.

5 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 vascular retiniana inducida por hVEGF. Premezclados 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 (premezclados, ivt). Inhibición completa de la permeabilidad vascular retinaria inducida por hVEGF por parte de ESBA903. Premezclados 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 15 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 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 divulgación 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 dan a conocer los hibridomas, ácidos nucleicos, vectores y células hospedadoras para la expresión de los anticuerpos recombinantes, métodos para aislarlos y el uso de dichos anticuerpos en medicina.

Definiciones

30 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 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 45 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 (flt), 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 flt comprende un dominio extracelular, un dominio transmembranario y 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. Natl. 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 flt 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 55 El término «conejo», tal como se utiliza en la presente, se refiere a un animal que pertenece a la familia de los lepóridos.

60 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.

65 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 al 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

5 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).

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 10 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.

15 15 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 20 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 25 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 30 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 35 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.

35 35 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, p. ej., que tiene un tamaño, una forma, una carga eléctrica, propiedades químicas similares, que incluyen la capacidad de 40 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 45 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.

50 50 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 deleciones de nucleótidos y aminoácidos. Por ejemplo, pueden introducirse modificaciones mediante técnicas 55 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 (p. ej., lisina, arginina, histidina), cadenas laterales ácidas (p. ej., ácido aspártico, ácido glutámico), cadenas laterales polares sin carga (p. ej., glicina, asparagina, glutamina, serina, treonina, tirosina, cisteína, triptófano), cadenas laterales apolares (p. ej., alanina, valina, leucina, isoleucina, prolina, fenilalanina, metionina), cadenas laterales con ramificaciones en la posición beta (p. ej., treonina, valina, isoleucina) y cadenas laterales aromáticas (p. ej., 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 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 aminoácido 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 ciertos grupos R hidrófobos (p. ej., Alanina, Serina o Treonina) son más hidrófilos (es decir, de hidrofilia mayor o hidrofobia menor) 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 Cornette *et al.*, *J. Mol. Biol.*, 195: 659-685 (1987)).
- Tal como se utiliza en la presente, cuando una secuencia de aminoácidos (p. ej., una primera secuencia V_H o V_L) se alinea con una o más secuencias de aminoácidos adicionales (p. ej., una o más secuencias V_H o V_L en una base de datos), una posición de aminoácido en una secuencia (p. ej., 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, el término «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 maduras, 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 CdC).
- El término «inmunolígador» se refiere a una molécula que contiene todo o una parte del sitio de unión a antígeno de un anticuerpo, p. ej., todo o parte del dominio variable de cadena pesada y/o ligera, de tal modo que el inmunolígador reconoce específicamente un antígeno diana. Los ejemplos no limitantes de inmunolígadores incluyen moléculas de inmunoglobulina completa y scFv, así como fragmentos de anticuerpo, que incluyen pero no se limitan a (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 (véanse 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, el término «propiedad funcional» es una propiedad de un polipéptido (p. ej., un inmunolígador) cuya una mejora (p. ej., relativa a 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. En

5 todavía otra realización, la propiedad funcional es la expresión proteínica (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.

10 El término «epítopo» o «determinante antigénico» 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*, Tomo 66, G. E. Morris, Ed. (1996).

15 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.

20 15 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 plasmones superficiales (SPR, por sus siglas en inglés) en un instrumento BIACORE.

25 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.

30 25 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.

35 30 Un inmunolígador «químérico», tal como se utiliza en la presente, tiene una porción 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.

40 35 «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. Winter ha dado a conocer un método general para insertar CDR en armazones aceptores humanos en la Patente Estadounidense N.º 5.225.539. El documento US6.407.213 da a conocer un número de posiciones de aminoácidos del armazón donde se prefiere una sustitución procedente del inmunolígador donante.

45 40 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.

50 45 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. Ciertos vectores tienen capacidad de replicación autónoma en una célula hospedadora en que se introducen (p. ej., vectores bacterianos que tienen un origen de replicación bacteriano y vectores episómicos de mamífero). Se pueden integrar otros vectores (p. ej., 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.

60 55 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.

5 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.

10 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. Los trastornos mediados por VEGF a modo de ejemplo incluyen, pero no se limitan a, degeneración macular senil, glaucoma neovascular, retinopatía diabética, 15 retinopatía de la prematuridad, fibroplasia retro lenticular, carcinomas de mama, carcinomas broncopulmonares, carcinomas gástricos, carcinomas esofágicos, carcinomas colorrectales, carcinomas hepáticos, carcinomas ováricos, las comas, arrenoblastomas, carcinomas cervicouterinos, carcinoma endometrial, hiperplasia endometrial, endometriosis, 20 fibrosarcomas, coriocarcinoma, cáncer de cabeza y cuello, carcinoma nasofaríngeo, carcinomas laringeos, hepatoblastoma, sarcoma de Kaposi, melanoma, carcinomas de piel, hemangioma, hemangioma cavernoso, hemangioblastoma, carcinomas pancreáticos, retinoblastoma, astrocitoma, glioblastoma, schwannoma, oligodendrogloma, meduloblastoma, neuroblastomas, rabdomiosarcoma, 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.

25 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.

30 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.

35 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 aceptor humano de origen natural (FW 1.4, SEQ ID No. 172). No se realizaron cambios en las regiones de armazón. El propio armazón se preselecciónó en función de propiedades funcionales deseables (solubilidad y estabilidad).

40 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 armazón aceptor 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.

45 50 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».

55 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».

60 65 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 inmunolígador. Ocasionalmente, un inmunolígador recibió una segunda denominación que se identifica mediante el prefijo «ESBA». Por ejemplo, ESBA903 designa el mismo inmunolígador que 578minmax o EP578minmax o Epi578minmax.

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. Aunque se pueden utilizar métodos y materiales similares o equivalentes a los descritos en la presente en la puesta en práctica o evaluación de la presente invención, se describen a continuación métodos y materiales adecuados. En caso de

contradicción, prevalecerá la presente memoria descriptiva, incluidas las definiciones. Además, los materiales, métodos y ejemplos son solamente ilustrativos y no se pretende que sean limitantes.

5 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

10 En un aspecto, la presente divulgación se refiere a inmunoligadores que se unen a VEGF y son, por tanto, adecuados para bloquear la función de VEGF *in vivo*. Las CDR de estos inmunoligadores se derivan de anticuerpos monoclonales anti-VEGF de conejo que se obtuvieron a partir de conejos que se inmunizaron con VEGF humano y/o 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 15 extraordinariamente altas.

En la presente se da a conocer un inmunoligador, que se une específicamente a VEGF, que comprende al menos una de una secuencia de aminoácidos CDRH1, una CDRH2, una CDRH3, una CDRL1, una CDRL2 o una CDRL3. Se exponen 20 secuencias de aminoácidos CDR a modo de ejemplo para su uso en los inmunoligadores de la divulgación en las SEQ ID Nos: 2-72 (Tablas 1-6).

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

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	GFSLNTYYMN	12
509maxII	GFSLSSYYMS	13
Consenso	GFSLSSGYYMC	14

Tabla 2. Secuencias de aminoácidos CDR H2 de inmunoligadores anti-VEGF de la invención.

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	IIAPDDTYYASWAKS	24

Identificador de secuencia	CDR-H2	SEQ ID No.
509maxII	ILDYVGTDYASWAKG	25
Consenso	CIDAGSDGDTYYASWAKG	26

Tabla 3. Secuencias de aminoácidos CDR H3 de inmunoligadores anti-VEGF de la invención.

Identificador de secuencia	CDR-H3	SEQ ID No.
60	GNNYYIYTDGGYAYAGLEL	27
435	GSNWYSDL	28
453	GDASYGVDSFMLPL	29
375	SDPASSWSFAL	30
610	SDYSSGWGTDI	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 de la invención.

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

5

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

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

Identificador de secuencia	CDR-L2	SEQ ID No.
509	KASTLES	58
511	RASTLAS	59
Consenso	KASTLAS	60

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

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

- 5 En la presente se describe un inmunoligador que comprende al menos una CDR que tiene al menos un 75% de similitud, preferentemente al menos un 75% de identidad, más preferentemente al menos un 80%, 85%, 90% 95%, incluso más preferentemente un 100% de identidad con una secuencia consenso del grupo que consiste en la 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. El VH de dicho inmunoligador puede comprender las CDR del grupo que consiste en la SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 26 y SEQ ID NO: 37 y/o las CDR del VL de dicho inmunoligador pueden comprender CDR del grupo que consiste en la SEQ ID NO: 49, SEQ ID NO: 60 y SEQ ID NO: 71. La CDR se puede seleccionar del grupo que consiste en la 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.
- 10 15 En la presente se describe además un inmunoligador que comprende al menos una CDR que tiene al menos un 75% de similitud, preferentemente al menos un 75% de identidad, más preferentemente al menos un 80%, 85%, 90% 95%, incluso más preferentemente un 100% de identidad con una secuencia del grupo que consiste en la 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. El VH de dicho inmunoligador puede comprender las CDR del grupo que consiste en la SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 15 y SEQ ID NO: 27 y/o las CDR del VL de dicho inmunoligador pueden comprender CDR del grupo que consiste en la SEQ ID NO: 38, SEQ ID NO: 50 y SEQ ID NO: 61. Como alternativa, el VH de dicho inmunoligador puede comprender las CDR del grupo que consiste en la SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 15 y SEQ ID NO: 27 y/o las CDR del VL de dicho inmunoligador pueden comprender CDR del grupo que consiste en la SEQ ID NO: 38, SEQ ID NO: 50 y SEQ ID NO: 61.
- 20 25 En la presente se describe un inmunoligador que comprende al menos una CDR que tiene al menos un 75% de similitud, preferentemente al menos un 75% de identidad, más preferentemente al menos un 80%, 85%, 90% 95%, incluso más preferentemente un 100% de identidad con una secuencia del grupo que consiste en la SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 28, SEQ ID NO: 39, SEQ ID NO: 51, y SEQ ID NO: 62. El VH de dicho inmunoligador puede comprender las CDR del grupo que consiste en la SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 28 y/o las CDR del VL de dicho inmunoligador pueden comprender CDR del grupo que consiste en la SEQ ID NO: 39, SEQ ID NO: 51, y SEQ ID NO: 62.
- 30 En la presente se da a conocer también un inmunoligador que comprende al menos una CDR que tiene al menos un 75% de similitud, preferentemente al menos un 75% de identidad, más preferentemente al menos un 80%, 85%, 90% 95%, incluso más preferentemente un 100% de identidad con una secuencia del grupo que consiste en la SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 29, SEQ ID NO: 40, SEQ ID NO: 52 y SEQ ID NO: 63.. El VH de dicho inmunoligador puede comprender las CDR del grupo que consiste en la SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 29 y/o las CDR del VL de dicho inmunoligador pueden comprender CDR del grupo que consiste en la SEQ ID NO: 40, SEQ ID NO: 52 y SEQ ID NO: 63.

- En la presente se da a conocer además un inmunolígador que comprende al menos una CDR que tiene al menos un 75% de similitud, preferentemente al menos un 75% de identidad, más preferentemente al menos un 80%, 85%, 90% 95%, incluso más preferentemente un 100% de identidad con una secuencia del grupo que consiste en la SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 30, SEQ ID NO: 41, SEQ ID NO: 53 y SEQ ID NO: 64.. El VH de dicho inmunolígador puede 5 comprender las CDR del grupo que consiste en la SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 18 y SEQ ID NO: 30 y/o las CDR del VL de dicho inmunolígador pueden comprender CDR del grupo que consiste en la SEQ ID NO: 41, SEQ ID NO: 53 y SEQ ID NO: 64.
- En la presente se da a conocer además un inmunolígador que comprende al menos una CDR que tiene al menos un 75% 10 de similitud, preferentemente al menos un 75% de identidad, más preferentemente al menos un 80%, 85%, 90% 95%, incluso más preferentemente un 100% de identidad con una secuencia del grupo que consiste en la SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 31, SEQ ID NO: 42, SEQ ID NO: 54 y SEQ ID NO: 65.. El VH de dicho inmunolígador puede 15 comprender las CDR del grupo que consiste en la SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 19 y SEQ ID NO: 31 y/o las CDR del VL de dicho inmunolígador pueden comprender CDR del grupo que consiste en la SEQ ID NO: 42, SEQ ID NO: 54 y SEQ ID NO: 65.
- En la presente se da a conocer además un inmunolígador que comprende al menos una CDR que tiene al menos un 75% 20 de similitud, preferentemente al menos un 75% de identidad, más preferentemente al menos un 80%, 85%, 90% 95%, incluso más preferentemente un 100% de identidad con una secuencia del grupo que consiste en la SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 32, SEQ ID NO: 43, SEQ ID NO: 55 y SEQ ID NO: 66.. El VH de dicho inmunolígador puede 25 comprender las CDR del grupo que consiste en la SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 20 y SEQ ID NO: 32 y/o las CDR del VL de dicho inmunolígador pueden comprender CDR del grupo que consiste en la SEQ ID NO: 43, SEQ ID NO: 55 y SEQ ID NO: 66.
- En la presente se da a conocer además un inmunolígador que comprende al menos una CDR que tiene al menos un 75% 30 de similitud, preferentemente al menos un 75% de identidad, más preferentemente al menos un 80%, 85%, 90% 95%, incluso más preferentemente un 100% de identidad con una secuencia del grupo que consiste en la SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 21, SEQ ID NO: 33, SEQ ID NO: 44, SEQ ID NO: 56 y SEQ ID NO: 67.. El VH de dicho inmunolígador comprende las CDR del grupo que consiste en la SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 21 y SEQ ID NO: 33 y/o las CDR del VL de dicho inmunolígador pueden comprender CDR del grupo que consiste en la SEQ ID NO: 44, SEQ ID NO: 56 y SEQ ID NO: 67.
- En la presente se da a conocer además un inmunolígador que comprende al menos una CDR que tiene al menos un 75% 35 de similitud, preferentemente al menos un 75% de identidad, más preferentemente al menos un 80%, 85%, 90% 95%, incluso más preferentemente un 100% de identidad con una secuencia del grupo que consiste en la SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 22, SEQ ID NO: 34, SEQ ID NO: 45, SEQ ID NO: 57 y SEQ ID NO: 68.. El VH de dicho inmunolígador puede comprender las CDR del grupo que consiste en la SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 22 y SEQ ID NO: 34 y/o las CDR del VL de dicho inmunolígador pueden comprender CDR del grupo que consiste en la SEQ ID NO: 45, SEQ ID NO: 57 y SEQ ID NO: 68
- En la presente se da a conocer además un inmunolígador que comprende al menos una CDR que tiene al menos un 75% 40 de similitud, preferentemente al menos un 75% de identidad, más preferentemente al menos un 80%, 85%, 90% 95%, incluso más preferentemente un 100% de identidad con una secuencia del grupo que consiste en la SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 23, SEQ ID NO: 25, SEQ ID NO: 35, SEQ ID NO: 46, SEQ ID NO: 58 y SEQ ID NO: 69. El VH de dicho inmunolígador puede comprender las CDR del grupo que consiste en la SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 23 y SEQ ID NO: 35 y/o las CDR del VL de dicho inmunolígador pueden comprender CDR del grupo que consiste en la SEQ ID NO: 46, SEQ ID NO: 58 y SEQ ID NO: 69. Como alternativa, el VH de dicho inmunolígador puede comprender las CDR del grupo que consiste en la SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 25 y SEQ ID NO: 35 y/o las CDR del VL de dicho inmunolígador 45 pueden comprender CDR del grupo que consiste en la SEQ ID NO: 46, SEQ ID NO: 58 y SEQ ID NO: 69.
- En la presente se da a conocer además un inmunolígador que comprende al menos una CDR que tiene al menos un 75% 50 de similitud, preferentemente al menos un 75% de identidad, más preferentemente al menos un 80%, 85%, 90% 95%, incluso más preferentemente un 100% de identidad con una secuencia del grupo que consiste en la 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. El VH de dicho inmunolígador puede comprender las CDR del grupo que consiste en la SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 24 y SEQ ID NO: 36. Adicionalmente o como alternativa, el VL de dicho inmunolígador puede comprender CDR del grupo que consiste en la 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.
- El inmunolígador que se da a conocer en la presente neutraliza el VEGF humano y puede presentar reactividad cruzada 60 con VEGF de rata/ratón o una porción de estos.
- El inmunolígador puede comprender un anticuerpo o cualquier soporte de unión alternativo capaz de albergar CDR. Las CDR expuestas en las SEQ ID Nos: 2-72 se pueden injertar en cualquier soporte de unión adecuado utilizando cualesquier métodos reconocidos en la técnica (véanse, 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. Sci. U.S.A.* 86:10029-10033; la Patente 65

Estadounidense N.º 5.225.539 de Winter, y las Patentes Estadounidenses 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 inmunoligadores que se dan a conocer en la presente estén humanizados y, por tanto, son adecuados para aplicaciones terapéuticas.

- 5 En el caso de anticuerpos, las CDR de conejo expuestas en las SEQ ID Nos: 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, 10 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, las CDR expuestas en las SEQ ID Nos: 2-72 se pueden injertar en los armazones de anticuerpo humano derivados mediante el cribado de «control de calidad» que se da a conocer en el documento EP1479694. Las secuencias de 15 aminoácidos de armazones a modo de ejemplo para su uso en la invención se exponen en las SEQ ID Nos: 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 20 los anticuerpos de conejo donantes originales.
- 20 Por tanto, las CDR y/o motivos de CDR que se dan a conocer en la presente pueden estar presentes en una secuencia de armazón de la región variable de cadena pesada que tiene al menos un 80% de identidad secuencial, más preferentemente al menos un 85%, 90% 95%, incluso más preferentemente un 100% de identidad con la secuencia de la SEQ ID NO: 169. Tal como se describe además en la presente, la secuencia de armazón de la región variable de cadena 25 pesada puede comprender la SEQ ID NO: 170 o SEQ ID NO: 171.
- 25 Las CDR y/o motivos de CDR que se dan a conocer en la presente pueden estar presentes en una secuencia de armazón de la región variable de cadena ligera que tiene al menos un 85% de identidad secuencial, más preferentemente al menos un 90%, 95%, incluso más preferentemente un 100% de identidad con la secuencia de la SEQ ID NO: 167, más preferentemente que comprende la SEQ ID NO: 167 o SEQ ID NO: 168.
- 30 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 35 a través de una unión de disulfuro.
- 35 El inmunolígador, que se une específicamente a VEGF, puede comprender al menos una de una secuencia de aminoácidos VL o una VH. Se exponen secuencias de aminoácidos VH o VL a modo de ejemplo para su uso en los inmunoligadores de la divulgación en las SEQ ID Nos: 72-106 y 107-166, respectivamente.
- 40 En la presente se da a conocer además un inmunolígador que comprende un VH que tiene al menos un 80%, más preferentemente al menos un 85%, 90%, 95%, con la mayor preferencia un 100% de identidad con una secuencia seleccionada del grupo que consiste en la 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);
- 45 y/o un VL que tiene al menos un 80%, más preferentemente al menos un 85%, 90%, 95%, con la mayor preferencia un 100% de identidad con una secuencia seleccionada del grupo que consiste en la SEQ ID NO: 72, SEQ ID NO: 82 y SEQ ID NO: 93 (VL 60, VL 60min, VL 60max, respectivamente).
- 50 En la presente se da a conocer además un inmunolígador que comprende un VH que tiene al menos un 80%, más preferentemente al menos un 85%, 90%, 95%, con la mayor preferencia un 100% de identidad con una secuencia seleccionada del grupo que consiste en la SEQ ID NO: 109, SEQ ID NO: 120 y SEQ ID NO: 132 (VH 435, VH 435min y VH 435max, respectivamente);
- 55 y/o un VL que tiene al menos un 80%, más preferentemente al menos un 85%, 90%, 95%, con la mayor preferencia un 100% de identidad con una secuencia seleccionada del grupo que consiste en la SEQ ID NO: 73, SEQ ID NO: 83 y SEQ ID NO: 94 (VL 435, VL 435min y VL 435max, respectivamente).
- 60 Preferentemente, dicho inmunolígador tiene al menos un 80%, más preferentemente al menos un 85%, 90%, 95%, con la mayor preferencia un 100% de identidad con la SEQ ID NO: 175 (435max).
- 65 En la presente se da a conocer además un inmunolígador que comprende un VH que tiene al menos un 80%, más preferentemente al menos un 85%, 90%, 95%, con la mayor preferencia un 100% de identidad con una secuencia

seleccionada del grupo que consiste en la SEQ ID NO: 110, SEQ ID NO: 121 y SEQ ID NO: 133 (VH 453, VH 453min y VH 453max, respectivamente);

5 y/o un VL que tiene al menos un 80%, más preferentemente al menos un 85%, 90%, 95%, con la mayor preferencia un 100% de identidad con una secuencia seleccionada del grupo que consiste en la SEQ ID NO: 74, SEQ ID NO:84 y SEQ ID NO: 95 (VL 453, VL 453min y VL 453max, respectivamente).

10 En la presente se da a conocer además un inmunolígador que comprende un VH que tiene al menos un 80%, más preferentemente al menos un 85%, 90%, 95%, con la mayor preferencia un 100% de identidad con una secuencia seleccionada del grupo que consiste en la SEQ ID NO: 111, SEQ ID NO: 122 y SEQ ID NO: 134 (VH 375, VH 375min y VH 375max, respectivamente);

15 y/o un VL que tiene al menos un 80%, más preferentemente al menos un 85%, 90%, 95%, con la mayor preferencia un 100% de identidad con una secuencia seleccionada del grupo que consiste en la SEQ ID NO: 75, SEQ ID NO: 85 y SEQ ID NO:96 (VL 375, VL 375min y VL 375max, respectivamente).

20 En la presente se da a conocer además un inmunolígador que comprende un VH que tiene al menos un 80%, más preferentemente al menos un 85%, 90%, 95%, con la mayor preferencia un 100% de identidad con una secuencia seleccionada del grupo que consiste en la SEQ ID NO: 112, SEQ ID NO: 123 y 135 (VH 610, VH 610min y VH 610max, respectivamente);

25 y/o un VL que tiene al menos un 80%, más preferentemente al menos un 85%, 90%, 95%, con la mayor preferencia un 100% de identidad con una secuencia seleccionada del grupo que consiste en la SEQ ID NO: 76, SEQ ID NO: 86 y SEQ ID NO: 97 (VL 610, VL 610min y VL 610max, respectivamente).

30 En la presente se da a conocer además un inmunolígador que comprende un VH que tiene al menos un 80%, más preferentemente al menos un 85%, 90%, 95%, con la mayor preferencia un 100% de identidad con una secuencia seleccionada del grupo que consiste en la 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);

35 y/o un VL que tiene al menos un 80%, más preferentemente al menos un 85%, 90%, 95%, con la mayor preferencia un 100% de identidad con una secuencia seleccionada del grupo que consiste en la 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).

40 Tal como se describe en la presente, dicho inmunolígador puede tener al menos un 80%, más preferentemente al menos un 85%, 90%, 95%, con la mayor preferencia un 100% de identidad con la SEQ ID NO: 178 (578min), SEQ ID NO: 179 (578max) o SEQ ID NO: 180 (578minmax).

45 En la presente se da a conocer además un inmunolígador que comprende un VH que tiene al menos un 80%, más preferentemente al menos un 85%, 90%, 95%, con la mayor preferencia un 100% de identidad con una secuencia seleccionada del grupo que consiste en la SEQ ID NO: 114, SEQ ID NO: 125 y SEQ ID NO: 137 (VH 534, VH 534min y VH 534max, respectivamente);

50 y/o un VL que tiene al menos un 80%, más preferentemente al menos un 85%, 90%, 95%, con la mayor preferencia un 100% de identidad con una secuencia seleccionada del grupo que consiste en la SEQ ID NO: 78, SEQ ID NO: 88 y SEQ ID NO: 99 (VL 534, VL 534min y VL 534max, respectivamente).

55 En la presente se da a conocer además un inmunolígador que comprende un VH que tiene al menos un 80%, más preferentemente al menos un 85%, 90%, 95%, con la mayor preferencia un 100% de identidad con una secuencia seleccionada del grupo que consiste en la 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);

60 y/o un VL que tiene al menos un 80%, más preferentemente al menos un 85%, 90%, 95%, con la mayor preferencia un 100% de identidad con una secuencia seleccionada del grupo que consiste en la SEQ ID NO: 79, SEQ ID NO:89 y SEQ ID NO: 100 (VL 567, VL 567min y VL 567max, respectivamente).

65 Tal como se describe en la presente, dicho inmunolígador puede tener al menos un 80%, más preferentemente al menos un 85%, 90%, 95%, con la mayor preferencia un 100% de identidad con la SEQ ID NO: 177 (567min).

En la presente se da a conocer además un inmunolígador que comprende un VH que tiene al menos un 80%, más preferentemente al menos un 85%, 90%, 95%, con la mayor preferencia un 100% de identidad con una secuencia

seleccionada del grupo que consiste en la 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);

5 y/o un VL que tiene al menos un 80%, más preferentemente al menos un 85%, 90%, 95%, con la mayor preferencia un 100% de identidad con una secuencia seleccionada del grupo que consiste en la SEQ ID NO: 80, SEQ ID NO: 90 y SEQ ID NO: 101 (VL 509, VL 509min y VL 509max, respectivamente).

10 En la presente se da a conocer además un inmunolígador que comprende un VH que tiene al menos un 80%, más preferentemente al menos un 85%, 90%, 95%, con la mayor preferencia un 100% de identidad con una secuencia seleccionada del grupo que consiste en la 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);

15 y/o un VL que tiene al menos un 80%, más preferentemente al menos un 85%, 90%, 95%, con la mayor preferencia un 100% de identidad con una secuencia seleccionada del grupo que consiste en la 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).

Tal como se describe en la presente, dicho inmunolígador puede tener al menos un 80%, más preferentemente al menos un 85%, 90%, 95%, con la mayor preferencia un 100% de identidad con la SEQ ID NO: 176 (511_max).

20 25 En la presente se da a conocer un inmunolígador, que se une específicamente a VEGF, que comprende una secuencia de aminoácidos con similitud sustancial con una secuencia de aminoácidos expuesta en las SEQ ID Nos: 2-166 y en las SEQ ID Nos: 175-180, y donde el inmunolígador conserva esencialmente o mejora las propiedades funcionales deseadas del inmunolígador anti-VEGF descrito. Los porcentajes de similitud preferidos incluyen, pero no se limitan a, al menos un 50%, 60%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90% o 95% de identidad.

30 35 En la presente se da a conocer un inmunolígador, que se une específicamente a VEGF, que comprende una secuencia de aminoácidos con identidad sustancial con una secuencia de aminoácidos expuesta en las SEQ ID Nos: 2-166 y en las SEQ ID Nos. 175-180, y donde el inmunolígador conserva o mejora las propiedades funcionales deseadas del inmunolígador anti-VEGF descrito. Los porcentajes de identidad preferidos incluyen, pero no se limitan a, al menos un 50%, 60%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90% o 95% de identidad.

40 45 En la presente se da a conocer un inmunolígador, que se une específicamente a VEGF, que comprende una secuencia de aminoácidos con sustituciones conservadoras en relación con una secuencia de aminoácidos expuesta en las SEQ ID Nos: 2-166 y en las SEQ ID Nos. 175-180, y donde el inmunolígador conserva o mejora las propiedades funcionales deseadas del inmunolígador anti-VEGF descrito.

Tal como se describe en la presente, el inmunolígador anti-VEGF se puede unir específicamente a VEGF humano y/o de rata/ratón.

50 55 Los inmunolígados que se unen específicamente a VEGF humano pueden presentar o no reactividad cruzada con moléculas de VEGF de otras especies, por ejemplo, VEGF de ratón, VEGF de rata, VEGF de conejo o VEGF de cobaya. Tal como se describe en la presente, el inmunolígador anti-VEGF se puede unir específicamente a VEGF humano y/o de rata/ratón.

Los inmunolígados que se unen específicamente a VEGF humano pueden estar madurados por afinidad.

60 65 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. 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). Se describen otros conectores que se pueden utilizar para la presente invención 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), *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 VH 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 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.

Los anticuerpos o derivados de anticuerpo de la presente divulgación pueden tener afinidades por VEGF humano con constantes de disociación K_d en un intervalo de $10^{-14}M$ a $10^{-5}M$. Tal como se describe en la presente, el anticuerpo o derivados de anticuerpo de la presente divulgación pueden tener afinidades por VEGF humano con una K_d de ≤ 1 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.

5 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.

10 **Inmunoligadores que se unen a los mismos epítopos en VEGF**

En otro aspecto, la invención se refiere a anticuerpos que se unen a un epítopo en VEGF reconocido por un anticuerpo que comprende una cualquiera de las secuencias de aminoácidos expuestas en la SEQ ID No 2-211. Tales anticuerpos se pueden identificar sobre la base de su capacidad de presentar competencia cruzada con un anticuerpo que comprende 15 una cualquiera o varias de las secuencias de aminoácidos expuestas en la SEQ ID No 2-211 en ensayos de unión a VEGF estándar que incluyen, pero no se limitan a, ELISA. La capacidad de un anticuerpo de prueba para inhibir la unión a VEGF humano de un anticuerpo que comprende una cualquiera o varias de las secuencias de aminoácidos expuestas en la SEQ ID No 2-211 demuestra que el anticuerpo de ensayo puede presentar competencia cruzada, por tanto, interactuar 20 con un epítopo superpuesto en VEGF humano como un anticuerpo que comprende una cualquiera o varias de las secuencias de aminoácidos expuestas en la SEQ ID No 2-211.

Adicionalmente o como alternativa, tales anticuerpos también se pueden identificar utilizando técnicas de mapeo epítópico 25 estándar para determinar si se unen a los mismos inmunógenos peptídicos. También se pueden emplear técnicas de modelado estructural para definir adicionalmente los determinantes moleculares exactos de la interacción anticuerpo/VEGF, que incluyen, pero no se limitan a, RMN, cristalografía de rayos X, modelado por ordenador o tomografía proteínica (Banyay *et al.*, 2004 *ASSAY and Drug Development Technologies* (2), 5, Páginas 516-567). De hecho, la estructura cristalina de VEGF se ha resuelto y se conocen los residuos aminoacídicos de la superficie que 30 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 de VEGF disponible en la técnica, identificar anticuerpos que se unen a un epítopo en VEGF reconocido por los anticuerpos que comprenden una cualquiera o varias de las secuencias de aminoácidos expuestas en la SEQ ID No 2-211 entra dentro de las competencias de la técnica.

35 Los anticuerpos que se unen a un epítopo en VEGF reconocido por un anticuerpo que comprende una cualquiera o varias de las secuencias de aminoácidos expuestas en la SEQ ID No 2-211 se pueden unir a 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} .

40 Los anticuerpos que se unen a un epítopo en VEGF reconocido por un anticuerpo que comprende una cualquiera una o más de las secuencias de aminoácidos expuestas en la SEQ ID No 2-211 pueden unirse específicamente a VEGF humano y no presentar reactividad cruzada con moléculas de VEGF de otras especies, por ejemplo, VEGF de ratón, VGEF de rata, VEGF de conejo o VEGF de cobaya.

45 Los anticuerpos que se unen a un epítopo en VEGF reconocido por un anticuerpo que comprende una cualquiera o varias de las secuencias de aminoácidos expuestas en la SEQ ID No 2-211 pueden presentar reactividad cruzada con moléculas de VEGF de otras especies, por ejemplo, VEGF de ratón, VGEF de rata o VEGF de conejo.

Variantes optimizadas

50 Los anticuerpos de la divulgación se pueden optimizar además para que tengan propiedades funcionales mejoradas, p. ej., solubilidad y/o estabilidad mejoradas.

En la presente se dan a conocer además anticuerpos optimizados de acuerdo con la metodología «consenso funcional» que se da a conocer en el documento WO2008/110348, titulado «Sequence Based Engineering and Optimization of Single Chain Antibodies», presentado el 12 de marzo de 2008.

55 Por ejemplo, los inmunoligadores anti-VEFG de la divulgación se pueden comparar con una base de datos de scFv seleccionados funcionalmente para identificar posiciones de residuos aminoacídicos que son ya sea más o menos tolerantes a la variabilidad que la posición o posiciones correspondientes en el inmunoligador anti-VEGF, lo cual indica así que tal posición o posiciones de residuos identificadas pueden ser adecuadas para modificarlas a fin de mejorar una funcionalidad tal como la estabilidad y/o solubilidad.

60 Se describen posiciones de armazón para la sustitución a modo de ejemplo en el documento WO2009/000099, titulado «Methods of Modifying Antibodies, and Modified Antibodies with Improved Functional Properties» y publicado el 31 de diciembre de 2008, y el documento WO2009/000098, titulado «Sequence Based Engineering and Optimization of Single Chain Antibodies» y publicado el 31 de diciembre de 2008. Por ejemplo, se pueden introducir una o más de las siguientes

sustituciones en una posición de aminoácido (se hace referencia a la numeración de AHo para cada una de las posiciones de aminoácido enumeradas a continuación) en la región variable de cadena pesada de un inmunolígador de la divulgación:

- (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;
- (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;
- (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;
- (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;
- (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;
- (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;
- (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
- (z) N, S o A, más preferentemente N o S, incluso más preferentemente N, en la posición de aminoácido 107.

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

- (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;
- (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;
- (dd) V, L, I o M, más preferentemente V o L, en la posición de aminoácido 4;
- 5 (ee) S, E o P, más preferentemente S o E, incluso más preferentemente S, en la posición de aminoácido 7;
- (ff) T o I, más preferentemente I, en la posición de aminoácido 10;
- 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;
- (ii) T, S o A, más preferentemente T o S, incluso más preferentemente T, en la posición de aminoácido 14;
- 15 (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;
- 20 (ll) R o Q, más preferentemente Q, en la posición de aminoácido 24;
- (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;
- 25 (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;
- 30 (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;
- (ss) I, V o T, más preferentemente V o T, R, incluso más preferentemente T, en la posición de aminoácido 74;
- 35 (tt) R, Q o K, más preferentemente R o Q, incluso más preferentemente R, en la posición de aminoácido 82;
- (uu) L o F, más preferentemente F, en la posición de aminoácido 91;
- 40 (vv) G, D, T o A, más preferentemente G, D o T, incluso más preferentemente T, en la posición de aminoácido 92;
- (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
- 45 (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.
- 50 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, 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.
- 55 En la presente se dan a conocer además inmunoligadores que comprenden una o más de las mutaciones que mejoran la solubilidad y/o estabilidad descritas en el documento WO 2009/155723, titulado «Solubility Optimization of Immunobinders». 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 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.

Hibridomas que expresan anticuerpos anti-VEGF de conejo

5

En otro aspecto, la invención se refiere a un hibridoma que expresa un anticuerpo monoclonal que comprende una cualquiera o varias de las secuencias de aminoácidos expuestas en las SEQ ID Nos 72-81 y SEQ ID Nos 107-117. Los métodos para generar hibridomas a partir de linfocitos B de conejo son muy conocidos en la técnica y se dan a conocer, por ejemplo, en la solicitud de patente estadounidense N.º 2005/0033031.

10

Producción de inmunoligadores anti-VEGF

15

Los anticuerpos o derivados de anticuerpo de la presente divulgación se pueden generar 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 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.

20

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; la Patente Estadounidense N.º 5.225.539 de Winter, y las Patentes Estadounidenses N.ºs 5.530.101; 5.585.089; 5.693.762 y 6.180.370 de Queen et al., así como los que se dan a conocer en el documento WO2009/155723, titulado «Humanization of Rabbit Antibodies Using Universal Antibody Frameworks».

25

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).

30

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 clonian 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. Se ha de entender que los anticuerpos de la presente invención comprenden las secuencias que se dan a conocer en lugar de que consistan en ellas. Por ejemplo, las estrategias de clonación pueden requerir 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 de iniciación 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 una realización preferida de la presente invención, se elige un vector de expresión para la expresión periplásmica 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 citoplásmica 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 técnica.

35

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 periplásmica 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 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 anticuerpo de la presente invención se pueden caracterizar 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.

5 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 una concentración eficaz casi máxima de VEGF (0,08 nM). Preferentemente, el anticuerpo tiene un valor de la dosis eficaz 50 (DE50) de no más de aproximadamente 5 nM, preferentemente no más de aproximadamente 1 nM, preferentemente no más de aproximadamente 1 nM, preferentemente no más de aproximadamente 0,5 nM y con la mayor preferencia 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, en estas concentraciones el anticuerpo es capaz de inhibir el crecimiento de células endoteliales inducido por VEGF *in vitro* en, p. ej., un 50% o más.

10

Moléculas biespecíficas

15 En otro aspecto, la presente invención se refiere a moléculas biespecíficas que comprenden un anticuerpo anti-VEGF, o un fragmento de este, de la divulgación. Un anticuerpo de la invención, o porciones de unión a antígeno de este, puede derivatizarse o unirse a otra molécula funcional, p. ej., otro péptido o proteína (p. ej., otro anticuerpo o ligando para un receptor) para generar una molécula biespecífica que se une a al menos dos sitios de unión o moléculas diana diferentes. El anticuerpo de la invención 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 por el término «molécula biespecífica» tal como se utiliza en la presente. Para crear una molécula biespecífica de la invención, un anticuerpo de la invención 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 para un tumor o específicos para un patógeno, péptido o mimético de unión, de modo que se produzca una molécula biespecífica. Por consiguiente, la presente invención 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 30 Las moléculas biespecíficas pueden comprender una especificidad de unión al menos un anticuerpo, o un fragmento de anticuerpo de este, 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 tal como se describe en la Patente Estadounidense N.º 4946778 de Ladner *et al.*

25 35 Aunque se prefieren los anticuerpos monoclonales humanos, otros anticuerpos que se pueden emplear en las moléculas biespecíficas de la invención son anticuerpos monoclonales murinos, químéricos y humanizados.

40 Las moléculas biespecíficas de la presente invención pueden prepararse conjugando las especificidades de unión constitutivas, utilizando métodos conocidos en la técnica. Por ejemplo, cada especificidad de unión de la molécula biespecífica se puede generar por separado y después conjugarlas entre sí. Cuando las especificidades de unión son proteínas o péptidos, se pueden utilizar diversidad de agentes de acoplamiento o reticulación para la conjugación covalente. Los ejemplos de agentes de reticulación 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*-maleimidometyl)ciclohexano-1-carboxilato de sulfosuccinimidilo (sulfo-SMCC) (véanse, 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).

50 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.

55 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 de la invención puede ser una molécula monocatenaria que comprende un anticuerpo monocatenario y un determinante de unión, o una molécula biespecífica monocatenaria que comprende 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.

5 La unión de las moléculas biespecíficas a sus dianas específicas se puede confirmar mediante, por ejemplo, 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 particular interés mediante el empleo de un reactivo marcado (p. ej., un anticuerpo específico para el complejo de interés). Por ejemplo, los complejos de VEGF-anticuerpo se pueden detectar utilizando, p. ej., un anticuerpo enlazado a una enzima o fragmento de anticuerpo que reconoce y se une específicamente a los complejos de anticuerpo-VEGF. Como alternativa, los complejos se pueden detectar utilizando cualquiera de diversidad de inmunoensayos diferentes. Por ejemplo, el anticuerpo se puede marcar radioactivamente y utilizar 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, marzo, 1986). El isótopo radioactivo se puede detectar por medios tales como el uso de un contador de y o un contador de centelleo o mediante autoradiografía.

10

15

Inmunoconjungados

20 En otro aspecto, la presente invención se refiere a un anticuerpo anti-VEGF, o un fragmento de este, conjugado con un resto terapéutico, tal como una citotoxina, un fármaco (p. ej., un inmunosupresor) o una radiotoxina. Tales conjugados se denominan en la presente «inmunoconjungados». Los inmunoconjungados que incluyen una o más citotoxinas se denominan «inmunotoxinas». Una citotoxina o agente citotóxico incluye cualquier agente que sea perjudicial para (p. ej., destruye) las células. Los ejemplos incluyen taxol, citocalasina B, gramicidina D, bromuro de etidio, emetina, mitomicina, etopósido, tenopósido, vincristina, vinblastina, colchicina, doxorubicina, daunorubicina, dihidroxiantracindiona, 25 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-fluorouracilo dacarbazine), agentes alquilantes (p. ej., mecloretamina, tioepa clorambucilo, melfalán, carmustina (BSNU) y lomustina (CCNU), ciclofosfamida, 30 busulfano, dibromomanitol, estreptozotocina, mitomicina C y *cis*-dclorodiamina platino (II) (DDP) cisplatino), antraciclinas (p. ej., daunorubicina (previamente daunomicina) y doxorubicina), antibióticos (p. ej., dactinomicina (previamente actinomicina), bleomicina, mitramicina y antramicina (AMC)), y agentes antimitóticos (p. ej., vincristina y vinblastina).

35 Otros ejemplos preferidos de citotoxinas terapéuticas que se pueden conjugar con un anticuerpo de la invención incluyen duocarmicinas, calicheamicinas, maitansinas y auristatinas, y derivados de estas. Un ejemplo de un conjugado de anticuerpo con caliqueamicina está disponible en el mercado (Mylotarg™; Wyeth-Ayerst).

40 Las citotoxinas se pueden conjugar con anticuerpos de la invención utilizando la tecnología de conectores disponible en la técnica. 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).

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 de la presente invención también se pueden conjugar con un isótopo radioactivo 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. Se comercializan ejemplos de radioinmunoconjungados, que incluyen Zevalin™ (IDEC Pharmaceuticals) y Bexxar™ (Corixa Pharmaceuticals), y se pueden utilizar métodos similares para preparar radioinmunoconjungados utilizando los anticuerpos de la invención.

60 Los conjugados de anticuerpo de la invención se pueden utilizar para modificar una respuesta biológica dada, y no se ha interpretar 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.

65

Las técnicas para conjugar un resto terapéutico de este tipo con anticuerpos son muy conocidas, véanse, 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).

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 sí 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.

Se consideran todas las dosis y pautas autorizadas por la FDA adecuadas para su uso con Lucentis.

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 en combinación con otro agente que es eficaz con esos fines, tal como el factor de necrosis tumoral (TNF), un anticuerpo capaz de inhibir o neutralizar la actividad angiogénica del factor de crecimiento fibroblástico (FGF) o el factor de crecimiento hepatocítico (HGF), un anticuerpo capaz de inhibir o neutralizar las actividades coagulantes del factor tisular, proteína C o proteína S (véase Esmon *et al.*, documento WO 91/01753, publicado el 21 de febrero de 1991), un anticuerpo capaz de unirse al receptor de HER2 (véase Hudziak *et al.*, documento WO 89/06692, publicado el 27 de julio de 1989), o uno o más agentes terapéuticos convencionales tales como, por ejemplo, agentes alquilantes, fotocoagulantes (tales como verteporfin), 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.

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 que se dan a conocer en *Current Protocols in Immunology, supra*, por ejemplo. 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 una 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 Estadounidense N.º 4.737.456), luciferina, 2,3-dihidroftalazinodionas, 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 para conjugar 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:
- 30 (i) Peroxidasa de rábano picante (HRPO) con hidrogenoperoxidasa como sustrato, donde la hidrógeno-peroxidasa oxida un precursor de tinte (p. ej., *ortho*-fenilendiamina (OPD) o clorhidrato de 3,3',5,5'-tetrametilbenzidina (TMB));
- (ii) fosfatasa alcalina (AP) con *para*-nitrofenilfosfato como sustrato cromógeno; y
- 35 (iii) .beta.-D-galactosidasa (.beta.-D-Gal) con un sustrato cromógeno (p. ej., *P*-nitrofenil-.beta.-D-galactosidasa) o el sustrato fluorógeno 4-metilumbeliferil-.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.
- 40 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 inmunoprecipitación. Zola, *Monoclonal Antibodies: A Manual of Techniques*, págs.147-158 (CRC Press, Inc. 1987).
- 45 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.
- 50 50 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. Véase, p. ej., la Pat. Estadounidense 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-immunoglobulina 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.
- 60 60 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.
- 65 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.

5 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 (p. ej., un precursor de sustrato que proporciona el cromóforo o fluoróforo detectable). Además, se pueden incluir otros aditivos tales como estabilizadores, tampones (p. ej., 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 se pueden proporcionar como polvos secos, habitualmente liofilizados, que incluyen excipientes que al disolverse proporcionarán una disolución de los reactivos con la concentración apropiada.

10

Preparados farmacéuticos

15 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 permita 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 aceptables» son aquellos que se pueden administrar razonablemente a un sujeto que es un mamífero para proporcionar una dosis eficaz del principio activo empleado.

20

25 Una formulación «estable» es una en la que el anticuerpo o derivado de anticuerpo de esta retiene 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 de al menos 3 meses a 2 años. Además, la formulación es preferentemente estable después de congelar (hasta, p. ej., -70° C) y descongelar la formulación.

30

30 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 desnaturalización 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.

35

35 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.

40

45 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.

50

50 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.

55

55 Un «poliol» es una sustancia con múltiples grupos hidroxilo, e incluye azúcares (azúcares reductores y no reductores), alcoholes 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 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 (p. ej., -20° C) de modo

tal 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.

- 5 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. Los ejemplos de tampones que controlarán el pH en este intervalo 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 fosfato.

10 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 cualquier afección que 15 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.

20 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 octadecildimetilbencilamonio, 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 benzetonio. Otros tipos de conservantes incluyen alcoholes aromáticos tales como fenol, alcohol butílico y bencílico, alquilparabenos tales como metil- o propilparabeno, catecol, resorcinol, ciclohexanol, 3-pentanol y *m*-cresol. El conservante más preferido en la presente es el alcohol bencílico.

25 25 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 (p. ej., disolución salina tamponada neutra o disolución salina tamponada con fosfato), etanol, aceite mineral, aceite vegetal, sulfóxido de dimetilo, 30 carbohidratos (p. ej., glucosa, manosa, sacarosa o dextranos), manitol, proteínas, adyuvantes, polipéptidos o aminoácidos tales como glicina, antioxidantes, agentes quelantes tales como EDTA o glutationa 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.

35 35 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 albúmina sérica (p. ej., humana o bovina), albúmina de huevo, péptidos, polilisina y polisacáridos tales como aminodextrano y poliamidoaminas. Los portadores 40 también incluyen materiales de soporte sólidos tales como perlas y micropartículas que comprenden, por ejemplo, polilactato poliglicolato, polí(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.

45 45 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 composiciones proporcionadas en la 50 presente se pueden formular como un liofilizado. El término parenteral, tal como se utiliza en la presente, incluye la inyección subcutánea, intradérmica, intravascular (p. ej., intravenosa), intramuscular, raquídea, intracranial, intratecal e intraperitoneal, así como cualquier técnica de inyección o infusión similar.

55 55 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.

60 65 Las composiciones farmacéuticas se pueden formular como formulaciones de liberación sostenida (es decir, una formulación tal como una cápsula que efectúa una liberación lenta de modulador después de la 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 humor corporal (p. ej., sangre, plasma, suero, LCR, líquido sinovial, linfa, líquido intersticial celular, lágrimas u orina) que es suficiente para unirse de forma detectable a 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 contiene una cantidad eficaz de al menos un anticuerpo o derivado de anticuerpo tal como se describe en la presente e instrucciones (p. ej., etiquetado) que indican que la composición contenida se ha de utilizar para tratar una enfermedad/trastorno que responde a un anticuerpo o derivado de anticuerpo después de la administración en el 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 polioxialquenilo 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 deseé, pero generalmente estará en un intervalo de peso molecular promedio de 500Da a 50 000Da. Para la aplicación local donde el anticuerpo se diseña para penetrar el tejido, un peso molecular preferido del polímero es de aproximadamente 5000Da. La molécula polimérica se puede acoplar al anticuerpo, en particular al extremo carboxiterminal de la cadena pesada del fragmento Fab a través un péptido bisagra unido covalentemente tal como se describe en el documento WO0194585. 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 tal 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 aproximadamente 8,0, preferentemente de aproximadamente 5,5 a aproximadamente 7. Los ejemplos de tampones que controlarán el pH dentro de este intervalo incluyen tampones de acetato (p. ej., 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 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 cantidad menor de un monosacárido (p. ej., manitol), en comparación con un disacárido (tal como trehalosa).

5 También se añade un tensioactivo a la formulación de anticuerpo o derivado de anticuerpo. Los tensioactivos a modo de ejemplo 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 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%.

10 15 En una realización, la formulación contiene los agentes identificados anteriormente (es decir, anticuerpo o derivado de anticuerpo, tampón, poliol y tensioactivo) y está esencialmente exenta de uno o más conservantes, tales como alcohol bencílico, fenol, *m*-cresol, clorobutanol y benzetonio 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 20 estabilizadores farmacéuticamente aceptables diferentes tales como los descritos en *Remington's 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 son atóxicos para los receptores en las dosificaciones y concentraciones empleadas e incluyen: agentes tamponantes adicionales, codisolventes, 25 antioxidantes que incluyen ácido ascórbico y metionina, agentes quelantes tales como EDTA, complejos metálicos (p. ej., complejos de proteína-Zn), polímeros biodegradables tales como poliésteres, y/o contraiones formadores de sales tales como sodio.

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

35 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.

40 45 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.

50 55 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.

Se consideran las dosis y pautas autorizadas por la FDA adecuadas para su uso con Lucentis.

55 **Artículos de fabricación**

60 En la presente también se da a conocer un artículo de fabricación que comprende un recipiente que contiene la formulación farmacéutica acuosa de la presente divulgación y proporciona opcionalmente 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 virlo 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, o asociada con, el recipiente 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, p. ej., 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

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**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.

5 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.

10 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 Abs con afinidad mayor que la inmunización de ratón.

15 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 solamente potencial inmunógeno leve para 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. 20 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).

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

- 25 A. Preinmunización de conejos con VEGFA₁₆₅ 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 la estructura de cristal). 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.
- 30 B. Preinmunización de ratones con VEGFA₁₆₅ 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 la estructura de cristal). 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.
- 35 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.
- 40 D. Inmunización con VEGFA₁₆₅ completo en conejos.

EJEMPLO 2

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

Injerto de CDR de conejo

50 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

60 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

5 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 influentes 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-10 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 15 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

20 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

25 Los scFv descritos y caracterizados en la presente se produjeron tal como se indica a continuación. Las secuencias VL humanizadas (SEQ ID NOs:82-106) se conectaron con secuencias VH humanizadas (SEQ ID NOs:118-166) a través del conector de la 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). Los insertos de ADN resultantes se clonaron en el vector de expresión 30 bacteriano pGMP002 a través de los sitios de restricción Ncol e 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 sitúa 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 extrajeron e 35 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 e 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 para ESBA105 tal como se describe en el Ejemplo 1 del documento WO2008006235.

40 EJEMPLO 3

ANÁLISIS DE LA UNIÓN A BIACORE DE SCFV ANTI-VEGF

45 En este ejemplo, se evaluó la capacidad de unión a Biacore de scFv y se midió la afinidad de unión utilizando el método de resonancia de plasmones superficiales a modo de ejemplo con BIACore™-T100. Las proteínas VEGF, evaluadas para determinar la unión a estos scFv candidatos, en este ejemplo y ejemplos posteriores incluyen VEGF₁₆₅ humano recombinante (PeproTech EC Ltd.), VEGF₁₂₁ humano recombinante (PeproTech EC Ltd.), VEGF₁₁₀ humano recombinante (ESBATech 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.) expresados en *Escherichia coli* purificados. Para el experimento de resonancia de plasmones superficiales, se activaron chips biosensores de 50 dextrano carboximetilado (CM4, GE Healthcare) con clorhidrato de *N*-etil-*N'*-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida y *N*-hidroxisuccinimidada 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 amídico estándar. La diversidad de respuestas obtenidas con estas 55 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 concentraciones diferentes 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, 0,005% de tensioactivo P20) en las cubetas de lectura a una velocidad de flujo de 30 μ l/min durante 5 min. Se permitió que la disociación de scFv anti-VEGF del VEGF en el chip CM4 transcurriera durante 10 min a 25 °C. Se generaron sensogramas para cada muestra de scFv anti-VEGF después de la corrección para la cubeta de referencia en línea seguida 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 60 disociación (K_d) se calcularon usando el software BIACORE T100.

disociación aparente (K_D) se calcularon utilizando el modelo de unión de Langmuir en correspondencia uno a uno con el programa informático de evaluación BIACore T100, versión 1.1.

Como un resultado a modo de ejemplo, algunos scFv anti-VEGF candidatos cabeza de serie 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 se describe en ejemplos posteriores, también se muestra en la Tabla 7. Las curvas cinéticas de algunos candidatos cabeza de serie a modo de ejemplo, p. ej., 511max y 578max, para su unión a hVEGF₁₆₅ se ilustran en la Figura 1. También se determinaron sus constantes de afinidad (K_d , K_a y K_D). Algunos candidatos cabeza de serie también presentan especificidad de especie en su unión a diferentes proteínas VEGF de fuentes diferentes. Por ejemplo, algunos datos de afinidad medidos a pH5 utilizando VEGF₁₆₄ de ratón y de rata como compañero de unión se muestran en las Tablas 8 a y b. Un scFv candidato cabeza de serie a modo de ejemplo, 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 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.

A parte de la especificidad de especie en su unión a VEGF de organismos diferentes, muchos scFv candidatos cabeza de serie también presentan afinidades de unión diferenciadas hacia isoformas diferentes de VEGF. Por ejemplo, los datos de afinidad medidos 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.

La presente invención también da a conocer derivados que se originan a partir de los scFv anti-VEGF candidatos cabeza de serie, que se mencionan anteriormente. Algunos derivados cabeza de serie del candidato 578 y 511, tal como se enumeran en la Tabla 10, se ejemplifican por su afinidad y potencia (medidas a pH 5,0). En este experimento, la medición de Biacore se utilizó para determinar la afinidad de estos derivados hacia hVEGF₁₆₅, mientras que el ELISA de competición y/o el ensayo con HUVEC para hVEGFR2 se utilizaron para definir su potencia para inhibir 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.

Para derivados de candidatos cabeza de serie, sus caracterizaciones biofísicas se determinaron y ejemplificaron en las Figuras 5-7 y la tabla 11. Estas características incluyen, tal como se ejemplifica en la tabla 11, la T_m determinada por FTIR, el porcentaje de pérdida de proteína o lamina β después de la 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: resumen de la afinidad y potencia de candidatos cabeza de serie

ID	Proteína N.º	Actividad rel. en ELISA comp. para hVEGFR2 (CE50 _{luc} [nM]/CE50 _{prueba} [nM])	Actividad rel. en ELISA comp. para hVEGFR1 (CE50 _{luc} [nM]/CE50 _{prueba} [nM])	Actividad rel. en ensayo con HUVEC con 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-maxII	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	15,7/54,5	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

(continua en la página siguiente)

ID	Mediciones de Biacore (pH 5)			Mediciones de Biacore (pH 7.4)				
	VEGF ₁₆₅	ka (1/Ms)	kd (1/s)	KD (M)	VEGF ₁₆₅	ka (1/Ms)	kd (1/s)	KD (M)
375-min	9.27E+05	5.01E-03	5.41E-09	>E+08	3.86E+00	2.42E-01	NA	NA
375-max	2.44E+06	6.55E-03	2.68E-09	5.09E+07	2.42E-01	4.74E-09	3.06E-09	3.06E-09
509-min	6.23E+05	1.14E-03	1.82E-09	3.52E+06	1.08E-02	3.78E-10	2.61E-09	2.61E-09
509-max	2.26E+06	2.72E-03	1.21E-09	1.42E+06	5.37E-04	8.85E-04	1.31E-09	1.31E-09
509-maxII	8.38E+05	2.82E-03	3.37E-09	7.59E+06	1.98E-02	6.85E-05	8.56E-05	8.56E-05
511-min	5.05E+05	1.28E-03	2.53E-09	6.75E+05	2.02E-04	1.81E-05	ND	ND
511-max	6.59E+05	4.40E-05	6.67E-11	8.00E+05	1.43E-04	1.43E-10	ND	ND
534-min C-His	2.71E+05	9.21E-03	3.41E-08	ND	2.62E-03	2.47E-09	ND	ND
534-max	1.88E+06	1.73E-02	9.21E-09	1.06E+06	7.00E-04	6.31E-10	ND	ND
567-min	2.01E+06	4.61E-04	2.30E-10	1.11E+06	1.67E-04	1.43E-10	ND	ND
567-max	1.20E+06	2.26E-04	1.88E-10	1.17E+06	2.02E-04	1.81E-10	ND	ND
578-min	1.14E+06	1.03E-02	9.01E-09	1.11E+06	3.76E-05	2.37E-11	ND	ND
578-max	7.00E+05	3.07E-04	4.39E-10	1.58E+06	No hay unión	No hay unión	ND	ND
610-min	2.51E+05	2.65E-03	1.06E-08	>E+08	3.57E+01	NA	ND	ND
610-max	5.09E+05	6.01E-04	1.18E-09	No hay unión	1.43E-02	2.89E-08	ND	ND
435-min	No hay unión	No hay unión	No hay unión	4.53E-09	1.13E+06	1.04E-04	9.22E-11	9.22E-11
435-max	1.67E+05	7.55E-04	No hay unión	No hay unión	No hay unión	No hay unión	No hay unión	No hay unión

(tabla 7, continuación)

Tabla 8a: especificidad de especie de candidatos cabeza de serie 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
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 candidatos a desarrollo seleccionados

ID	Proteína N.º	Mediciones de Biacore para VEGF164 de ratón			Valores relativos para VEGF164 de ratón	
		ka (1/Ms)	kd (1/s)	KD (M)	(kd hVEGF165/kd _m V EGF164)	(Kd hVEGF165/Kd _m VEGF164)
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 T84N_V89L_DHP	1017	1,47E+06	2,16E-03	1,46E-09	1,4	1,8

(continuación)

ID	Proteína N.º	Mediciones de Biacore para VEGF164 de rata			Valores relativos para VEGF164 de ratón	
		ka (1/Ms)	kd (1/s)	KD (M)	(kd hVEGF165/kd _m V EGF164)	(Kd hVEGF165/Kd _m VEGF164)
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 T84N_V89L_DHP	1017	1,04E+05	1,90E-03	1,82E-09	1,6	1,5

Tabla 9: Unión de candidatos cabeza de serie seleccionados a isoformas de VEGF (VEGF121 humano y hVEGF110)

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	no hay unión
509-max	7,42E+05	2,49E-04	3,35E-10	no hay unión
509-maxII	8,97E+05	1,23E-03	1,37E-09	no hay unión
511-min	7,78E+05	9,63E-04	1,24E-09	no hay unión
511-max	4,67E+05	9,97E-05	2,14E-10	no hay unión
567-min	1,89E+06	4,54E-05	2,41E-11	no hay unión
567-max	1,13E+06	5,76E-05	5,11E-11	no hay unión
578-min	9,61E+05	8,80E-03	9,16E-09	no hay unión
578-max	5,87E+05	5,58E-04	9,50E-10	no hay unión

Tabla 10: Resumen de la afinidad y potencia de derivados cabeza de serie (578 y 511)

ID	Proteína N. ^o	Actividad rel. en ELISA comp. para hVEGR2 (CE50 _{Luc} [nM]/CE50 prueba [nM])	Actividad rel. en ensayo con (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						
T84N_V89A_DHP		ND	ND	ND	ND	ND
578max synth FW opt	950	ND	ND	1,35E+06	5,86E-04	4,33E-10
578min_max_synthFW	997	7,2	ND	1,23E+06	9,89E-04	8,03E-10
578max_min_synthFW	990	ND	ND	1,55E+06	5,31E-03	3,42E-09
578min_max_FW1. synth	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: Resumen de la caracterización biofísica de derivados cabeza de serie (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 synth FW opt	950	63,62	54,06%	97,85%
578min_max_synthFW	997	63,25	50,89%	98,02%

578max_min_synthFW	990	ND	ND	ND
578min_max_FW1. synth	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 [CE50 en % de saturación de NH4(SO4)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	27,88	24	+++
T84N_V89L	ND	22	+++
578min_max	ND	36	+++
T84N_V89A	ND	30	+++
578min_max	30,80	19,4	++
T84N_V89A_DHP	30,70	24	+++
578max synth FW opt	28,30	0,5	++
578min_max_synthFW	30,05	28	+++
578max_min_synthFW	ND	13,5	+++
578min_max_FW1. synth	25,10	6,47	+++
511-min	ND	3,75	+++
511-max	8,62	7	+++
511min_max	ND	20,70	16,5
511max_min	ND		+++
567min			+++

Algunos derivados, como los que se enumeran en la Figura 6, se compararon por su desnaturalización y precipitación después de estrés térmico (p. ej., sometidos 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

Nombre de la muestra	% de lámina beta	Nanodrop (mg/ml)
991	99,4	99,2
802	100,4	96,7
821	100,6	93,5
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**

10

Para scFv anti-VEGF candidatos o sus derivados que se dan a conocer en la presente invención, 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).

15

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, se recubrió con VEGF₁₆₅ humano una placa de ELISA Maxisorp de 96 pocillos (Nunc) con una concentración de 0,05 µg/ml en PBS y se bloqueó utilizando PBS con un 0,1% de BSA y un 0,2% de Tween 20 (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

5 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 contra 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-dosis de los scFv. La potencia a modo de ejemplo de candidatos cabeza de serie o sus derivados, medida mediante un ensayo de bloque del receptor VEGFR2, se enumera en la Tabla 7 y 9.

10 Para el ensayo de bloqueo del receptor VEGFR1, se recubrió con VEGF₁₆₅ humano una placa de ELISA Maxisorb de 96 pocillos (Nunc) con una concentración de 0,0125 µg/ml en PBS y se bloqueó utilizando PBS con un 0,4% de BSA y un 0,1% de Tween 20. 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 con un Fc de IgG₁ humana marcado con 6x histidina, se incubó primero 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 Fcy de cabra contra 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-dosis de los scFv. La potencia a modo de ejemplo de candidatos cabeza de serie, medida mediante un ensayo de bloque del receptor VEGFR1, se enumera en la Tabla 7.

EJEMPLO 5

ENSAYO CON HUVEC DE LA INHIBICIÓN DE VEGF

25 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.

30 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). De 7 a 8 h después, se añadieron 50 µl de medio de privación de nutrientes (ECGM sin complementos que contenía un 0,5% de FCS termoinactivado y un 1% de penicilina/estreptomicina) a las células y las células se privaron de nutrientes durante de 15 a 16 horas. Se prepararon diluciones en serie 1:3 de scFv anti-VEGF (0,023-150 nM) y 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 preincubaron durante 30-60 min a temperatura ambiente. Las diferentes 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 (620 nm utilizados como longitud de onda de referencia) 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.

50 La potencia a modo de ejemplo de candidatos cabeza de serie o sus derivados, medida mediante ensayos con HUVEC, se enumera en la Tabla 7. Además, la inhibición de la proliferación de HUVEC inducida por hVEGF₁₆₅ por parte de un derivado de candidatos cabeza de serie, 578minmax, se ejemplifica 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 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.

EJEMPLO 6

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

60 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 tinte azul Evans al 1% bajo a anestesia general. Una hora después de la inyección del tinte, se inyectó 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 inyectó 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 tinte azul 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 scFv candidatos, ESBA903 (578minmax) y 802 (511max), en la inhibición del hVEGF se ilustró en la Figura 11, representada por diferentes tamaños de zonas que contienen el tinte azul Evans extravasado desde el sistema vascular a la piel. Los datos de eficacia para 903 y 802 se muestran en la Figura 12. En una concentración de 6,9 nM, 903 y 802 mostraron una inhibición más fuerte de la extravasación vascular inducida por VEGF a la piel en comparación con Lucentis en todos los animales evaluados (Figura 12).

EJEMPLO 7

EFECTOS 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 anestesiaron y sus pupilas se dilataron. Todos los animales recibieron inyecciones intravítreas de 500 ng de hrVEGF (10 μ l) en ambos ojos. 24 horas después de la inyección de VEGF, se realiza una infusión intravenosa de tinte azul 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 tanto las muestras de retina como plasma, se utilizan 60 μ L de sobrenadante para medir la absorbancia del tinte azul Evans (ABS) con un espectrofotómetro a 620/740 nm. La destrucción de la barrera hemorretiniana y la posterior permeabilidad vascular retinaria tal como se mide por la absorbancia de tinte se calculan como medias \pm 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 $P \leq 0,05$ 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.

LISTA DE SECUENCIAS

5 <110> ESBATEch, an Alcon Biomedical Research Unit LLC
 <120> Anticuerpos estables y solubles que inhiben VEGF
 <130> Anticuerpos estables y solubles que inhiben VEGF
 <140> Aún no se ha asignado
 <141> 2009-06-25
 <150> 09768693.5
 10 <151> 2009-06-25
 <150> PCT/CH2009/000220
 <151> 2009-06-25
 <150> US61/133,212
 <151> 2008-06-25
 15 <160> 180
 <170> PatentIn versión 3.5
 <210> 1
 <211> 11
 <212> PRT
 20 <213> Homo sapiens
 <400> 1
 Lys Phe Met Asp Val Tyr Gln Arg Ser Tyr Cys
 1 5 10
 <210> 2
 <211> 11
 25 <212> PRT
 <213> Desconocido
 <220>
 <223> CDR procedente de anticuerpo de conejo
 <400> 2
 Gly Phe Pro Phe Ser Ser Gly Tyr Trp Val Cys
 30 1 5 10
 <210> 3
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Desconocido
 35 <220>
 <223> CDR procedente de anticuerpo de conejo
 <400> 3
 Gly Phe Ser Phe Ser Ser Gly Tyr Trp Ile Cys
 40 1 5 10
 <210> 4
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Desconocido
 <220>
 <223> CDR procedente de anticuerpo de conejo
 45 <400> 4
 Gly Phe Ser Leu Asn Thr Asn Tyr Trp Met Cys
 1 5 10
 <210> 5
 <211> 11
 <212> PRT
 50 <213> Desconocido
 <220>
 <223> CDR procedente de anticuerpo de conejo
 <400> 5

Gly Phe Ser Phe Ser Arg Ser Tyr Tyr Ile Tyr
 1 5 10
 <210> 6
 <211> 11
 <212> PRT
 5
 <213> Desconocido
 <220>
 <223> CDR procedente de anticuerpo de conejo
 <400> 6
 Gly Phe Ser Phe Thr Thr Thr Asp Tyr Met Cys
 1 5 10
 10
 <210> 7
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Desconocido
 <220>
 <223> CDR procedente de anticuerpo de conejo
 <400> 7
 Gly Ile Asp Phe Ser Gly Ala Tyr Tyr Met Gly
 1 5 10
 <210> 8
 <211> 11
 20
 <212> PRT
 <213> Desconocido
 <220>
 <223> CDR procedente de anticuerpo de conejo
 <400> 8
 Gly Phe Ser Leu Thr Asp Tyr Tyr Tyr Met Thr
 1 5 10
 25
 <210> 9
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Desconocido
 30
 <220>
 <223> CDR procedente de anticuerpo de conejo
 <400> 9
 Gly Phe Ser Leu Ser Tyr Tyr Tyr Met Ser
 1 5 10
 <210> 10
 35
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Desconocido
 <220>
 <223> CDR procedente de anticuerpo de conejo
 <400> 10
 40
 Gly Phe Ser Leu Ser Asp Tyr Tyr Met Cys
 1 5 10
 <210> 11
 <211> 10
 <212> PRT
 45
 <213> Desconocido
 <220>
 <223> CDR procedente de anticuerpo de conejo
 <400> 11
 Gly Phe Ser Leu Ser Ser Tyr Tyr Met Cys
 1 5 10
 50
 <210> 12
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Desconocido

<211> 17
<212> PRT
<213> Desconocido
<220>
<223> CDR procedente de anticuerpo de conejo
<400> 18
Cys Ile Leu Ala Gly Asp Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asn Trp Ala Lys
1 5 10 15

Gly
<210> 19
<211> 16
<212> PRT
<213> Desconocido
<220>
<223> CDR procedente de anticuerpo de conejo
<400> 19
Tyr Ile Asp Tyr Asp Gly Asp Arg Tyr Tyr Ala Ser Trp Ala Lys Gly
1 5 10 15

<210> 20
<211> 16
<212> PRT
<213> Desconocido
<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

<210> 21
<211> 16
<212> PRT
<213> Desconocido
<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

<210> 22
<211> 16
<212> PRT
<213> Desconocido
<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

<210> 23
<211> 16
<212> PRT
<213> secuencia artificial
<400> 23
Cys Leu Asp Tyr Val Gly Asp Thr Asp Tyr Ala Ser Trp Ala Lys Gly
1 5 10 15

<210> 24
<211> 16
<212> PRT
<213> Desconocido
<220>
<223> CDR procedente de anticuerpo de conejo

5 Leu Asp Ile
<210> 38
<211> 11
<212> PRT
<213> Desconocido
<220>
<223> CDR procedente de anticuerpo de conejo
<400> 38
Gln Ala Ser Gln Ser Ile Ser Ser Tyr Leu Ser
1 5 10
<210> 39
<211> 11
<212> PRT
<213> Desconocido
<220>
<223> CDR procedente de anticuerpo de conejo
<400> 39
Gln Ala Ser Gln Ser Ile Gly Ser Ser Leu Ala
1 5 10
<210> 40
<211> 13
<212> PRT
<213> Desconocido
<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
<210> 41
<211> 11
<212> PRT
<213> Desconocido
<220>
<223> CDR procedente de anticuerpo de conejo
<400> 41
Gln Ala Ser Glu Asn Ile Asn Ile Trp Leu Ser
1 5 10
<210> 42
<211> 11
<212> PRT
<213> Desconocido
<220>
<223> CDR procedente de anticuerpo de conejo
<400> 42
Gln Ala Ser Gln Ser Ile Ser Ser Trp Leu Ser
1 5 10
<210> 43
<211> 11
<212> PRT
<213> Desconocido
<220>
<223> CDR procedente de anticuerpo de conejo

5 <400> 43
Gln Ala Ser Glu Ile Ile His Ser Trp Leu Ala
1 5 10
<210> 44
<211> 11
<212> PRT
<213> Desconocido
<220>
<223> CDR procedente de anticuerpo de conejo
<400> 44
Gln Ala Ser Gln Ser Ile Asn Ile Trp Leu Ser
1 5 10
<210> 45
<211> 11
<212> PRT
<213> Desconocido
<220>
<223> CDR procedente de anticuerpo de conejo
<400> 45
Gln Ala Asp Gln Ser Ile Tyr Ile Trp Leu Ser
1 5 10
<210> 46
<211> 11
<212> PRT
<213> Desconocido
<220>
<223> CDR procedente de anticuerpo de conejo
<400> 46
Gln Ala Ser Gln Asn Ile Arg Ile Trp Leu Ser
1 5 10
<210> 47
<211> 11
<212> PRT
30 <213> Desconocido
<220>
<223> CDR procedente de anticuerpo de conejo
<400> 47
Gln Ala Ser Gln Ser Ile Asn Ile Trp Cys Ser
1 5 10
<210> 48
<211> 11
<212> PRT
<213> Desconocido
<220>
40 <223> CDR procedente de anticuerpo de conejo
<400> 48
Gln Ala Ser Gln Ser Ile Asn Ile Trp Leu Ser
1 5 10
<210> 49
<211> 13
<212> PRT
<213> Desconocido
<220>
<223> CDR procedente de anticuerpo de conejo
<400> 49
45 Gln Ala Ser Gln Ser Ile Asn Ile Asn Asn Trp Leu Ser
1 5 10
<210> 50
<211> 7
<212> PRT
50

5 <213> Desconocido
<220>
<223> CDR procedente de anticuerpo de conejo
<400> 50
Lys Ala Ser Thr Leu Ala Ser
1 5
<210> 51
<211> 7
<212> PRT
<213> Desconocido
10 <220>
<223> CDR procedente de anticuerpo de conejo
<400> 51
Thr Ala Ala Asn Leu Ala Ser
1 5
<210> 52
<211> 7
<212> PRT
<213> Desconocido
15 <220>
<223> CDR procedente de anticuerpo de conejo
<400> 52
Tyr Ala Ser Thr Leu Ala Ser
1 5
<210> 53
<211> 7
<212> PRT
20 <213> Desconocido
<220>
<223> CDR procedente de anticuerpo de conejo
<400> 53
Gln Ala Ser Lys Leu Ala Ser
1 5
<210> 54
<211> 7
<212> PRT
25 <213> Desconocido
<220>
<223> CDR procedente de anticuerpo de conejo
<400> 53
Gln Ala Ser Thr Leu Ala Ser
1 5
<210> 54
<211> 7
<212> PRT
30 <213> Desconocido
<220>
<223> CDR procedente de anticuerpo de conejo
<400> 54
Gln Ala Ser Thr Leu Ala Ser
1 5
<210> 55
<211> 7
35 <212> PRT
<213> Desconocido
<220>
<223> CDR procedente de anticuerpo de conejo
<400> 54
Gln Ala Ser Thr Leu Ala Ser
1 5
<210> 55
<211> 7
40 <212> PRT
<213> Desconocido
<220>
<223> CDR procedente de anticuerpo de conejo
<400> 55
Leu Ala Ser Thr Leu Ala Ser
1 5
<210> 56
<211> 7
45 <212> PRT
<213> Desconocido
<220>
<223> CDR procedente de anticuerpo de conejo
<400> 55
Lys Glu Ser Thr Leu Ala Ser
1 5
<210> 56
50 <211> 7
<212> PRT
<213> Desconocido
<220>
<223> CDR procedente de anticuerpo de conejo
<400> 56
Lys Glu Ser Thr Leu Ala Ser

5 <210> 57
<211> 7
<212> PRT
<213> Desconocido
<220>
<223> CDR procedente de anticuerpo de conejo
<400> 57
Lys Ala Ser Thr Leu Glu Ser
1 5
10 <210> 58
<211> 7
<212> PRT
<213> Desconocido
<220>
<223> CDR procedente de anticuerpo de conejo
<400> 58
Lys Ala Ser Thr Leu Glu Ser
1 5
15 <210> 59
<211> 7
<212> PRT
<213> Desconocido
<220>
<223> CDR procedente de anticuerpo de conejo
<400> 59
Arg Ala Ser Thr Leu Ala Ser
1 5
20 <210> 60
<211> 7
<212> PRT
<213> Desconocido
<220>
<223> CDR procedente de anticuerpo de conejo
<400> 59
Arg Ala Ser Thr Leu Ala Ser
1 5
25 <210> 61
<211> 7
<212> PRT
<213> Desconocido
<220>
30 <223> CDR procedente de anticuerpo de conejo
<400> 60
Lys Ala Ser Thr Leu Ala Ser
1 5
<210> 61
<211> 14
<212> PRT
<213> Desconocido
<220>
35 <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
40 <210> 62
<211> 10
<212> PRT
<213> Desconocido
<220>
45 <223> CDR procedente de anticuerpo de conejo
<400> 62
Gln Asn Phe Ala Thr Ser Asp Thr Val Thr
1 5 10
50 <210> 63
<211> 11
<212> PRT
<213> Desconocido
<220>

<223> CDR procedente de anticuerpo de conejo
<400> 63
Ala Gly Gly Tyr Ser Ser Thr Ser Asp Asn Thr
1 5 10
<210> 64
<211> 12
<212> PRT
<213> Desconocido
<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
<210> 65
<211> 12
<212> PRT
<213> Desconocido
<220>
<223> CDR procedente de anticuerpo de conejo
<400> 65
Gln Asn Asn Tyr Gly Phe Arg Ser Tyr Gly Gly Ala
1 5 10
<210> 66
<211> 12
<212> PRT
<213> Desconocido
<220>
<223> CDR procedente de anticuerpo de conejo
<400> 66
Gln Asn Val Tyr Leu Ala Ser Thr Asn Gly Ala Asn
1 5 10
<210> 67
<211> 12
<212> PRT
<213> Desconocido
<220>
<223> CDR procedente de anticuerpo de conejo
<400> 67
Gln Asn Asn Tyr Asp Ser Gly Asn Asn Gly Phe Pro
1 5 10
<210> 68
<211> 12
<212> PRT
<213> Desconocido
<220>
<223> CDR procedente de anticuerpo de conejo
<400> 68
Gln Asn Asn Ala His Tyr Ser Thr Asn Gly Gly Thr
1 5 10
<210> 69
<211> 12
<212> PRT
<213> Desconocido
<220>
<223> CDR procedente de anticuerpo de conejo
<400> 69
Gln Asn Asn Ala His Tyr Ser Thr Asn Gly Gly Thr
1 5 10
<210> 70
<211> 13

5 <212> PRT
 <213> Desconocido
 <220>
 <223> CDR procedente de anticuerpo de conejo
 <400> 70
 Gln Ala Asn Tyr Ala Tyr Ser Ala Gly Tyr Gly Ala Ala
 1 5 10
 <210> 71
 <211> 14
 <212> PRT
 10 <213> Desconocido
 <220>
 <223> CDR procedente de anticuerpo de conejo
 <400> 71
 Gln Asn Asn Tyr His Tyr Ser Ser Ser Thr Asn Gly Gly Thr
 1 5 10
 <210> 72
 <211> 112
 <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
 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
 Ser Asp Tyr Gly Asn Pro Phe Gly Gly Thr Glu Ala Val Val Lys
 100 105 110
 25 <210> 73
 <211> 108
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 30 <223> secuencia VL-scFv recombinante
 <400> 73

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
 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

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

Val Thr Phe Gly Gly Gly Thr Glu Val Val Val Thr
 100 105

<210> 74

<211> 111

<212> PRT

5

<213> Secuencia artificial

<220>

<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
 20 25 30

10

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
 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

Thr Ser Asp Asn Thr Phe Gly Gly Thr Glu Val Val Val Lys
 100 105 110

<210> 75

<211> 110

<212> PRT

15

<213> Secuencia artificial

<220>

<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

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 Leu Ile
 35 40 45

Tyr Gln Ala Ser Lys 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

Ala Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Asn Asn Tyr Ser Tyr Asn Arg
 85 90 95

Tyr Gly Ala Pro Phe Gly Gly Thr Glu Val Val Val Lys
 100 105 110

<210> 76

<211> 110

<212> PRT

5

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> secuencia VL-scFv recombinante

<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

Leu Ser Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro Lys Leu 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

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

10

<210> 77

<211> 110

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

15

<223> secuencia VL-scFv recombinante

<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

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

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

5 <210> 78

<211> 110

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> secuencia VL-scFv recombinante

10 <400> 78

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 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

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
 85 90 95

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

15 <210> 79

<211> 110

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> secuencia VL-scFv recombinante

<400> 79

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 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

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
 85 90 95

Asn Gly Gly Thr Phe Gly Gly Thr Glu Val Val Val Lys
 100 105 110

5 <210> 80

<211> 110

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> secuencia VL-scFv recombinante

10 <400> 80

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 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

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
 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 Thr Glu Val Val Val Lys
 100 105 110

15 <210> 81

<211> 111

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> secuencia VL-scFv recombinante

<400> 81

ES 2 793 008 T3

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 25 30

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

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

Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Asp Leu Glu Cys
 65 70 75 80

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

Gly Tyr Gly Ala Ala Phe Gly Gly Thr Glu Val Val Val Lys
 100 105 110

<210> 82

<211> 113

<212> PRT

5

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> secuencia VL-scFv recombinante

<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 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
 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 Ser Asn Tyr Gly Gly Ser Ser
 85 90 95

Ser Asp Tyr Gly Asn Pro Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu
 100 105 110

Gly

<210> 83

<211> 109

<212> PRT

15

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> secuencia VL-scFv recombinante

<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
 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

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
 100 105

<210> 84

<211> 112

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> secuencia VL-scFv recombinante

<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
 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

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
 100 105 110

<210> 85

<211> 111

15 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> secuencia VL-scFv recombinante

<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
 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
 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 Tyr Ser Tyr Asn Arg
 85 90 95

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

<210> 86

<211> 111

<212> PRT

5

<213> secuencia artificial

<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
 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 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 Tyr Gly Phe Arg Ser
 85 90 95

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

<210> 87

<211> 111

10

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> secuencia VL-scFv recombinante

<400> 87

ES 2 793 008 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 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

5 <210> 88

<211> 111

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> secuencia VL-scFv recombinante

10 <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

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

15 <210> 89

<211> 111

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> secuencia VL-scFv recombinante

<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
 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
 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
 100 105 110

5 <210> 90

<211> 111

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> secuencia VL-scFv recombinante

10 <400> 90

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 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
 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

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

15 <210> 91

<211> 112

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<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

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 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

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

<210> 92

<211> 111

<212> PRT

5

<213> Secuencia artificial

<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

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

10

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

Asn Gly Ala Asn Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
 100 105 110

<210> 93

<211> 113

<212> PRT

15

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> secuencia VL-scFv recombinante

<400> 93

ES 2 793 008 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 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
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 Ser Asn Tyr Gly Gly Ser Ser
85 90 95

Ser Asp Tyr Gly Asn Pro Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu
100 105 110

Gly

<210> 94

<211> 109

<212> PRT

5

<213> Secuencia artificial

<220>

<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

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

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
100 105

10

<210> 95

<211> 112

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

15

<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

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

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

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

5 <210> 96
 <211> 111
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 10 <223> secuencia VL-scFv recombinante
 <400> 96
 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
 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
 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

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

15 <210> 97
 <211> 111
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <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

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

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

5 <210> 98

<211> 111

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> secuencia VL-scFv recombinante

10 <400> 98

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 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 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> 99

<211> 111

<212> PRT

15 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> secuencia VL-scFv recombinante

<400> 99

ES 2 793 008 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 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 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 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

<210> 100

<211> 111

<212> PRT

5

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> secuencia VL-scFv recombinante

<400> 100

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
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
65 70 75 80

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

10

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

<210> 101

<211> 111

<212> PRT

15

<213> Secuencia artificial

<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

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
 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 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

<210> 102

<211> 112

<212> PRT

5

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> secuencia VL-scFv recombinante

<400> 102

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

10

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

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

<210> 103

<211> 111

<212> PRT

15

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> secuencia VL-scFv recombinante

<400> 103

ES 2 793 008 T3

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

<211> 111

<212> PRT

5

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> secuencia VL-scFv recombinante

<400> 104

Asp 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
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

10

<210> 105

<211> 111

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

15

<223> secuencia VL-scFv recombinante

<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
 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

5 <210> 106

<211> 112

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> secuencia VL-scFv recombinante

10 <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
 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

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
 100 105 110

15 <210> 107

<211> 128

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> secuencia VH-scFv recombinante

<400> 107

ES 2 793 008 T3

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 Pro Phe Ser Ser Gly Tyr
20 25 30

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

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
100 105 110

Ala Gly Leu Glu Leu Trp Gly Pro Gly Ile Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120 125

<210> 108

5

<211> 128

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> secuencia VH-scFv recombinante

10

<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

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
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

Ala Gly Leu Glu Leu Trp Gly Pro Gly Ile Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120 125

<210> 109

<211> 117

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

5 <223> secuencia VH-scFv recombinante

<400> 109

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

<210> 110

<211> 124

10 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> secuencia VH-scFv recombinante

<400> 110

Gln Glu Arg Leu Val Glu Ser Gly Gly Leu Val Gln Pro Glu Gly
1 5 10 15Ser Leu Thr Leu Thr Cys Lys Ala Ser Gly Phe Ser Phe Ser Arg Ser
20 25 30

15 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 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
 115 120

<210> 111

<211> 119

<212> PRT

5

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> secuencia VH-scFv recombinante

<400> 111

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

Leu Thr Leu Thr Cys Lys Ala Ser Gly Phe Ser Phe Thr Thr Asp
 20 25 30

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

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

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
 115

10

<210> 112

<211> 117

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

15

<223> secuencia VH-scFv recombinante

<400> 112

ES 2 793 008 T3

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
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

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
100 105 110

Val Thr Val Ser Leu
115

<210> 113

<211> 117

<212> PRT

5

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> secuencia VH-scFv recombinante

<400> 113

Gln Ser Val 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 Thr Asp Tyr Tyr
20 25 30

10

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

Gly Phe Ile Asp Pro Asp 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
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
100 105 110

Val Thr Val Ser Leu
115

<210> 114

<211> 116

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

5 <223> secuencia VH-scFv recombinante

<400> 114

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

<210> 115

<211> 116

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> secuencia VH-scFv recombinante

<400> 115

ES 2 793 008 T3

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
65 70 75 80

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

Asp Ser Arg Gly Trp Gly Leu Asn Ile Trp Gly Pro Gly Thr Leu Val
100 105 110

Thr Val Ser Leu
115

<210> 116

<211> 116

<212> PRT

5

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> secuencia VH-scFv recombinante

<400> 116

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 Ser Tyr Tyr
20 25 30

10

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

Cys Leu Asp Tyr Val Gly Asp Thr Asp Tyr Ala Ser Trp Ala Lys Gly
50 55 60

Arg Phe Thr Ile Ser Lys Ala Ser Thr Thr Val Asp Leu Lys Ile Thr
65 70 75 80

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

Asp Ser Arg Gly Trp Gly Leu Asn Ile Trp Gly Pro Gly Thr Leu Val
100 105 110

Thr Val Ser Leu
115

<210> 117

<211> 118

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

5 <223> secuencia VH-scFv recombinante

<400> 117

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

<210> 118

<211> 130

10 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala 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

Val Ser 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 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
 85 90 95

Tyr Cys Ala Lys 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

Ser Ser
 130

<210> 119

<211> 130

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Ser Phe Ser Ser Gly

ES 2 793 008 T3

20

25

30

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

Val Ser 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 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
 85 90 95

Tyr Cys Ala Lys 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

Ser Ser
 130

<210> 120

<211> 119

<212> PRT

5

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> secuencia VH-scFv recombinante

<400> 120

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 Asn
 20 25 30

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

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
 85 90 95

10

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

<210> 121

<211> 125

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> secuencia VH-scFv recombinante

<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

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
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

Pro Leu Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120 125

5

<210> 122

<211> 121

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

10

<220>

<223> secuencia VH-scFv recombinante

<400> 122

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

ES 2 793 008 T3

1 5 10 15

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

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
 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

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 123

<211> 120

<212> PRT

5

<213> Secuencia artificial

<220>

<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

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
 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

10 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

<210> 124

<211> 120

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<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
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 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
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

5

<210> 125

<211> 119

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

10

<220>

<223> secuencia VH-scFv recombinante

<400> 125

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

ES 2 793 008 T3

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
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 70 75 80

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
115

<210> 126

<211> 119

<212> PRT

5

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> secuencia VH-scFv recombinante

<400> 126

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 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

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

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

10

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

115

<210> 127

<211> 119

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> secuencia VH-scFv recombinante

<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

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

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
100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115

5

<210> 128

<211> 119

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

10

<220>

<223> secuencia VH-scFv recombinante

<400> 128

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

ES 2 793 008 T3

1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala 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

Ser Ile Ile Ala Pro Asp Asp Thr Thr Tyr Tyr Ala Ser Trp Ala Lys
 50 55 60

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
 100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115

<210> 129

<211> 120

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> secuencia VH-scFv recombinante
 <400> 129
 Gln Val Gln Leu Val Gln Thr 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
 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 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
 85 90 95

10 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

<210> 130

<211> 130

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> secuencia VH-scFv recombinante

<400> 130

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 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

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
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

Ser Ser

130

<210> 131

<211> 130

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

10 <220>

<223> secuencia VH-scFv recombinante

<400> 131

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 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
 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

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

Ser Ser
 130

<210> 132

<211> 119

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> secuencia VH-scFv recombinante

<400> 132

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 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
 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

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
 115

<210> 133

<211> 125

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> secuencia VH-scFv recombinante

<400> 133

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 Lys Ala Ser Gly Phe Ser Phe Ser Arg Ser
 20 25 30

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

Val Gly 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 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

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

10 <210> 134

<211> 121

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

15 <223> secuencia VH-scFv recombinante

<400> 134

ES 2 793 008 T3

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 Thr Thr Thr
 20 25 30

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

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
 100 105 110

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 135

<211> 120

<212> PRT

5

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> secuencia VH-scFv recombinante

<400> 135

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 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 Gly Tyr Ile Asp Tyr Asp Gly Asp Arg Tyr Tyr Ala Ser Trp Ala
 50 55 60

10

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
 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

<210> 136

<211> 120

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> secuencia VH-scFv recombinante

5 <400> 136

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

<210> 137

<211> 119

<212> PRT

10 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> secuencia VH-scFv recombinante

<400> 137

ES 2 793 008 T3

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

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
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

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 138

<211> 119

<212> PRT

5

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> secuencia VH-scFv recombinante

<400> 138

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 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

10

Gly Arg Phe Thr Ile Ser Lys Asp 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
85 90 95

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

<210> 139

<211> 119

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> secuencia VH-scFv recombinante

5 <400> 139

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

<210> 140

<211> 119

<212> PRT

10 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> secuencia VH-scFv recombinante

<400> 140

ES 2 793 008 T3

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 Ser Tyr
20 25 30

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

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

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 141

<211> 119

<212> PRT

5

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> secuencia VH-scFv recombinante

<400> 141

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 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

Gly Ile Ile Ala Pro Asp Asp Thr Thr Tyr Tyr Ala Ser Trp Ala Lys
50 55 60

10

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 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

115

<210> 142

<211> 120

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> secuencia VH-scFv recombinante

5 <400> 142

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

<210> 143

<211> 119

<212> PRT

10

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> secuencia VH-scFv recombinante

<400> 143

ES 2 793 008 T3

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

Ser Ile Arg Leu Ser Cys Ala Ala 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

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

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
100 105 110

Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 144

<211> 120

<212> PRT

5

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> secuencia VH-scFv recombinante

<400> 144

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

Ser Ile 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

10

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
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

<210> 145

<211> 119

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> secuencia VH-scFv recombinante

5 <400> 145

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

<210> 146

<211> 120

<212> PRT

10 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> secuencia VH-scFv recombinante

<400> 146

ES 2 793 008 T3

Gln Val Gln Leu Val Gln Thr Gly 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
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

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
115 120

<210> 147

<211> 119

<212> PRT

5

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> secuencia VH-scFv recombinante

<400> 147

Val Gln Leu Val Glu Ser 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

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

10

Gly Arg Phe 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 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

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 148

<211> 120

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> secuencia VH-scFv recombinante

5 <400> 148

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

<210> 149

<211> 120

<212> PRT

10

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> secuencia VH-scFv recombinante

<400> 149

ES 2 793 008 T3

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 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
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

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> 150

<211> 120

<212> PRT

5

<213> Secuencia artificial

<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

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

10

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

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> 151

<211> 120

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> secuencia VH-scFv recombinante

5 <400> 151

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

<210> 152

<211> 120

<212> PRT

10 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> secuencia VH-scFv recombinante

<400> 152

ES 2 793 008 T3

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

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 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
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

<211> 120

<212> PRT

5

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> secuencia VH-scFv recombinante

<400> 153

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

Val Gly Phe Ile Asp Pro Asp Asp Pro Tyr Tyr Ala Thr Trp Ala
50 55 60

10

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
100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

115 120

<210> 154

<211> 120

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> secuencia VH-scFv recombinante

5 <400> 154

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

<210> 155

<211> 119

<212> PRT

10 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> secuencia VH-scFv recombinante

<400> 155

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

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 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
 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

<210> 156

<211> 119

<212> PRT

5

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> secuencia VH-scFv recombinante

<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

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

10

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Thr Ser Lys 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

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

<210> 157

<211> 120

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> secuencia VH-scFv recombinante

5 <400> 157

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

<210> 158

<211> 120

<212> PRT

10 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> secuencia VH-scFv recombinante

<400> 158

ES 2 793 008 T3

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

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 Leu Tyr
65 70 75 80

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

Ala 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> 159

<211> 120

<212> PRT

5

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> secuencia VH-scFv recombinante

<400> 159

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

Val Gly Phe Ile Asp Pro Asp Asp Pro Tyr Tyr Ala Thr Trp Ala
50 55 60

10

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 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

115

120

<210> 160

<211> 120

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> secuencia VH-scFv recombinante

5 <400> 160

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

<210> 161

<211> 120

<212> PRT

10 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> secuencia VH-scFv recombinante

<400> 161

ES 2 793 008 T3

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly 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
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 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

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

<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
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

10

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
100 105 110

Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser

115

120

<210> 163

<211> 120

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> secuencia VH-scFv recombinante

5 <400> 163

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

<210> 164

<211> 120

<212> PRT

10

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> secuencia VH-scFv recombinante

<400> 164

ES 2 793 008 T3

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

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
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> 165

<211> 120

<212> PRT

5

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> secuencia VH-scFv recombinante

<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
35 40 45

Val Gly Phe Ile Asp Pro Asp Asp Pro Tyr Tyr Ala Thr Trp Ala
50 55 60

10

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 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

115 120

<210> 166

<211> 120

<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

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 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

Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 167
 <211> 381
 <212> PRT
 10 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> secuencia aceptora VL-scFv recombinante
 <220>
 <221> CDR
 15 <222> (24)..(123)
 <223> Puede haber al menos 3 y hasta 50 aminoácidos presentes
 <220>
 <221> CDR
 <222> (139)..(238)
 20 <223> Puede haber al menos 3 y hasta 50 aminoácidos presentes
 <220>
 <221> CDR
 <222> (271)..(370)
 <223> Puede haber al menos 3 y hasta 50 aminoácidos presentes
 25 <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

Xaa
35 40 45

Xaa
50 55 60

Xaa
65 70 75 80

Xaa
85 90 95

Xaa
100 105 110

Xaa Trp Tyr Gln Gln Lys
115 120 125

Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
130 135 140

Xaa
145 150 155 160

Xaa
 165 170 175

Xaa
 180 185 190

Xaa
 195 200 205

Xaa
 210 215 220

Xaa Gly Val
 225 230 235 240

Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ala Glu Phe Thr Leu Thr
 245 250 255

Ile Ser Ser Leu Gln Pro Asp Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Xaa Xaa
 260 265 270

Xaa
 275 280 285

Xaa
 290 295 300

Xaa
 305 310 315 320

Xaa
 325 330 335

Xaa
 340 345 350

Xaa
 355 360 365

Xaa Xaa Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly
 370 375 380

<210> 168

<211> 381

<212> PRT

5

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> secuencia aceptora VL-scFv recombinante

<220>

<221> CDR

10

<222> (24)..(123)

<223> Puede haber al menos 3 y hasta 50 aminoácidos presentes

<220>

<221> CDR

<222> (139)..(238)

15

<223> Puede haber al menos 3 y hasta 50 aminoácidos presentes

<220>

<221> CDR

<222> (271)..(370)

<223> Puede haber al menos 3 y hasta 50 aminoácidos presentes

5 <400> 168

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

Xaa
 180 185 190

Xaa
 195 200 205

Xaa
 210 215 220

Xaa Gly Val
 225 230 235 240

Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ala Glu Phe Thr Leu Thr
 245 250 255

Ile Ser Ser Leu Gln Pro Asp Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Xaa Xaa
 260 265 270

Xaa
 275 280 285

Xaa
 290 295 300

Xaa
 305 310 315 320

Xaa
 325 330 335

Xaa
 340 345 350

Xaa
 355 360 365

Xaa Xaa Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly
 370 375 380

<210> 169

<211> 382

<212> PRT

5

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> secuencia aceptora VH-scFv recombinante

<220>

<221> CDR

<222> (26)..(125)

<223> Puede haber al menos 3 y hasta 50 aminoácidos presentes.

<220>

<221> CDR

<222> (140)..(239)

10

<223> Puede haber al menos 3 y hasta 50 aminoácidos presentes.

<220>

<221> CDR

<222> (272)..(371)

<223> Puede haber al menos 3 y hasta 50 aminoácidos presentes.

<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
20 25 30

Xaa
35 40 45

Xaa
50 55 60

Xaa
65 70 75 80

Xaa
85 90 95

Xaa
100 105 110

Xaa Trp Val Arg
115 120 125

Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ser Xaa Xaa Xaa Xaa
130 135 140

Xaa
145 150 155 160

Xaa
165 170 175

Xaa
180 185 190

Xaa
 195 200 205

Xaa
 210 215 220

Xaa Arg
 225 230 235 240

Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met
 245 250 255

Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Lys Xaa
 260 265 270

Xaa
 275 280 285

Xaa
 290 295 300

Xaa
 305 310 315 320

Xaa
 325 330 335

Xaa
 340 345 350

Xaa
 355 360 365

Xaa Xaa Xaa Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 370 375 380

<210> 170

<211> 381

<212> PRT

5

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> secuencia aceptora VH-scFv recombinante

<220>

<221> CDR

10

<222> (26)..(125)

<223> Puede haber al menos 3 y hasta 50 aminoácidos presentes.

<220>

<221> CDR

<222> (140)..(239)

15

<223> Puede haber al menos 3 y hasta 50 aminoácidos presentes.

<220>

<221> CDR

<222> (272)..(371)

20

<223> Puede haber al menos 3 y hasta 50 aminoácidos presentes.

<400> 170

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 Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
 20 25 30

Xaa
 35 40 45

Xaa
 50 55 60

Xaa
 65 70 75 80

Xaa
 85 90 95

Xaa
 100 105 110

Xaa Trp Val Arg
 115 120 125

Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Gly Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
 130 135 140

Xaa
 145 150 155 160

Xaa
 165 170 175

Xaa
 180 185 190

Xaa
 195 200 205

Xaa
 210 215 220

Xaa Arg
 225 230 235 240

Phe Thr Ile Ser Arg Asp Thr Ser Lys Asn Thr Val Tyr Leu Gln Met
 245 250 255

Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Xaa
 260 265 270

Xaa
 275 280 285

Xaa
 290 295 300

Xaa
 305 310 315 320

Xaa
 325 330 335

Xaa
 340 345 350

Xaa
 355 360 365

Xaa Xaa Xaa Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser
 370 375 380

<210> 171

<211> 382

<212> PRT

5

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> secuencia aceptora VH-scFv recombinante

<220>

<221> CDR

10

<222> (26)..(125)

<223> Puede haber al menos 3 y hasta 50 aminoácidos presentes.

<220>

<221> CDR

<222> (140)..(239)

15

<223> Puede haber al menos 3 y hasta 50 aminoácidos presentes.

<220>

<221> CDR

<222> (272)..(371)

20

<223> Puede haber al menos 3 y hasta 50 aminoácidos presentes.

<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
 20 25 30

Xaa
 35 40 45

Xaa
 50 55 60

Xaa
 65 70 75 80

Xaa
 85 90 95

Xaa
 100 105 110

Xaa Trp Val Arg
 115 120 125

Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Gly Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
 130 135 140

Xaa
 145 150 155 160

Xaa
 165 170 175

Xaa
 180 185 190

Xaa
 195 200 205

Xaa
 210 215 220

Xaa Arg
 225 230 235 240

Phe Thr Ile Ser Lys Asp Thr Ser Lys Asn Thr Val Tyr Leu Gln Met
 245 250 255

Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Xaa
 260 265 270

Xaa
 275 280 285

Xaa
 290 295 300

Xaa
 305 310 315 320

Xaa
 325 330 335

Xaa
 340 345 350

Xaa
 355 360 365

Xaa Xaa Xaa Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 370 375 380

<210> 172

<211> 783

<212> PRT

5

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> secuencia aceptora -scFv recombinante

<220>

<221> CDR

10

<222> (24)..(123)

<223> Puede haber al menos 3 y hasta 50 aminoácidos presentes.

<220>

<221> CDR

<222> (139)..(238)

15

<223> Puede haber al menos 3 y hasta 50 aminoácidos presentes.

<220>

<221> CDR

<222> (271)..(370)

20

<223> Puede haber al menos 3 y hasta 50 aminoácidos presentes.

<220>

<221> CDR

<222> (427)..(526)

25

<223> Puede haber al menos 3 y hasta 50 aminoácidos presentes.

<220>

<221> CDR

<222> (541)..(640)

<223> Puede haber al menos 3 y hasta 50 aminoácidos presentes.

<220>

<221> CDR

<222> (673)..(772)

<223> Puede haber al menos 3 y hasta 50 aminoácidos presentes.

<400> 172

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

Xaa Xaa

ES 2 793 008 T3

180

185

190

Xaa
195 200 205

Xaa
210 215 220

Xaa Gly Val
225 230 235 240

Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ala Glu Phe Thr Leu Thr
245 250 255

Ile Ser Ser Leu Gln Pro Asp Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Xaa Xaa
260 265 270

Xaa
275 280 285

Xaa
290 295 300

Xaa
305 310 315 320

Xaa
325 330 335

Xaa
340 345 350

Xaa
355 360 365

Xaa Xaa Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly Gly Gly
370 375 380

Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly
385 390 395 400

Ser Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly
405 410 415

Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
420 425 430

Xaa
 435 440 445

Xaa
 450 455 460

Xaa
 465 470 475 480

Xaa
 485 490 495

Xaa
 500 505 510

Xaa Trp Val
 515 520 525

Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ser Xaa Xaa Xaa Xaa
 530 535 540

Xaa
 545 550 555 560

Xaa
 565 570 575

Xaa
 580 585 590

Xaa
 595 600 605

Xaa
 610 615 620

Xaa
 625 630 635 640

Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln
 645 650 655

Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Lys
 660 665 670

Xaa
 675 680 685

Xaa
 690 695 700

Xaa
 705 710 715 720

Xaa
 725 730 735

Xaa
 740 745 750

Xaa
 755 760 765

Xaa Xaa Xaa Xaa Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 770 775 780

<210> 173

<211> 783

<212> PRT

5

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> secuencia aceptora -scFv recombinante

<220>

<221> CDR

10

<222> (24)..(123)

<223> Puede haber al menos 3 y hasta 50 aminoácidos presentes.

<220>

<221> CDR

<222> (139)..(238)

15

<223> Puede haber al menos 3 y hasta 50 aminoácidos presentes.

<220>

<221> CDR

<222> (271)..(370)

20

<223> Puede haber al menos 3 y hasta 50 aminoácidos presentes.

<220>

<221> CDR

<222> (427)..(526)

25

<223> Puede haber al menos 3 y hasta 50 aminoácidos presentes.

<220>

<221> CDR

<222> (541)..(640)

30

<223> Puede haber al menos 3 y hasta 50 aminoácidos presentes.

<220>

<221> CDR

<222> (673)..(772)

35

<223> Puede haber al menos 3 y hasta 50 aminoácidos presentes.

<400> 173

ES 2 793 008 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 Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
20 25 30

Xaa
35 40 45

Xaa
50 55 60

Xaa
65 70 75 80

Xaa
85 90 95

Xaa
100 105 110

Xaa Trp Tyr Gln Gln Lys
115 120 125

Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
130 135 140

Xaa
145 150 155 160

Xaa
165 170 175

Xaa
180 185 190

Xaa
195 200 205

Xaa
210 215 220

Xaa Gly Val
225 230 235 240

Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr
 245 250 255

Ile Ser Ser Leu Gln Pro Asp Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Xaa Xaa
 260 265 270

Xaa
 275 280 285

Xaa
 290 295 300

Xaa
 305 310 315 320

Xaa
 325 330 335

Xaa
 340 345 350

Xaa
 355 360 365

Xaa Xaa Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly Gly Gly
 370 375 380

Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly
 385 390 395 400

Ser Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly
 405 410 415

Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Thr Ala Ser Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
 420 425 430

Xaa
 435 440 445

Xaa
 450 455 460

Xaa
 465 470 475 480

Xaa
 485 490 495

Xaa
 500 505 510

Xaa Trp Val
 515 520 525

Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Gly Xaa Xaa Xaa Xaa
 530 535 540

Xaa
 545 550 555 560

Xaa
 565 570 575

Xaa
 580 585 590

Xaa
 595 600 605

Xaa
 610 615 620

Xaa
 625 630 635 640

Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Thr Ser Lys Asn Thr Val Tyr Leu Gln
 645 650 655

Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg
 660 665 670

Xaa
 675 680 685

Xaa
 690 695 700

Xaa
 705 710 715 720

Xaa
 725 730 735

Xaa
 740 745 750

Xaa
 755 760 765

Xaa Xaa Xaa Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 770 775 780

<210> 174

<211> 783

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> secuencia aceptora -scFv recombinante
 <220>
 <221> CDR
 <222> (24)..(123)
 <223> Puede haber al menos 3 y hasta 50 aminoácidos presentes.
 <220>
 <221> CDR
 10 <222> (139)..(238)
 <223> Puede haber al menos 3 y hasta 50 aminoácidos presentes.
 <220>
 <221> CDR
 <222> (271)..(370)
 15 <223> Puede haber al menos 3 y hasta 50 aminoácidos presentes.
 <220>
 <221> CDR
 <222> (427)..(526)
 <223> Puede haber al menos 3 y hasta 50 aminoácidos presentes.
 20 <220>
 <221> CDR
 <222> (541)..(640)
 <223> Puede haber al menos 3 y hasta 50 aminoácidos presentes.
 <220>
 25 <221> CDR
 <222> (673)..(772)
 <223> Puede haber al menos 3 y hasta 50 aminoácidos presentes.
 <400> 174
 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
 20 25 30

Xaa
 35 40 45

Xaa
 50 55 60

Xaa
 65 70 75 80

Xaa
 85 90 95

Xaa
 100 105 110

Xaa Trp Tyr Gln Gln Lys
 115 120 125

Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
 130 135 140

Xaa
 145 150 155 160

Xaa
 165 170 175

Xaa
 180 185 190

Xaa
 195 200 205

Xaa
 210 215 220

Xaa Gly Val
 225 230 235 240

Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr
 245 250 255

Ile Ser Ser Leu Gln Pro Asp Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Xaa Xaa
 260 265 270

Xaa
 275 280 285

Xaa
 290 295 300

Xaa
 305 310 315 320

Xaa
 325 330 335

Xaa
 340 345 350

Xaa
 355 360 365

Xaa Xaa Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly Gly Gly
 370 375 380

Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly
 385 390 395 400

Ser Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly
 405 410 415

Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Thr Val Ser Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
 420 425 430

Xaa
 435 440 445

Xaa
 450 455 460

Xaa
 465 470 475 480

Xaa
 485 490 495

Xaa
 500 505 510

Xaa Trp Val
 515 520 525

Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Gly Xaa Xaa Xaa Xaa
 530 535 540

Xaa
 545 550 555 560

Xaa
 565 570 575

Xaa
 580 585 590

Xaa
 595 600 605

Xaa
 610 615 620

Xaa
 625 630 635 640

Arg Phe Thr Ile Ser Lys Asp Thr Ser Lys Asn Thr Val Tyr Leu Gln
 645 650 655

Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg
 660 665 670

Xaa
 675 680 685

Xaa
 690 695 700

Xaa
 705 710 715 720

Xaa
 725 730 735

Xaa
 740 745 750

Xaa
 755 760 765

Xaa Xaa Xaa Xaa Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 770 775 780

<210> 175

<211> 248

<212> PRT

5

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> scFv recombinante

<400> 175

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
 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

Ser Arg 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 Gly Gly
 100 105 110

Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly
 115 120 125

Ser Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly 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
 145 150 155 160

Asn Tyr Trp Met Cys Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu
 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

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
 225 230 235 240

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 245

<210> 176

<211> 251

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> scFv recombinante

<400> 176

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 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

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

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly 115 120 125

Gly Gly Gly Ser Glu Val Gln Leu Val Glu Ser 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

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

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

Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 245 250

<210> 177
 <211> 250
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> scFv recombinante
 <400> 177

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
 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
 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

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

Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Ser Leu
 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

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
 225 230 235 240

Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 245 250

<210> 178
 <211> 251
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> scFv recombinante
 <400> 178

ES 2 793 008 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 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 Gly
100 105 110

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

Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Ser Leu
145 150 155 160

Thr Asp Tyr 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 Pro Tyr Tyr Ala
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

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

<210> 179
5 <211> 251
<212> PRT
<213> Secuencia artificial
<220>
<223> scFv recombinante

<400> 179

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	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	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	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							

Pro	Gly	Gly	Ser	Leu	Arg	Leu	Ser	Cys	Thr	Ala	Ser	Gly	Phe	Ser	Leu
				145		150		155		160					

Thr	Asp	Tyr	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
				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
				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

<220>

10 <223> scFv recombinante

<400> 180

ES 2 793 008 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 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 Gly
100 105 110

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ser 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
145 150 155 160

Thr Asp Tyr 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

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
225 230 235 240

Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
245 250

REIVINDICACIONES

- 5 **1.** Un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno de este para su uso en terapia o el diagnóstico *in vivo*, comprendiendo el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno de este una cadena pesada variable que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 164 y una cadena ligera variable que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 87.
- 10 **2.** El anticuerpo o fragmento de unión a antígeno de este para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, donde el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno de este se une específicamente a VEGF humano, de rata y de ratón.
- 15 **3.** El anticuerpo o fragmento de unión a antígeno de este para su uso de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, donde el fragmento de unión a antígeno es un scFv, un fragmento Fab, un fragmento Fab' o un fragmento F(ab')₂.
- 20 **4.** El anticuerpo o fragmento de unión a antígeno de este para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, donde el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno de este se formula para la administración tópica, intraocular, oral, nasal, rectal o parenteral.
- 25 **5.** El anticuerpo o fragmento de unión a antígeno de este para su uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, donde el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno de este tiene un residuo de metionina aminoterminal en la proteína final derivado del codón de iniciación.
- 30 **6.** El anticuerpo o fragmento de unión a antígeno de este para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, donde el fragmento de unión a antígeno es un scFv, y la región variable de cadena pesada y la región variable de cadena ligera están unidas por la secuencia de la SEQ ID NO: 181.
- 35 **7.** El anticuerpo o fragmento de unión a antígeno de este para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes para su uso en el tratamiento de una enfermedad mediada por VEGF.
- 40 **8.** El anticuerpo o fragmento de unión a antígeno de este para su uso de acuerdo con la reivindicación 7, donde la enfermedad mediada por VEGF se selecciona del grupo que consiste en la degeneración macular senil, glaucoma neovascular, retinopatía diabética, retinopatía de la prematuridad.
- 45 **9.** El anticuerpo o fragmento de unión a antígeno de este para su uso de acuerdo con la reivindicación 7, donde la enfermedad mediada por VEGF se selecciona del grupo que consiste en fibroplasia retrolental, carcinomas de mama, carcinomas broncopulmonares, 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, 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.** Uso de un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno de este en la producción de un medicamento para el tratamiento de una enfermedad mediada por VEGF, donde el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno de este comprende una cadena pesada variable que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 164 y una cadena ligera variable que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 87.
- 55 **11.** El uso de la reivindicación 10, donde el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno de este se une específicamente a VEGF humano, de rata y de ratón.
- 60 **12.** El uso de la reivindicación 10 u 11, donde el fragmento de unión a antígeno es un scFv, un fragmento Fab, un fragmento Fab' o un fragmento F(ab')₂.
- 65 **13.** El uso de una cualquiera de las reivindicaciones 10 a 12, donde el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno de este se formula para la administración tópica, intraocular, oral, nasal, rectal o parenteral.
- 70 **14.** El uso de cualquiera de las reivindicaciones 10 a 12, donde el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno de este tiene un residuo de metionina aminoterminal en la proteína final derivado del codón de iniciación.

15. El uso de una cualquiera de las reivindicaciones 10 a 14, donde el fragmento de unión a antígeno es un scFv, y la región variable de cadena pesada y la región variable de cadena ligera están unidas por la secuencia de la SEQ ID NO: 181.
- 5 16. El uso de una cualquiera de las reivindicaciones 10 a 14, donde el sujeto padece una enfermedad mediada por VEGF seleccionada del grupo que consiste en la degeneración macular senil, glaucoma neovascular, retinopatía diabética, retinopatía de la prematuridad.
- 10 17. El uso de una cualquiera de las reivindicaciones 10 a 14, donde el sujeto padece una enfermedad mediada por VEGF seleccionada del grupo que consiste en fibroplasia retrolenticular, carcinomas de mama, carcinomas broncopulmonares, 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 laringeos, hepatoblastoma, sarcoma de Kaposi, melanoma, carcinomas de piel, hemangioma, hemangioma cavernoso, hemangioblastoma, carcinomas pancreáticos, retinoblastoma, astrocitoma, glioblastoma, schwannoma, oligodendrogioma, meduloblastoma, neuroblastomas, rabdomiosarcoma, 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.
- 15

Fig. 1a

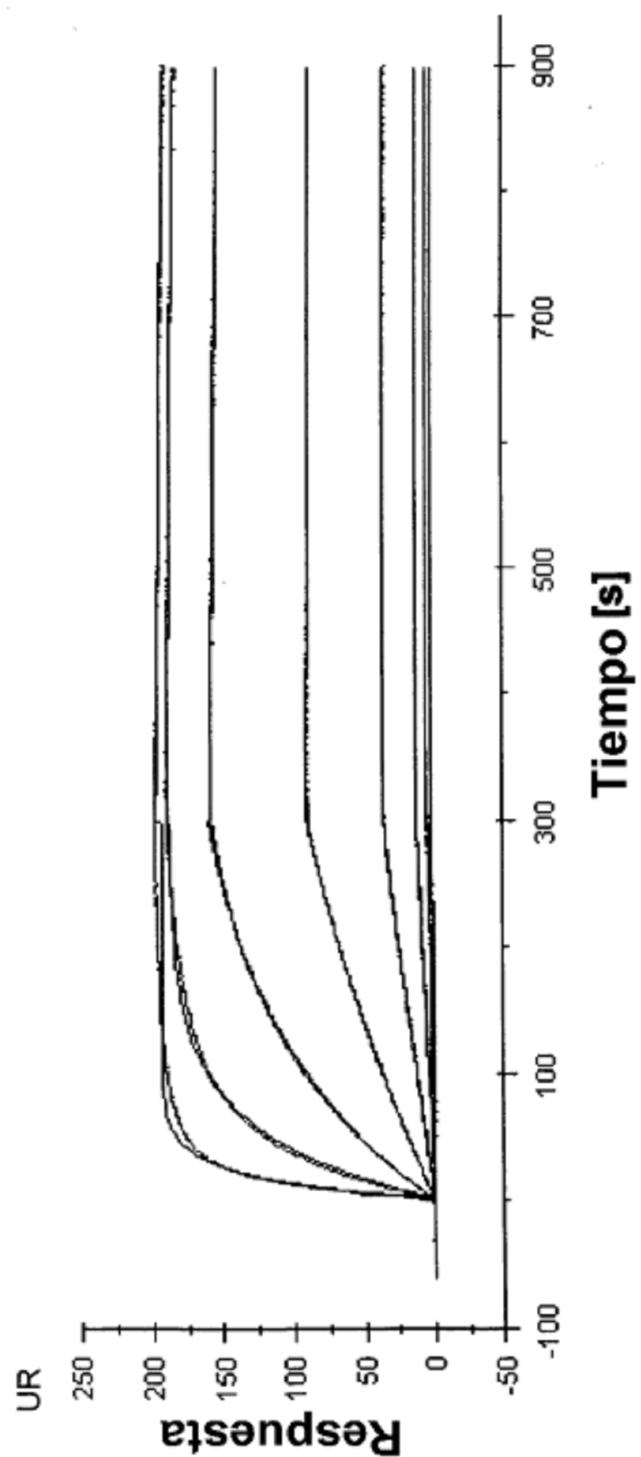


Fig. 1b

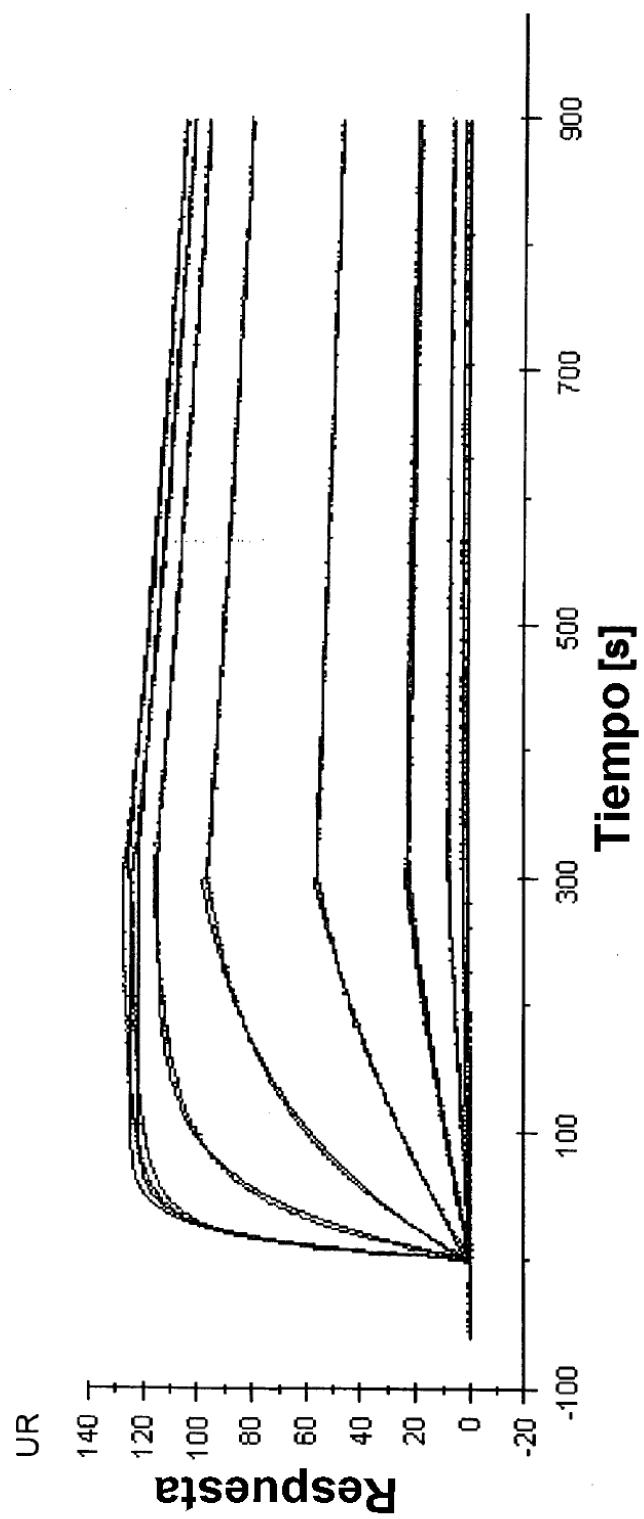


Fig. 2a

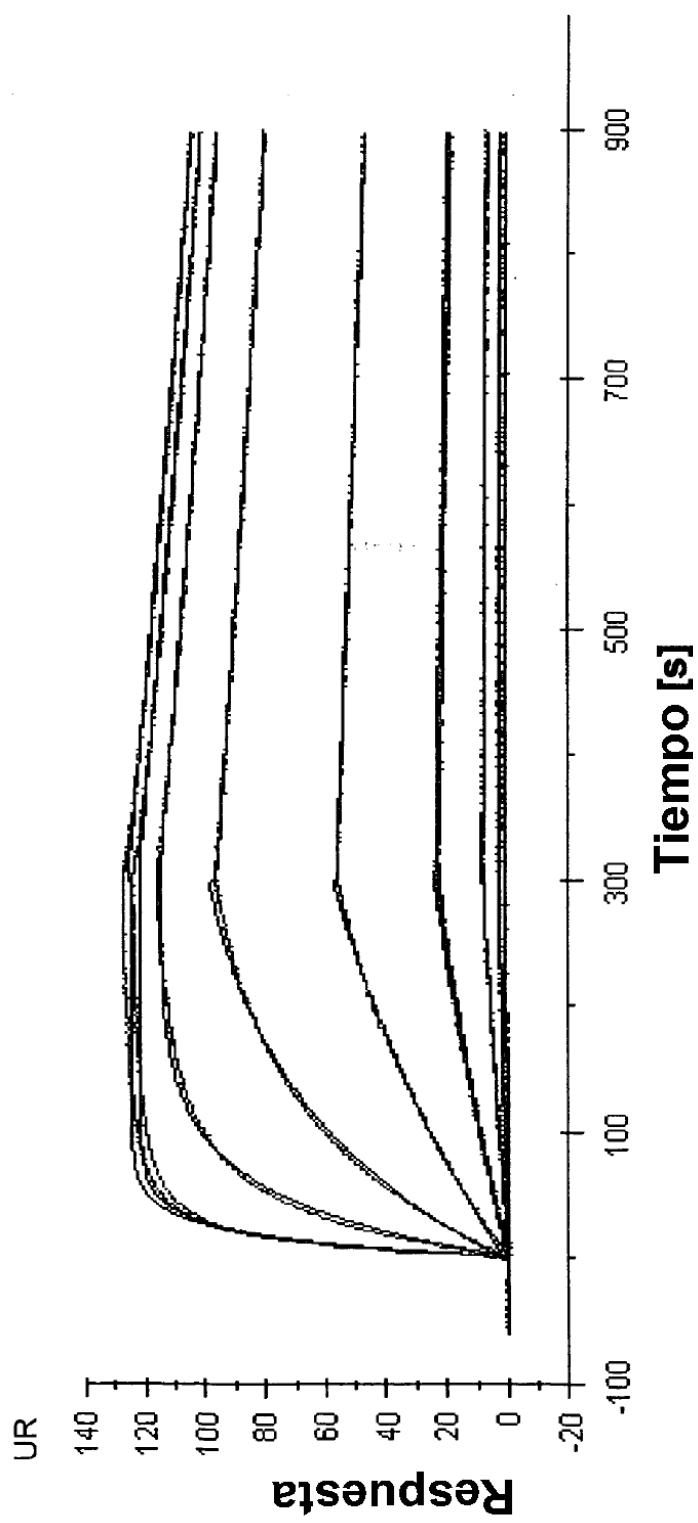


Fig. 2b

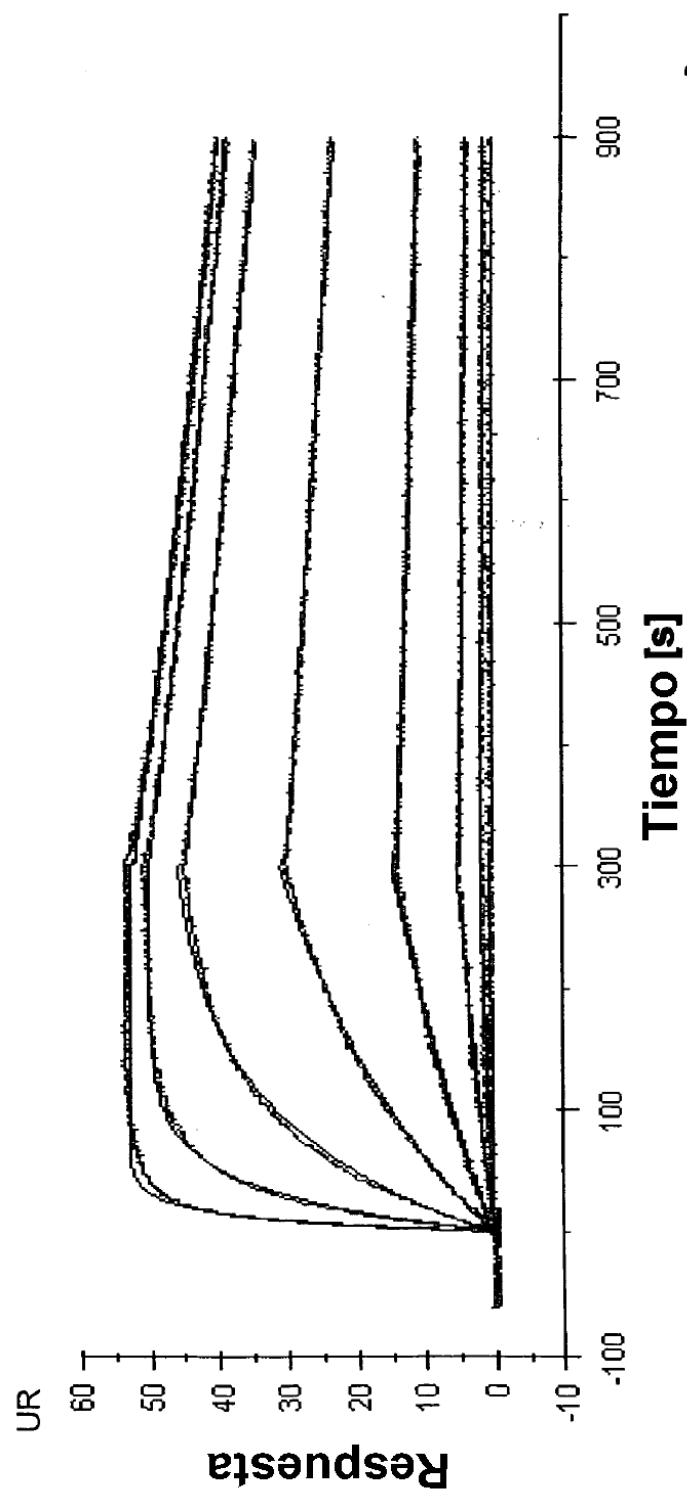


Fig. 2c

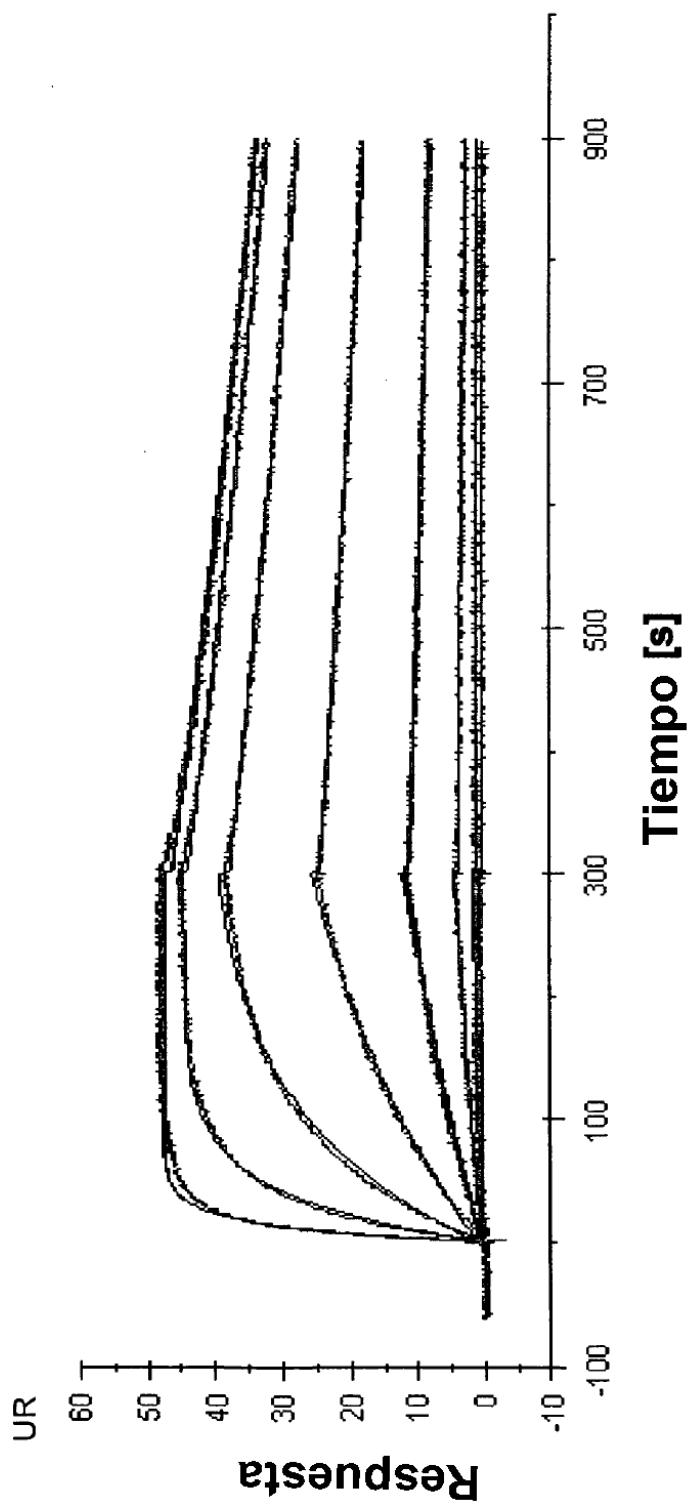


Fig. 3a

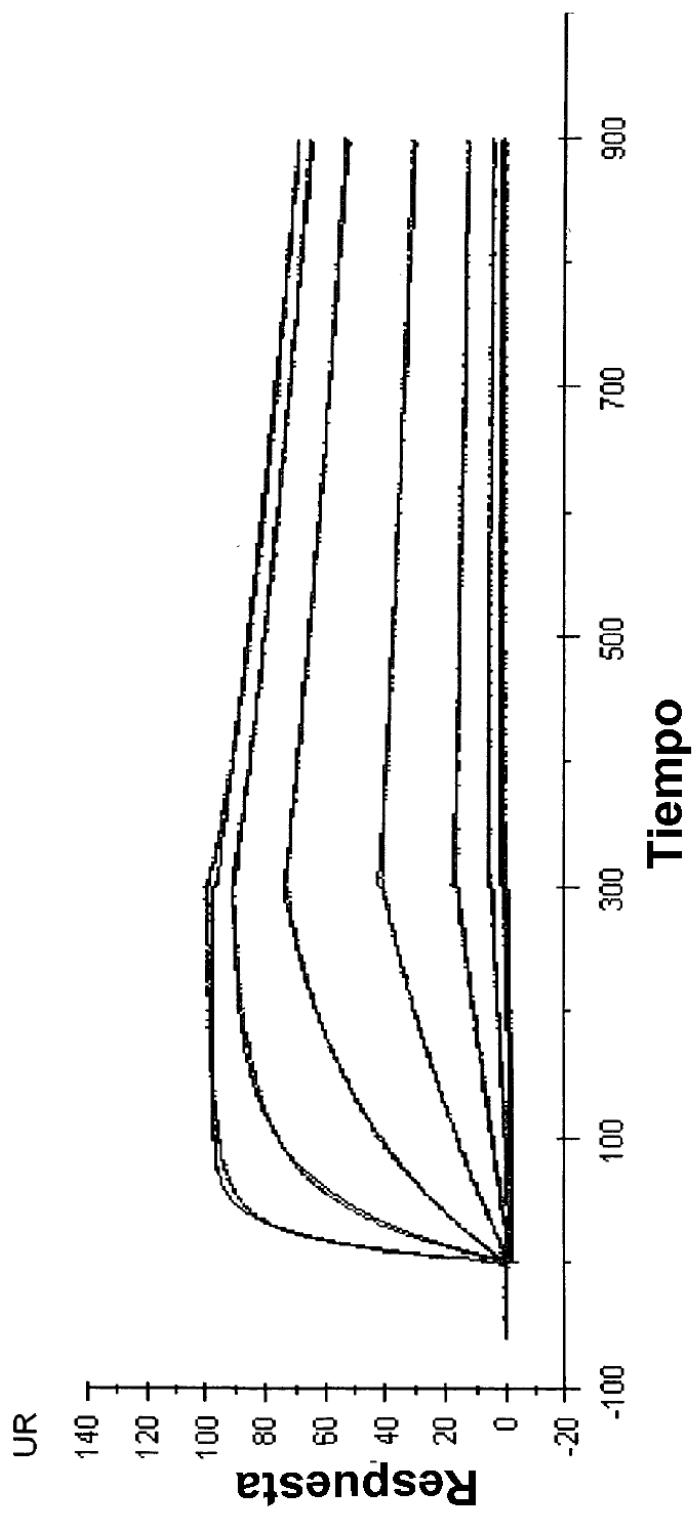


Fig. 3b

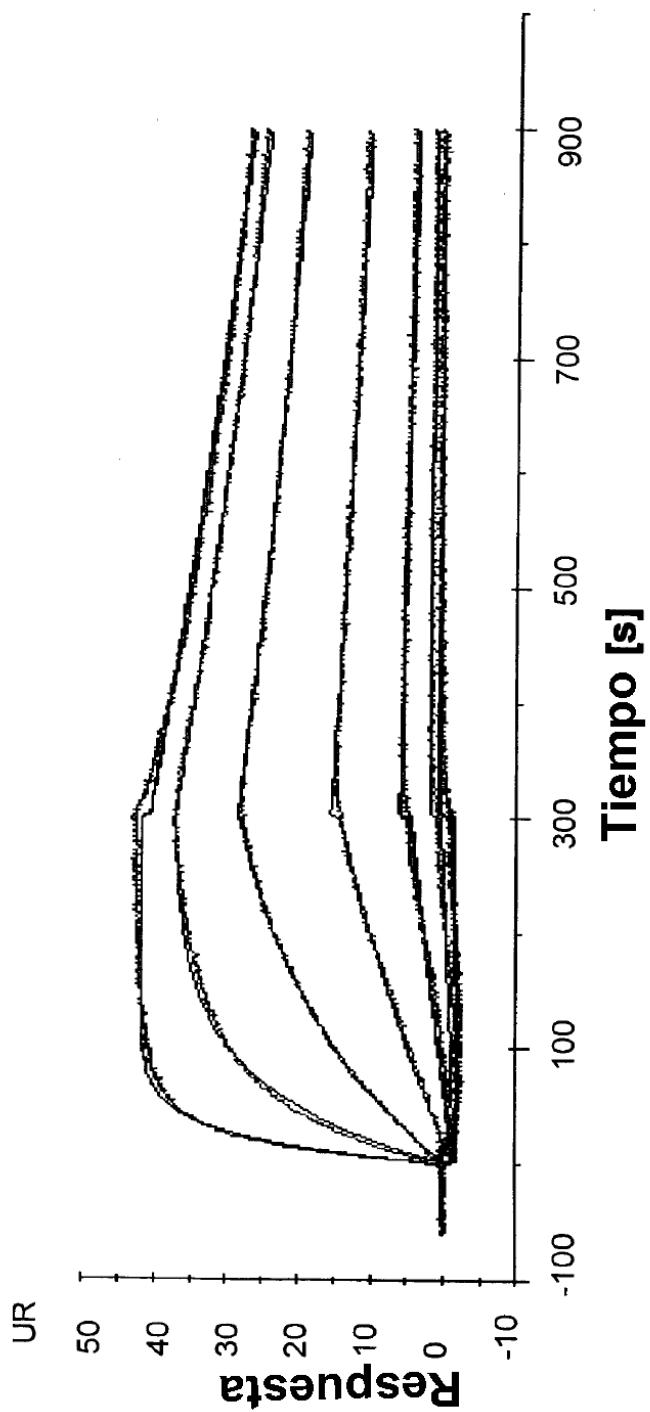


Fig. 4a

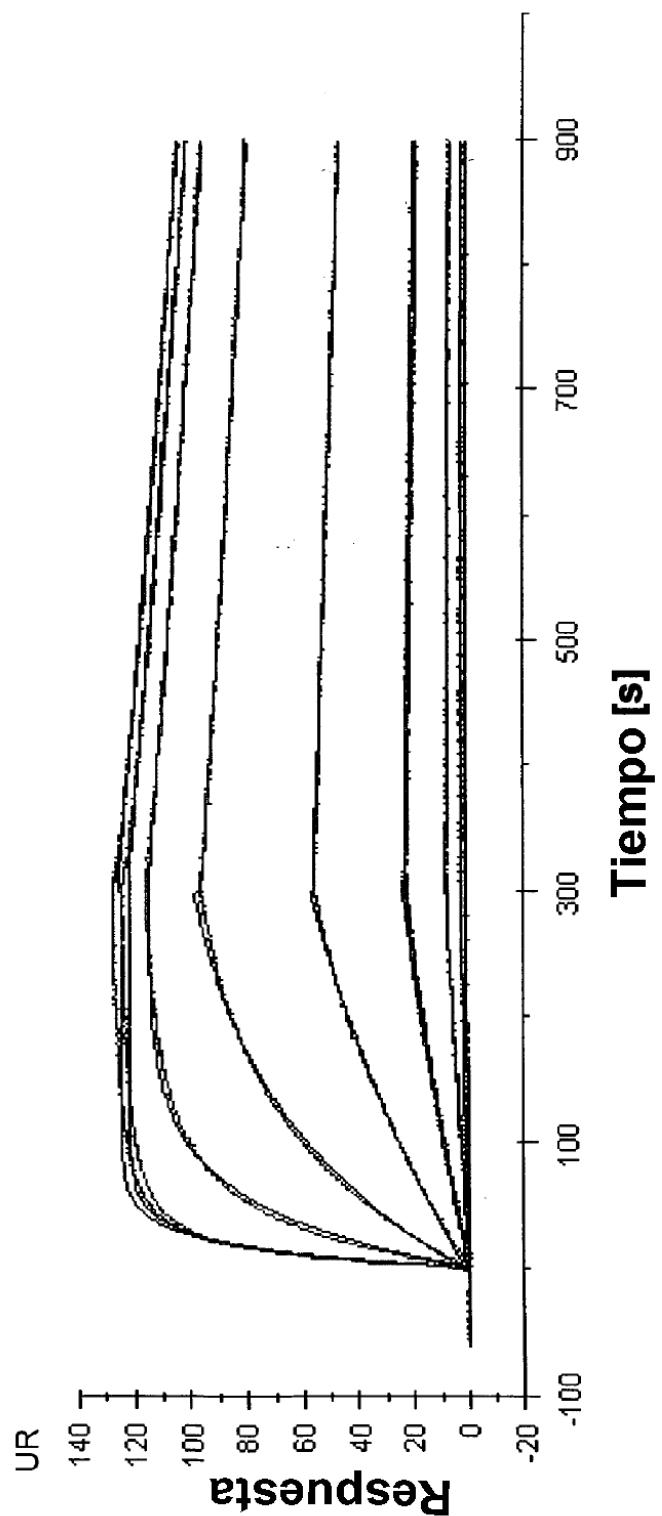


Fig. 4b

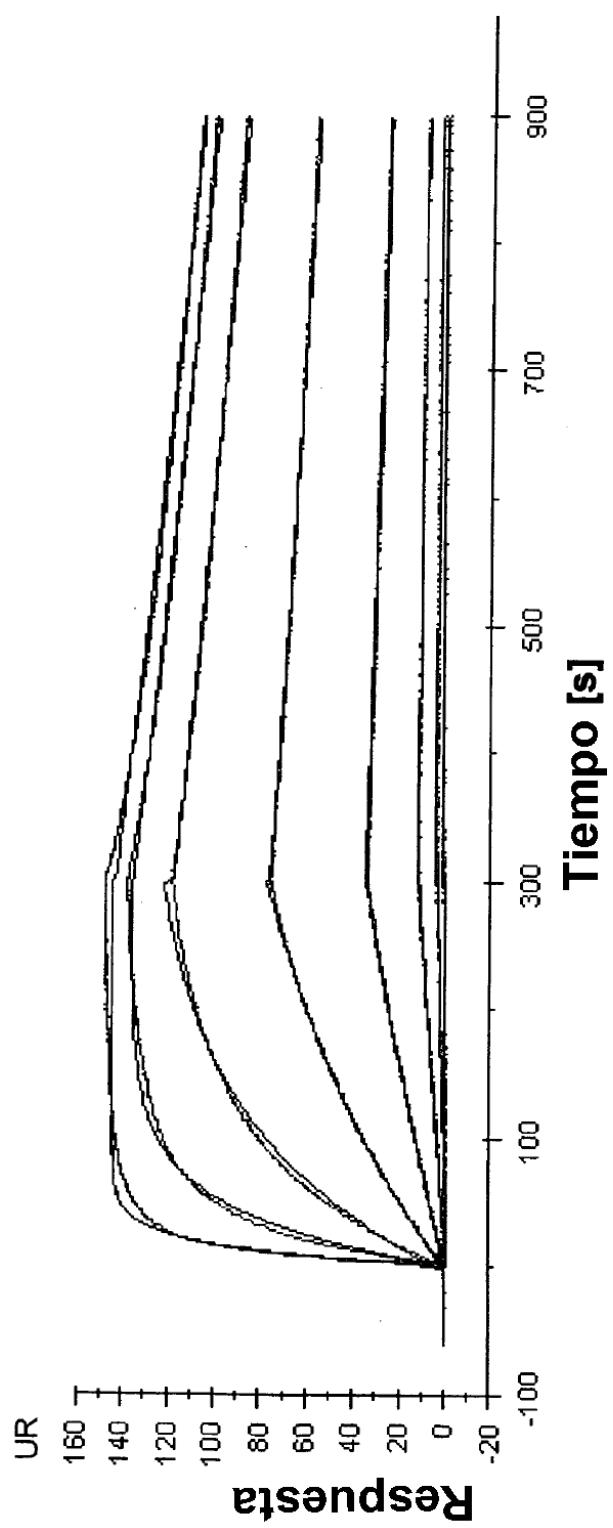
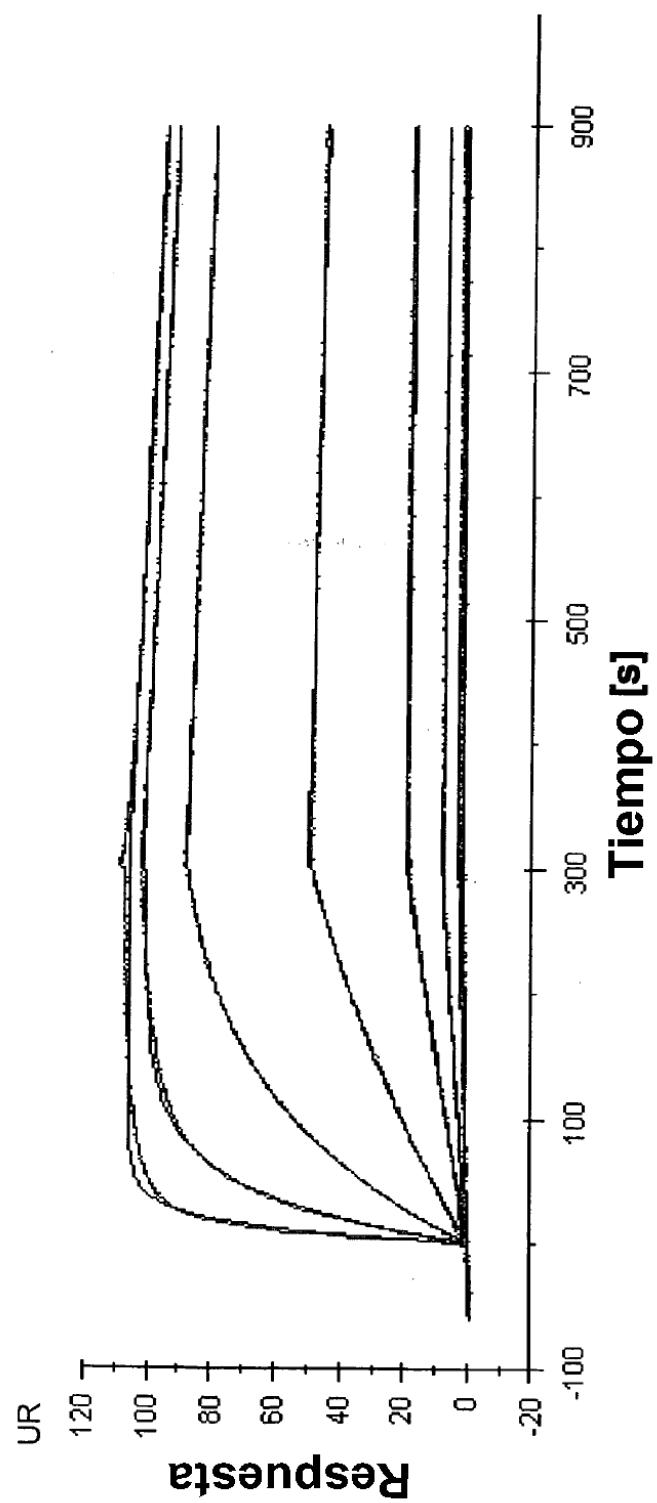
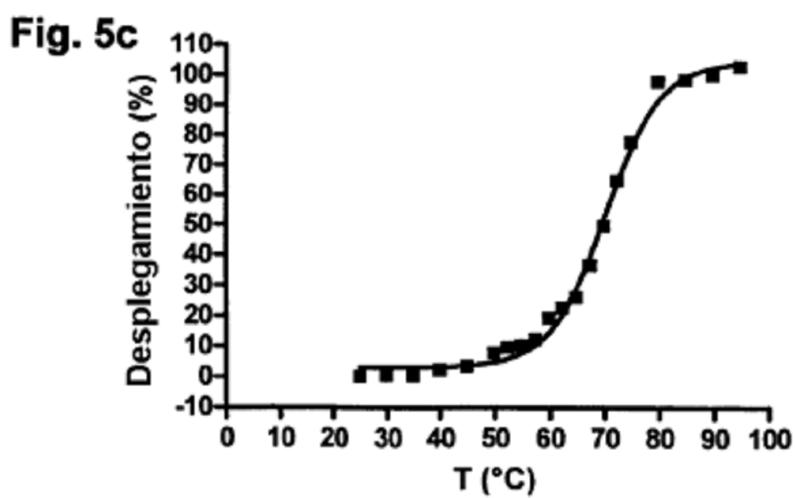
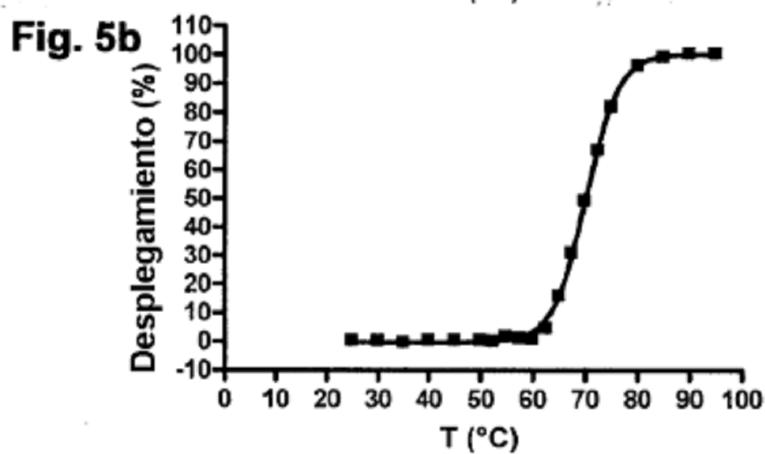
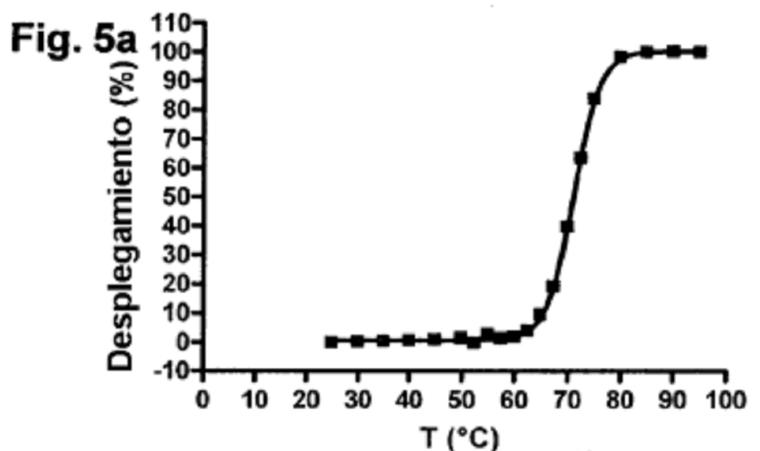
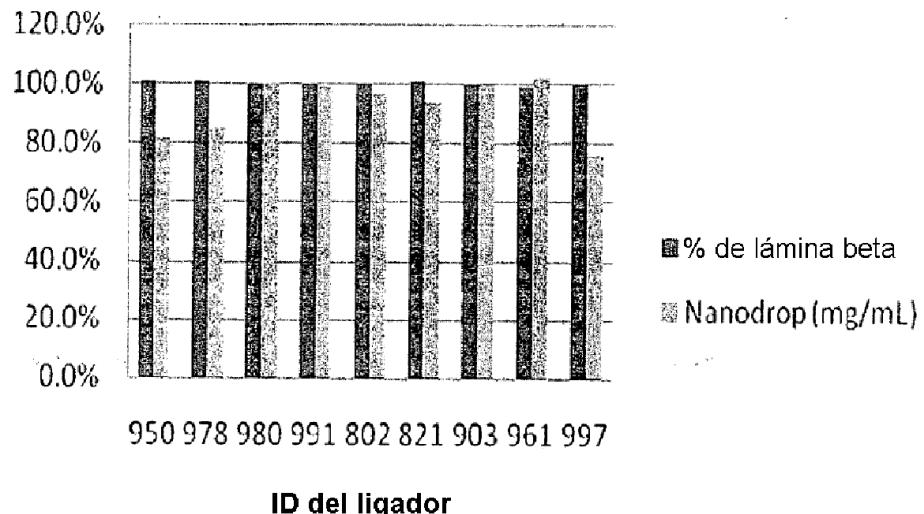


Fig. 4c



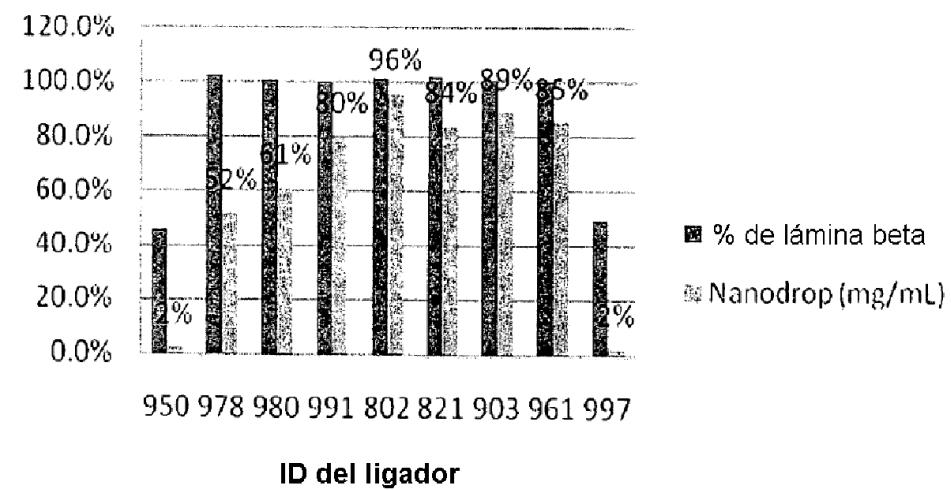
Valores normalizados respecto a la prot nativa (%)

Fig. 6a



Valores normalizados respecto a la prot nativa (%)

Fig. 6b



Valores normalizados respecto a la prot nativa (%)

Fig. 6c

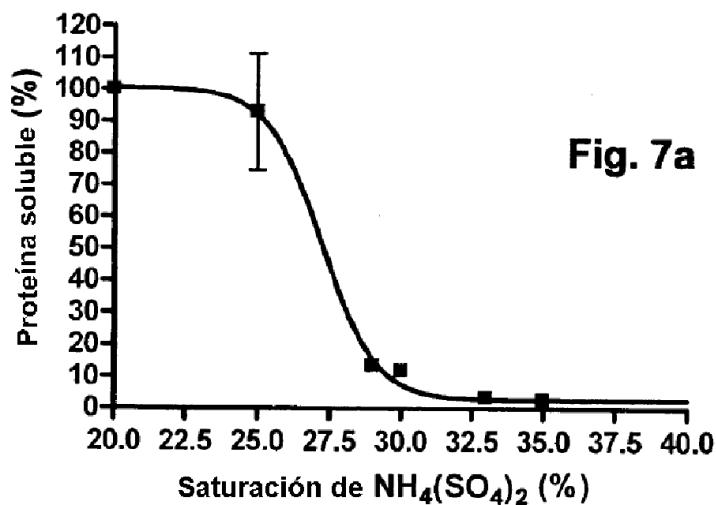
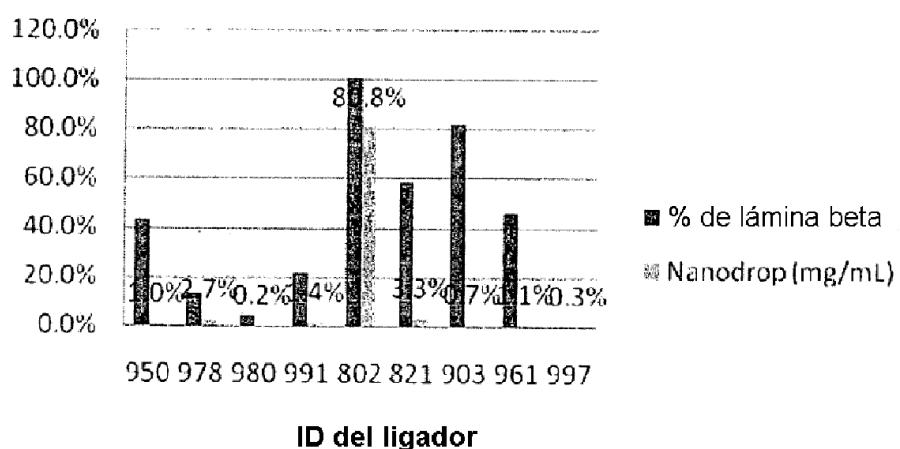
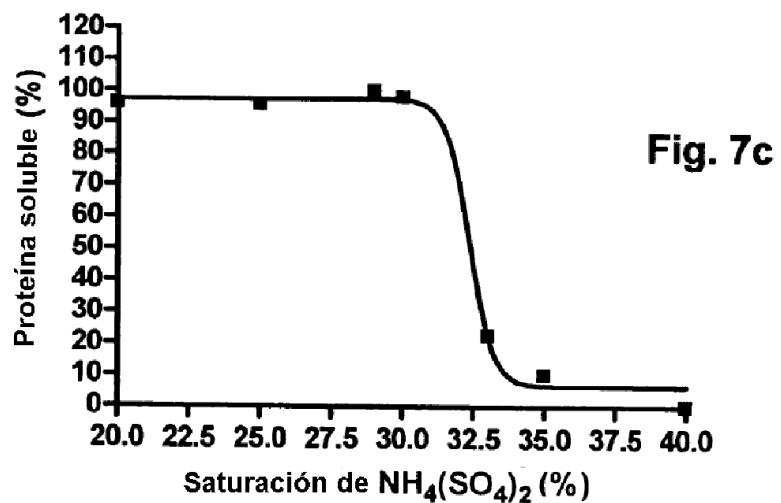
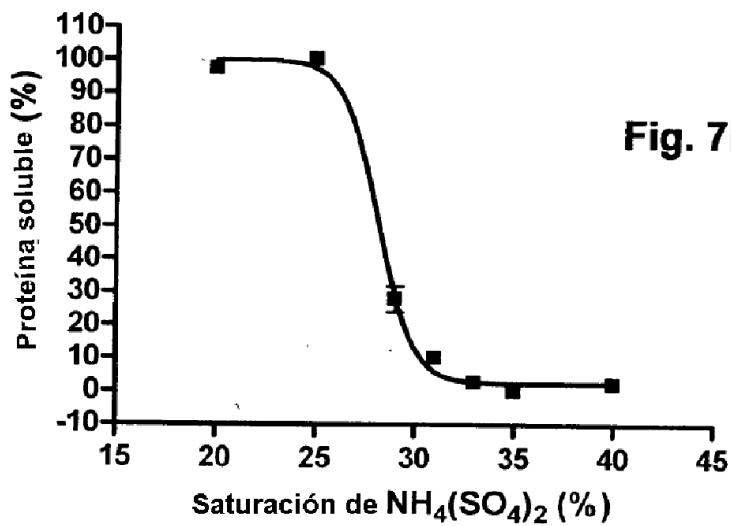
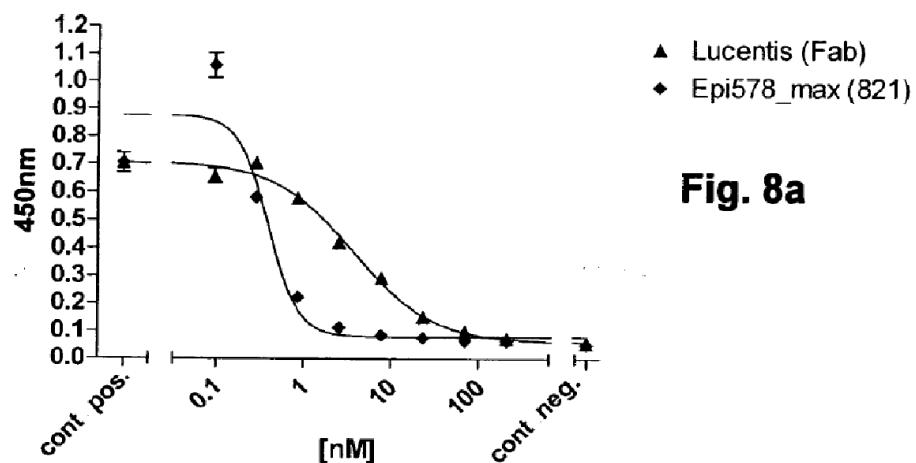
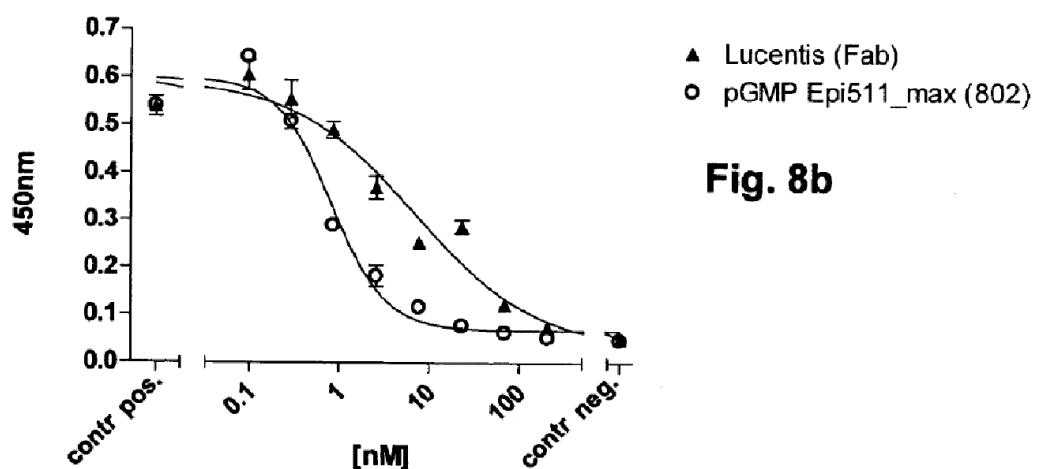
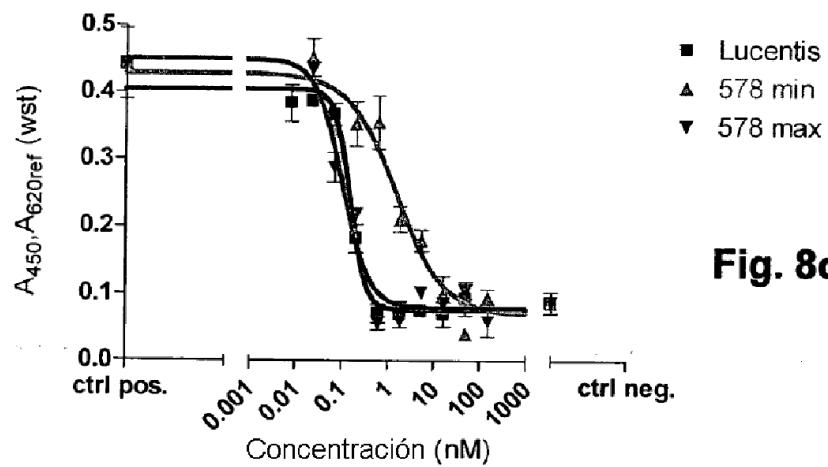
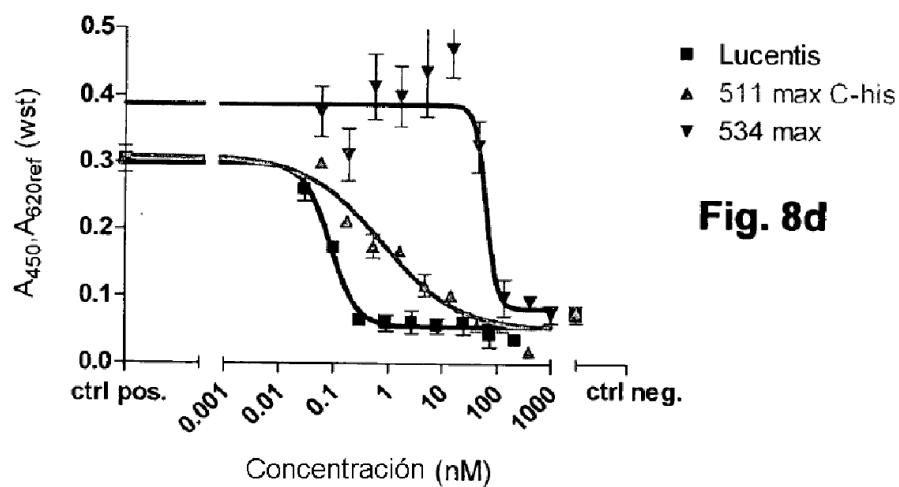
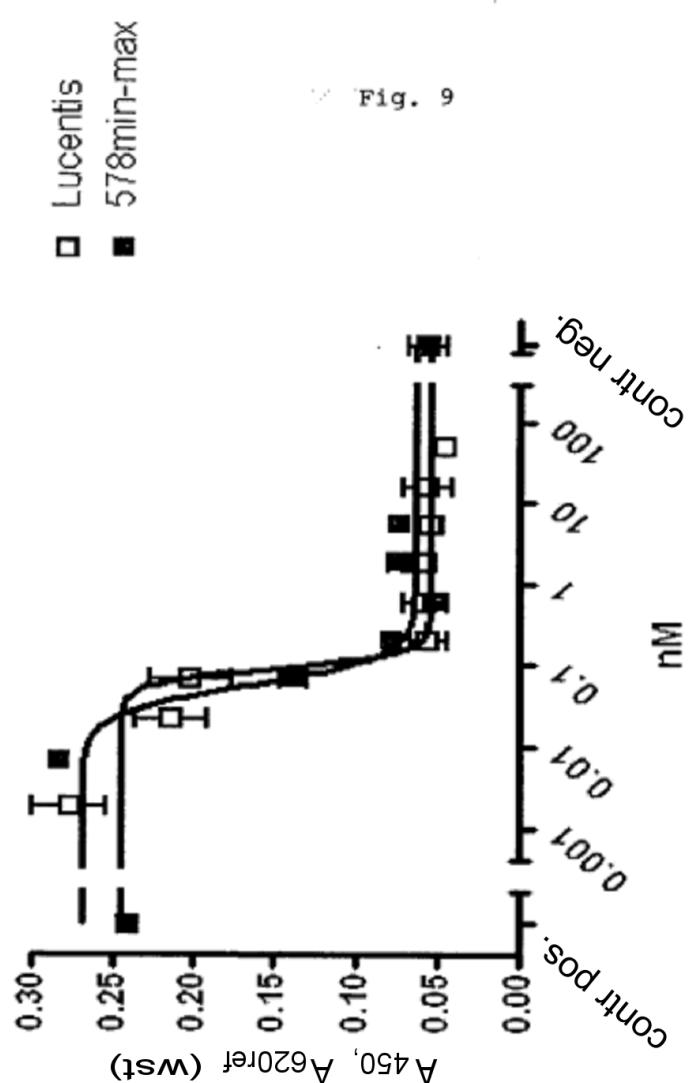


Fig. 7a



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

**Fig. 8c****Fig. 8d**



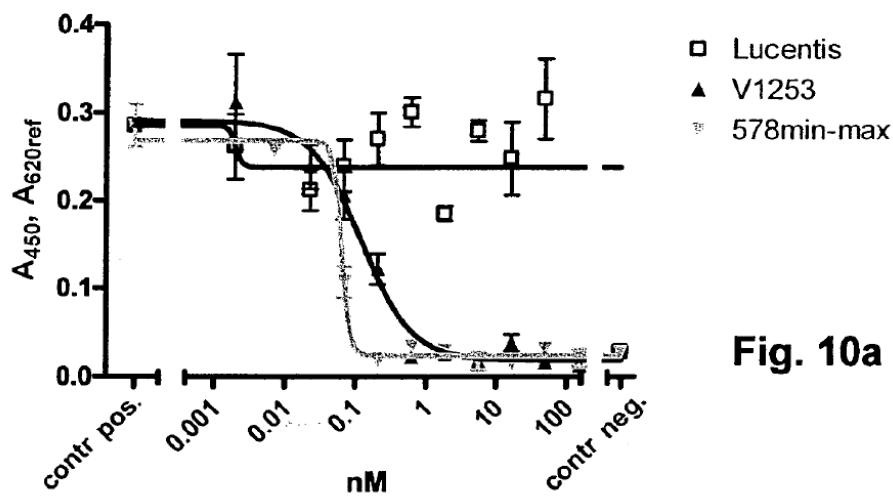


Fig. 10a

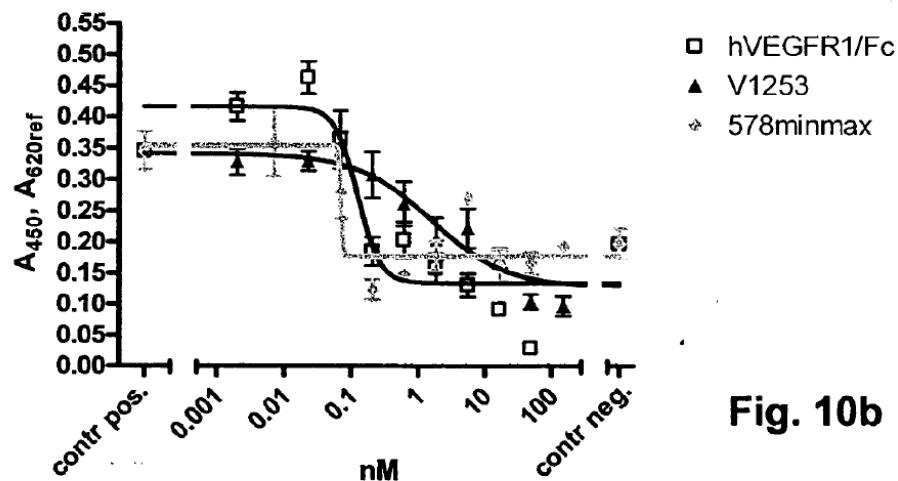


Fig. 10b

Fig. 10

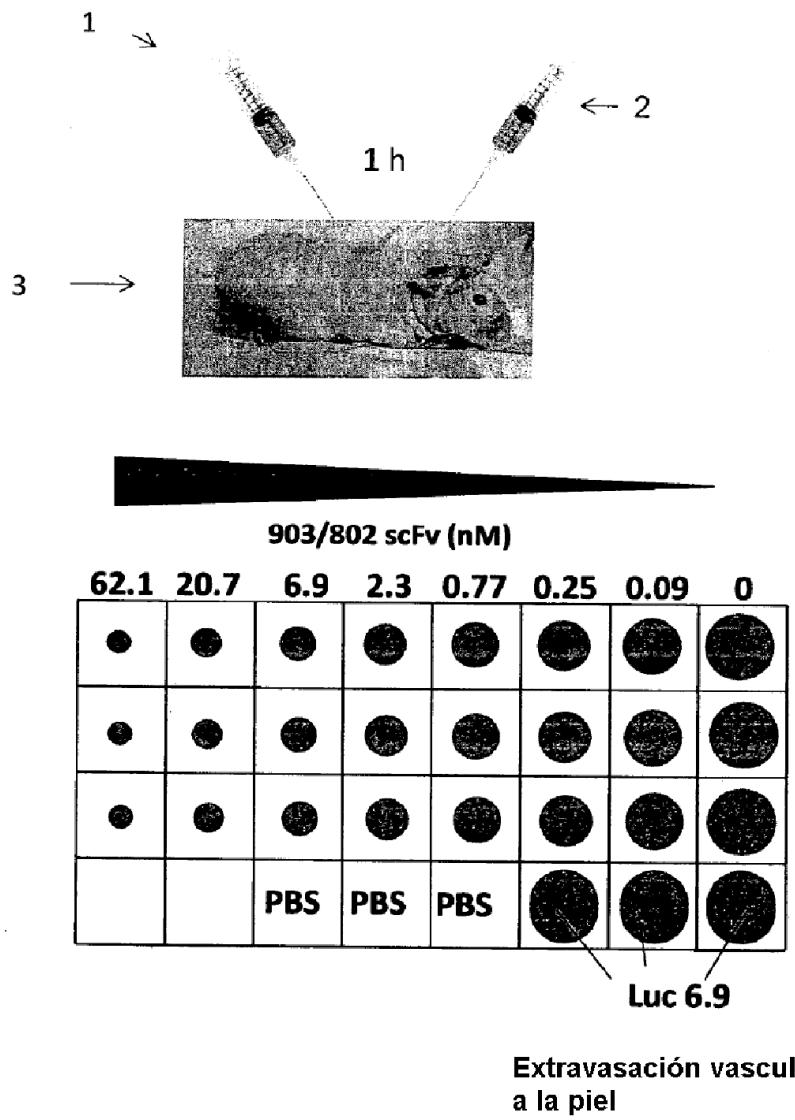
**Fig. 11**

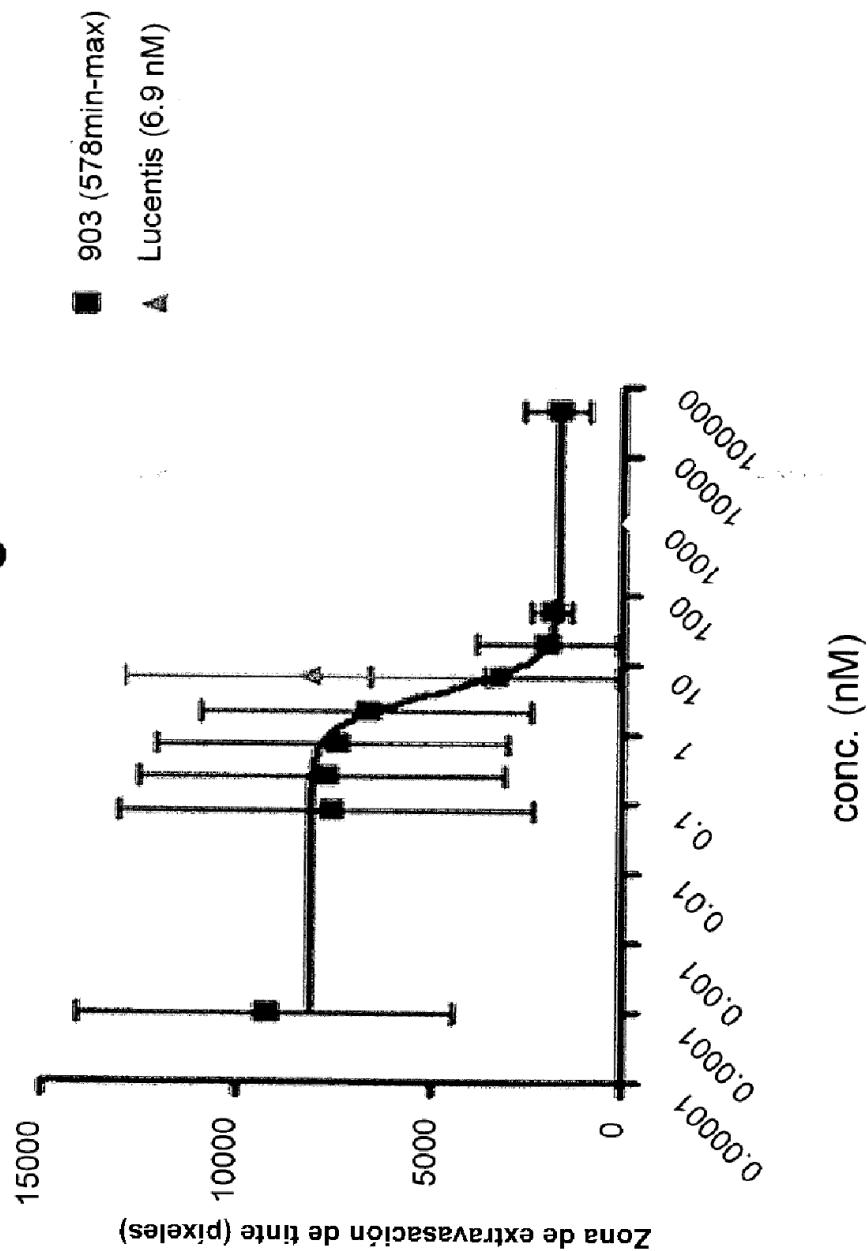
Fig. 12a

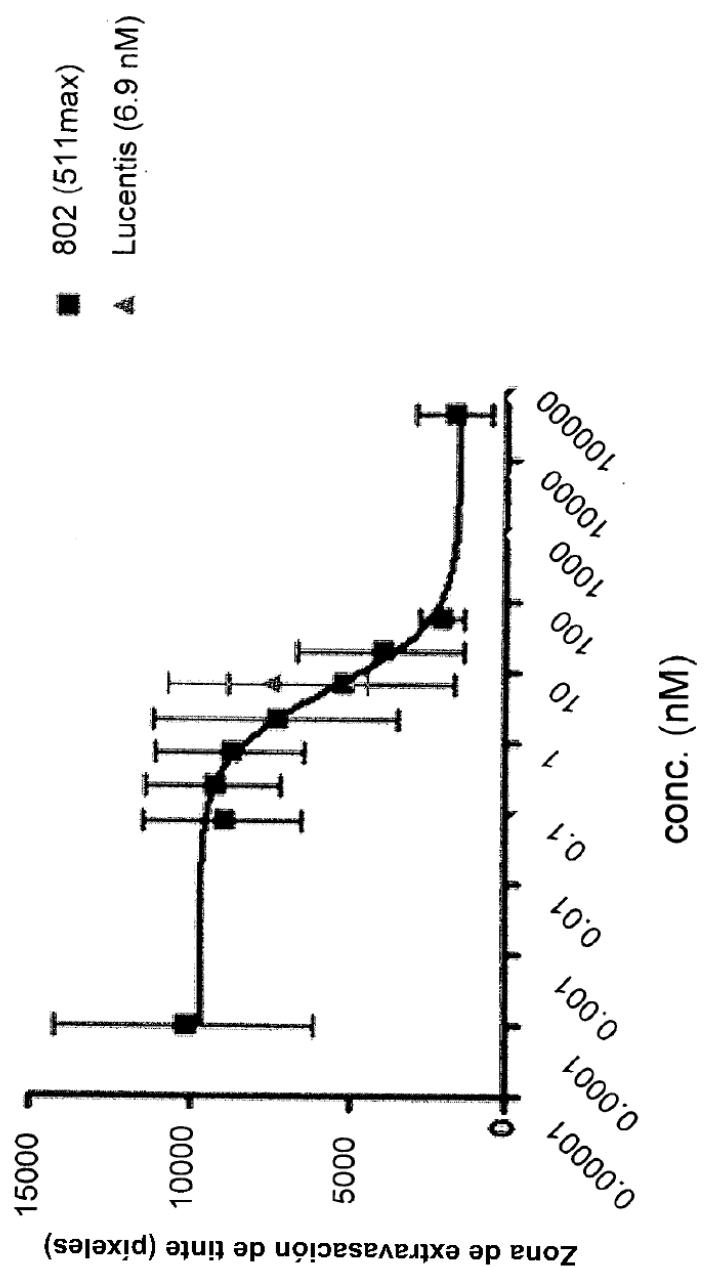
Fig. 12b

Fig. 12c

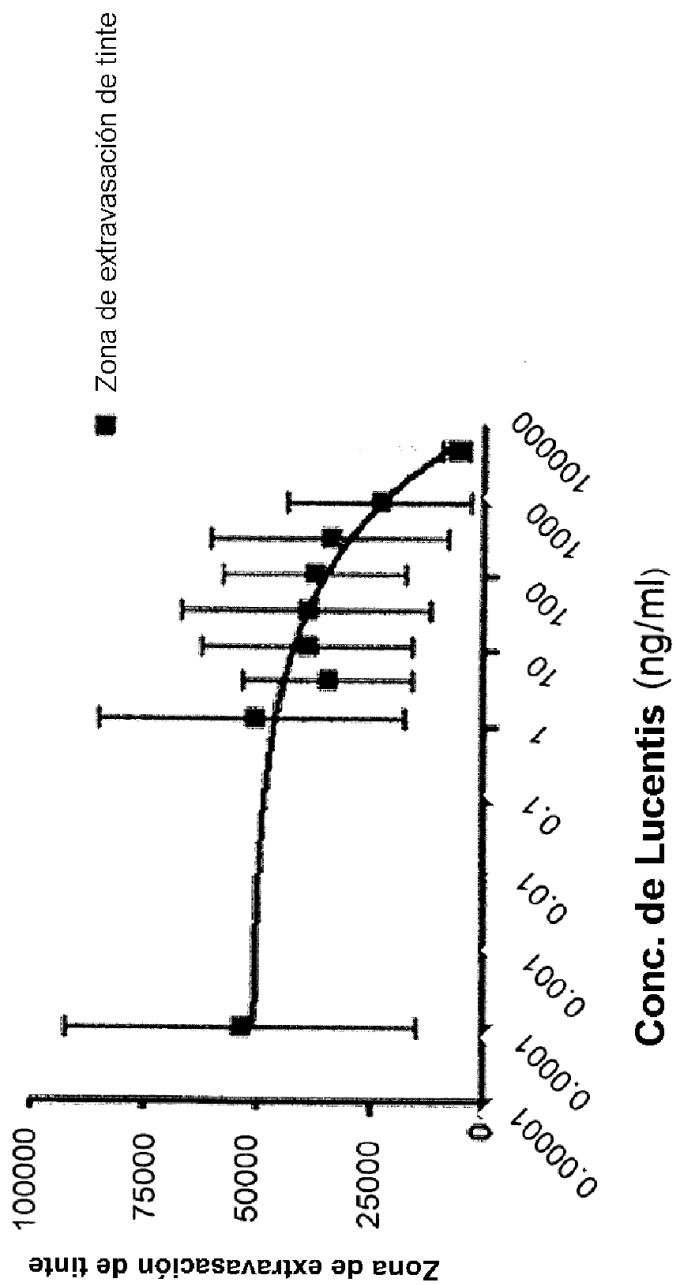


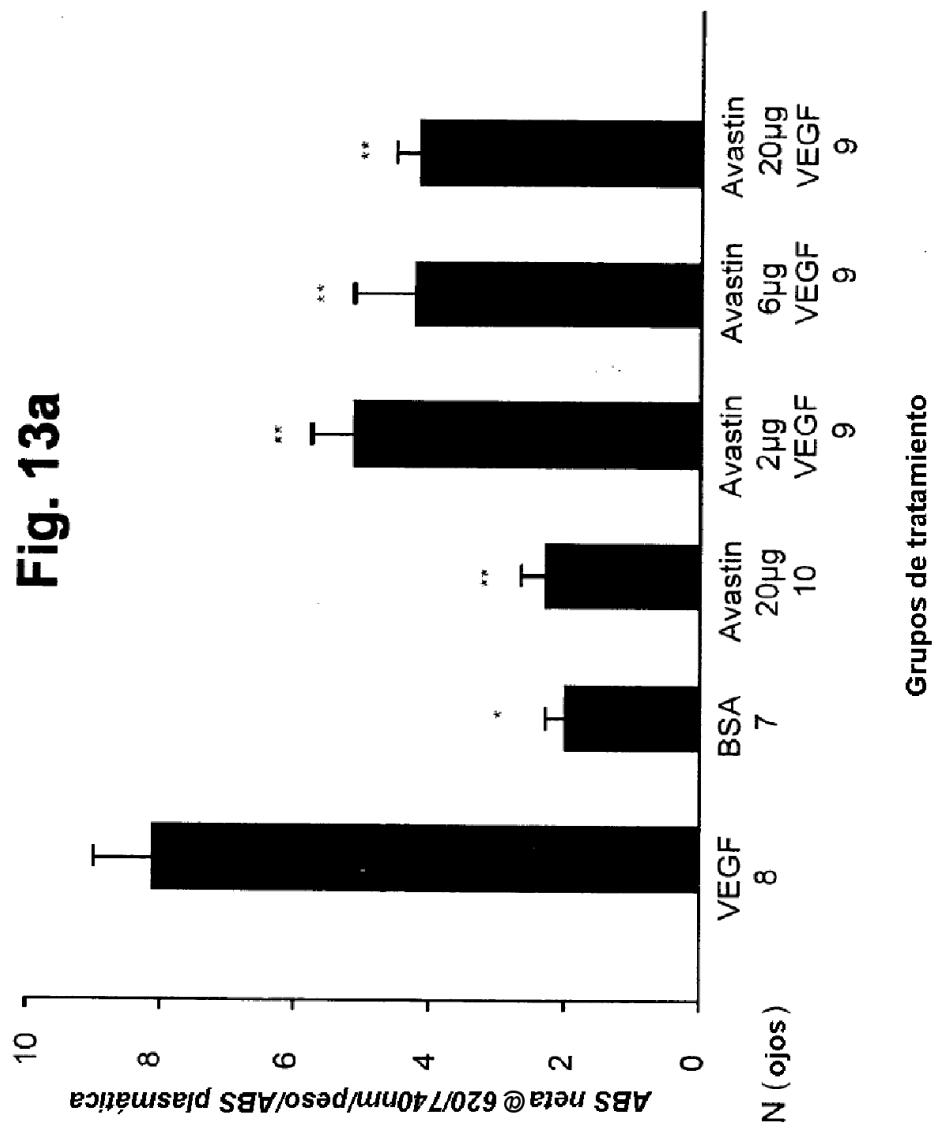
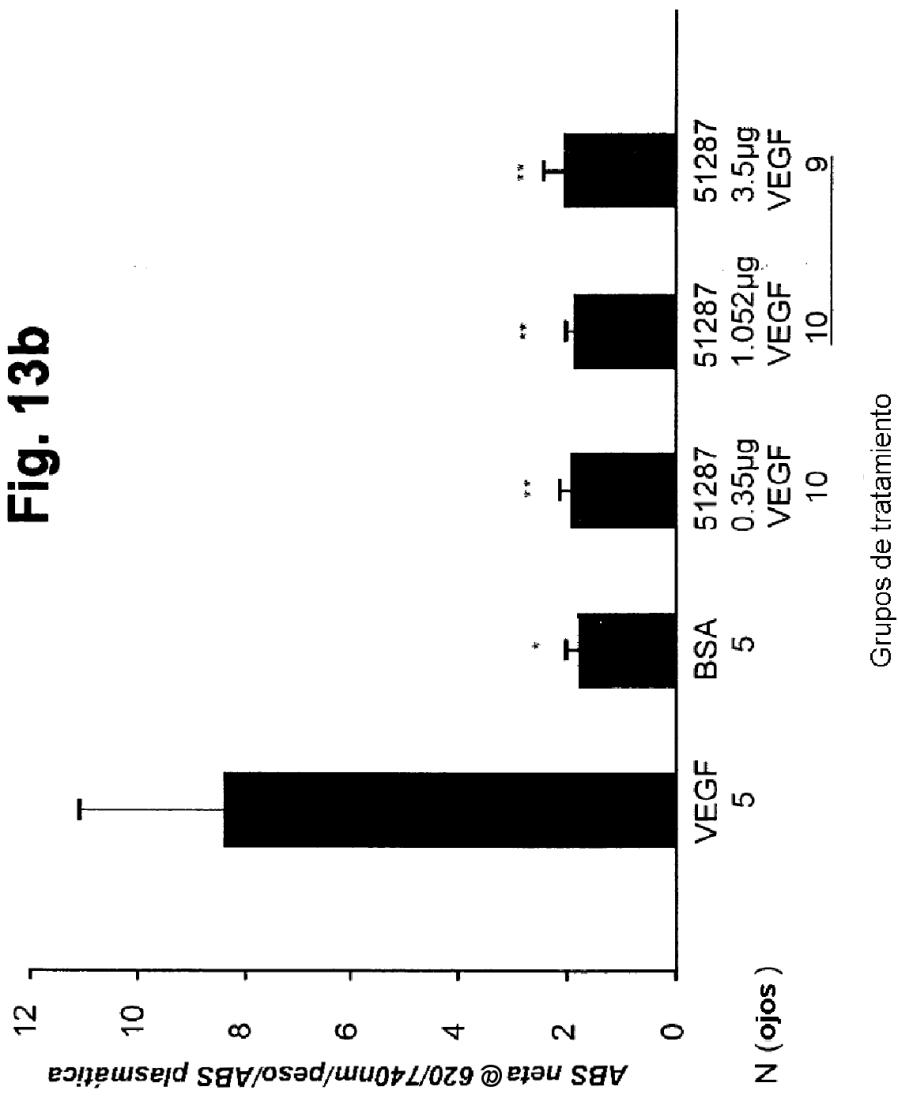
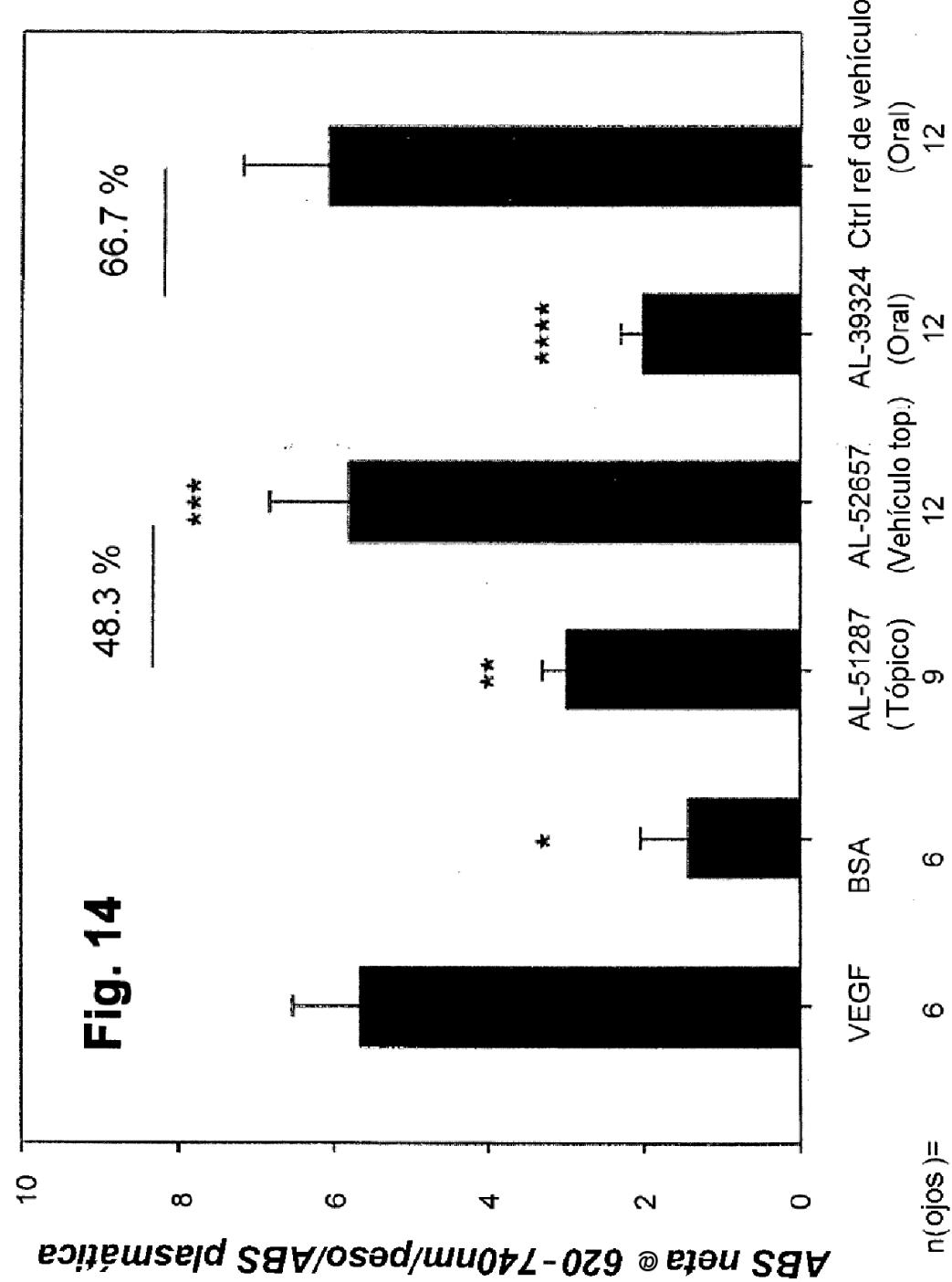
Fig. 13a

Fig. 13b



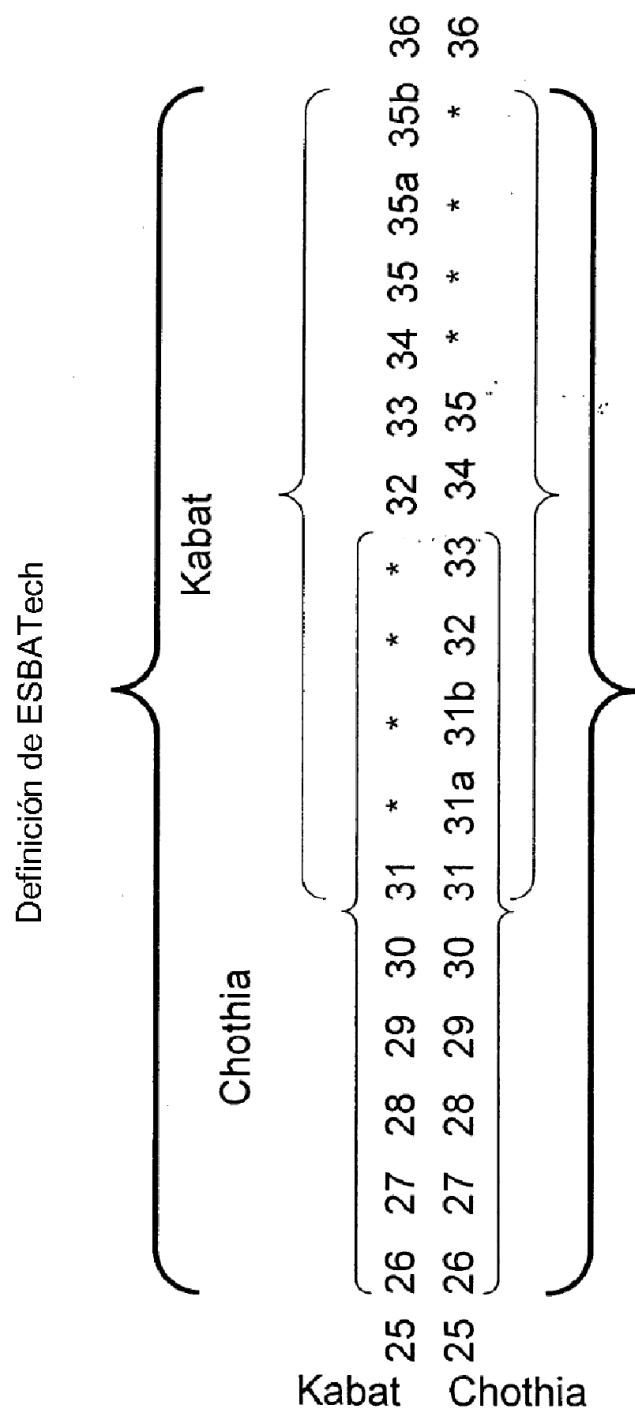


Figura 15