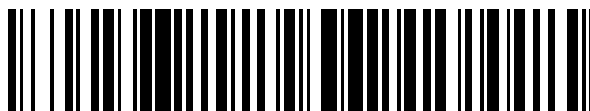


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 450 933**

51 Int. Cl.:

C07K 16/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **26.06.2007 E 07768499 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **15.01.2014 EP 2158217**

54 Título: **Anticuerpo monoclonal humano que neutraliza el receptor del factor de crecimiento endotelial vascular y uso del mismo**

30 Prioridad:

13.06.2007 KR 20070057719

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

25.03.2014

73 Titular/es:

**PHARMABCINE INC. (100.0%)
412 Daejeon bioventure town 461-8, Jeonming-
dong, Yuseong-gu
Daejeon 305-390, KR**

72 Inventor/es:

**YOO, JIN SAN;
LEE, WEON SUP;
SHIM, SANG RYEOL;
PARK, MI HEE;
KANG, JEONG EUN;
KIM, DO YUN;
LEE, JOON CHUL;
LEE, DONG HEON;
CHO, TOO HYON;
SUL, SAM SOOK;
KWON, YOUNG GUEN;
PYUN, BO JEONG;
KIM, KWI HWA;
YUN, CHAE OK;
KIM, NAHM JU;
JEON, JAE WON;
LEE, DONG SUP;
PARK, YOUNG WOO;
RHA, GEUN BAE;
JANG, HYUN SOOK;
YOO, HYEON MI;
KIM, SUNG WOO;
KIM, SEMI y
KOH, SANG SEOK**

74 Agente/Representante:

PONS ARIÑO, Ángel

ES 2 450 933 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

Anticuerpo monoclonal humano que neutraliza el receptor del factor de crecimiento endotelial vascular y uso del mismo.

5

Campo técnico

La presente invención se refiere a anticuerpos monoclonales humanos que neutralizan el receptor del factor de crecimiento endotelial vascular y al uso de los mismos y, más particularmente, a moléculas de ScFv humanas que neutralizan el receptor del factor de crecimiento endotelial vascular, a una composición para inhibir la angiogénesis y a una composición para el tratamiento del cáncer, que contienen las moléculas de ScFv humanas.

10

Antecedentes de la técnica

La angiogénesis significa la formación de nuevos vasos sanguíneos a partir de vasos preexistentes por el crecimiento, diferenciación y migración de células endoteliales y no se produce en adultos sanos, excepto en algunas ocasiones especiales que incluyen la curación de heridas, menstruación, etc. Sin embargo, se ha indicado una formación excesiva de nuevos vasos sanguíneos en enfermedades tales como el crecimiento tumoral y la metástasis, la degeneración macular asociada a la edad, la artritis reumatoide, la retinopatía diabética, la psoriasis y la inflamación crónica (Cameliet y Jain, *Nature*, 407: 249, 2000). Por esta razón, se han realizado muchos intentos de tratar enfermedades, particularmente tumores, usando inhibidores de la angiogénesis.

20

Los factores implicados en la angiogénesis incluyen el factor del crecimiento endotelial vascular (VEGF), el factor de crecimiento epitelial (EGF), el factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), el factor de crecimiento transformante b (TGFb), el factor de crecimiento de fibroblastos (FGF), etc. Entre ellos, el factor de crecimiento endotelial vascular es un factor específico de células endoteliales que está implicado directamente en el crecimiento, diferenciación y migración de células endoteliales, y existen cuatro isoformas diferentes (VEGF165, VEGF121, VEGF189 y VEGF206). Entre las cuatro isoformas, el VEGF 165 es la isoforma más abundante en todos los tejidos humanos excepto en el de la placenta (Tisher *et al.*, *J. Biol. Chem.*, 266: 11947, 1991).

25

30

El factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) regula la formación de nuevos vasos sanguíneos debida a la diferenciación de precursores endoteliales (angioblastos) *in situ*, se expresa en tejidos embrionarios (Breier *et al.*, *Development (Camb)*, 114: 521, 1992), macrófagos y queratinocitos epiteliales en proliferación durante la curación de heridas (Brown *et al.*, *J. Exp. Med.*, 176: 1375, 1992) y puede ser responsable del edema tisular asociado con la inflamación (Ferrara *et al.*, *Endocr. Rev.*, 13: 18, 1992). Ciertos estudios de hibridación *in situ* han demostrado una alta expresión de VEGF en varias líneas tumorales humanas incluyendo las del glioblastoma multiforme, hemangioblastoma, neoplasias del sistema nervioso central y sarcoma de Kaposi asociado con el SIDA (Plate *et al.*, *Nature*, 359: 845, 1992; Plate *et al.*, *Cancer Res.*, 53: 5822, 1993; Berkman *et al.*, *J. Clin. Invest.*, 91: 153, 1993; Nakamura *et al.*, *AIDS Weekly*, 13(1), 1992). También se han observado altos niveles de VEGF en la angiogénesis inducida por hipoxia (Shweiki *et al.*, *Nature*, 359: 843, 1992).

35

40

La función biológica del VEGF está mediada por los receptores de VEGF de alta afinidad que se expresan selectivamente en las células endoteliales durante la embriogénesis (Millauer *et al.*, *Cell*, 72: 835, 1993) y durante la formación de tumores. Los receptores de VEGF (VEGFR) típicamente son tirosina quinasa de tipo receptor de clase III caracterizadas por tener varios bucles, típicamente 5 o 7, de tipo inmunoglobulina en el dominio de unión al ligando extracelular amino-terminal del receptor (Kaipainen *et al.*, *J. Exp. Med.*, 178: 2027, 1993). Las otras dos regiones incluyen una región transmembrana y un dominio catalítico intracelular carboxilo-terminal interrumpido por una inserción de secuencias interquinasa hidrófilas de longitudes variables, denominada dominio de inserto de quinasa (Terman *et al.*, *Oncogene*, 6: 1677, 1991). Los receptores de VEGF incluyen receptores con función tirosina quinasa de tipo fms (Flt-1), o VEGFR-1 (Shibuya *et al.*, *Oncogene*, 5: 519, 1990; documento WO 92/14248; Terman *et al.*, *Oncogene*, 6: 1677, 1991), y receptores que contienen dominio de inserto de quinasa/quinasa de hígado fetal (KDR/Flk-1), o VEGFR-2 (Matthews *et al.*, *PNAS*, 88: 9026, 1991), aunque también pueden unirse a VEGF otros receptores tales como la neuropilina-1 y la neuropilina-2. Otro receptor de tirosina quinasa, VEGFR-3 (Flt-4), se une a los homólogos de VEGF VEGF-C y VEGF-D y es importante en el desarrollo de vasos linfáticos.

45

50

55

Lu D. *et al.*; *International Journal of Cancer*, Vol. 97, Nº 3, 20 de enero de 2002 (20-01-2002), páginas 393-399, divulga la selección de anticuerpos neutralizantes humanos de alta afinidad para VEGFR2 a partir de una gran biblioteca de presentación de fagos de anticuerpos para una terapia antiangiogénica.

60

Zhu Z. *et al.*; *Cancer Research*, Vol. 58, Nº 15, 1 de agosto de 1998 (01-08-1998), páginas 3209-3214, divulga la inhibición de la activación del receptor inducido por el factor de crecimiento endotelial vascular con anticuerpos monocatenarios anti-receptor que contiene dominio de inserto de quinasa obtenidos de una biblioteca de presentación de fagos.

65

Lu D. *et al.*; *Journal of Biological Chemistry*, Vol. 278, Nº 44, 12 de agosto de 2003 (12-08-2003), páginas 43496-43507 divulga la adaptación de la selección *in vitro* de anticuerpos humanos de afinidad en el intervalo picomolar

dirigidos contra el receptor del factor de crecimiento endotelial vascular 2 para aumentar la actividad neutralizante.

Zhang Haifan *et al.*, *Leukemia and Lymphoma*, Vol. 45, Nº 9, 1 de septiembre de 2004 (01-09-2004), páginas 1887-1897 divulga la inhibición del crecimiento tanto autocrino como paracrino de la leucemia humana con un anticuerpo completamente humano dirigido contra el receptor del factor de crecimiento endotelial vascular 2.

Miao H Q *et al.*, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, Vol. 345, Nº 1, 23 de junio de 2006 (23-06-2006), páginas 438-445, divulga la potente neutralización de las actividades biológicas de VEGF con un fragmento Fab de anticuerpo completamente humano dirigido contra el receptor de VEGF 2.

El documento US-5.874.542 divulga anticuerpos monoclonales que se unen específicamente a un dominio extracelular de un receptor de VEGF y neutralizan la activación del receptor.

El documento US-6.524.583 B1 divulga anticuerpos que inhiben específicamente la unión de VEGF a solamente uno (VEGFR2) de los dos receptores de VEGF.

El documento WO 03/075840 A2 divulga un anticuerpo que se une a KDR con una afinidad comparable a o mayor que la del VEGF humano, y que neutraliza la activación de KDR.

Las células endoteliales que se infiltran en los gliomas expresan altos niveles de Flk-1 (Plate *et al.*, *Nature*, 359: 845, 1992). Los niveles de Flk-1 están regulados positivamente de forma específica por el VEGF producido por los glioblastomas humanos (Plate *et al.*, *Cancer Res.*, 53: 5822, 1993).

El descubrimiento de altos niveles de expresión de Flk-1 en células endoteliales asociadas a glioblastomas (GAEC) indica que la actividad del receptor probablemente se induce durante la formación del tumor, ya que apenas se pueden detectar transcritos de Flk-1 en las células endoteliales cerebrales normales. Esta regulación positiva se limita a las células endoteliales vasculares muy próximas al tumor. El bloqueo de la actividad de VEGF con anticuerpos monoclonales (mAb) anti-VEGF neutralizantes dio como resultado la inhibición del crecimiento de xenoinjertos tumorales humanos en ratones desnudos (Kim, K. *et al.*, *Nature*, 362: 841-844, 1993), lo que indica un papel directo de VEGF en la angiogénesis relacionada con tumores.

Aunque los ligandos de VEGF están regulados positivamente en las células tumorales y sus receptores están regulados positivamente en las células endoteliales vasculares infiltradas en los tumores, los niveles de expresión de los ligandos de VEGF y sus receptores son bajos en las células normales que no están asociadas con la angiogénesis. Por lo tanto, dichas células normales bloquearían la interacción entre VEGF y sus receptores para inhibir la angiogénesis, inhibiendo de este modo el crecimiento tumoral.

Las células endoteliales que se infiltran en gliomas expresan altos niveles de VEGFR-2, y están regulados positivamente de forma específica por el VEGF producido por los glioblastomas humanos (Plate *et al.*, *Nature*, 359: 845, 1992; Plate *et al.*, *Cancer Res.*, 53: 5822, 1993). El descubrimiento de altos niveles de expresión de VEGFR-2 en células endoteliales asociadas a glioblastomas (GAEC) sugiere que la actividad del receptor se induce durante la formación de los tumores, ya que los transcritos de VEGFR-2 apenas son detectables en las células endoteliales cerebrales normales.

Por lo tanto, se están realizando activamente estudios centrados en la inhibición de la actividad de VEGF, que se expresa en sitios de crecimiento tumoral, para inhibir la angiogénesis y de esta manera inhibir el crecimiento tumoral. Típicamente, se han desarrollado métodos para inhibir los receptores de VEGF en la membrana de células cancerosas para evitar que el VEGF entre en las células. Los ejemplos de líneas celulares que producen anticuerpos para VEGFR incluyen una línea celular de hibridoma que produce anticuerpo monoclonal de rata anti-VEGFR-2 de ratón (DC101; ATCC HB 11534), una línea celular de hibridoma (M25, 18A1; ATCC HB 12152) que produce anticuerpo monoclonal de ratón anti-VEGFR-2 de ratón mAb 25, y una línea celular de hibridoma que produce anticuerpo monoclonal de ratón anti-VEGFR-2 de ratón mAb 73 [(M73,24; ATCC HB 12153), KM1730 (FERM BP-5697; documentos WO 98/22616; WO 99/59636), M1731 (FERM BP-5718), KM1732 (FERM BP-5698), KM1748 (FERM BP-5699), KM1750 (FERM BP-5700)].

Ha habido un desarrollo continuo de anticuerpos humanizados contra receptores de VEGF. Estos anticuerpos humanizados contra receptores de VEGF, que se han desarrollado hasta la fecha, han mostrado una alta competición con el VEGF *in vitro*, pero han tenido problemas debido a que tienen una capacidad reducida para neutralizar los receptores de VEGF en las células y a que los anticuerpos no muestran reactividad cruzada en ratones o ratas, de modo que no pueden llevarse a cabo ensayos animales.

Como consecuencia, los presentes inventores han construido una biblioteca de anticuerpos completamente humanos no inmunizados, han explorado anticuerpos de fragmento variable de cadena sencilla (ScFv) contra el receptor de VEGF (KDR), y han descubierto que los anticuerpos muestran un excelente efecto neutralizante de KDR, no solamente *in vitro*, sino también *in vivo* y en las células, y muestran reactividad cruzada incluso en ratones y ratas, completando de este modo la presente invención.

Descripción de la invención

Es un objeto de la presente invención proporcionar anticuerpos de fragmento variable de cadena sencilla (ScFv) completamente humanos ScFv-6A6 y IgG-6A6, que tengan una excelente capacidad para neutralizar el receptor de VEGF en las células e *in vivo*.

Otro objeto de la presente invención es proporcionar un fragmento variable de cadena sencilla (ScFv) completamente humano, que sea una variante de cadena ligera de 6A6, que muestre una mejor capacidad para neutralizar el receptor de VEGF en comparación con ScFv-6A6.

Otro objeto más de la presente invención es proporcionar una composición para inhibir la angiogénesis, que contenga un ScFv o IgG completamente humano con la capacidad de neutralizar el receptor de VEGF.

Otro objeto más de la presente invención es proporcionar una composición para el tratamiento del cáncer, que contenga un ScFv o IgG completamente humano con la capacidad de neutralizar el receptor de VEGF.

Para conseguir los objetos anteriores, en un aspecto, la presente invención proporciona una molécula de fragmento variable de cadena sencilla (ScFv), que contiene un región variable de cadena ligera representada por una secuencia de aminoácidos de una cualquiera de las SEQ ID NOs: 1 a 19 y actúa neutralizando el receptor del factor de crecimiento endotelial vascular, teniendo la molécula de ScFv (fragmento variable de cadena sencilla), y preferentemente una construcción de la misma, una región variable de cadena pesada representada por una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 20.

En otro aspecto, la presente invención proporciona un ADN que codifica dicha molécula de ScFv (fragmento variable de cadena sencilla), un vector que contiene dicho ADN, y células recombinantes transformadas con dicho vector. En la presente invención, las células son preferentemente células bacterianas o animales.

En otro aspecto más, la presente invención proporciona una composición para inhibir la angiogénesis, que contiene dicha molécula de ScFv, y una composición para el tratamiento del cáncer, que contiene dicha molécula de ScFv.

En otro aspecto más, la presente invención proporciona una IgG, que contiene una región variable de cadena ligera representada por una secuencia de aminoácidos de una cualquiera de las SEQ ID NOs: 1 a 19 y actúa neutralizando el receptor del factor de crecimiento endotelial vascular. En la presente invención, dicha IgG preferentemente tiene una región variable de cadena pesada representada por una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 20.

En otro aspecto más, la presente invención proporciona una composición para inhibir la angiogénesis, que contiene dicha IgG, y una composición para el tratamiento del cáncer, que contiene dicha IgG.

A partir de la siguiente descripción detallada y las reivindicaciones adjuntas resultarán evidentes otros elementos y aspectos de la presente invención.

Breve descripción de los dibujos

La Figura 1 muestra la secuencia de aminoácidos y función de un gen insertado en un vector pCDNA3-KDR D123tFcm.

La Figura 2 muestra un diagrama esquemático de KDR(ECD1-2) y KDR(ECD2-3)-Fc para mapeo de epítomos de acuerdo con la presente invención.

La Figura 3 muestra los resultados de SDS-PAGE de KDR(ECD1-3)-Fc purificado en la presente invención.

La Figura 4 muestra los resultados de los ensayos de competición de VEGF para fago anti-KDR y ScFv anti-KDR de acuerdo con la presente invención.

La Figura 5 muestra la secuencia de ácido nucleico, secuencia de aminoácidos y secuencia de CDR del fago ScFv 6A6 de acuerdo con la presente invención.

La Figura 6 muestra los resultados de SDS-PAGE para ScFv 6A6 purificado.

La Figura 7 muestra los resultados de ensayos de competición de VEGF usando ScFv anti-KDR.

La Figura 8 muestra los resultados del mapeo de epítomos de ScFv anti-KDR de acuerdo con la presente invención.

La Figura 9 muestra un mapa de escisión de pIGHD-6A6Hvy que es un vector que contiene la región invariable y región de cadena pesada de IgG 6A6.

- La Figura 10 muestra un mapa de escisión de plgGLD-6A6Lgt que es un vector que contiene la región constante y región de cadena ligera de IgG.
- 5 La Figura 11 muestra los resultados de SDS-PAGE de IgG 6A6 purificada.
- La Figura 12 muestra los resultados de ensayos de competición de VEGF usando IgG 6A6 anti-KDR.
- La Figura 13 muestra los resultados de ensayos de competición de IgG 6A6 anti-KDR con familias de VEGF.
- 10 La Figura 14 muestra los resultados del análisis de FACS para la afinidad de unión del anticuerpo IgG anti-KDR por células HUVEC.
- La Figura 15 muestra los resultados del ensayo de FACS para la competición del anticuerpo IgG anti-KDR de la invención con VEGF165 en células HUVEC.
- 15 La Figura 16 muestra los resultados del análisis de transferencia de Western para la expresión de KDR en células K562 (ATCC CCL-243).
- La Figura 17 muestra la afinidad de unión del anticuerpo IgG anti-KDR de la invención por la línea celular K562.
- 20 La Figura 18 muestra los resultados del ensayo de FACS para la competición del anticuerpo IgG anti-KDR de la invención con VEGF en la línea celular K562.
- La Figura 19 muestra los resultados del análisis de FACS para la afinidad de unión de un anticuerpo anti-KDR por una línea celular resistente a Gleevec.
- 25 La Figura 20 muestra los resultados de análisis para la inhibición de la proliferación celular de la IgG anti-KDR de acuerdo con la presente invención.
- 30 La Figura 21 muestra los resultados del análisis de transferencia de Western para la capacidad del anticuerpo anti-KDR de la invención para inhibir la fosforilación de KDR y la fosforilación de ERK, que se induce por VEGF.
- La Figura 22 muestra la capacidad de un anticuerpo de KDR de tipo IgG para inhibir la migración de células endoteliales por VEGF.
- 35 La Figura 23 muestra que un anticuerpo de KDR de tipo IgG inhibe la formación de tubos de células endoteliales inducida por VEGF.
- La Figura 24 muestra la inhibición de la internalización de VEGF-KDR mediante la unión entre el anticuerpo de KDR de tipo IgG y el KDR de la superficie celular.
- 40 La Figura 25 muestra el efecto inhibitor del anticuerpo de KDR de tipo IgG sobre el crecimiento del anillo aórtico de rata inducido por VEGF.
- 45 La Figura 26 muestra los resultados del análisis para el efecto inhibitor del anticuerpo de KDR de tipo IgG sobre la angiogénesis inducida por VEGF.
- La Figura 27 muestra los resultados del análisis para el efecto inhibitor de un anticuerpo 6A6 sobre el crecimiento tumoral en la línea celular HCT116 en un modelo de xenoinjerto de ratón de cáncer de colon.
- 50 La Figura 28 es una fotografía de tumores extirpados después del tratamiento con el anticuerpo 6A6 en el modelo de xenoinjerto de ratón de cáncer de colon.
- La Figura 29 muestra los resultados del análisis para el efecto inhibitor del anticuerpo 6A6 sobre el crecimiento tumoral en la línea celular A549 en un modelo de xenoinjerto de ratón de cáncer de pulmón.
- 55 La Figura 30 muestra los resultados del marcaje del anticuerpo 6A6 de tipo IgG con isótopo radioactivo de yodo.
- La Figura 31 muestra imágenes en color del anticuerpo 6A6 de tipo IgG marcado con yodo-123 en un modelo de tumor de ratón de leucemia mielógena crónica.
- 60 La Figura 32 es un diagrama esquemático que muestra la preparación de la redistribución de cadena ligera.
- La Figura 33 muestra los resultados de ensayos de competición de VEGF de anticuerpos anti-KDR obtenidos mediante redistribución de cadena ligera.
- 65

La Figura 34 muestra los resultados de ensayos de competición de VEGF de anticuerpos anti-KDR obtenidos mediante redistribución de cadena ligera.

5 La Figura 35 muestra los resultados de ensayos de competición de VEGF de anticuerpos anti-KDR obtenidos mediante redistribución de cadena ligera.

Descripción detallada de la invención y realizaciones preferidas

10 En un aspecto, la presente invención se refiere a un anticuerpo ScFv (fragmento variable de cadena sencilla) completamente humano 6A6 (TTAC-0001)-ScFv, que neutraliza el factor de crecimiento endotelial vascular.

15 El ScFv-6A6 se exploró de la siguiente manera. En primer lugar, se construyó una biblioteca de anticuerpos completamente humanos, y se construyó una línea celular que expresaba una proteína de fusión compuesta de cada uno de los dominios extracelulares 1-3 de KDR(VEGFR-2), fusionado con Fc. Se exploraron anticuerpos ScFv anti-KDR que neutralizaban KDR de la biblioteca de anticuerpos completamente humanos en la línea celular usando proteínas de fusión KDR D1-D3-Fc recombinantes purificadas.

20 Los anticuerpos ScFv explorados se expresaron y purificaron en bacterias con marcaje de V5, y se realizaron ensayos de unión a KDR D1-D3-Fc humano y ensayos de competición de VEGF en estado de partícula de fago ScFv. Además, también se llevó a cabo un análisis BIAcore para medir la afinidad del anticuerpo-ScFv, y se obtuvo ScFv-6A6 que había mantenido la afinidad de manera contante y se convirtió en la forma de IgG.

25 Además, en la presente invención, se confirmó mediante transferencia de Western que ScFv-6A6 inhibía la fosforilación del factor de señalización de la angiogénesis ERK en células HUVEC procedentes de un cultivo primario y que esta inhibición dependía de la concentración de ScFv-6A6.

En otro aspecto, la presente invención se refiere a un anticuerpo IgG-6A6 completamente humano que neutraliza el receptor del factor de crecimiento endotelial vascular.

30 El análisis de FACS reveló que el IgG-6A6 se unía fuertemente a KDR humano endógeno, que se expresaba en la superficie de células HUVEC vivas (ATCC, Estados Unidos), en comparación con un anticuerpo quimérico IgG IMC-1C11 disponible en el mercado (Imclone, Estados Unidos) y que, incluso cuando las células también se trataban con un VEGF₁₆₅ humano que se unía de forma competitiva, el IgG-6A6 neutralizaba más eficazmente KDR, expresado en la superficie de las células HUVEC, en comparación con el anticuerpo quimérico IgG IMC-1C11.

35 Esto sugiere que los resultados de los ensayos de competición de VEGF en el ELISA difieren de los resultados que indican que IgG-6A6 y el anticuerpo quimérico IgG IMC-1C11 neutralizaban KDR a niveles similares. Es decir, los resultados del ensayo *in vitro* y los resultados del ensayo *in vivo* pueden diferir entre sí y hay una limitación en la selección de anticuerpos eficaces basándose en los resultados de ensayo *in vitro*.

40 Además, en la presente invención, se pudo observar que el anticuerpo IgG-6A6 se unía más fuertemente a KDR, expresado en la línea celular de leucemia mieloide aguda humana K562 (ATCC, Estados Unidos), en comparación con la IgG IMC-1C11.

45 Además, en la presente invención, se confirmó mediante transferencia de Western que IgG-6A6 inhibía la fosforilación del factor de señalización de la angiogénesis ERK en células HUVEC procedentes de un cultivo primario y que esta inhibición era dependiente de la concentración de IgG-6A6.

50 Además, en la presente invención, se observó que IgG-6A6 de acuerdo con la presente invención inhibía la movilidad quimiotáctica de las células HUVEC que se movían a un ambiente en el que estaba presente VEGF y que IgG-6A6 también inhibía la formación de tubos de células HUVEC, que es una acción directa de la angiogénesis.

55 Además, en la presente invención, para confirmar que el efecto inhibitor de IgG-6A6 sobre los efectos de VEGF en células HUVEC se debe a que IgG-6A6 bloquea la entrada de receptores de VEGF en células HUVEC, se realizó una observación con un microscopio confocal en un experimento usando un anticuerpo de KDR marcado con FITC. Como resultado, se observó que el receptor de VEGF (KDR) no podía entrar en las células cuando las células se habían tratado con IgG-6A6.

60 Además, mediante un ensayo de anillo aórtico de rata *ex vivo*, se descubrió que en anillos aórticos de rata tratados con IgG-6A6 no se producía crecimiento vascular. Además, se analizó la angiogénesis mediante un ensayo de tapón de matrigel inyectando matrigel por vía subcutánea en ratones. Como resultado, se observó angiogénesis en los tapones en un grupo tratado con VEGF, pero en un grupo tratado con VEGF junto con IgG-6A6 no se observó angiogénesis, lo que sugiere que IgG-6A6 tenía un efecto inhibitor de la angiogénesis *in vivo*.

65 En otro aspecto más, la presente invención se refiere a variantes obtenidas mutando la secuencia de cadena ligera de ScFv-6A6 mediante redistribución de cadena ligera.

Mediante la redistribución de cadena ligera se obtuvieron 18 variantes de cadena ligera de ScFv-6A6, y la redistribución de cadena ligera se realizó de la siguiente manera.

5 (1) Para evitar que se seleccionara 6A6 de nuevo durante un proceso de bioselección, se trató el ADN de una biblioteca de redistribución de cadena ligera de 6A6 con la enzima de restricción *SpeI* que tenía un sitio de reconocimiento en la CDR3 de 6A6. Después el ADN se introdujo por transfección en células ETB, se constituyó una sub-biblioteca, y se realizaron ensayos de afinidad de KDR y de competición de VEGF en ELISA para seleccionar clones que tuvieran una excelente capacidad neutralizante de KDR.

10 (2) En una etapa de lavado en el proceso de bioselección, se dejó que los clones de anticuerpo compitieran con KDR soluble para seleccionar clones que tuvieran una excelente capacidad neutralizante de KDR.

(3) En una etapa para permitir que se unieran fagos al antígeno KDR en el proceso de bioselección, también se añadió IgG IMC-1121B (ImClone, Estados Unidos) para seleccionar clones que tuvieran una capacidad neutralizante de KDR que fuera superior o similar a la de la IgG 1121B.

15 En otro aspecto adicional, la presente invención se refiere a una composición para inhibir la angiogénesis y a una composición para tratar cánceres, que contienen dicho ScFv o IgG.

20 Como se usa en el presente documento, el término "angiogénesis" incluye la angiogénesis implicada en el crecimiento tumoral y metástasis, degeneración macular asociada a la edad, artritis reumatoide, retinopatía diabética, psoriasis e inflamación crónica, pero el alcance de la presente invención no se limita a estos trastornos.

25 En la presente invención, dicho cáncer incluye, entre otros, cáncer de colon, cáncer de páncreas, cáncer rectal, cáncer colorrectal, cáncer de próstata, cáncer renal, melanoma, cáncer de próstata con metástasis en hueso, cáncer ovárico y leucemia.

30 La composición de la presente invención puede administrarse por cualquier vía adecuada para una molécula específica. La composición de la presente invención puede proporcionarse a animales, incluyendo seres humanos, por cualquier medio adecuado, directamente (por ejemplo, por vía local, tal como por inyección, inyección subcutánea o administración tópica en el lugar del tejido) o por vía sistémica (por ejemplo, por vía parenteral o por vía oral). Cuando la composición de la presente invención se va a proporcionar por vía parenteral, tal como mediante administración intravenosa, subcutánea, oftálmica, intraperitoneal, intramuscular, bucal, rectal, vaginal, intraorbital, intracerebral, intracraneal, intraespinal, intraventricular, intratecal, intracisternal, intracapsular, intranasal o mediante administración por aerosol, la composición preferentemente comprende parte de una suspensión o solución compatible fisiológicamente fluida o acuosa. Por lo tanto, el vehículo o excipiente es fisiológicamente aceptable de modo que cuando se suministra el agente deseado al sujeto, la solución no afecta de forma adversa de otro modo al equilibrio de electrolitos y/o al volumen del sujeto. El medio acuoso para el agente puede comprender por lo tanto solución salina fisiológica normal.

40 La proteína ScFv o IgG de la presente invención puede administrarse para tratamientos terapéuticos a un paciente con cáncer en una cantidad suficiente para prevenir, inhibir o reducir la progresión del tumor, por ejemplo, el crecimiento, invasividad, metástasis y/o recurrencia del tumor. Una cantidad adecuada para conseguir esto se define como una "dosis terapéuticamente eficaz". Las cantidades eficaces para este uso dependerán de la gravedad de la enfermedad y el estado general del propio sistema inmunitario del paciente.

45 La dosis de la proteína de acuerdo con la presente invención es preferentemente de 0,01-100 mg/kg y, más preferentemente, de 0,1-10 mg/m².

50 Sin embargo, la dosis óptima dependerá de la enfermedad que se esté tratando y de la existencia de efectos secundarios y puede determinarse usando experimentación rutinaria. La administración del anticuerpo puede ser por inyecciones en embolada periódicas, o por administración intravenosa o intraperitoneal continua desde un depósito externo (por ejemplo, desde una bolsa intravenosa) o un depósito interno (por ejemplo, desde un implante bioerosionable). Además, las proteínas de anticuerpo de la presente invención también pueden administrarse al destinatario deseado junto con una pluralidad de diferentes moléculas biológicamente activas. Sin embargo, la combinación óptima de proteína de fusión y otras moléculas, modos de administración y dosificaciones pueden determinarse por experimentación rutinaria dentro del nivel de experiencia en la técnica.

55 La composición de acuerdo con la presente invención puede usarse en combinación con otros agentes terapéuticos asociados con la enfermedad relevante.

60 Existe sinergia cuando los tumores, incluyendo tumores humanos, se tratan con el anticuerpo del receptor de VEGF en combinación con radiación, quimioterapia, un antagonista adicional del receptor o una combinación de los mismos. En otras palabras, la inhibición del crecimiento tumoral por un antagonista del receptor de VEGF se potencia más de lo esperado cuando se combina con agentes quimioterapéuticos, radiación o un antagonista adicional del receptor o combinaciones de los mismos. Puede mostrarse sinergia, por ejemplo, por una mayor inhibición del crecimiento tumoral con el tratamiento combinado que la que se esperaría por el efecto aditivo del tratamiento con un antagonista del receptor de VEGF y un agente quimioterapéutico, radiación o un antagonista

adicional del receptor. Preferentemente, la sinergia se demuestra por remisión del cáncer cuando no se espera remisión por el tratamiento con una combinación de un antagonista del receptor de VEGF y un agente quimioterapéutico, radiación o un antagonista adicional del receptor.

- 5 El antagonista del receptor de VEGF se administra antes, durante o después de comenzar la quimioterapia o radioterapia, así como cualquier combinación de los mismos, es decir, antes y durante, antes y después, durante y después, o antes, durante y después de comenzar la quimioterapia y/o radioterapia. Por ejemplo, cuando el antagonista del receptor de VEGF es un anticuerpo, el anticuerpo se administra típicamente entre 1 y 30 días, preferentemente entre 3 y 20 días, más preferentemente entre 5 y 12 días antes de comenzar la radioterapia y/o quimioterapia.

Anticuerpos del receptor de VEGF

- 15 En una realización, el anticuerpo del receptor de VEGF se une específicamente a un epítipo presente en el dominio extracelular de un receptor de VEGF. El dominio extracelular de un receptor de VEGF es el dominio de unión al ligando. El dominio de unión al ligando puede encontrarse en cualquiera de los extremos del receptor, pero normalmente se encuentra en el extremo amino terminal.

- 20 Algunos ejemplos de receptores de VEGF incluyen los receptores con función proteína tirosina quinasa denominados en la bibliografía Flt-1 (VEGFR-1), KDR y Flk-1 (VEGFR-2). A no ser que se indique otra cosa o el contexto sugiera claramente otra cosa, la presente memoria descriptiva seguirá la nomenclatura habitual en la bibliografía de receptores de VEGF. Se denominará KDR a la forma humana de un receptor de VEGF que tenga PM 180 kD (Terman *et al.*, *Oncogene*, 6: 1677, 1991). Se denominará Flk-1 (VEGFR-2) al homólogo murino de KDR (Matthews *et al.*, *PNAS*, 88: 9026, 1991). Se denomina Flt-1 (VEGFR-1) a una forma del receptor de VEGF diferente de, pero relacionada con, el receptor KDR/Flk-1 (Shibuya *et al.*, *Oncogene*, 5: 519, 1990).

- 25 Otros receptores de VEGF incluyen los que pueden formar entrecruzamientos con VEGF marcado, o que pueden coimmunoprecipitarse con KDR. Algunas formas conocidas de estos receptores de VEGF tienen pesos moleculares de aproximadamente 170 kD, 150 kD, 130-135 kD, 120-125 kD y 85 kD (Quinn *et al.*, *PNAS*, 90: 7533, 1993; Scher *et al.*, *J. Biol. Chem.*, 271: 5761, 1996).

- 30 El receptor de VEGF habitualmente está unido a una célula, tal como una célula endotelial. El receptor de VEGF también puede estar unido a una célula no endotelial, tal como una célula tumoral. Como alternativa, el receptor de VEGF puede estar liberado de la célula, preferentemente en forma soluble.

- 35 El antagonista de la presente invención neutraliza los receptores de VEGF. En la presente memoria descriptiva, neutralizar un receptor significa inactivar la actividad quinasa intrínseca del receptor para transducir una señal. Un ensayo fiable para la neutralización del receptor de VEGF es la inhibición de la fosforilación del receptor.

- 40 La presente invención no está limitada por ningún mecanismo particular de neutralización del receptor de VEGF. El mecanismo provocado por un antagonista no es necesariamente igual que el provocado por otro antagonista. Algunos mecanismos posibles incluyen evitar la unión del ligando de VEGF al dominio de unión extracelular del receptor de VEGF, y evitar la dimerización u oligomerización de los receptores. Sin embargo, no pueden descartarse otros mecanismos.

- 45 Un anticuerpo del receptor de VEGF (o VEGFR), en el contexto de la presente invención, inhibe la activación de la subfamilia de receptores de VEGFR. Por inhibición de la activación de la subfamilia de receptores de VEGFR se entiende cualquier reducción en la activación del VEGFR. Es decir, no es necesario que la prevención de la activación detenga completamente la activación del VEGFR. Además, la inhibición de la activación del VEGFR, como se define por la presente invención, significa la inhibición del VEGFR después de la interacción del anticuerpo de VEGFR y VEGFR. Por asociación, se entiende que una interacción física o química suficiente entre el VEGFR y el anticuerpo de VEGFR es la que inhibe la actividad tirosina quinasa del receptor. Un experto en la materia apreciará que los ejemplos de dichas interacciones químicas, que incluyen asociación o enlace, se conocen en la técnica e incluyen enlace covalente, enlace iónico, enlace de hidrógeno, etc. En consecuencia, el antagonista de VEGFR de la presente invención inhibe la actividad tirosina quinasa del receptor, lo que evita la autofosforilación del receptor y la fosforilación de otras diversas proteínas implicadas en las rutas de señalización de VEGFR. Dichas rutas, que están implicadas en la regulación de la vasculogénesis y la angiogénesis, incluyen cualquiera de las siguientes: la ruta de la fosfolipasa Cy (PLCy) o la ruta de la fosfatidilinositol 3' quinasa (PI3-K)/Akt y proteína quinasa activada por mitógeno (MAPK) (Larrivee *et al.*, *Int. J. Med.*, 5: 447, 2000).

- 60 La subfamilia de receptores de VEGFR se caracteriza por la presencia de siete bucles de tipo inmunoglobulina en el dominio extracelular, una única región transmembrana y un dominio de tirosina quinasa dividido en la región intracelular (receptores con función tirosina quinasa de clase III). Hay varios miembros conocidos de la subfamilia de receptores de VEGFR, incluyendo los ejemplos VEGFR-1, VEGFR-2 y VEGFR-3.

- 65 En general, se cree que KDR (VEGFR-2) es el principal transductor de señales de VEGF que da como resultado la

proliferación, migración, diferenciación, formación de tubos, aumento de la permeabilidad vascular y mantenimiento de la integridad vascular de las células endoteliales. El VEGFR-1 posee una actividad quinasa mucho más débil y es incapaz de generar una respuesta mitogénica cuando se estimula por VEGF, aunque se une a VEGF con una afinidad que es aproximadamente 10 veces mayor que la de KDR (VEGFR-2). También se ha implicado al VEGFR-1 en la migración inducida por VEGF y factor de crecimiento de placenta (P1GF) de monocitos y macrófagos y en la producción de factor tisular.

Como sucede con el VEGFR descrito anteriormente, el aumento de la activación del VEGFR puede deberse a mayores niveles de ligando, amplificación del gen de VEGFR, aumento de la transcripción del receptor o mutaciones que provoquen una señalización del receptor no regulada.

En una realización de la presente invención, el anticuerpo de VEGFR inhibe la unión de VEGFR a su ligando. La unión de un ligando a un dominio extracelular externo de VEGFR estimula la dimerización del receptor, autofosforilación de VEGFR, activación del dominio tirosina quinasa citoplasmático interno del receptor, e inicio de múltiples rutas de transducción de señales implicadas en la regulación de la vasculogénesis y angiogénesis.

Los ligandos para VEGFR incluyen VEGF y sus homólogos P1GF, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D y VEGF-E. Por ejemplo, P1GF, que es un factor secretado dimérico y solamente se une a VEGFR-1, se produce en grandes cantidades por citotroblastos vellosos, sincitiotroblastos y trofoblastos extravelllosos y tiene una alta homología de aminoácidos con VEGF. Existen tres isoformas en seres humanos, P1GF-1, P1GF-2 y P1GF-3. Los estudios con ratones con deficiencia de P1GF demuestran que este factor de crecimiento no está implicado en la angiogénesis por sí, sino que más bien modula específicamente los efectos angiogénicos y de permeabilidad del VEGF durante situaciones patológicas. Además, VEGF-D está estrechamente relacionado con VEGF-C debido a la presencia de extensiones N y C terminales que no se encuentran en otros miembros de la familia de VEGF. En tejidos humanos adultos, el ARNm de VEGF-D es más abundante en el corazón, pulmón, músculo esquelético, colon e intestino delgado. Los análisis de la especificidad del receptor de VEGF-D revelaron que VEGF-D es un ligando tanto para VEGFR-2 (Flk1) como para VEGFR-3 (Flt4) y puede activar estos receptores; sin embargo, VEGF-D no se une a VEGFR-1. Además, VEGF-D es un mitógeno para las células endoteliales.

En otra realización de la presente invención, el anticuerpo de VEGFR se une específicamente a VEGFR. Debe apreciarse que el anticuerpo de VEGFR puede unirse externamente a la parte extracelular de VEGFR, que puede inhibir o no la unión del ligando, o internamente al dominio tirosina quinasa. Preferentemente, el antagonista de VEGFR de la presente invención es un anticuerpo, o equivalente funcional del mismo, específico para VEGFR, cuyos detalles describen con más detalle posteriormente.

En una realización preferida, el anticuerpo del receptor de VEGF se une específicamente a KDR. Se prefieren particularmente proteínas de unión a antígeno que se unan al dominio extracelular de KDR y bloqueen la unión por uno o ambos de sus ligandos, VEGF y PIGF, y/o neutralicen la activación de KDR inducida por VEGF o PIGF.

También existen diversos hibridomas que producen anticuerpos de VEGFR-2. Por ejemplo, se depositó una línea celular de hibridoma productora de anticuerpo monoclonal de rata anti-VEGFR-2 de ratón (DC101) como ATCC HB 11534; se depositó una línea celular de hibridoma (M25. 18A1) productora de anticuerpo monoclonal de ratón anti-VEGFR-2 de ratón mAb 25 como ATCC HB 12152; y se depositó una línea celular de hibridoma (M73.24) productora de anticuerpo monoclonal de ratón anti-VEGFR-2 mAb 73 como ATCC HB 12153.

Además, existen diversos hibridomas que producen anticuerpos anti-VEGFR-1 e incluyen, entre otros, hibridomas KM1730 (depositado como FERM BP-5697), KM1731 (depositado como FERM BP-5718), KM1732 (depositado como FERM BP-5698), KM1748 (depositado como FERM BP-5699), KM1750 (depositado como FERM BP-5700) divulgados en los documentos WO 98/22616, WO 99/59636, AU 5066698 B2 y CA 2328893.

Se conocen en la técnica muchos otros antagonistas de VEGFR. Algunos ejemplos de antagonistas de VEGFR se describen en los documentos US 5.185.438; 5.621.090; 5.283.354; 5.270.458; 5.367.057; 5.548.065; 5.747.651; 5.912.133; 6.677.434; 6.960.446; 5.840.301; 5.861.499; 6.365.157; 5.955.311; 6.365.157; 6.811.779; y WO 2001/66063. Los documentos US 5.861.301, Terman *et al.*, *Oncogene*, 6:1677, 1991, WO 94/10202 y WO 95/21865, divulgan antagonistas de VEGFR y, específicamente, anticuerpos anti-VEGFR-2. Además, se divulgan anticuerpos anti-VEGFR-2 en los documentos US. 6.177.401 y 5.712.395. El documento US 5.981.569 divulga antagonistas de VEGFR que son moléculas orgánicas. Además, se conocen anticuerpos biespecíficos (BsAbs), que son anticuerpos que tienen dos especificidades o sitios de unión a antígeno diferentes, dirigidos contra KDR (VEGFR-2) y VEGFR-1. Además, Hennequin *et al.*, *J. Med. Chem.*, 42: 5369, 1999 divulga ciertas quinazolininas, quinolininas y cinolininas que son útiles como antagonistas del receptor de VEGF (Annie *et al.*, *J. Acqu. Immune Defic. Syn. and Hum. Retrovirol.*, 17: A41, 1998).

Además, se conocen en la técnica ensayos para la determinación de anticuerpos de VEGFR. Los anticuerpos de VEGFR de la presente invención inhiben la actividad tirosina quinasa de VEGFR, que generalmente implica acontecimientos de fosforilación. En consecuencia, en la presente invención, los ensayos de fosforilación son útiles en la determinación de anticuerpos de VEGFR. Se describen algunos ensayos para actividad tirosina quinasa en

Panek *et al.*, J. Pharmacol. Exp. Thera., 283: 1433, 1997 y Batley *et al.*, Life Sci., 62: 143, 1998. Además, pueden utilizarse métodos específicos para la detección de la expresión de VEGFR.

Anticuerpos

5 Los anticuerpos de la presente invención pueden producirse por métodos conocidos en la técnica (Kohler y Milstein, Nature, 256: 495, 1975; Campbell, Monoclonal Antibody Technology, The Production and Characterization of Rodent and Human Hybridomas; Burdon *et al.*, Eds., Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology, Vol. 13, Elsevier Science Publishers, Ámsterdam, 1985; Huse *et al.*, Science, 246: 1275, 1989). Los anticuerpos de la
10 presente invención pueden ser anticuerpos monoclonales o policlonales o cualquier otro tipo adecuado de anticuerpo, tal como un fragmento o un derivado de un anticuerpo, un fragmento variable de cadena sencilla (ScFv) o un homólogo sintético del anticuerpo, siempre que el anticuerpo tenga las mismas características de unión o tenga características de unión comparables a las del anticuerpo completo. Como se usa en el presente documento, a no ser que se indique otra cosa o resulte evidente por el contexto, los dominios, regiones y fragmentos de anticuerpo
15 siguen las definiciones convencionales bien conocidas en la técnica (Abbas *et al.*, Cellular and Molecular Immunology, W. B. Saunders Company, Filadelfia, PA, 1991). Preferentemente, los anticuerpos de la presente invención son anticuerpos monoclonales.

Pueden producirse fragmentos de anticuerpo escindiendo un anticuerpo completo o expresando ADN que codifica el
20 fragmento. Pueden prepararse fragmentos de anticuerpo por métodos descritos en la bibliografía publicada (Lamoyi *et al.*, J. Immunol. Methods, 56: 235, 1983; Parham, J. Immunol., 131: 2895, 1983). Dichos fragmentos pueden contener fragmento Fab o un fragmento F(ab')₂ o ambos fragmentos. Dichos fragmentos también pueden contener anticuerpos de fragmentos variables de cadena sencilla, es decir, ScFv, dicuerpos u otros fragmentos de anticuerpo. En los documentos WO 93/21319, EP 239.400, WO 89/09622, EP 338.745 y EP 332.424 se divulgan métodos para
25 producir dichos equivalentes funcionales.

Los fragmentos variables de cadena sencilla (ScFv) son polipéptidos que consisten en la región variable de una
cadena pesada de un anticuerpo unida a la región variable de una cadena ligera de un enlazador peptídico corto. Por lo tanto, el ScFv comprende el sitio de combinación con anticuerpo completo. Estas cadenas pueden producirse
30 en bacterias o en células eucariotas. Un ejemplo típico de un anticuerpo de cadena sencilla en la presente invención es ScFv-6A6 (TTAC-0001). Se ha demostrado que ScFv-6A6 bloquea la interacción VEGF-KDR (VEGF-VEGFR-2) e inhibe la fosforilación del receptor estimulada por VEGF. Este ScFv-6A6 se une tanto al KDR soluble (VEGFR-2) como al KDR expresado en la superficie celular (VEGFR-2) en células HUVEC y células K562. El ScFv-6A6 tiene una secuencia de cadena ligera de SEQ ID NO: 35 y una secuencia de cadena pesada de SEQ ID NO: 36. El
35 anticuerpo ScFv-6A6 es un anticuerpo completamente humano y puede construirse con anticuerpos Fab', F(ab')₂, ScFv bivalente, ScFv recombinante bivalente o IgG humana.

Preferentemente, aunque los fragmentos de anticuerpo contienen las seis regiones determinantes de
40 complementariedad (CDR) del anticuerpo completo, también pueden ser funcionales fragmentos que contienen menos de todas estas regiones, tales como tres, cuatro o cinco CDR. Si el fragmento de anticuerpo es demasiado corto para ser inmunogénico, puede conjugarse con una molécula portadora. Algunas moléculas portadoras adecuadas incluyen hemocianina de lapa californiana y albúmina de suero bovino. La conjugación puede llevarse a cabo por métodos conocidos en la técnica.

45 Los anticuerpos de la presente invención también incluyen anticuerpos cuyas características de unión pueden mejorarse por mutación directa, métodos de maduración de afinidad, presentación en fagos o redistribución de cadenas. La afinidad y especificidad pueden modificarse o mejorarse mutando CDR y seleccionando sitios de unión a antígeno que tienen las características deseadas (Yang *et al.*, J. Mol. Biol., 254: 392, 1995). Las CDR se mutan de
50 diversas maneras. Una manera es seleccionar aleatoriamente restos individuales o combinaciones de restos de modo que en una población de sitios de unión a antígeno por lo demás idénticos, los veinte aminoácidos se encuentran en posiciones particulares. Como alternativa, se inducen mutaciones sobre una serie de restos de CDR por métodos de PCR propensa a errores ((Hawkins *et al.*, J. Mol. Biol., 226: 889, 1992). Los vectores de presentación de fagos que contienen genes de región variable de cadena pesada y ligera se propagan en cepas mutadas de *E. coli* (Low *et al.*, J. Mol. Biol., 250: 359, 1996). Estos métodos de mutagénesis son ilustrativos de los
55 numerosos métodos conocidos por un experto en la materia.

Los anticuerpos, y particularmente los anticuerpos monoclonales, pueden producirse por métodos conocidos en la
técnica. Los ejemplos de producción de anticuerpos incluyen, entre otros, producción en células de hibridoma y transformación de células de mamífero con ADN que codifica el antagonista del receptor. Estos métodos se
60 describen en diversas publicaciones (Kohler y Milstein, Nature, 256: 495, 1975; Campbell en "Monoclonal Antibody Technology, The Production and Characterization of Rodent and Human Hybridomas" en Burdon *et al.*, Eds., Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology, Vol.13, Elsevier Science Publishers, Ámsterdam, 1985; Huse *et al.*, Science, 246: 1275, 1989).

65 También se preparan equivalentes de anticuerpos por métodos conocidos en la técnica. Por ejemplo, pueden prepararse fragmentos de anticuerpos enzimáticamente a partir de anticuerpos completos. Preferentemente, se

preparan equivalentes de anticuerpos a partir de ADN que codifica dichos equivalentes. Puede prepararse ADN que codifica fragmentos de anticuerpos suprimiendo todo excepto la parte deseada del ADN que codifica el anticuerpo de longitud completa. Puede prepararse ADN que codifica anticuerpos quimerizados recombina-
 5 do ADN que codifica regiones constantes humanas, obtenido sustancial o exclusivamente a partir de las regiones de anticuerpo humano correspondientes, y ADN que codifica regiones variables, obtenido sustancial o exclusivamente a partir de la secuencia de la región variable de un mamífero distinto de un ser humano. Puede prepararse ADN que codifica anticuerpos humanizados recombina-
 10 do ADN que codifica regiones constantes y regiones variables distintas de las regiones determinantes de complementariedad (CDR), obtenido sustancial o exclusivamente a partir de las regiones de anticuerpo humano correspondientes y ADN que codifica CDR, obtenido sustancial o exclusivamente a partir de un mamífero distinto de un ser humano.

Las fuentes adecuadas de moléculas de ADN que codifican fragmentos de anticuerpos incluyen células, tales como hibridomas, que expresan el anticuerpo de longitud completa. Los fragmentos pueden usarse tal cual como equivalentes de anticuerpo, o pueden recombinarse en equivalentes, como se ha descrito anteriormente. Las
 15 selecciones y recombinaciones de ADN descritas en esta sección pueden llevarse a cabo por métodos conocidos, tales como los descritos en las solicitudes de patente publicadas que se indican anteriormente en la sección titulada "Equivalentes Funcionales de Anticuerpos" y/u otras técnicas de ADN recombinante convencionales, tales como las descritas más adelante.

Son células hospedadoras preferidas para la transformación con vectores y para la expresión de los anticuerpos de la presente invención células de mamífero, por ejemplo, células COS-7, células de ovario de hámster chino (CHO) y líneas celulares de origen linfocítico tales como células de linfoma, mieloma o hibridoma. Como alternativa, puede usarse otro hospedador eucariota, tal como levaduras. Por ejemplo, la línea celular del estroma de hígado fetal de
 20 ratón 2018 se une a las proteínas de fusión APTag-FIk 1 y APTag-FIk-2, es decir, contiene ligandos de VEGFR-2 y FIk-2 (ATCC, Manassas, VA, CRL 10907), la línea celular de bazo fetal humano Fsp 62891 contiene el ligando de FIk-2 (ATCC CRL 10935) y la línea celular de timo fetal del estroma humano, F. thy 62891, contiene el ligando de VEGFR-2 (ATCC CRL 10936).

Como se usa en el presente documento, el término "vector" significa cualquier ácido nucleico que comprende una secuencia de nucleótidos competente a incorporar en una célula hospedadora y a recombinar con e integrar en el genoma de la célula hospedadora, o a replicar de forma autónoma como un episoma. Dichos vectores incluyen ácidos nucleicos lineales, plásmidos, fagémidos, cósmidos, vectores de ARN, vectores virales y similares. Los
 30 ejemplos de un vector viral incluyen, entre otros, un retrovirus, un adenovirus y un virus adenoasociado.

Como se usa en el presente documento, se entiende que la expresión "expresión génica" o "expresión de una proteína diana" significa la transcripción de una secuencia de ADN, la traducción de un transcrito de ARNm y la secreción de un producto de proteína de fusión Fc.

En la presente invención, las células hospedadoras adecuadas pueden transformarse o transfectarse con ADN y pueden usarse para expresar y/o secretar proteínas diana. Las células hospedadoras preferidas para su uso en la presente invención incluyen células de hibridoma inmortalizadas, células de mieloma NS/O, células 293, células de ovario de hámster Chino (CHO), células HELA y células COS.

Las células hospedadoras transformadas se cultivan por métodos conocidos en la técnica en un medio líquido que contiene fuentes asimilables de carbono (carbohidratos tales como glucosa o lactosa), nitrógeno (aminoácidos, péptidos, proteínas o sus productos de degradación tales como peptonas, sales de amonio o similares), y sales inorgánicas (sulfatos, fosfatos y/o carbonatos de sodio, potasio, magnesio y calcio). El medio contiene adicionalmente, por ejemplo, sustancias promotoras del crecimiento tales como oligoelementos, por ejemplo hierro, cinc, manganeso y similares.

Cuando se desee expresar una construcción génica en una levadura, un gen de selección adecuado para su uso en levadura es el gen de trp1 presente en el plásmido de levadura YRp7 (Stincludomb *et al.*, Nature, 282: 39, 1979; Kingsman *et al.*, Gene, 7: 141, 1979). El gen de trp1 proporciona un marcador de selección para una cepa mutante de levadura que carece de la capacidad para crecer en triptófano, por ejemplo, ATCC 44076 o PEP4-1 (Jones, Genetics, 85: 12, 1977). La presencia de la lesión de trp1 en el genoma de la célula hospedadora de levadura proporciona después un ambiente eficaz para detectar la transformación por crecimiento en ausencia de triptófano. De forma similar, las cepas de levadura deficientes en Leu2 (ATCC 20622 o 38626) se complementan por plásmidos conocidos que portan el gen de Leu2.

Como alternativa, el ADN que codifica el antagonista del receptor puede clonarse en vectores derivados de virus tales como adenovirus, virus adenoasociados, herpes virus, retrovirus o lentivirus. La expresión génica está controlada por secuencias reguladoras inducibles o no inducibles.

En resumen, se selecciona una fuente adecuada de células que contienen moléculas de ácido nucleico que expresan el ADN deseado, tales como un anticuerpo, equivalente de anticuerpo o receptor de VEGF. El ARN total se prepara por procedimientos convencionales a partir de una fuente adecuada. El ARN total se usa para dirigir la

síntesis de ADNc. En manuales convencionales de biología molecular tales como, por ejemplo, los descritos anteriormente, se proporcionan métodos convencionales para aislar ARN y sintetizar ADNc.

5 El ADNc puede amplificarse por métodos conocidos. Por ejemplo, el ADNc puede usarse como un molde para la amplificación por reacción en cadena de la polimerasa (PCR) (Saiki *et al.*, Science, 239: 487, 1988; documento US 4.683.195). Las secuencias de los cebadores oligonucleotídicos para la amplificación por PCR derivan de la secuencia conocida a amplificar. Los oligonucleótidos se sintetizan por métodos conocidos en la técnica (Caruthers, Science, 230: 281, 1985).

10 En la amplificación por PCR se usa una mezcla de oligonucleótidos cadena arriba y cadena abajo. Las condiciones se optimizan para cada par de cebadores particular de acuerdo con procedimientos convencionales. El producto de PCR se analiza, por ejemplo, por electroforesis, para determinar el ADNc que tiene el tamaño correcto, correspondiente a la secuencia entre los cebadores. Como alternativa, la región codificante puede amplificarse en dos o más fragmentos solapantes. Los fragmentos solapantes se diseñan para incluir un sitio de restricción que
15 permita el ensamblaje del ADNc intacto a partir de los fragmentos.

Para aislar las regiones codificantes de proteína completas para los receptores de VEGF, por ejemplo, el cebador oligonucleotídico de PCR cadena arriba es complementario a la secuencia del extremo 5', abarcando preferentemente el codón de iniciación ATG y al menos 5-10 nucleótidos cadena arriba del codón de iniciación. El
20 cebador oligonucleotídico de PCR cadena abajo es complementario de la secuencia del extremo 3' de la secuencia de ADN deseada. La secuencia de ADN deseada preferentemente codifica la parte extracelular completa del receptor de VEGF, y opcionalmente codifica todo o parte de la región transmembrana y/o todo o parte de la región intracelular, incluyendo el codón de terminación.

25 El ADN a amplificar, tal como el que codifica anticuerpos, equivalentes de anticuerpo o receptores de VEGF, también puede replicarse en una amplia diversidad de vectores de clonación en una amplia diversidad de células hospedadoras. La célula hospedadora puede ser procariota o eucariota.

30 El vector en el que se corta y empalma el ADN puede comprender segmentos de secuencias de ADN cromosómicas, no cromosómicas y sintéticas. Algunos vectores de clonación procariotas adecuados incluyen plásmidos derivados de *E. coli* tales como colEI, pCRI, pBR322, pMB9, pKSM y RP4. Los vectores procariotas también incluyen derivados de ADN de fagos tales como M13 y otros fagos de ADN monocatenario filamentosos. Un vector preferido para clonar ácido nucleico que codifica el receptor de VEGF es el vector de Baculovirus.

35 El vector que contiene el ADN a expresar se introduce por transfección en una célula hospedadora adecuada. La célula hospedadora se mantiene en un medio de cultivo apropiado, y se somete a condiciones en las que se replican las células y el vector. El vector puede recuperarse de la célula. El ADN a expresar puede recuperarse del vector.

40 El ADN a expresar, tal como el que codifica anticuerpos, equivalentes de anticuerpo o receptores, puede insertarse en un vector de expresión adecuado y expresarse en una célula hospedadora procariota o eucariota adecuada.

Por ejemplo, el ADN insertado en una célula hospedadora puede codificar la parte extracelular completa del receptor de VEGF o un fragmento soluble de la parte extracelular del receptor de VEGF. La parte extracelular del receptor de VEGF codificado por el ADN opcionalmente puede unirse por el extremo 5' o el extremo 3', o por ambos extremos, a
45 secuencias de aminoácidos adicionales. Las secuencias de aminoácidos adicionales pueden unirse a la región extracelular del receptor de VEGF, tales como la secuencia líder, a la región transmembrana y/o a la región intracelular del receptor de VEGF. Las secuencias de aminoácidos adicionales también pueden ser secuencias no unidas al receptor de VEGF de forma natural. Preferentemente, dichas secuencias de aminoácidos adicionales cumplen un fin particular, tal como mejorar los niveles de expresión, la secreción, la solubilidad o la
50 inmunogenicidad.

Se conocen vectores para expresar proteínas en bacterias, especialmente *E. coli*, (Dieckmann y Tzagoloff, J. Biol. Chem., 260: 1513, 1985). Estos vectores contienen secuencias de ADN que codifican antranilato sintetasa (TrpE) seguido de un polienlazador en el extremo carboxilo terminal. Otros sistemas de vectores de expresión se basan en
55 la beta-galactosidasa (pEX); PL lambda; proteína de unión a maltosa (pMAL); y glutatión S-transferasa (pGST) (Gene, 67: 31, 1988; Peptide Research, 3: 167, 1990).

También se conocen vectores adecuados para la expresión en células de mamífero. Dichos vectores incluyen derivados bien conocidos de SV-40, adenovirus, secuencias de ADN derivadas de retrovirus y vectores lanzadera
60 obtenidos por combinación de vectores de mamífero funcionales, tales como los descritos anteriormente, y plásmidos funcionales y ADN de fago.

En la técnica se conocen vectores adicionales para la expresión de células eucariotas (Southern, P. J. y Berg, P., J. Mol. Appl. Genet., 1: 327, 1982; Subramani *et al.*, Mol. Cell. Biol., 1: 854, 1981; Kaufmann y Sharp, J. Mol. Biol., 159: 601, 1982; Kaufmann y Sharp, Mol. Cell. Biol., 1982; Scahill *et al.*, PNAS, 80: 4654, 1983; Urlaub y Chasin, PNAS, 77: 4216, 1980). Los vectores de expresión útiles en la presente invención contienen al menos una secuencia de

control de la expresión que está unida operativamente con la secuencia de ADN o fragmento a expresar. La secuencia de control se inserta en el vector para controlar y regular la expresión de la secuencia de ADN clonada. Los ejemplos de secuencias de control de la expresión útiles incluyen el sistema lac, el sistema trp, el sistema tac, el sistema trc, regiones promotoras y operadoras importantes del fago lambda, la región de control de la proteína de cubierta fd, los promotores glucolíticos de levadura, por ejemplo, el promotor para la 3-fosfoglicerato quinasa, los promotores de fosfatasa ácida de levadura, por ejemplo, Pho5, los promotores de los factores de acoplamiento alfa de levadura, y promotores derivados de poliovirus, adenovirus, retrovirus y virus de simio, por ejemplo, los promotores temprano y tardío de SV40, y otras secuencias que se sabe que controlan la expresión de genes de células procariotas o eucariotas y sus virus.

Para la expresión, se insertan en una célula hospedadora vectores que contienen las señales de control y el ADN a expresar, tal como el que codifica anticuerpos, equivalentes de anticuerpo o receptores de VEGF. Algunas células hospedadoras de expresión útiles incluyen células procariotas y eucariotas bien conocidas. Algunos hospedadores procariotas adecuados incluyen, por ejemplo, *E. coli*, tal como *E. coli* SG-936, *E. coli* HB 101, *E. coli* W3110, *E. coli* X1776, *E. coli* X2282, *E. coli* DHI y *E. coli* MRC1, *Pseudomonas*, *Bacillus*, tal como *Bacillus subtilis*, y *Streptomyces*. Las células eucariotas adecuadas incluyen células de levadura y otros hongos, insectos, animales, tales como células COS y células CHO, células humanas y células vegetales en cultivo tisular.

Después de la expresión en una célula hospedadora mantenida en un medio adecuado, el polipéptido o péptido a expresar, tal como anticuerpos, equivalentes de anticuerpo o receptores de VEGF, puede aislarse del medio y purificarse por medios conocidos en la técnica. Si el polipéptido o péptido no se secreta al medio de cultivo, las células hospedadoras se lisan antes del aislamiento y purificación.

Además, los anticuerpos de la invención pueden prepararse inmunizando a un mamífero con un receptor soluble. Los receptores solubles pueden usarse tal cual como inmunógenos, o pueden unirse a una proteína portadora u a otros objetos, tales como perlas, por ejemplo, perlas de sepharose. Después de que el mamífero ha producido anticuerpos, se aísla una mezcla de células productoras de anticuerpos, tales como los esplenocitos. Los anticuerpos monoclonales pueden producirse aislando células productoras de anticuerpos individuales a partir de la mezcla e inmortalizando las células, por ejemplo, fusionándolas con células tumorales tales como células de mieloma. Los hibridomas resultantes se conservan en cultivo, y expresan anticuerpos monoclonales, que se recogen del medio de cultivo.

Los anticuerpos también pueden prepararse a partir de receptores unidos a la superficie de células que expresan el receptor específico de interés. La célula a la que están unidos los receptores puede ser una célula que expresa de forma natural el receptor, tal como una célula endotelial vascular en el caso de VEGFR. Como alternativa, la célula a la que está unido el receptor puede ser una célula en la que se ha introducido por transfección el ADN que codifica el receptor, tal como células 3T3, que se han transfectado con VEGFR.

Un receptor puede usarse como un inmunógeno para inducir un anticuerpo de la presente invención. El péptido receptor puede obtenerse a partir de fuentes naturales, tales como células que expresan los receptores. Por ejemplo, el péptido receptor de VEGF puede obtenerse a partir de células endoteliales vasculares. Como alternativa, pueden prepararse péptidos receptores sintéticos usando máquinas disponibles en el mercado. En dicha realización, la secuencia de aminoácidos del receptor de VEGF puede proporcionarse mediante la bibliografía publicada (Shibuya *et al.*, *Oncogene*, 5: 519, 1990; documento PCT/US92/01300; Terman *et al.*, *Oncogene*, 6: 1677, 1991; Matthews *et al.*, *PNAS*, 88: 9026, 1991).

Como alternativa, se clona y expresa ADN que codifica un receptor, tal como un ADNc o un fragmento del mismo, y el polipéptido resultante se recupera y de este modo puede usarse como un inmunógeno para inducir un anticuerpo de la presente invención. Por ejemplo, para preparar los receptores de VEGF contra los que se preparan los anticuerpos, pueden insertarse moléculas de ácido nucleico que codifican los receptores de VEGF de la presente invención, o partes de las mismas, especialmente las partes extracelulares de las mismas, en vectores conocidos para su expresión en células hospedadoras usando técnicas de ADN recombinante convencionales, tales como las descritas más adelante. Las fuentes adecuadas de dichas moléculas de ácido nucleico incluyen células que expresan receptores de VEGF, es decir, células endoteliales vasculares.

El anticuerpo puede prepararse en cualquier mamífero; los mamíferos adecuados distintos de seres humanos incluyen, por ejemplo, un conejo, rata, ratón, caballo, cabra o primate. Con frecuencia se usan ratones para preparar anticuerpos monoclonales. El anticuerpo puede ser un miembro de una de las siguientes clases de inmunoglobulina: IgG, IgM, IgA, IgD, o IgE, y las subclases de las mismas, y preferentemente es un anticuerpo IgG1. Los anticuerpos de la presente invención y sus equivalentes funcionales pueden ser o pueden combinar miembros de cualquiera de las clases de inmunoglobulina.

Neutralización de la activación por VEGF de receptores de VEGF

La neutralización de la activación de un receptor de VEGF en una muestra de células endoteliales o no endoteliales, tales como células tumorales, puede realizarse *in vitro* o *in vivo*. La neutralización de la activación por VEGF de un

receptor de VEGF en una muestra de células que expresan el receptor de VEGF comprende poner en contacto las células con el anticuerpo de la presente invención. Las células se ponen en contacto *in vitro* con el anticuerpo, antes, simultáneamente con, o después de añadir VEGF a la muestra de células.

5 *In vivo*, el anticuerpo de la presente invención se pone en contacto con un receptor de VEGF mediante la administración a un mamífero. Los métodos de administración a un mamífero incluyen, por ejemplo, administración oral, intravenosa, intraperitoneal, subcutánea o intramuscular.

10 Este método de neutralización *in vivo* es útil para inhibir la angiogénesis en un mamífero. La inhibición de la angiogénesis es un método terapéutico útil, tal como para prevenir o inhibir la angiogénesis asociada con afecciones patológicas tales como el crecimiento tumoral. En consecuencia, el anticuerpo de la presente invención es un agente inmunoterapéutico antiangiogénico y antitumoral.

15 Como se usa en el presente documento, el término "mamífero" significa cualquier mamífero. Algunos ejemplos de mamíferos incluyen mascotas, tales como perros y gatos; animales de granja, tales como cerdos, vacas, ovejas y cabras; animales de laboratorio, tales como ratones y ratas; primates, tales como monos, simios y chimpancés; y seres humanos.

20 Se encuentran receptores de VEGF en algunas células no endoteliales, tales como células tumorales, lo que indica la presencia inesperada de un bucle autocrino y/o paracrino en estas células. Los antagonistas, por ejemplo, los anticuerpos, de la presente invención son útiles en la neutralización de la actividad de los receptores de VEGF en dichas células, bloqueando de este modo el bucle autocrino y/o paracrino e inhibiendo el crecimiento tumoral. Los métodos para inhibir la angiogénesis y para inhibir afecciones patológicas tales como el crecimiento tumoral en un mamífero comprenden administrar una cantidad eficaz de uno cualquiera de los antagonistas de la invención, por ejemplo, anticuerpos, incluyendo cualquiera de los equivalentes funcionales de los mismos, por vía sistémica a un mamífero, o directamente a un tumor existente en el mamífero. El mamífero es preferentemente humano. Este método es eficaz para tratar sujetos tanto con tumores sólidos, preferentemente tumores altamente vasculares, como con tumores no sólidos.

30 La inhibición o reducción del crecimiento tumoral incluye la prevención o inhibición de la progresión de un tumor, incluyendo tumores cancerosos y no cancerosos. La progresión de un tumor incluye la invasividad, metástasis, recurrencia y aumento de tamaño del tumor. La inhibición o reducción del crecimiento tumoral también incluye la destrucción de un tumor.

35 Todos los tipos de tumores pueden tratarse por los métodos de la presente invención. Los tumores pueden ser sólidos o no sólidos.

40 Algunos ejemplos de tumores sólidos que pueden tratarse con los antagonistas de la presente invención incluyen carcinomas, sarcomas, blastomas o gliomas. Algunos ejemplos de dichos tumores incluyen tumores epidermoides, tumores escamosos, tales como tumores de cabeza y cuello, tumores colorrectales, tumores de próstata, tumores de mama, tumores de pulmón, incluyendo tumores de pulmón microcíticos y no microcíticos, tumores pancreáticos, tumores de tiroides, tumores ováricos y tumores de hígado. Otros ejemplos incluyen sarcoma de Kaposi, neoplasias del SNC, neuroblastomas, hemangioblastomas capilares, meningiomas y metástasis cerebrales, melanoma, carcinomas y sarcomas gastrointestinales y renales, rhabdomyosarcoma, glioblastoma, preferentemente glioblastoma multiforme y leiomyosarcoma. Los ejemplos del cáncer cutáneos vascularizados para los que son eficaces los antagonistas de la presente invención incluyen carcinoma de células escamosas, carcinoma de células basales y cánceres cutáneos que pueden tratarse reprimiendo el crecimiento de queratinocitos malignos, tales como queratinocitos malignos humanos.

50 Algunos ejemplos de tumores no sólidos incluyen leucemias, mielomas múltiples y linfomas. Algunos ejemplos de leucemias incluyen leucemia mielocítica aguda (AML), leucemia mielocítica crónica (CML), leucemia linfocítica aguda (ALL), leucemia linfocítica crónica (CLL), leucemia eritrocítica o leucemia monocítica. Algunos ejemplos de linfomas incluyen linfomas asociados con la enfermedad de Hodgkin y la enfermedad no Hodgkin.

55 La prevención o inhibición de la angiogénesis también es útil para tratar afecciones patológicas no neoplásicas caracterizadas por una angiogénesis excesiva, tales como glaucoma neovascular, retinopatía proliferativa incluyendo retinopatía diabética proliferativa, artritis, degeneración macular, hemangiomas, angiofibromas y psoriasis.

60 **Uso de los anticuerpos de la invención para aislar y purificar el receptor de VEGF**

Los antagonistas de la presente invención pueden usarse para aislar y purificar el receptor de VEGF usando métodos convencionales tales como cromatografía de afinidad (Dean *et al.*, Affinity Chromatography: A Practical Approach, IRL Press, Arlington, VA, 1985). Otros métodos bien conocidos en la técnica incluyen separación magnética con perlas magnéticas recubiertas con anticuerpo, "selección" con un anticuerpo unido a una matriz sólida y citometría de flujo (FACS).

La fuente del receptor de VEGF es típicamente células vasculares y, especialmente, células endoteliales vasculares, que expresan el receptor de VEGF. Son fuentes adecuadas de células endoteliales vasculares los vasos sanguíneos, tales como células sanguíneas de cordón umbilical, especialmente células endoteliales vasculares del cordón umbilical humano (HUVEC).

Los receptores de VEGF pueden usarse como material de partida para producir otros materiales, tales como antígenos para preparar anticuerpos monoclonales y policlonales adicionales que reconozcan y se unan al receptor de VEGF u otros antígenos de la superficie de células que expresan el VEGF.

Uso de anticuerpos de la invención para aislar y purificar células tumorales positivas para KDR

Los anticuerpos de la presente invención pueden usarse para aislar y purificar células tumorales positivas para Flk-1 KDR (VEGFR-2), es decir, células tumorales que expresan KDR, usando métodos convencionales tales como cromatografía de afinidad (Dean, P. D. G. *et al.*, Affinity Chromatography: A Practical Approach, IRL Press, Arlington, VA, 1985). Otros métodos bien conocidos en la técnica incluyen separación magnética con perlas magnéticas recubiertas con anticuerpo, agentes citotóxicos, tales como complemento, conjugados con el anticuerpo, "selección" con un anticuerpo unido a una matriz sólida y citometría de flujo (FACS).

Control de los niveles de VEGF y receptores de VEGF *in Vitro* o *in Vivo*

Los anticuerpos de la presente invención pueden usarse para controlar los niveles de VEGF o receptores de VEGF *in vitro* o *in vivo* en muestras biológicas usando ensayos convencionales y métodos conocidos en la técnica. Algunos ejemplos de muestras biológicas incluyen fluidos corporales, tales como sangre. Los ensayos convencionales implican, por ejemplo, marcar los anticuerpos y realizar inmunoensayos convencionales, tales como radioinmunoensayos, como se conoce bien en la técnica.

En la bibliografía se describen técnicas de ADN recombinante convencionales útiles para llevar a cabo la presente invención (Sambrook *et al.*, "Molecular Cloning, "Segunda Edición, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1987; Ausubel *et al.*, (Eds) "Current Protocols in Molecular Biology, "Green Publishing Associates/Wiley-Interscience, Nueva York, 1990).

Administración

Los anticuerpos del receptor de la presente invención pueden administrarse para tratamientos terapéuticos a un paciente que padezca un tumor, en una cantidad suficiente para prevenir, inhibir o reducir la progresión del tumor, por ejemplo, el crecimiento, la invasividad, la metástasis y/o la recurrencia del tumor. Una cantidad adecuada para conseguir este fin se define como una dosis terapéuticamente eficaz. Las cantidades eficaces para este uso dependerán de la gravedad de la enfermedad y del estado general del propio sistema inmunitario del paciente. Los programas de dosificación también variarán dependiendo de la patología y del estado del paciente, y típicamente variarán desde una sola dosificación en embolada o infusión continua a múltiples administraciones al día (por ejemplo, cada 4-6 horas) o como se indique por el médico a cargo del tratamiento y el estado del paciente. Sin embargo, debe indicarse que la presente invención no está limitada a ninguna dosis particular.

La presente invención puede usarse para tratar cualquier tumor adecuado, incluyendo, por ejemplo, tumores de mama, corazón, pulmón, intestino delgado, colon, bazo, riñón, vejiga, cabeza y cuello, ovario, próstata, cerebro, páncreas, piel, hueso, médula ósea, sangre, timo, útero, testículos, cuello uterino o hígado. Preferentemente, los métodos de la presente invención se usan cuando el tumor es un tumor del colon o cuando el tumor es un carcinoma de pulmón no microcítico (NSCLC).

Además, los tumores de la presente invención preferentemente tienen una expresión o señalización aberrante de VEGFR. Se ha observado una señalización potenciada por VEGFR en muchos cánceres humanos diferentes. Las células endoteliales que se infiltran en gliomas expresan altos niveles de VEGFR-2 (Plate *et al.*, Nature, 359: 845, 1992). Los niveles de VEGFR-2 están específicamente regulados de forma positiva por VEGF producido por glioblastomas humanos (Plate *et al.*, Cancer Res., 53: 5822, 1993). El descubrimiento de altos niveles de la expresión de VEGFR-2 en células endoteliales asociadas a glioblastoma (GAEC) indica que la actividad del receptor probablemente se induzca durante la formación del tumor, ya que los transcritos de VEGFR-2 apenas son detectables en las células endoteliales de cerebro normales. Esta regulación positiva está restringida a las células endoteliales vasculares muy próximas al tumor.

La presente invención es útil para la inhibición o reducción del crecimiento tumoral. Por inhibición o reducción del crecimiento tumoral se entiende la prevención, la inhibición o la reducción de la progresión del tumor, por ejemplo, el crecimiento, invasividad, metástasis y/o recurrencia del tumor. Además, la presente invención también puede ser útil para el tratamiento de una afección angiogénica, tal como aterosclerosis, artritis, degeneración macular y psoriasis. La identificación de los pacientes que tienen afecciones para las que es útil la presente invención está dentro de la capacidad y el conocimiento de un experto en la materia.

En la presente invención puede usarse cualquier método o vía adecuada para administrar los anticuerpos de VEGFR, por ejemplo, administración oral, intravenosa, intraperitoneal, subcutánea o intramuscular. La dosis de antagonista administrada depende de numerosos factores que incluyen, por ejemplo, el tipo de anticuerpos, el tipo y gravedad del tumor a tratar y la vía de administración de los anticuerpos. Debería enfatizarse, sin embargo, que la presente invención no se limita a ningún método o vía de administración particular.

En una realización alternativa, el antagonista de VEGFR puede administrarse en combinación con uno o más agentes antineoplásicos (documento US 6.217.866). Puede usarse cualquier agente antineoplásico adecuado, tal como un agente quimioterapéutico o radiación. Los ejemplos de agentes quimioterapéuticos incluyen, entre otros, cisplatino, doxorubicina, paclitaxel, irinotecán (CPT-11), topotecán o una combinación de los mismos. Cuando el agente antineoplásico es radiación, la fuente de la radiación puede ser externa (radioterapia de haz externo-EBRT) o interna (braquiterapia-BT) al paciente que se esté tratando. La dosis de agente antineoplásico administrada depende de numerosos factores que incluyen, por ejemplo, el tipo de agente, el tipo y gravedad de tumor que se trate y la vía de administración del agente. Debe subrayarse, sin embargo, que la presente invención no se limita a ninguna dosis particular.

En una realización alternativa adicional, el anticuerpo de VEGFR de la presente invención puede administrarse en combinación con uno o más adyuvantes adecuados, tales como, por ejemplo, citocinas (por ejemplo, IL-10 e IL-13) u otros inmunoestimuladores. Véase, por ejemplo, Larrivee *et al.*, mencionado anteriormente. Debe apreciarse, sin embargo, que la administración de solamente el antagonista de VEGFR es suficiente para prevenir, inhibir o reducir la progresión del tumor de una manera terapéuticamente eficaz.

Además, el anticuerpo de VEGFR puede administrarse como un conjugado de ligando, que se une específicamente al receptor y libera una carga tóxica letal después de la internalización de la toxina-ligando. Se diseñaron conjugados entre toxinas y los receptores con el objetivo de desarrollar agentes tóxicos específicos para VEGFR o células tumorales que sobreexpresan VEGFR minimizando a la vez la toxicidad no específica. Por ejemplo, se demostró que un conjugado compuesto de EGF y endotoxina de *Pseudomonas* (PE) era tóxico para células HeLa que expresaban EGFR *in vitro*. Diversos agentes, incluyendo la tioridacina y los adenovirus, pueden potenciar la captación celular del conjugado, así como aumentar la citotoxicidad del conjugado.

Se entiende que los anticuerpos de VEGFR de la presente invención, cuando se usen en un mamífero con un objetivo profiláctico o de tratamiento, se administrarán en forma de una composición que comprende adicionalmente un vehículo farmacéuticamente aceptable. Los vehículos farmacéuticamente aceptables adecuados incluyen, por ejemplo, uno o más de los siguientes: agua, solución salina, solución salina tamponada con fosfato, dextrosa, glicerol, etanol y similares, así como combinaciones de los mismos. Los vehículos farmacéuticamente aceptables pueden comprender además cantidades minoritarias de sustancias adyuvantes tales como agentes humectantes o emulsionantes, conservantes o tampones, que aumentan el periodo de validez o eficacia de las proteínas de unión. Las composiciones para inyección pueden, como se conoce bien en la técnica, formularse para proporcionar una liberación rápida, prolongada o retardada del principio activo después de su administración al mamífero.

Los anticuerpos de VEGFR de la presente invención pueden estar en diversas formas. Estas incluyen, por ejemplo, formas de dosificación sólidas, semisólidas y líquidas, tales como comprimidos, píldoras, polvos, soluciones, dispersiones o suspensiones líquidas, liposomas, supositorios, soluciones inyectables e infundibles. La forma preferida depende del modo de administración deseado y de la aplicación terapéutica.

Dichos anticuerpos pueden prepararse de una manera bien conocida en la técnica farmacéutica. Para realizar la composición, el principio activo habitualmente se mezclará con un vehículo, o se diluirá con un vehículo, y/o se incluirá dentro de un vehículo que puede estar, por ejemplo, en forma de una cápsula, sobrecito, papel u otro recipiente. Cuando el vehículo actúa como diluyente, puede ser un material sólido, semisólido o líquido, que actúa como vehículo, excipiente o medio para el principio activo. Por lo tanto, la composición puede estar en forma de comprimidos, grageas, sobrecitos, obleas, elixires, suspensiones, aerosoles (en forma sólida o en un medio líquido), pomadas que contienen, por ejemplo, hasta el 10% en peso del compuesto activo, cápsulas de gelatina blanda y dura, supositorios, soluciones de inyección, suspensiones, polvos envasados estériles y un parche tópico.

Radiación

La fuente de radiación usada en combinación con un antagonista del receptor de VEGF puede ser externa o interna al paciente que se esté tratando. Cuando la fuente es externa al paciente, la terapia se conoce como terapia de radiación de haz externo (EBRT). Cuando la fuente de radiación es interna al paciente, el tratamiento se denomina braquiterapia (BT).

La radiación se administra de acuerdo con técnicas convencionales bien conocidas usando el equipo convencional fabricado para este fin, tal como AECL Theratron y Varian Clinac. La dosis de radiación depende de numerosos factores como se conoce bien en la técnica. Dichos factores incluyen el órgano que se trate, los órganos sanos en la trayectoria de la radiación que podrían verse afectados negativamente de forma involuntaria, la tolerancia del paciente a la radioterapia y el área del cuerpo que necesite tratamiento. La dosis típicamente estará comprendida

entre 1 y 100 Gy, y más particularmente entre 2 y 80 Gy. Algunas dosis que se han indicado incluyen 35 Gy para la médula espinal, 15 Gy para los riñones, 20 Gy para el hígado y 65-80 Gy para la próstata. Debe subrayarse, sin embargo, que la presente invención no se limita a ninguna dosis particular. La dosis se determinará por el médico a cargo del tratamiento de acuerdo con factores particulares en una situación dada, incluyendo los factores mencionados anteriormente.

La distancia entre la fuente de la radiación externa y el punto de entrada en el paciente puede ser cualquier distancia que represente un equilibrio aceptable entre la destrucción de las células diana y la minimización de los efectos secundarios. Típicamente, la fuente de radiación externa está a una distancia comprendida entre 70 cm y 100 cm del punto de entrada en el paciente.

La braquiterapia se lleva a cabo generalmente poniendo la fuente de radiación en el paciente. Típicamente, la fuente de radiación se pone aproximadamente a una distancia de 0-3 cm del tejido que se esté tratando. Las técnicas conocidas incluyen braquiterapia intersticial, intercavitaria y superficial. Las semillas radiactivas pueden implantarse de forma permanente o temporal. Algunos átomos radiactivos típicos que se han usado en implantes permanentes incluyen yodo-125 y radón. Algunos átomos radiactivos típicos que se han usado en implantes temporales incluyen radio, cesio-137 e iridio-192. Algunos átomos radiactivos adicionales que se han usado en braquiterapia incluyen americio-241 y oro-198.

La dosis de radiación para la braquiterapia puede ser la misma que se ha mencionado anteriormente para la terapia de radiación de haz externo. Para determinar la dosis de braquiterapia, además de los factores mencionados anteriormente para determinar la dosis de terapia de radiación de haz externo, también se tiene en cuenta la naturaleza del átomo radiactivo usado.

25 Quimioterapia

Los agentes quimioterapéuticos incluyen todos los compuestos químicos que son eficaces para inhibir el crecimiento tumoral. La administración de agentes quimioterapéuticos puede realizarse de una diversidad de maneras incluyendo de forma sistémica por las vías parenteral y entérica. En una realización, el antagonista del receptor de VEGF y el agente quimioterapéutico se administran como moléculas separadas. En otra realización, el antagonista del receptor de VEGF se une, por ejemplo, por conjugación, a un agente quimioterapéutico.

Los ejemplos de agentes quimioterapéuticos incluyen agentes alquilantes, por ejemplo, mostazas nitrogenadas, compuestos de etilenimina y alquil sulfonatos; antimetabolitos, por ejemplo, antagonistas de ácido fólico, purina o pirimidina; inhibidores mitóticos, por ejemplo, alcaloides de la vinca y derivados de podofilotoxina; antibióticos citotóxicos; y compuestos que dañan o interfieren con la expresión del ADN.

Adicionalmente, los agentes quimioterapéuticos incluyen anticuerpos, moléculas biológicas y moléculas pequeñas, como se describe en el presente documento. Los ejemplos particulares de agentes quimioterapéuticos o de quimioterapia incluyen cisplatino, dacarbazina (DTIC), dactinomicina, mecloretamina (mostaza nitrogenada), estreptozocina, ciclofosfamida, carmustina (BCNU), lomustina (CCNE), doxorubicina (adriamicina), daunorubicina, procarbazona, mitomicina, citarabina, etopósido, metotrexato, 5-fluorouracilo, vinblastina, vincristina, bleomicina, paclitaxel (taxol), docetaxel (taxotere), aldesleucina, asparaginasa, busulfán, carboplatino, cladribina, dacarbazina, floxuridina, fludarabina, hidroxurea, ifosfamida, interferón alfa, leuprolide, megestrol, melfalán, mercaptopurina, plicamicina, mitotano, pegaspargasa, pentostatina, pipobroman, plicamicina, estreptozocina, tamoxifeno, tenipósido, testolactona, tioguanina, tiotepa, mostaza de uracilo, vinorelbina, clorambucilo, taxol y combinaciones de los mismos.

La presente invención también incluye kits para inhibir el crecimiento tumoral que comprenden una cantidad terapéuticamente eficaz de un antagonista de EGFR y una cantidad terapéuticamente eficaz de un antagonista de VEGFR. El antagonista de EGFR o VEGFR de los kits de la invención puede ser cualquier antagonista adecuado, del que se han descrito ejemplos anteriormente. Preferentemente, el antagonista de EGFR del kit comprende un anticuerpo o equivalente funcional del mismo, específico para EGFR. Como alternativa, y también preferentemente, el antagonista de EGFR del kit comprende una molécula pequeña específica para EGFR. El antagonista de VEGFR del kit preferentemente comprende un anticuerpo o equivalente funcional del mismo, específico para VEGFR. Como alternativa, el antagonista de VEGFR del kit preferentemente comprende una molécula pequeña específica para VEGFR. Además, los kits de la presente invención pueden comprender además un agente antineoplásico. En el presente documento se han descrito ejemplos de agentes antineoplásicos adecuados en el contexto de la presente invención. Los kits de la presente invención pueden comprender además un adyuvante, cuyos ejemplos también se han descrito anteriormente.

En consecuencia, los anticuerpos de receptor de la presente invención pueden usarse *in vivo* e *in vitro* para métodos de investigación, diagnóstico, profilácticos o de tratamiento, que se conocen bien en la técnica. Por supuesto, debe entenderse y esperarse que puedan realizarse variaciones en los principios de la invención divulgada en el presente documento por un experto en la materia.

Ejemplos

La presente invención se describirá con más detalle en lo sucesivo. Sin embargo, debe entenderse que estos ejemplos tienen únicamente fines ilustrativos y no deben considerarse limitantes del alcance de la presente invención.

Ejemplo 1: Establecimiento de la línea celular secretora de KDR-Fc

El gen correspondiente a los dominios extracelulares (ECD) 1-3 del gen de KDR (n° de referencia AF063658 en el GenBank) se amplificó a partir de una biblioteca de ADNc placentario humano (Clontech, Estados Unidos). La amplificación se llevó a cabo usando los cebadores KDR 1F (SEQ ID NO: 21) y KDR 3R (SEQ ID NO: 22) que tienen sitios de digestión *Bam*HI y *Nhe*I respectivamente.

SEQ ID NO: 21: 5'-CGC GGATCC ATGGAG AGCAA-3'

SEQ ID NO: 22: 5'-CCGCTAGC TTTTTCATGGACCCTGACA-3'

Para producir una proteína quimérica KDR(ECD1-3)-Fc, se digirió un vector pcNA3-BACE-Fc (Publicación de Patente Coreana 10-2005-0032177) compuesto de un gen de la proteína BACE-Fc insertado en un vector pcDNA3 (Invitrogen, Estados Unidos) con *Bam*HI y *Nhe*I, y después se ligó con el fragmento de PCR digerido con las mismas enzimas de restricción. El dominio de Fc se amplificó por PCR usando los cebadores ThFc-F (SEQ ID NO: 23) y MycFc-R (SEQ ID NO: 24) para tener un sitio de digestión de trombina y un marcador de myc, y el fragmento amplificado se ligó con el vector usando sitios *Nhe*I y *Xho*I, construyendo de este modo pcDNA3-KDR D123tFcm.

SEQ ID NO: 23: 5'-CCGCTAGCAGCGGCCTGGTGCCGCGCGGGCAGCGACAAACTCAC-3';

SEQ ID NO: 24: 5'-GGCTCGAGTCACAGGTCTTCTCAGAGATCAGC TTCTGCTCTTACCCGGAGAC-3'

El pcDNA3-KDR D123tFcm consiste en una secuencia de bases que codifica los restos de aminoácidos 1-327 que comprenden la secuencia señal de secreción y el dominio extracelular de KDR humano, una secuencia de bases que codifica un sitio de reconocimiento de trombina (SSGLVPRGS), una secuencia de bases que codifica 227 aminoácidos correspondientes al dominio Fc de inmunoglobulina G humana (hIgG) y una secuencia de bases (EQKLISEEDL) que codifica el marcador de myc (Fig. 1).

Para el mapeo de epítomos de anticuerpos, se prepararon KDR (ECD1-2)-Fc (restos de aminoácidos 1-222) y KDR(ECD2-3)-Fc (restos de aminoácidos 1-327 (Δ 24-116)). Para clonar KDR (ECD1-2), la secuencia preparada se amplificó por PCR usando un cebador KDR 1F (5'-CGC GGATCC ATGGAG AGCAA: SEQ ID NO 25) y un cebador KDR 12R (5'-CTA GCTAGC CCTAT ACCCT ACAAC GACA-3': SEQ ID NO: 26), y después, el fragmento amplificado por PCR se insertó en pcDNA3-KDR D123tFcm digerido con *Bam*HI y *Nhe*I, preparándose de este modo pcDNA3-KDR D12tFcm. Para clonar KDR (ECD2-3), se amplificaron un fragmento de PCR del cebador KDR 1F y el cebador KDR 23SR (SEQ ID NO: 26) y un fragmento de PCR del cebador KDR 23SF (SEQ ID NO: 27) y el cebador KDR 23R (SEQ ID NO: 28) por PCR solapante. El fragmento de PCR resultante se insertó en pcDNA3-KDR D123tFcm usando sitios *Bam*HI y *Nhe*I, preparándose de este modo pcDNA3-KDR D23tFcm (Fig. 2).

SEQ ID NO: 26: 5'-ACA TAACCC ACAG AGGCG GCCCGGG TCTCCA-3'

SEQ ID NO: 27: 5'-GACCCGGCCGCTCTGTGGGTTATGTTCAAGATTACAGA-3'

SEQ ID NO: 28: 5'-CTA GCTAGC TTTTTC TGGACCCTGACA-3'

Para producir una proteína quimérica KDR(ECD)-Fc, el vector pcDNA3-KDR D123tFcm preparado anteriormente se introdujo por transfección en células CHO-DG44 (Aprogen, Corea), y las células se cultivaron en α -MEM (Gibco, Estados Unidos), que contenía dFBS al 10 % (Gibco, Estados Unidos) y G418 a 500 μ g/ml (geneticina; Sigma, Estados Unidos). Para optimizar la expresión de la proteína quimérica KDR(ECD)-Fc, las células se cultivaron en medio CHO-SFM2 (Gibco) en presencia de MTX (metotrexato, Sigma), mientras se aumentaba la concentración de MTX. Como resultado, se confirmó que la proteína se expresaba de forma óptima en presencia de MTX a una concentración 700 nM.

La proteína producida se purificó usando cromatografía de afinidad de proteína A (proteína A-Sepharose, GE healthcare) y cromatografía de exclusión por tamaño (Hiload superdex 200, GE healthcare) y se almacenó en tampón fosfato 10 mM (pH 7,0) que contenía NaCl 150 mM. La Fig. 3 muestra los resultados de SDS-PAGE de KDR(ECD1-3)-Fc purificado de acuerdo con el método anterior.

Ejemplo 2: Preparación de biblioteca de presentación en fagos de anticuerpos de cadena sencilla (ScFv) humanos (vírgenes) completos

Se obtuvo ARN total a partir de cinco donantes de médula ósea sanos usando TRI Reagent (Sigma) y, basándose en el ARN total, se purificó ARNm usando un kit de purificación de ARNm (kit de preparación de ARNm oligotex, Qiagen, Estados Unidos). El ARNm se trató usando un sistema de RT-PCR (sistema de RT-PCR ThermoScript, Gibco-BRL, Estados Unidos) para obtener ADNc. Para obtener un gen VH, se amplificó cada uno de un fragmento

ES 2 450 933 T3

del gen V y un fragmento DJ usando los cebadores mostrados en la Tabla 1, y cada uno de los fragmentos de ADN amplificados se amplificaron por una segunda PCR usando cebadores (SEQ ID NOs: 29-61) que tenían sitios de enzimas de restricción Sfil en el extremo 5' y en el extremo 3'.

5

Tabla 1: Secuencia de cebadores para amplificar fragmentos de genes VH y DJ

Directo-gen VH		SEQ ID NO:
H05	GARGTGCAGCTGGTGGAGTC	29
H06	CAGSTGCAGCTGCAGGAGTC	30
H08	CAGGTACAGCTGCAGCAGTC	31
H09	CAGRTGCAGCTGGTGCAGTCTGGGG	32
H11	GAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGAGCA	33
H12	CAGGTTTCAGCTGGTGCAGTCTGGAG	34
H13	CAGGTTTCAGCTGGTGCAGTCTGGGG	35
H14	CAGGTCCAGCTGGTACAGTCTGGGG	36
H15	CAGGTCACCTTGAAGGAGTCTGGTCCTGT	37
H16	CAGATCACCTTGAAGGAGTCTGGTCCTAC	38
H17	CAGGTCACCTTGAGGGAGTCTGGTCCTGC	39
H25	GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGTG	40
H32	CAGGTGCAGCTACAGCAGTGGGGCG	41
Inverso-gen VH		
H210	AATACACGGCCGTGTCCTCAGATC	42
H210L	AATACACGGCCGTGTCCTCAGATCTCAGGCTG CTCAGCTCCATGTAGGCTGAG	43
H211	AGCTCCATGTAGGCTGTGTCT	44
H212	AGCTCCATGTAGGCTGTGCTCATAGACC	45
H213	AGCTCCATGTAGGCTGTGCTTGTGGACA	46
H214	AGCTCCATGTAGGCTGTGCTTATGGAG	47
H220	AAGGACCACCTGCTTTTGGAGG	48
H230	AATACACGGCCGTGTCCTCGGCTCTCAGACTG TTCATT	49
H240	AATACACGGCCTGTCCACGGCGG	50
H250	AATACATGGCGGTGTCCGAGGCCT	51
Directo-gen DJ		
CDR3-1	GATCTGAGGACACGGCCGTGATTACTGT	52
CDR3-2	CCTCCAAAAGCCAGGTGGTCCTT	53
CDR3-3	GAGCCGAGGACACGGCCGTGATTACTGT	54
CDR3-4	CCGCCGTGGACACGGCCGTGATTACTGT	55
CDR3-5	AGGCCTCGGACACCGCCATGATTACTGT	56
Inverso-gen DJ		
JH-U1	CTGAGGAGACGGTGACC	57
Fusión V-DJ		
H48Sfil-dir	GCGATGGCCCAGCCGGCCATGGCCCAGRTGCA GCTGGTRSAGTC	58
H49Sfil-dir	GCGATGGCCCAGCCGGCCATGGCCCAGRTCAC CTTGARGGAGTC	59
H50Sfil-dir	GCGATGGCCCAGCCGGCCATGGCCCAGGTRCA GTRCAGSAGT	60
H47Sfil-inverso	GGAATTCGGCCCCGAGGCCTGARGAGACRGT GACC	61
cf.) R: A o G; S: C o G		

ES 2 450 933 T3

Para obtener un gen VL, se realizó una primera PCR usando cada uno de los cebadores (Tabla 2) para la amplificación del gen lambda y cebadores (Tabla 3) para la amplificación del gen kappa, y cada uno de los fragmentos amplificados se sometió a una segunda PCR usando cebadores (lambda: SEQ ID Nos: 76-81 y kappa: SEQ ID Nos: 106-108) que tenían un sitio de digestión *BstXI* en el extremo 5' y en el extremo 3'.

5

Tabla 2: Secuencia de cebadores para amplificar un fragmento del gen lambda

Directo Vλ		SEQ ID NO.
L01	CAGYCTGTGCTGACTCAG	62
L03	CAGCCTGTGCTGACTCAAT	63
L06	TCCTATGAGCTGACWCAG	64
L15	CAGYCTGTGCTGACTCAGCCGT	65
L20	CAGTCTGTGCTGACGCAGCCG	66
L23	CAGTCTGCCCTGACTCAGCCTC	67
L24	CAGTCTGCCCTGACTCAGCCTG	68
L25	CAGRCTGTGGTGACYCAGGAGCCCTCAC	69
L26	CAGRCTGTGGTGACYCAGGAGCCATCGT	70
L28	TCCTATGAGCTGACWCAGCCACT	71
L34B	AATTTATGCTGACTCAGCCC	72
Inverso Vλ		
L35	CCTCCTCCACCTAGGACGGTGACCTTGG TCCCAGTT	73
L36	CCTCCTCCACCTAGGACGGTCAGCTTGG TCCCTCCG	74
L37	CCTCCTCCACCGAGGGCGGTCAGCTGGG TGCCTCCT	75
Vλ 2ª PCR (<i>BstXI</i>)		
L34BstXI-dir	GGTGGATCCAGCGGTGTGGGTCCAATT TTATGCTGACTCAGCCC	76
L40BstXI-dir	GGTGGATCCAGCGGTGTGGGTCCCAGY CTGTGCTGACTCAGCC	77
L41BstXI-dir	GGTGGATCCAGCGGTGTGGGTCCCAGC CTGTGCTGACTCAATC	78
L42BstXI-dir	GGTGGATCCAGCGGTGTGGGTCCCAGT CTGCCCTGACTCAGCC	79
L43BstXI-dir	GGTGGATCCAGCGGTGTGGGTCCCAGR CTGTGGTGACYCAGGA	80
L44BstXI-dir	GGTGGATCCAGCGGTGTGGGTCCCTCCT ATGAGCTGACWCAG	81
L38BstXI-inverso	GAATCCACGAGGCTGGCTCCTCCACCK AGGRCCGT	82
cf.) K: G o T; R: A o G; Y: T o C; W: A o T		

Tabla 3: Secuencia de cebadores para amplificar un fragmento del gen Kappa

Directo Vκ		SEQ ID NO.
K12	GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCCC	83
K13	GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCA	84
K14	GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCTTCYG	85
K15	GACATCCAGATGACCCAGTCTCCTTCCA	86
K16	AACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCTGCCA	87
K17	AACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTT	88
K18	GCCATCCAGTTGACCCAGTCTCCAT	89
K19	GCCATCCGGATGACCCAGTCTCCATTCTCC	90
K20	GTCATCTGGATGACCCAGTCTCCATCCTTA	91
K21	GATATTGTGATGACCCAGACTCCACTCTCTCTGT	92
K22	GATATTGTGATGACCCAGACTCCACTCTCCCTGC	93
K23	GATATTGTGATGACCCAGACTCCACTCTCCTCA	94

Directo V _κ		SEQ ID NO.
K24	GATRTTGTGATGACTCAGTCTCCACTCTC	95
K25	GAAATTGTGTTGACRCAGTCTCCAG	96
Directo V _κ		
K27	GACATCGTGATGACCCAGTCTCCAG	97
VKA1	GATGTTGTGATGACTCAGTCTCCACTCTCCCTGCC CGTCACCCTTGGAC	98
VK10	GAAATTGTGCTGACTCAGTCTCCAGACTTT	99
VK30	GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTC TGCATCTGTAGGAG	100
Inverso V _κ		
K28	TCCTCCACGTTTGATTTCCACCTTGGTCCCTTG	101
K29	TCCTCCACGTTTGATCTCCAGCTTGGTCCCC	102
K30	TCCTCCACGTTTGATATCCACTTTGGTCCCAG	103
K31	TCCTCCACGTTTGATCTCCACCTTGGTCCCTCC	104
K32	TCCTCCACGTTTAATCTCCAGTCGTGTCCCT	105
V _κ BstXI		
K33BstXI-dir	GGTGGATCCAGCGGTGTGGGTTCCGACATCCAGA TGACCCAGTCTCC	106
K34BstXI-dir	GGTGGATCCAGCGGTGTGGGTTCCGATATTGTGA TGACCCAGWCTCC	107
K36BstXI-inverso	GAATTCACGAGGCTGGCTCCTCCACGTTTGATH TCCA	108
cf.) H: A, C o T; W: A o T		

Para introducir el fragmento génico VH y el fragmento génico VL en un vector de fagémido, se usó un vector pAK100 (Krebber, A. *et al.*, J. Immunol. Method., 201: 35, 1997). Para introducir el fragmento génico VL, se mutaron tres dominios *Bst*XI (236, 365 y 488) presentes en el gen del represor lac (*lacI*) del vector pAK100 usando el kit de mutagénesis específico Quikchange (Stratagene, Estados Unidos). Usando el vector pAK100 modificado, para preparar un vector de cadena principal para la construcción de la biblioteca de ScFv, el gen V de cadena pesada, amplificado usando el cebador H05 (SEQ ID NO: 29) y el cebador H230 (SEQ ID NO: 49), y el fragmento génico DJ, amplificado usando el cebador CDR3-3 (SEQ ID NO: 54) y el cebador JH-U1 (SEQ ID NO: 57), se sometieron a una segunda PCR con H48*Sfil* (SEQ ID NO: 58)/H47*Sfil* (SEQ ID NO: 61) y la región variable de cadena pesada resultante se digirió con *Sfil* y se ligó al vector pAK100 modificado digerido con la misma enzima. Para introducir una cadena ligera y un enlazador, la región de cadena pesada se amplificó usando cebadores (directo: SEQ ID NO: 109; e inverso: SEQ ID NO: 110), y la secuencia de cadena ligera del anticuerpo 4-1BB humano (LB506) (Publicación de Patente Coreana 2000-0034847) se amplificó usando cada uno de los cebadores (directo: SEQ ID NO: 111; e inverso: SEQ ID NO: 112). Los fragmentos amplificados se insertaron en el vector pAK100 modificado en el que se había introducido el dominio variable de cadena pesada, usando *Xba*I/*Eco*RI, preparándose de este modo un vector de cadena principal de biblioteca de anticuerpos.

SEQ ID NO: 109: 5'-CGAATTTCTAGATAACGA-3'

SEQ ID NO: 110: 5'-CCTCCGCCACTACCTCCTCCTCCGAGGCCCCCGAGGCCTGA-3'

SEQ ID NO: 111: 5'-GGTAGTGGCGGAGGAGGCTCCGGTGGATCCAGCGGTGTGG GTTCCGATATTGTG-3'

SEQ ID NO: 112: 5'-CTCGAATCCACGAGGCTGGCTCCTCCACGTTTGATTTC-3'

Para introducir regiones variables de cadena ligera, se digirió cada región variable de cadena ligera (κ , λ) amplificada con *Bst*XI y se insertó en el vector de cadena principal de la biblioteca de anticuerpos. El plásmido resultante se digirió con una enzima de restricción *Sfil* y se ligó con un fragmento de PCR amplificado de región variable de cadena pesada previamente digerido con *Sfil*. El plásmido ligado se introdujo por transfección en células ElectroTen-Blue competentes (Stratagene, Estados Unidos). Como resultado, se recogió una biblioteca de fagos de ScFv que tenía una diversidad de aproximadamente 10^{11} a partir de la colonia.

30 Ejemplo 3: Bioselección

La reserva de biblioteca construida en el Ejemplo 2 se cultivó hasta la fase logarítmica y se rescató con el fago auxiliar M13K07 (GE healthcare, Estados Unidos). La biblioteca resultante se amplificó en medio 2xYT (2xYT/C/K; que contiene 34 μ g/ml de cloranfenicol y 70 μ g/ml de kanamicina y complementado con IPTG 1 mM) a 30 °C durante una noche.

La reserva de fagos se precipitó en PEG6000 al 20 %/NaCl 2,5 M y se resuspendió en PBS. La reserva de fagos resuspendida se incubó en solución de leche desnatada al 2 %/PBS que contenía 500 μ g/ml de una proteína Fc humana a 37 °C durante 1 hora para retirar los fagos que mostraban Fc anti-humano.

El KDR (VEGFR-2 humano) usado como un antígeno era KDR(ECD1-3)-Fc que comprendía los dominios 1, 2 y 3 de tipo IgG del dominio extracelular de KDR. Se cultivó la línea celular estable de KDR(ECD1-3)-Fc preparada en el Ejemplo 1, y se purificó KDR(ECD1-3)-Fc a partir de la línea celular cultivada.

5 En primer lugar, se bloquearon tubos Maxisorp Star (Nunc, Dinamarca) recubiertos con KDR(ECD1-3)-Fc (10 µg/ml) con leche desnatada al 2 %/PBS a temperatura ambiente durante 2 horas y después se inocularon con $5,4 \times 10^{12}$ ufp de la reserva de fagos a temperatura ambiente durante 1 hora. Los tubos se lavaron 10 veces con PBST (PBS que
10 contenía Tween 20 al 0,1 %) y después se lavaron 10 veces con PBS. El fago unido se eluyó con 1 ml de solución nueva de trietilamina 100 mM a temperatura ambiente durante 10 minutos. El fago eluido se dejó en reposo junto con 10 ml de células XL1-Blue en la mitad de la fase logarítmica a 37 °C durante 30 minutos, y después se cultivó con agitación durante 30 minutos. Después, las células XL1-Blue infectadas se cultivaron en una placa de 2x YT/C que contenía glucosa al 1 % a 30 °C durante una noche. Después de la primera selección, el segundo y tercer procesos de selección se realizaron recubriendo una placa de 96 pocillos (Nunc, Estados Unidos) con KDR(ECD1-3)-Fc en lugar del tubo maxisorp. Después de realizarse la tercera selección, se analizó la capacidad neutralizante
15 de KDR del fago obtenido mediante ensayos de competición de VEGF.

Para ensayos de competición de VEGF, se dejó reaccionar una microplaca recubierta con 200 ng de VEGF 165 (R&D system) durante una noche con leche desnatada al 2 %/PBS a 37 °C durante 2 horas. La microplaca se lavó con PBS y después se puso una mezcla, obtenida haciendo reaccionar 10 ng de KDR(ECD1-3)-Fc con diversas
20 cantidades de fago a temperatura ambiente durante 1 hora, en cada pocillo de la placa y se dejó reaccionar a temperatura ambiente durante 2 horas. La solución de reacción se lavó con PBS, se dejó reaccionar con un anticuerpo anti-KDR de conejo (Reliatech, Alemania) a 37 °C durante 1 hora, y se dejó reaccionar con un anticuerpo de cabra anti-conejo conjugado con HRP (peroxidasa de rábano rústico) (Abcam, Reino Unido) a 37 °C durante 1 hora. Después de terminar la reacción, se reveló el color de cada pocillo con una solución de TMB (Sigma) y después se midió con respecto a absorbancia a 450 nm (Fig. 4).
25

Como resultado, se vio que 6A6, 6H1, 6G1 y 6C1 podían inhibir la unión de VEGF con KDR, y entre ellos, 6A6 y 6H1 mostraban la mayor capacidad para neutralizar VEGF. Además, se mostró que 6A6 y 6H1 tenían una afinidad de unión similar a la de un fago 1C11 reconstruido (denominado en lo sucesivo en el presente documento 1C11) obtenido en el Ejemplo 4. Las secuencias de ADN, secuencias de aminoácidos y secuencias de CDR de ScFv 6A6 (TTAC-0001) se muestran en la Fig. 5.
30

Además, las secuencias de bases y secuencias de aminoácidos de ScFv 6A6 (TTAC-0001) se expresaron como CDR 1 de cadena pesada (SEQ ID NO: 113 and SEQ ID NO: 114), CDR 2 de cadena pesada (SEQ ID NO: 115 y SEQ ID NO: 116), CDR 3 de cadena pesada (SEQ ID NO: 117 y SEQ ID NO: 118), CDR 1 de cadena ligera (SEQ ID NO: 119 y SEQ ID NO: 120), CDR 2 de cadena ligera (SEQ ID NO: 121 y SEQ ID NO: 122), CDR 3 de cadena ligera (SEQ ID NO: 123 y SEQ ID NO: 124), regiones variables de cadena pesada (SEQ ID NO: 125 y SEQ ID NO: 20), regiones variables de cadena ligera (SEQ ID NO: 126 y SEQ ID NO: 1) y regiones de cadena pesada de IgG (SEQ ID NO: 127 y SEQ ID NO: 128) y regiones de cadena ligera de IgG (SEQ ID NO: 129 y SEQ ID NO: 130).
35

40 Ejemplo 4: Construcción de vectores de fagos IMC-1121(rIMC-1121) e IMC-1C11(rIMC-1C11) reconstruidos

Para obtener partículas de fago ScFv IMC-1C11 (documento PCT/US2001/10504) y ScFv IMC-1121 (documento PCT/US2002/006762) (Imclone) a usar como grupos de control positivos, se clonó la región ScFv de cada anticuerpo en el vector pAK.
45

Para IMC-1C11, se clonó un gen variable de cadena ligera usando, como molde, un clon de pTA-d9-07 (LG Life Sciences) obtenido a partir de una biblioteca de anticuerpos vírgenes de ratón (LG Life Sciences). El clon se amplificó por PCR usando los cebadores LR y LF mostrados en la Tabla 4, y el gen variable de cadena ligera amplificado se digirió con *Bst*XI y se ligó a un vector de cadena principal de biblioteca pretratado con *Bst*XI. Se amplificó un gen variable de cadena pesada por PCR usando un clon de pTA-A5N2-10 (LG Life Sciences) como molde con los cebadores mostrados en la Tabla 4. Posteriormente, cada una de las reacciones de PCR se realizó usando cada uno de los pares de cebadores HF1-RI(A), HF2-HR2(B), HF3-HR3(C) y HF4-HR4(D), y cada uno de los fragmentos amplificados se amplificó por PCR solapante usando A-B (conjunto de cebadores HF1-HR2) y C-D (par de cebadores HF3-HR4), y después se amplificó por PCR solapante usando A-B-C-D (par de cebadores HF1-HR4). Después, cada uno de los fragmentos amplificados se trató con *Sfi*I y se ligó con el vector de cadena principal de biblioteca que contiene el gen de cadena ligera de 1C11 tratado con *Sfi*I. La Tabla 4 muestra la secuencia señal de PelB y la secuencia de ADN para el codón ámbar (TGA) del vector de fago (pAK-r1c11).
50
55
60

Tabla 4: Cebador LR y LF

Nombre	Secuencia	SEQ ID NO:
cadena ligera de pTA-d9_07	GACATTGTTTC TCATCCAGTC TCCAGCAATC ATGTCTGCAT CTCCAGGGGA GAAGGTCACC ATAACCTGCA GTGCCAGCTC AAGTGTAAGT TACATGCACT GGTTCCAGCA GAAGCCAGGC ACTTCTCCCA AACTCTGGAT TTATAGCACA TCCAACCTGG CTTCTGGAGT CCCTGCTCGC TTCAGTGGCA GTGGATCTGG GACCTCTTAC TCTCTCACA TCAGCCGAAT GGAGGCTGAA GATGCTGCCA CTTATTACTG CCAGCAAAGG AGTAGTTACC CATTCACGTT CCGCTCGGGG ACAAAGTTGG AAATAAAA	131
cadena pesada de pTA-A5N ² -10	CAGGTTCAGC TCCAGCAGTC TGGGGCAGAG CTGTGAGGT CAGGGGCCTC AGTCAAGTTG TCCTGCACAG CTTCTGGCTT CAACATTA AA GACTACTATA TGCCTGGGT GAAGCAGAGG CCTGAACAGG GCCTGGAGTG GATTGGATGG ATTGATCCTG CGAATGGTAA TACTAAATATGACCCGAAGT TCCAGGGCAA GGCCACTATA ACAGCAGACA CATCCTCAA CACAGCCTAC CTGCAGCTCA GCAGCCTGAC ATCTGAGGAC ACTGCCGTCT ATTACTGTGC TAGATGGGAC TGGTACTTCG ATGTCTGGGG CGCAGGGACC ACGGTCACCG TTCC	132
LF	CTGCAGAACC AGCGGTGTGG GTTCCGACAT CGAGCTCACT CAGTCTCCAT G	133
LR	CTGCAGAACC ACGAGGCTGG CTCCTCCAG TTTTATTTCC AGCTTGGTCC CCG	134
HF1	CGGCCAGCC GGCCATGGCC CAGGTCAAGC TGCAGCAGTC TGGGGCAGAG CTGTGGGGGT CAGGGGCC	135
HF2	GGCTTCAACA TTAAAGACTT CTATATGCA	136
HF3	GATTATGCCC CGAAGTTCCA GGGCAAGGCC ACCATGACTG CAGACTCATC CTCCA	137
HF4	TACTGTAATG CATACTATGG TGACTACGAA GGCTACTGGG GCCAA	138
HR1	GTCTTTAATG TTGAAGCCAG AAGTTGTGCA G	139
HR2	ACTTCGGGGC ATAATCAGAA TCACCATTCT CAGGATCAAT CCATCCAATC	140
HR3	GTATGCATTA CAGTAATAG	141
HR4	CCGAGGCCCC CGAGGCCTGA GGAGACGGTG ACCGTGGTCC CTTGGCCCCA GTAGCCTTCG TA	142
ADN de r1C11-ScFv	ATGAAATACC TATTGCCTAC GGCAGCCGCTGGATTGTTAT TACTCGCGGC CCAGCCGGCC ATGGCCCAGG TCAAGCTGCA GCAGTCTGGG GCAGAGCTTG TGGGGTCAGG GGCCTCAGTC AAATTGTCCT GCACAACCTC TGGCTTCAAC ATTAAGACT TCTATATGCA CTGGGTGAAG CAGAGGCCTG AACAGGGCCT GGAGTGGATT GGATGGATTG TCCTGAGAA TGGTGATTCT GATTATGCCC CGAAGTTCCA GGGCAAGGCC ACCATGACTG CAGACTCATC CTCCAACACA GCCTACCTGC AGCTCAGCAG CCTGACATCT GAGGACACTG CCGTCTATTA CTGTAATGCA TACTATGGTG ACTACGAAGG CTACTGGGGC CAAGGGACCA CGGTCACCGT CTCCTCAGGC CTCGGGGGCC TCGGAGGAGG AGGTAGTGGC GGAGGAGGCT CCGGTGGATC CAGCGGTGTG GGTCCGACA TCGAGCTCAC TCAGTCTCCA GCAATCATGT CTGCATCTCC AGGGGAGAAG GTCACCATAA CCTGCAGTGC CAGCTCAAGT GTAAGTTACA TGCCTGGTT CCAGCAGAAG CCAGGCACTT CTCCAAACT CTGGATTAT AGCACATCCA ACCTGGATTA TGGAGTCCCT GCTCGCTTCA GTGGCAGTGG ATCTGGGACC TCTTACTCTC TCACAATCAG CCGAATGGAG GCTGAAGATG CTGCCACTTA TTA CTGCCAG CAAAGGAGTA GTTACCCATT CACGTTCCGC TCGGGGACCA AGCTGGAAT AAAACGTGGA GGAGCCAGCC TCGTGAAT CGAGCAGAAG CTGATCTCTG AGGAAGACCT GTAG	143

Para obtener IMC-1121, se usó 6G1 como molde para clonar una región variable de cadena ligera. El molde de 6G1 se amplificó por PCR usando los pares de cebadores LF-KR1(A), LF1-LR2(B), LF2-LR3(C) y LF3-LR4(D), se amplificó por PCR solapante usando A-B (conjunto de cebadores LF-LR2) y C-D (par de cebadores LF2-LR), y después se amplificó por PCR solapante usando A-B-C-D (par de cebadores LF-LR). El fragmento de PCR obtenido se trató con BstXI y se insertó en el vector de cadena principal de la biblioteca (IMC-1121 reconstruido; denominado en lo sucesivo en el presente documento IMC-1121). Los cebadores usados en el presente documento se muestran en la Tabla 5.

Para la región variable de cadena pesada, se usó como molde el clon de YGKL-136 que tenía una secuencia más parecida a IMC-1121 entre las secuencias de clones obtenidas de la biblioteca de ScFv vírgenes humanos (Ejemplo 2). El clon de YGKL-136 se amplificó por PCR usando cada uno de los pares de cebadores HF-HR1(A), HF1-HR2(B) y HF2-HR(C), se sometió a PCR solapante A+B (par de cebadores HF-HR2) y después se sometió a PCR solapante de A+B y C (par de cebadores HF-HR). El fragmento de PCR producido se trató con SfiI y se ligó a un vector de cadena principal de biblioteca que contenía cadena ligera.

Tabla 5: Cebador LF y HF para clonar la región variable de cadena ligera

Nombre	Secuencia	SEQ ID NO:
Cadena pesada de YGKL-136 (molde)	GAGGTGCAGC TGGTGGAGTC TGGGGGAGGC CTGGTCAAGC CTGGGGGGTTC CCTGAGACTC TCCTGTGCAG CCTCTGGATT CACCTTCAGT AGCTATAGCA TGAAGTGGGT CCGCCAGGCT CCAGGGAAGG GGCTGGAGTG GGTCTCATCC ATTAGTAGTA GTAGTAGTTA CATACTAC GCAGACTCAG TGAAGGGCCG ATTCACCATC TCCAGAGACA ACGCCAAGAA CTCACTGTAT CTGCAAATGA ACAGTCTGAG AGCCGAGGAC ACGGCCGTGT ATTACTGTGC GAGAGTCACA GATGCTTTTG ATATCTGGGG CCCCGGAACC CTGGTCACCG TCTCCTCA	144
Cadena ligera de 6G1 (molde)	GACATCCAGA TGACCCAGTC TCCATCTTCC GTGTCTGCAT CTGTAGGAGA CAGAGTCACC ATCACTTGTG GGGCGAGTCA GGGTATTAGC AGCTATTTAG GCTGGTATCA GCAGAAACCA GGGAAAGCCC CTAAGCTCCT GATCTATGCT GCATCCAATT TGCAAACAGG GGTCCCGCCA AGGTTACAGC GCAGTGGATC CGGGACAAGT TCACTCTCA CCCTCAATAA TGTGCAGCCT GAAGATTCTG CAACTACTA TTGTCAACAG GCTGACAGTT TCCCTCTTTC GGCGGAGGGA CCAAAGTGGA AATCAAACGT GAGGAGCC	145
Cebador LF	CCCCAGCGGT GTGGGTTCCG ACA	146
Cebador LR1	TGGTGA CTCTGTCTCTATA GATGCAGACA CGGATGAT	147
Cebador LF1	TCTATAGGAG ACAGAGTCAC CA	148
Cebador LR2	TACCAGCCTA ACCAGTTGTC AATACCCTGA CTCGCCCG	149
Cebador LF2	TTGACA ACTG GTTAGGCTGG TATCAGCAGA AACCAGGG AAA	150
Cebador LR3	ACCTTGATGG GACCCCTGTG TCCAAATTGG ATGCATCATA GATCAGGAGC TT	151
Cebador LR	CCCCACGAGG CTGGCTCCTC CA	152
Cebador HF	CCGGCCAGC CGGCCATGGC CGAGGTGCAG CTGGTGCAGT CTGGGGGAGG CCTGGTCA	153
Cebador HF1	GTAGTAGTAG TAGTTACATA TACTACGCAG ACTCAGTGA	154
Cebador HF2	T TACTGTGCG AGAGTCACAG ATGCTTTTGA TATCTGGGGC CAAGGGACAA	155
Cebador HR1	TCACTGAGTC TGC GTAGTAT ATGTA ACTAC TACTACT	156

Nombre	Secuencia	SEQ ID NO:
Cebador HR2	CTGTGACTCT CGCACAGTAA TACA	157
Cebador HR	CCGGCCCCCG AGGCCTGAGG AGACGGTGAC CATTGTCCCT TGGCCCCAG	158
ADN de ScFv r1121	ATGAAATACC TATTGCCTAC GGCAGCCGCT GGATTGTTAT TACTCGCGGC CCAGCCGGCC ATGGCCGAGG TGCAGCTGGT GCAGTCTGGG GGAGGCCTGG TCAAGCCTGG GGGGTCCCTG AGACTCTCCT GTGCAGCCTC TGGATTACCC TTCAGTAGCT ATAGCATGAA CTGGGTCCGC CAGGCTCCAG GGAAGGGGCT GGAGTGGGTC TCATCCATTA GTAGTAGTAG TAGTTACATA TACTACGCAG ACTCAGTGAA GGGCCGATTC ACCATCTCCA GAGACAACGC CAAGAACTCA CTGTATCTGC AAATGAACAG TCTGAGAGCC GAGGACACGG CCGTGTATTA CTGTGCGAGA GTCACAGATG CTTTTGATAT CTGGGGCCAA GGGACAATGG TCACCGTCTC CTCAGGCCTC GGGGGCCTCG GAGGAGGAGG TAGTGGCGGA GGAGGCTCCG GTGGATCCAG CCGTGTGGGT TCCGACATCC AGATGACCCA GTCTCCATCT TCCGTGTCTG CATCTATAGG AGACAGAGTC ACCATCACTT GTCGGGCGAG TCAGGGTATT GACAACCTGGT TAGGCTGGTA TCAGCAGAAA CCTGGGAAAG CCCCTAAACT CCTGATCTAC GATGCATCCA ATTTGGACAC AGGGGTCCCA TCAAGGTTCA GTGGAAGTGG ATCTGGGACA TATTTACTC TCACCATCAG TAGCCTGCAA GCTGAAGATT TTGCAGTTTA TTTCTGTCAA CAGGCTAAAG CTTTTCTCC CACTTTCGGC GGAGGGACCA AGGTGGACAT CAAACGTGGA GGAGCCAGCC TCGTGGAATT CGAGCAGAAG CTGATCTCTG AGGAAGACCT GTGA	159

Ejemplo 5: Producción y purificación de ScFv soluble

- 5 Para preparar ScFv 6A6 soluble, se digirió pAK-6A6, que tenían una secuencia pelB y una secuencia ScFv, con *EcoRI* y *XbaI* para obtener un fragmento que tenía la secuencia pelB y la secuencia ScFv. El fragmento se insertó en el vector pET21b (Novagen, Estados Unidos) usando las mismas enzimas de restricción. Para añadir un marcador myc al vector insertado con el fragmento que tenía la secuencia pelB y la secuencia ScFv, el vector pET21b, al que se había insertado la secuencia pelB y la secuencia ScFv, como molde, se amplificó por PCR usando cebadores
- 10 (mycDir: SEQ ID NO: 160, y mycInv: SEQ ID NO: 161) y el fragmento de PCR se ligó al vector que tenía la secuencia pelB y la secuencia ScFv usando *EcoRI* y *XhoI*, construyéndose de este modo pET21b-KDR 6A6.

SEQ ID NO: 160: 5'-GAGCCAGCCTCGTGGAATTCGAACAAAAA-3'

SEC ID N°: 161: 5'-TGCTCGAGAT TCAGATCCTC TTCTGAGATG

AGTTTTTGTT GAATTCCACG AGGCT-3'

- 15 Para la medición cinética, se insertó una secuencia de marcador V5 (GKPIPPLLGLDST) en un sitio *XhoI* cadena abajo del marcador de myc de la siguiente manera. La secuencia resultante se amplificó por PCR usando cebadores (V5-Dir: SEQ ID NO: 162 y V5-Inv: SEQ ID NO: 163) que amplificaban los sitios de digestión *EcoRI* y *XhoI* que contenía la secuencia marcadora de V5 de pET21b-KDR 6A6, y el fragmento amplificado se digirió con *EcoRI* y *XhoI*
- 20 y se ligó a pET21b-KDR 6A6 digerido con las mismas enzimas de restricción, construyéndose de este modo pETV-KDR 6A6. El pETV-KDR 6A6 construido se usó para transformar *E. coli* BL21(DE3).

SEQ ID NO: 162: 5'-CCAGCCTCGTGGAATTC GAAC-3'

SEC ID N°: 163: 5'-CCGCTCGAG GGTGGAGTC CAGACCTAATAG

AGGGTT TGGGATCGG CTTTCCATTCAGATC CTCTTCTGA-3'

- 25 Las células *E. coli* BL21(DE3) transformadas con el pETV-KDR 6A6 se cultivaron para expresar la proteína ScFv soluble y se centrifugaron, y se recogió una fracción periplásmica de las células usando solución Tris 50 mM (pH 8,0) que contenía sacarosa al 20% y 200 µg/ml de un coctel inhibidor de proteasa y lisozima (Roche, Swiss). La

fracción obtenida se purificó usando cromatografía de afinidad de Ni-NTI (Hisprep, GE healthcare, Estados Unidos) y cromatografía de intercambio iónico (Q-sepharose, SP-sepharose, GE healthcare, Estados Unidos), obteniéndose de este modo una proteína ScFv.

- 5 Para 6A6, la columna Hisprep se equilibró usando una solución que contenía imidazol 20 mM, NaCl 0,4 M y PBS 1x, y la fracción periplásmica se puso en la columna y se eluyó con solución que contenía imidazol 300 mM (imidazol 300 mM, NaCl 0,4 M/PBS 1x). La proteína eluida se dializó con solución de imidazol 50 mM (pH 6,7), y después se eluyó usando cromatografía de intercambio catiónico aumentando a la vez la concentración de NaCl a 0,5 M. La proteína eluida se concentró (centriprep YM10, milipore, Estados Unidos) y se almacenó en solución PBS. La Figura 6 muestra los resultados de SDS-PAGE del ScFv 6A6 purificado.

Ejemplo 6: Ensayos de competición de VEGF con VEGF

- 15 Para examinar si el ScFv aislado puede inhibir la unión de KDR con VEGF, se realizaron ensayos de competición. Para este fin, se recubrió una placa de microtitulación de 96 pocillos con 20 ng de VEGF 165 a temperatura ambiente durante una noche, y después se dejó reaccionar con leche desnatada al 2%/PBS a 37 °C durante 2 horas. Después de terminarse la reacción, la placa se lavó con PBS y posteriormente se pusieron soluciones de mezcla, obtenidas dejando reaccionar 100 ng de KDR(ECD1-3) digerido con Fc con diversas cantidades de ScFv a temperatura ambiente durante 1 hora, en la placa de microtitulación y se dejó reaccionar a temperatura ambiente durante 2 horas. Después de terminar la reacción, la placa se lavó con PBS y posteriormente se añadió un anticuerpo anti-KDR de ratón (5 mg/ml, Reliatech, Alemania) y se dejó reaccionar a 37 °C durante 1 hora. Después, se añadió una dilución 1:5000 de un anticuerpo de cabra anti-ratón conjugado con HRP (Abcam, Reino Unido) y se dejó reaccionar durante 1 hora y posteriormente se añadió solución de TMB y se dejó reaccionar. Después, se midieron las células en cada pocillo de la placa con respecto a la absorbancia a 450 nm y 650 nm. La Figura 7 muestra los resultados de los ensayos competitivos de VEGF con el ScFv anti-KDR purificado en el Ejemplo 5. Como se muestra en la Figura 7, puede verse que solamente ScFv 6A6 muestra una capacidad potente de neutralizar KDR.

Ejemplo 7: Mapeo de epítomos con anticuerpo ScFv anti-KDR

- 30 Para examinar qué anticuerpos ScFv anti-KDR se unen con qué dominio de los dominios extracelulares 1-3 de KDR, se recubrió una placa de 96 pocillos con 3 µg/ml de cada uno de los KDR(ECD1-2), KDR(ECD2-3) y KDR(ECD 1-3)-Fc preparados de acuerdo con el método del Ejemplo 1 mediante reacción a 37 °C durante 2 horas. Después de terminar la reacción, la placa se lavó con PBS y posteriormente se bloqueó la parte de la placa que no se había recubierto con la proteína KDR con leche desnatada al 2%/PBS. Después, la placa se lavó de nuevo con PBS y posteriormente se añadió anticuerpo ScFv anti-KDR 330 nM y se dejó reaccionar a 37 °C durante 1 hora y 30 minutos. Después de terminar la reacción, la placa se lavó de nuevo con PBS y posteriormente se añadió una dilución 1:500 de un anticuerpo de conejo anti-His6x conjugado con HRP (Abcam, Reino Unido) y se dejó reaccionar a 37 °C durante 1 hora. Después se reveló el color de las células de cada pocillo con solución de TMB y se midió con respecto a la absorbancia a 450 nm.

Como resultado, pudo verse que 6A6 se unía al dominio extracelular 3 de KDR de la misma manera que IMC-1121 (Figura 8). Sin embargo, 6G1 y 6C1 se unían más fuertemente al dominio 1, aunque la absorbancia fuera baja.

Ejemplo 8: Expresión y purificación de IgG

- 50 Para la expresión en forma de IgG completa, se prepararon vectores de expresión de cadena pesada y de cadena ligera que comprendían, cada uno, una región constante completa. Para el vector de expresión de cadena pesada, se trató un vector plgGHD (Aprogen, Corea) que tenía una cadena principal de cadena pesada de 4-1 bb humano con *Sfil*, y después se ligó con un fragmento obtenido tratando la región variable de cadena pesada de pAK-ScFv con *Sfil*, construyéndose de este modo un vector de expresión plgGHD-6A6Hvy que comprendía una región constante completa y una región de cadena pesada (Figura 9).

- 55 Para el vector de expresión de cadena ligera, se trató un vector plgGLD (Aprogen, Corea) que tenía una cadena principal de cadena ligera de 4-1 bb humano con *BstXI*, y después se ligó con un fragmento obtenido tratando la región variable de cadena ligera de pAK-ScFv con *BstXI*, construyéndose de este modo un vector de expresión plgGLD-6A6Lgt que comprendía una región constante completa y una región de cadena ligera (Figura 10). En el caso de IMC-1C11 y 1121, los vectores de expresión de IgG se construyeron de la misma manera que se ha descrito anteriormente.

- 60 Para la expresión de IgG, se cotransfectaron células CHO DG44 (Aprogen, Corea) con la misma cantidad del vector de expresión de cadena ligera (plgGHD-6A6Hvy para el clon 6A6) y del vector de expresión de cadena pesada (plgGLD-6A6Lgt para el clon 6A6). Las células cotransfectadas se cultivaron en medio α -MEM que contenía dFBS al 10% y 500 µg/ml de G418, y después se seleccionó un clon que tuviera el nivel de expresión de proteína más alto, mientras que se añadía MTX a una concentración que variaba de 10 nM a 700 nM.

Para la expresión de anticuerpos, las células se cultivaron en medio CHO-SF2 que contenía MTX 700 nM, a 37 °C, y se recogió el cultivo. Se purificó IgG 6A6 a partir del sobrenadante combinado por cromatografía de afinidad usando una columna de proteína A (GE healthcare, Estados Unidos) de acuerdo con el protocolo del fabricante. El sobrenadante se vertió en la columna de proteína A equilibrada con una solución que contenía fosfato sódico 20 mM (pH 7,0) y NaCl 100 mM y se lavó con una solución que contenía fosfato sódico 20 mM (pH 7,0), EDTA 1 mM y NaCl 500 mM. Después, la proteína se eluyó con una solución de glicina-HCl 0,1 M (pH 3,3) que contenía NaCl 100 mM. La proteína eluida se neutralizó con Tris 1 M. La proteína eluida se mezcló con tampón de fosfato sódico 5 mM (pH 6,0) a una relación de 1:1, y después se vertió en una columna de SP-Sepharose empaquetada previamente (GE healthcare) equilibrada con fosfato sódico 5 mM (pH 6,0) que contenía NaCl 50 mM. La proteína unida a la columna se eluyó con un tampón de fosfato sódico (pH 7,0) que contenía NaCl 50 mM y se vertió en una columna de Q-sepharose empaquetada previamente (GE healthcare) equilibrada con un tampón de elución, y se recogió la proteína no unida. La proteína recogida se concentró con vivaspin 20 30 Kd (Sartorius) y se dializó con PBS. La Figura 11 muestra los resultados de SDS-PAGE de la proteína IgG 6A6 purificada de acuerdo con el método anteriormente descrito.

Ejemplo 9: Ensayos de competición de IgG anti-KDR con diversos VEGF

Se realizaron ensayos de competición de IgG anti-KDR con VEGF de la misma manera que los ensayos de competición de VEGF de ScFv KDR realizados en el Ejemplo 6 usando VEGF 165. Como resultado, la IgG 6A6 mostró la mayor capacidad para neutralizar KDR de todos los anticuerpos anti-IgG, lo cual es similar a los resultados de los ensayos de competición realizados con ScFv, y mostró una capacidad de neutralización de KDR similar a la de la IgG anti-KDR IMC-1121 reconstruida basándose en la secuencia de aminoácidos (Figura 12).

Además, para examinar la unión y competición de IgG 6A6 con isotipos y familias de VEGF distintas de VEGF165, se recubrió una placa de 96 pocillos con 200 ng de cada uno de VEGF121, VEGF165, VEGF-C, VEGF-D y VEGF-E, y después se llevaron a cabo ensayos de competición de la misma manera que en el Ejemplo 6. Como resultado, la IgG 6A6 mostró capacidad neutralizante de VEGF al unirse a VEGF121, VEGF165 y VEGF-E, que pertenecen a VEGF-A, y no se unió a VEGF-C y VEGF-D (Figura 13).

Ejemplo 10: Análisis de la afinidad de unión de ScFv e IgG anti-KDR

La afinidad de unión de los anticuerpos a KDR (VEGFR-2) se midió con BIAcore (GE healthcare). En el caso de ScFv, se inmovilizó KDR(ECD1-3)-Fc en una microplaca CM5 (GE healthcare, Suecia) de acuerdo con el manual del fabricante, y en el caso de ScFv marcado con V5, se inmovilizó un anticuerpo de V5 (Abchem, Reino Unido) en la microplaca. El ScFv marcado con V5 se unió a la microplaca CM5 que tenía el anticuerpo de V5 inmovilizado en la misma, y después se dejó que pasara por la superficie de la microplaca KDR(ECD1-3) sin Fc, obteniéndose de este modo sensogramas. En el caso de IgG, como sucede con el ScFv que no tiene V5, KDR(ECD1-3)-Fc se inmovilizó en la microplaca CM5, y después se dejó que diversas cantidades del anticuerpo pasaran por la superficie de la microplaca, obteniéndose de este modo sensogramas. Basándose en el sensograma obtenido a cada concentración, se midieron las constantes cinéticas k_{on} y k_{off} , y se calculó la K_d a partir de la relación de las constantes cinéticas k_{off}/k_{on} (Tabla 6).

Como resultado, se confirmó que, entre diversos ScFv, un ScFv que tenía una alta afinidad de unión por KDR era 6A6. Además, cuando 6A6 se convirtió en la forma de IgG, su valor de K_d fue aproximadamente 2 veces menor que el de IMC-1121. Esto sugiere que IgG 6A6 se unía más fuertemente a KDR que IMC-1121.

Tabla 6: valor de K_d (M) de IgG y ScFv anti-KDR

	ScFv	ScFv-V5	IgG		
			$k_{on}(1/Ms)$	$k_{off}(1/s)$	$K_d(M)$
6A6	1,11E-08	6,93E-09	3,17E+05	7,3E-05	2,3E-10
6H1	N/A	N/A	5,02E+04	7,20E-03	1,43E-07
6G1	4,11E-07	3,31E-08	9,06E+04	5,48E-03	6,05E-08
6C1	4,31E-08	N/A	1,38E+05	9,58E-03	6,95E-08
IMC-1121b	N/A	N/A	2,27E+05	8,75E-05	3,85E-10
* N/A (no aplicable)					

Ejemplo 11: Análisis de la capacidad neutralizante de KDR de IgG anti-KDR en células HUVEC usando análisis de FACS

5 Se cultivaron células HUVEC procedentes de un cultivo primario en medio sin suero durante una noche para inducir la sobreexpresión de KDR, y después las células se recogieron y se lavaron tres veces con PBS. Las células lavadas se dejaron reaccionar con IgG 6A6 o IgG IMC-1C11 (10 µg/ml) a 4 °C durante 1 hora, y después se dejaron reaccionar con un anticuerpo de conejo anti-IgG humana marcado con FITC (Abchem, Reino Unido) durante 60 minutos. Después de terminarse la reacción, las células se lavaron y se analizaron con un citómetro de flujo (FACS; modelo EPICS9, Coulter Corp., Estados Unidos).

10 Como resultado, como se muestra en la Figura 14, IMC-1C11 y 6A6 reconocieron el KDR de células HUVEC al mismo nivel.

15 Además, para examinar la capacidad inhibidora competitiva contra VEGF, se cultivaron células HUVEC en condiciones sin suero durante una noche para inducir la expresión de KDR, y después las células se recogieron y se lavaron tres veces con PBS. Las células lavadas se dejaron reaccionar con 20 ng/ml de VEGF a temperatura ambiente durante 30 minutos. Después de terminarse la reacción, las células se dejaron reaccionar con IgG 6A6 e IgG IMC-1C11 a 4 °C durante 1 hora, y después se dejaron reaccionar con un anticuerpo de conejo anti-IgG humana marcado con FITC a 4 °C durante 30 minutos.

20 Como resultado, como se muestra en la Figura 15, se observó que los dos anticuerpos mostraban una señal de unión a VEGF165, lo que indica que IgG 6A6 se unía de forma competitiva a VEGF. Además, en los ensayos de competición de VEGF, IgG 6A6 e IgG IMC-1C11 mostraron el mismo nivel de capacidad neutralizante de KDR, pero la capacidad neutralizante de KDR en células vivas reales fue aproximadamente dos veces mayor para IgG 6A6 que para IgG IMC-1C11.

Ejemplo 12: Análisis de la capacidad neutralizante de KDR de IgG anti-KDR en células K562

30 Para examinar la afinidad de unión por KDR de los anticuerpos en líneas celulares que expresan KDR distintas de células HUVEC, se analizó la expresión de KDR en la línea celular de leucemia K562 (ATCC CCL-243). La Figura 16 muestra los resultados de un análisis de transferencia de Western para la expresión de KDR en células K562 (ATCC CCL-243). Como se muestra en la Figura 16, las células K562 y HUVEC expresaban KDR independientemente de la presencia o ausencia del suero. Por lo tanto, las células K562 (ATCC CCL-243) se trataron de la misma manera que las células HUVEC del Ejemplo 11 y se analizaron por FACS para examinar si la IgG KDR podía unirse a las células K562.

35 Como resultado, como se muestra en la Figura 17, solamente IgG 6A6 se unía a las células K562 a un nivel significativo, a diferencia de lo que ocurría con las células HUVEC. Los resultados de los ensayos de FACS mediante competición de VEGF se muestran en la Figura 18. Como se muestra en la Figura 18, las células K562 no mostraron un gran cambio en la tasa de células positivas, a diferencia de lo que ocurría con las células HUVEC. Aunque la razón no está clara, se cree que esto se debe a que el anticuerpo 6A6 se une fuertemente al KDR expresado en la superficie de las células K562 o regula el crecimiento de las células usando el mecanismo de bucle autocrino de VEGF/KDR(VEGFR-2) y, por lo tanto, si VEGF se trata de forma externa, se induce la expresión de KDR en las células K562, de modo que se expresa una mayor cantidad de la proteína KDR en la superficie celular, y aumenta la señal de IgG 6A6 en comparación con antes de que el VEGF se trate de forma externa. Además, como se muestra en la Figura 19, se vio que IgG 6A6 podía unirse al KDR de células K562 resistentes a gleevec (The Catholic University of Korea).

Ejemplo 13: Análisis de la inhibición de la proliferación de células HUVEC por el anticuerpo 6A6

50 La inhibición de la proliferación de células HUVEC por IgG anti-KDR se analizó usando el reactivo WST-1 (Roche, Suiza). Se distribuyeron células HUVEC en cada pocillo de una placa de cultivo de 24 pocillos recubierta con gelatina a una concentración de 2×10^4 células/pocillo y se cultivaron durante 18 horas. Después, las células se cultivaron adicionalmente en medio M199 sin suero (Sigma-aldrich, Estados Unidos) durante 4 horas, y después se añadieron 20 ng/ml de VEGF y diversas concentraciones de 6A6. Después, se añadió el reactivo WST-1 de acuerdo con el manual del fabricante y, después de 1 hora y 4 horas, se midieron las células con respecto a la absorbancia a 450 nm y 690 nm (Figura 20).

60 Como resultado, cuando las células HUVEC se trataron con VEGF, su proliferación aumentó aproximadamente tres veces, pero cuando se añadió el anticuerpo 6A6 a las células HUVEC, la proliferación de las células se redujo de una manera dependiente de la concentración.

Ejemplo 14: Análisis del efecto del anticuerpo 6A6 sobre la inhibición de la fosforilación de KDR y ERK

65 Se cultivaron células HUVEC que habían crecido lo suficiente en medio M199 que contenía FBS al 1% durante 6 horas, y después se trataron con VEGF y anticuerpos 6A6, IMC-1121 y 6C1 a diversas concentraciones durante 10

minutos. Después, las células se lisaron con 1 ml de tampón de lisis (Tris-HCl 20 mM, pH 8,0, EDTA 2 mM, NaCl 137 mM, Na₃VO₄ 1 mM, PMSF 1 mM, glicerol al 10%, Triton X-100 al 1%) y se centrifugaron, y el sobrenadante se trató con 1 µg/ml de un anticuerpo anti-KDR/Fik-1 (Santa cruz Biotechnology, Estados Unidos) a 4 °C durante 3 horas. El sobrenadante tratado se incubó en perlas de agarosa de proteína A (Sigma-aldrich, Estados Unidos) durante 1 hora, y la proteína inmunoprecipitada se sometió a electroforesis en SDS-PAGE y después se analizó por transferencia de Western (Figura 21A).

Como resultado, se observó que cuando las células se trataban con VEGF, la fosforilación de KDR aumentaba como se esperaba, pero cuando las células se trataban con 6A6 o IMC-1121, se inhibía la fosforilación de KDR por VEGF. Además, el anticuerpo 6C1 no tuvo ningún efecto sobre la neutralización de VEGF.

De acuerdo con el método anteriormente descrito, se llevó a cabo un ensayo para examinar si se inhibiría la fosforilación de la quinasa ERK que se sabe que recibe la señal de KDR. Como resultado, se confirmó que 6A6 e IMC-1121 inhibían la fosforilación de ERK, pero 6C1 no inhibía sustancialmente la fosforilación de ERK como era de esperar (Figura 21B).

Ejemplo 15: Análisis del efecto inhibitor de IgG 6A6 anti-KDR sobre la quimiotaxia de células endoteliales inducida por VEGF

Para examinar el efecto inhibitor de IgG 6A6 sobre la migración de células HUVEC inducida por VEGF, se usó un transwell (Corning costar, Estados Unidos) que tenía un filtro de policarbonato de 6,5 mm de diámetro (tamaño de poros 8 µM). La superficie de la capa inferior del filtro se recubrió con 10 µg de gelatina, y se puso medio M199 nuevo (que contenía FBS al 1%) y VEGF en el pocillo de la capa inferior del filtro. Las células HUVEC se diluyeron en medio M199 (que contenía FBS al 1%) a una concentración de 1×10^6 /ml, se añadieron diversas concentraciones de los anticuerpos anti-KDR y se dejaron reaccionar a temperatura ambiente durante 30 minutos. Se pusieron 100 µl de la solución de reacción en el pocillo de la capa superior y se dejó reaccionar a 37 °C durante 4 horas. Después, las células se tiñeron con hematoxilina y eosina. Las células que no habían migrado se retiraron con un algodón y las células que migraron al pocillo de la capa inferior se observaron con un microscopio para determinar el número de estas células. Como resultado, se observó que la migración de células HUVEC inducida por VEGF se inhibía por 6A6 de una manera dependiente de la concentración (Figura 22).

Ejemplo 16: Análisis del efecto inhibitor de IgG 6A6 anti-KDR sobre la formación de tubos de células endoteliales inducida por VEGF

Para examinar si el anticuerpo 6A6 inhibe la formación de tubos de HUVEC inducida por VEGF, se pusieron 250 µl de matrigel reducido con factor del crecimiento (Collaborative biomedical products, Estados Unidos) en cada pocillo de una placa de cultivo tisular de 16 mm de diámetro y se polimerizó a 37 °C durante 30 minutos. Las células HUVEC se suspendieron en medio M199 (que contenía FBS al 1%), se mezclaron diversas cantidades del anticuerpo y se dejó que reaccionaran con las células. Después de 30 minutos, las células se sembraron en el matrigel a una concentración de 2×10^5 células/pocillo, se añadieron 10 ng/ml de VEGF, y las células se cultivaron durante 20 horas. Las células cultivadas se observaron con un microscopio y se capturaron imágenes con un Image-Pro plus (Media cybernetics, Estados Unidos). Como resultado, se observó que la formación de tubos de HUVEC inducida por VEGF se inhibía por IgG 6A6 (Figura 23).

Ejemplo 17: Inhibición de la internalización de VEGF-KDR mediante la unión de anticuerpo 6A6 a KDR en la superficie celular

Se pusieron células HUVEC en un cubreobjetos recubierto con gelatina a una concentración de 2×10^4 células/pocillo, después de 24 horas las células se lavaron dos veces con medio M199 y se cultivaron en medio M199 (que contenía FBS al 1%) durante 6 horas. Las células HUVEC se dejaron reaccionar con diversas concentraciones del anticuerpo durante 30 minutos y se dejaron reaccionar con 10 ng/ml de VEGF durante 10 minutos. Después de terminarse la reacción, las células se inmovilizaron y se filtraron con metanol o formaldehído al 2% durante 10 minutos y se lavaron con PBS. Después, las células se bloquearon con Triton X-100 al 0,1% y BSA/PBS al 2% durante 30 minutos, y las células se dejaron reaccionar con un anticuerpo de KDR de ratón durante 1 hora, y posteriormente se dejaron reaccionar con un anticuerpo anti-ratón marcado con FITC a temperatura ambiente durante 45 minutos. El cubreobjetos se montó con SloFade (Molecular Probe) y se observó con un microscopio confocal (Zeiss, Alemania) a 488 nm (longitud de onda de excitación).

Como resultado, como se muestra en la Figura 24, se observó que el anticuerpo 6A6 inhibía la infiltración de KDR en las células, y 6G1 no inhibía sustancialmente la infiltración de KDR en las células.

Ejemplo 18: Análisis ex vivo del efecto inhibitor de IgG anti-KDR en la angiogénesis

Para examinar si IgG 6A6 inhibe el crecimiento de vasos del anillo aórtico inducido por VEGF, se realizó un ensayo de anillo aórtico. En primer lugar, se retiraron arterias de ratas de 6 semanas de edad (Sprague Dawley) y después

se cortaron a un tamaño de aproximadamente 0,5 mm. La arteria cortada se puso en 120 μ l de una placa de 48 pocillos recubierta con matrigel y se cubrió con 50 μ l de matrigel. Se mezclaron VEGF (10 ng/ml) y cada una de las IgG 6A6, 6C1 y 1121 con medio sin suero endotelial humano (Invitrogen) a un volumen final de 200 μ l, y la mezcla se puso en cada pocillo de la placa. Después de 6 días, las células se inmovilizaron y se tiñeron con Diff-Quick (Baxter Diagnostics). Los datos se valoraron en una escala de 0 (menos positivo) a 5 (más positivo), y se realizaron seis ensayos independientes. La Figura 25A muestra una imagen del crecimiento de los vasos, y la Figura 25B muestra los resultados estadísticos de las puntuaciones para el crecimiento de los vasos. El anticuerpo 6A6 inhibía el crecimiento de los vasos inducido por VEGF, pero el anticuerpo 6C1 no mostró la capacidad inhibitoria. Los resultados del ensayo de anillo aórtico de rata *ex vivo* anteriormente descritos tienen un significado muy importante además del simple hecho de que 6A6 inhibe la angiogénesis inducida por VEGF. Es decir, los resultados revelaron que 6A6 podía unirse a Flk-1 para neutralizar el Flk-1 homólogo de KDR humano expresado en ratas, aunque se preparó con el fin de neutralizar el KDR humano. En otras palabras, puede verse que el anticuerpo 6A6 tiene reactividad cruzada entre seres humanos y ratas.

15 Ejemplo 19: Efecto de 6A6 sobre la inhibición de la angiogénesis *in vivo* inducida por VEGF (ensayo de tapón de matrigel en ratón *in vivo*)

Después del ensayo del anillo aórtico de rata, se realizó un ensayo de tapón de matrigel en ratón para examinar si el anticuerpo neutralizado de KDR humano 6A6 puede inhibir la angiogénesis inducida por VEGF *in vivo* en ratones. Para este fin, en ratones C57/BL6 de 6-8 semanas de edad se inyectaron por vía subcutánea 0,6 ml de matrigel que contenía 200 μ g del anticuerpo, 100 ng de VEGF y 10 unidades de heparina. Después de 7 días, el tapón de matrigel se extrajo por cirugía y se hizo una fotografía del mismo (Figura 26A). Después, el tapón se congeló rápidamente con nitrógeno líquido en presencia de un compuesto de OCT (temperatura de corte óptima) y se cortó a un grosor de 8-12 μ m. El tapón cortado se fijó con paraformaldehído tamponado neutro al 4% y se midió la densidad de los microvasos con un anticuerpo anti-CD31 (Figura 26B). Se observó que el anticuerpo 6A6 podía inhibir la formación de vasos sanguíneos inducida por VEGF *in vivo* en ratones. Al igual que en el experimento *ex vivo* en ratas, se confirmó de nuevo que el anticuerpo 6A6 podía neutralizar el homólogo de KDR de ratón Flk-1 y que había reactividad cruzada entre seres humanos y ratones. Entre los anticuerpos terapéuticos, aún no se ha presentado un anticuerpo de KDR que tenga reactividad cruzada entre seres humanos y ratones. Cuando se usa la reactividad cruzada entre especies del anticuerpo 6A6, puede confirmarse el efecto *in vivo* del anticuerpo usando ratones o ratas.

Ejemplo 20: Efecto antineoplásico del anticuerpo 6A6 en el modelo animal de xenoinjerto de cáncer de colon

35 El efecto antineoplásico del anticuerpo 6A6 en modelos animales de xenoinjerto de cáncer de colon se analizó usando ratones con anulación de IL-2R NOD/SCID con bajo número de linfocitos T, linfocitos B y linfocitos NK (hembras, 11 semanas de edad, de 25 g de peso, The Jackson Laboratories, Estados Unidos) que se sabe que tienen la ventaja de que las células reciben más fácilmente células cancerosas humanas, en comparación con los ratones NOD/SCID.

40 Como células cancerosas humanas se usaron células de cáncer de colon humano conocidas como HCT116 (ATCC, Estados Unidos), y la inyección de las células tumorales se realizó inyectando las células por vía subcutánea en el costado izquierdo de los ratones a una concentración de 2×10^5 células (DMEM sin suero)/10 μ l el día 0.

45 El anticuerpo 6A6 se inyectó por vía intravenosa en los ratones desde el día 1 (24 horas desde el día 0 en el que se inyectaron las células tumorales) tres veces por semana. Los ratones se dividieron en tres grupos, que consistían cada uno en 5 animales. El grupo 1 fue un grupo al que se inyectó PBS (grupo de control), al grupo 2 se le inyectaron 100 μ g/ea (= 4 mg/kg) del anticuerpo 6A6, y al grupo 3 se le inyectaron 200 μ g/ea (= 8 mg/kg) del anticuerpo 6A6. El tamaño de un tumor que apareció en los ratones se midió de acuerdo con la siguiente ecuación en días alternos durante 26 días:

$$\text{Volumen tumoral} = 1/2 \times (\text{longitud} \times \text{área} \times \text{altura}).$$

55 El día 30 se sacrificó a los ratones y se midió el peso del tumor. Como resultado, se observó que el tamaño tumoral se reducía de forma dependiente de la dosis en los grupos a los que se administró el anticuerpo 6A6, en comparación con el grupo de control al que se inyectó PBS (Figura 27 y Figura 28).

Ejemplo 21: Efecto antineoplásico del anticuerpo 6A6 en modelos animales de xenoinjerto de cáncer de pulmón

60 Se inyectaron células A549 de cáncer de pulmón humano (ATCC, Estados Unidos) por vía subcutánea en ratones desnudos (Japan SLC, Japón) a una concentración de 7×10^7 células para formar tumores. Diez días después de la inyección de las células cancerosas, pudieron observarse visualmente los tumores, y posteriormente se inyectó el anticuerpo 6A6 por vía intraperitoneal a los ratones tres veces por semana.

65 Los ratones se dividieron en tres grupos, que consistían cada uno en cinco animales. El grupo 1 era un grupo al que

se inyectó PBS (grupo de control), al grupo 2 se le inyectó 1 mg/kg del anticuerpo 6A6, y al grupo 3 se le inyectó 1 mg/kg de Avastin (Genentech, Estados Unidos). Como resultado, como puede verse en la Figura 29, el crecimiento del tumor se inhibió en el grupo al que se inyectó el anticuerpo 6A6 y en el grupo de control positivo al que se inyectó Avastin, en comparación con el grupo de control al que se inyectó PBS.

5

Ejemplo 22: Dirección tumoral *in vivo* del anticuerpo 6A6 marcado con yodo radiactivo

La dirección tumoral del anticuerpo 6A6 se analizó usando la afinidad de unión del anticuerpo por células K562 con CML (leucemia mielógena crónica). El anticuerpo se marcó con yodo 125 radiactivo usando un método de perlas de yodo para marcar más del 90% del anticuerpo con yodo (Figura 30A) y se preparó un anticuerpo anti-KDR (6A6) marcado con yodo radiactivo que tenía una pureza de más del 98% (Figura 30B). Se preparó un modelo tumoral de CML inyectando células K562 por vía subcutánea en ratones desnudos Balb/c, y cuando el tamaño tumoral alcanzó 1 cm de 21 a 28 días después de la inyección de las células K562, se inyectó el anticuerpo marcado con yodo 125 (100 µg) en la vena de la cola de los ratones desnudos de modelo tumoral de K562. Dos horas y 24 horas después de la inyección del anticuerpo, se obtuvieron imágenes por cámara gamma de los animales en los que se habían formado tumores. Se observó que la introducción del anticuerpo en los tumores mostraba patrones similares a las 2 horas y las 24 horas, y la radiactividad de fondo se redujo después de 24 horas. Se observó que el anticuerpo estaba localizado en el tumor, lo que sugería que KDR se expresaba en el tumor K562. Por lo tanto, debido al efecto terapéutico del propio anticuerpo por localización, así como debido al aumento del efecto terapéutico provocado por los rayos beta emitidos desde el isótopo radiactivo, es posible que el anticuerpo pueda usarse como un agente de radioinmunoterapia (Figura 31).

10

15

20

Ejemplo 23: Maduración de afinidad de IgG 6A6 usando redistribución de cadena ligera

Para identificar anticuerpos que tienen una afinidad mayor que la de 6A6, se retiró una cadena pesada del ADN de la biblioteca de anticuerpos humanos completa preparada en el Ejemplo 2, usando la enzima de restricción *Sfi*. En el sitio del que se había retirado la cadena pesada, se insertó una cadena pesada de pAK-6A6 tratada con enzima de restricción *Sfi*. El ADN resultante se usó para transformar células ETB (Electro Ten blue) (Stratagene, Estados Unidos), y las células se cultivaron en medio SOB durante 1 hora. Después, las células se extendieron en una placa cuadrada de 2 x YT (Cm), y al día siguiente se recogió la colonia y se almacenó a -70 °C. Como resultado, se construyó una biblioteca de redistribución de cadena ligera de 6A6 que tenía una diversidad de 4×10^6 (Figura 32).

25

30

Para examinar si la redistribución de cadena ligera de la biblioteca se había conseguido con éxito, se seleccionaron aleatoriamente 48 clones y se analizaron las secuencias de cadena ligera de dichos clones. Como resultado, no hubo solapamiento en las secuencias de cadena ligera de los 48 clones.

35

A partir de la biblioteca, se exploraron clones que tenían una afinidad de unión mayor que la de 6A6 de la misma manera que en el Ejemplo 3 mediante un proceso de bioselección usando una presentación en fagos.

40

Se obtuvieron finalmente 18 candidatos mediante los siguientes procedimientos.

(1) Para evitar que 6A6 se seleccionara de nuevo durante el proceso de bioselección, se trató el ADN de la biblioteca de redistribución de cadena ligera de 6A6 con una enzima de restricción *SpeI* que tenía un sitio de reconocimiento en la CDR3 de 6A6. Después, el ADN se usó para transformar células ETB, se construyó una sub-biblioteca basándose en las células cultivadas y se analizó la afinidad por KDR de las sub-biblioteca en ELISA. Entre los candidatos resultantes de la cuarta selección, se seleccionaron 94 candidatos y se sometieron a ensayos de unión a KDR de la misma manera que en el Ejemplo 5. Entre los candidatos que mostraban respuestas positivas, se seleccionaron aleatoriamente 4 candidatos y se determinaron sus secuencias de ADN. Además, los candidatos se sometieron a ensayos de competición de VEGF usando los fagos respectivos (Figura 33). Como resultado, se seleccionaron 4SD5, 4SC3 y 4SC5, que tenían una capacidad neutralizante de KDR similar o igual a la del grupo de control positivo 6A6.

45

50

(2) En una etapa de lavado en el proceso de bioselección, se seleccionaron KE3, KE6, 2KG8, 3KE11, 3KF11, 3KG3 y K3F1 mediante competición con KDR soluble. El procedimiento de bioselección usado en este caso fue el siguiente.

55

Se recubrieron tubos Maxisorp Star (Nunc, Dinamarca) con 4 ml de KDR (5 µg/ml) y se bloquearon con leche desnatada al 2%/PBS a 37 °C durante 2 horas. Después, se dejó que se unieran 500 µl del fago de la biblioteca de redistribución de cadena ligera de 6A6 suspendido en leche desnatada al 2% con el KDR, y después se dejó reaccionar en PBS-T al 0,1% (tween20) durante 1 hora. Posteriormente, los tubos se lavaron 10 veces con PBST al 0,1% y se lavaron 10 veces con tampón de PBS. Después, se añadieron 4 ml de KDR soluble (25 µg/ml/PBS) y se permitió la unión durante 30 minutos, y los tubos se trataron con trietilamina 100 mM durante 10 minutos para eluir el fago. El fago eluido se neutralizó con 500 µl de Tris-Cl 1 M (pH 7,5) y se usó para transformar células *E. coli* XL1-Blue durante 50 minutos, y después se cultivaron las células.

60

65

Los anticuerpos seleccionados en cada una de las tres etapas de selección se sometieron a ensayos de competición

de VEGF en un estado de partícula de fago-ScFv. Entre los cuatro anticuerpos candidatos obtenidos mediante la primera selección, se seleccionaron KE3 y KE6, que tenían alta capacidad competitiva con VEGF en comparación con los otros anticuerpos candidatos, y se excluyeron KC7 y KQ11 (Figura 34A). Entre los tres anticuerpos candidatos obtenidos mediante la segunda selección, se excluyó 2KE5 que tenía baja capacidad competitiva con VEGF, y se seleccionaron los anticuerpos 2KG4 y 2KG8 restantes, que tenían una capacidad competitiva con VEGF similar a la de 6A6. El 2KG4 mostró la misma secuencia que 3KG3, un anticuerpo seleccionado posteriormente, y por lo tanto se sustituyó por 3KG3 (Figura 34B).

Entre los cinco anticuerpos candidatos obtenidos mediante la tercera selección, se excluyeron 3KG2 y 3KF7, que tenían baja capacidad competitiva, y solamente se seleccionaron 3KE11, 3KF11 y 3KG3 (Figura 34C). De forma similar, se seleccionó K3F1 obtenido mediante la tercera selección, y K3F1 mostró una capacidad competitiva con VEGF significativamente mayor que la de 6A6 (Figura 34D).

(3) En una etapa para permitir que el fago se uniera al antígeno KDR en el procedimiento de bioselección, también se añadió IgG IMC-1121 obtenido en el Ejemplo 8 y, como resultado, se seleccionaron clones de IE4, 3IG11, 3IG12, 3IE1, 3IH2, I2F2, I3A12 e I3F2. El procedimiento de bioselección usado en este caso fue el siguiente.

Se recubrieron tubos Maxisorp Star (Nunc, Dinamarca) con 4 ml de KDR (5 µg/ml) y se bloquearon con leche desnatada al 2%/PBS a 37 °C durante 2 horas. Después, se permitió la unión de 500 µl del fago de la biblioteca de redistribución de cadena ligera de 6A6 suspendido en leche desnatada al 2% que contenía 21 µg/ml de IgG IMC-1121 (0,14 µM) durante 1 hora, y después se dejó reaccionar en PBST al 0,1% durante 1 hora. Posteriormente, los tubos se lavaron 10 veces con PBST 0,1% y se lavaron 10 veces con tampón de PBS. Después, se añadieron 4 ml de KDR soluble (25 µg/ml/PBS) a los tubos y se permitió la unión durante 30 minutos, y después se trataron con trietilamina 100 mM durante 10 minutos para eluir el fago. El fago eluido se neutralizó con 500 µl de Tris-Cl 1 M (pH 7,5) y después se usó para transformar células *E. coli* XL1-Blue durante 50 minutos, y se cultivaron las células.

Los anticuerpos seleccionados en cada una de las tres etapas de selección se sometieron a ensayos de competición con VEGF en un estado de partícula de fago-ScFv. Entre los tres anticuerpos candidatos obtenidos mediante la primera selección, solamente se seleccionó IE4, que tenía una capacidad competitiva con VEGF similar a la de 6A6 (Figura 35A). Se analizó la secuencia de ADN de IE4 y, como resultado, se observó que 28 aminoácidos de IE4 eran diferentes de los de 6A6. Además, 6A6 tenía 108 aminoácidos de cadena ligera, mientras que IE4 tenía 107 aminoácidos, lo que indica que en la CDR3 de 6A6 se había suprimido un aminoácido. La Figura 35B muestra los resultados de los ensayos de competición con VEGF de los tres anticuerpos candidatos obtenidos mediante la tercera selección. En la secuenciación de ADN, 3IG8 tenía una secuencia de cadena ligera completamente diferente de la de 6A6, y en los resultados de FACS, 3IG8 no se unía a las células vivas, lo que indica que no se convertía en la forma de IgG. Se seleccionaron 3IG11, 3IG12, 3IE1 y 3IH2 y se excluyó 3IA7 debido a que tenía un codón de terminación en la secuencia de cadena ligera. La Figura 35C muestra los resultados del ensayo de competición de VEGF de anticuerpos candidatos obtenidos mediante la segunda selección y la tercera selección. Se seleccionaron 3IA12, I3F2 e I2F2.

Las secuencias de ADN de cadena ligera de los 18 clones seleccionados se muestran en las SEQ ID NOs: 164 a SEQ ID NO: 181, y las secuencias de aminoácidos deducidas a partir de las secuencias de ADN se muestran en las SEQ ID NO: 2 a SEQ ID NO: 19. En la Tabla 7 se muestran regiones sustituidas en comparación con el aminoácido de cadena ligera de 6A6 (TTAC-0001). Además, los clones se renombraron "TTAC-0002 a TTAC-0019" (Tabla 8).

Tabla 7: Sitio de mutación de 18 clones seleccionados

Nombre del clon	Sito de la mutación
KE3 (TTAC-0002)	S13A R23G, L27I, D29S, V30Q, N31S
KE6 (TTAC-0003)	S13A, R19G, R23G, N26D, L27I, D29S, V30K, N31S, R38K, M47I, A51S
IE4 (ITAC-0004)	N1S, F2Y, M3E, V12S, S13A, R19T, R23E, D25K, L27I, D29S, V30K, N31S, R38K, V46L, M47I, A51Q, G56A, G67D, T69M, G76R, E78A, D91G, R92N, T93G, S94K, E95V, T99G, V103L
SD5 (TTAC-0005)	S13A, T100A
2KG8 (TTAC-0006)	S13A
3KE11 (TTAC-0007)	T71I
3KF11 (TTAC-0008)	P8S
3KG3 (TTAC-0009)	P8H

Nombre del clon	Sito de la mutación
3IG11 (TTAC-0010)	V46I
3IG12 (TTAC-0011)	R23M
3IE1 (TTAC-0012)	P8S, S13P, P39R, Y96F
3IH2 (TTAC-0013)	V12L, K16Q
K3F1 (TTAC-0014)	S13A, K16Q
I2F2 (TTAC-0015)	S9A
I3A12 (TTAC-0016)	E59K
I3F2 (TTAC-0017)	M47I
4SC3 (TTAC-0018)	S94N
4SC5 (TTAC-0019)	N1Q, M3V, S13A, R23G, D25N, L27I, D29S, V30K, N31S, R38K, M47I, A51S, S66F, G76R, R92S, T93S, S94R, E95D

Tabla 8: Nuevo nombre de los anticuerpos desarrollados

Nombre de los anticuerpos desarrollados	Nuevo nombre	Nombre de los anticuerpos desarrollados	Nuevo nombre
6A6	TTAC-0001	3IG12	TTAC-0011
KE3	TTAC-0002	3IE1	TTAC-0012
KE6	TTAC-0003	3IH2	TTAC-0013
IE4	TTAC-0004	K3F1	TTAC-0014
SD5	TTAC-0005	I2F2	TTAC-0015
2KG8	TTAC-0006	I3A12	TTAC-0016
3KE11	TTAC-0007	I3F2	TTAC-0017
3KF11	TTAC-0008	4SC3	TTAC-0018
3KG3	TTAC-0009	4SC5	TTAC-0019
3IG11	TTAC-0010		

Aplicabilidad industrial

5

Como se ha descrito con detalle anteriormente, la presente invención proporciona un anticuerpo completamente humano que tiene una excelente capacidad para neutralizar el receptor de VEGF en las células e *in vivo*, y una composición para inhibir la angiogénesis y una composición para el tratamiento del cáncer, que contienen dicho anticuerpo. El anticuerpo 6A6 de la invención que neutraliza el receptor del factor de crecimiento endotelial vascular muestra una excelente capacidad de neutralización en células vivas, en comparación con la de un anticuerpo disponible en el mercado contra el receptor del factor de crecimiento endotelial vascular, y muestra la capacidad de neutralizar el receptor del factor de crecimiento endotelial vascular no solamente en seres humanos, sino también en ratones y ratas. Por lo tanto, el anticuerpo 6A6 será útil en estudios antineoplásicos y será altamente eficaz en el tratamiento del cáncer.

10

15

<110> Korea Research Institute of Bioscience and Biotechnology

<120> Anticuerpo Monoclonal Humano Neutralizante del Receptor del Factor de Crecimiento Endotelial Vascular y Uso del Mismo

20

<130> PP-B0353

<150> KR10-2007-0057719

<151> 13-06-2007

25

<160> 181

ES 2 450 933 T3

<170> KopatentIn 1.71

<210> 1

<211> 108

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

10 <223> 6A6

<400> 1

```

Asn Phe Met Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Val Ser Pro Gly Lys
 1           5           10           15

Thr Ala Arg Ile Thr Cys Arg Gly Asp Asn Leu Gly Asp Val Asn Val
          20           25           30

His Trp Tyr Gln Gln Arg Pro Gly Gln Ala Pro Val Leu Val Met Tyr
          35           40           45

Tyr Asp Ala Asp Arg Pro Ser Gly Ile Pro Glu Arg Phe Ser Gly Ser
 50           55           60

Asn Ser Gly Asn Thr Ala Thr Leu Thr Ile Ser Gly Val Glu Ala Gly
 65           70           75           80

Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Val Trp Asp Arg Thr Ser Glu Tyr
          85           90           95

Val Phe Gly Thr Gly Thr Lys Val Thr Val Leu Gly
          100           105
    
```

15 <210> 2

<211> 108

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

20 <220>

<223> KE3

<400> 2

ES 2 450 933 T3

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

5 <210> 3
 <211> 108
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> KE6
 <400> 3

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

15 <210> 4
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <223> IE4
 <400> 4

ES 2 450 933 T3

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

5 <210> 5
 <211> 108
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> SD5
 <400> 5

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

15 <210> 6
 <211> 108
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <223> 2KG8
 <400> 6

ES 2 450 933 T3

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

5 <210> 7
 <211> 108
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> 3KE11
 <400> 7

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

15 <210> 8
 <211> 108
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <223> 3KF11
 <400> 8

ES 2 450 933 T3

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

5 <210> 9
 <211> 108
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> 3KG3
 <400> 9

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

15 <210> 10
 <211> 108
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <223> 3IG11
 <400> 10

ES 2 450 933 T3

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

5 <210> 11
 <211> 108
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> 3IG12
 <400> 11

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

15 <210> 12
 <211> 108
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <223> 3IE1
 <400> 12

ES 2 450 933 T3

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

5 <210> 13
 <211> 106
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> 3IH2
 <400> 13

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

15 <210> 14
 <211> 108
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <223> K3F1

ES 2 450 933 T3

<400> 14

```

Asn Phe Met Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Val Ala Pro Gly Gln
 1           5           10           15

Thr Ala Arg Ile Thr Cys Arg Gly Asp Asn Leu Gly Asp Val Asn Val
          20           25           30

His Trp Tyr Gln Gln Arg Pro Gly Gln Ala Pro Val Leu Val Met Tyr
          35           40           45

Tyr Asp Ala Asp Arg Pro Ser Gly Ile Pro Glu Arg Phe Ser Gly Ser
          50           55           60

Asn Ser Gly Asn Thr Ala Thr Leu Thr Ile Ser Gly Val Glu Ala Gly
 65           70           75           80

Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Val Trp Asp Arg Thr Ser Glu Tyr
          85           90           95

Val Phe Gly Thr Gly Thr Lys Val Thr Val Leu Gly
          100           105

```

5 <210> 15
 <211> 108
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> I2F2
 <400> 15

```

Asn Phe Met Leu Thr Gln Pro Pro Ala Val Ser Val Ser Pro Gly Lys
 1           5           10           15

Thr Ala Arg Ile Thr Cys Arg Gly Asp Asn Leu Gly Asp Val Asn Val
          20           25           30

His Trp Tyr Gln Gln Arg Pro Gly Gln Ala Pro Val Leu Val Met Tyr
          35           40           45

Tyr Asp Ala Asp Arg Pro Ser Gly Ile Pro Glu Arg Phe Ser Gly Ser
          50           55           60

Asn Ser Gly Asn Thr Ala Thr Leu Thr Ile Ser Gly Val Glu Ala Gly
 65           70           75           80

Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Val Trp Asp Arg Thr Ser Glu Tyr
          85           90           95

Val Phe Gly Thr Gly Thr Lys Val Thr Val Leu Gly
          100           105

```

15 <210> 16
 <211> 108
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>

ES 2 450 933 T3

<223> I3A12

<400> 16

```

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

```

<210> 17

<211> 108

<212> PRT

10 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> I3F2

15 <400> 17

```

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

```

<210> 18

<211> 108

<212> PRT

20 <213> Secuencia artificial

ES 2 450 933 T3

<220>
<223> 4SC3

5 <400> 18

```

Asn Phe Met Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Val Ser Pro Gly Lys
 1           5           10           15

Thr Ala Arg Ile Thr Cys Arg Gly Asp Asn Leu Gly Asp Val Asn Val
          20           25           30

His Trp Tyr Gln Gln Arg Pro Gly Gln Ala Pro Val Leu Val Met Tyr
          35           40           45

Tyr Asp Ala Asp Arg Pro Ser Gly Ile Pro Glu Arg Phe Ser Gly Ser
          50           55           60

Asn Ser Gly Asn Thr Ala Thr Leu Thr Ile Ser Gly Val Glu Ala Gly
 65           70           75           80

Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Val Trp Asp Arg Thr Asn Glu Tyr
          85           90           95

Val Phe Gly Thr Gly Thr Lys Val Thr Val Leu Gly
          100           105
    
```

10 <210> 19
<211> 108
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

15 <220>
<223> 4SC5
<400> 19

```

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

Thr Ala Arg Ile Thr Cys Gly Gly Asn Asn Ile Gly Ser Lys Ser Val
          20           25           30

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

Tyr Asp Ser Asp Arg Pro Ser Gly Ile Pro Glu Arg Phe Ser Gly Ser
          50           55           60

Asn Phe Gly Asn Thr Ala Thr Leu Thr Ile Ser Arg Val Glu Ala Gly
 65           70           75           80

Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Val Trp Asp Ser Ser Arg Asp Tyr
          85           90           95

Val Phe Gly Thr Gly Thr Lys Val Thr Val Leu Gly
          100           105
    
```

20 <210> 20
<211> 121
<212> PRT

ES 2 450 933 T3

<213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> 6A6 VH
 5 <400> 20
 Gln Met Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
 1 5 10 15
 Ser Val Lys Leu Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Ser Ser Tyr
 20 25 30
 Trp Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Arg Leu Glu Trp Met
 35 40 45
 Gly Glu Ile Asn Pro Gly Asn Gly His Thr Asn Tyr Asn Glu Lys Phe
 50 55 60
 Lys Ser Arg Val Thr Ile Thr Val Asp Lys Ser Ala Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Lys Ile Trp Gly Pro Ser Leu Thr Ser Pro Phe Asp Tyr Trp Gly
 100 105 110
 Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120
 10 <210> 21
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 15 <220>
 <223> cebador
 <400> 21
 cgcgatcca tggagagcaa 20
 20 <210> 22
 <211> 27
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 25 <220>
 <223> cebador
 <400> 22
 30 ccgctagcct tttcatggac cctgaca 27
 <210> 23
 <211> 44
 <212> ADN
 35 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> cebador
 40 <400> 23
 ccgctagcag cggcctggtg ccgcgcgca gcgacaaac tcac 44

ES 2 450 933 T3

<210> 24
 <211> 53
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 5
 <220>
 <223> cebador
 <400> 24
 10 ggctcgagtc acaggtcttc ctgagagatc agcttctgct ctaccgga gac 53
 <210> 25
 <211> 20
 <212> ADN
 15 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> cebador
 20 <400> 25
 cgcggatcca tggagagcaa 20
 <210> 26
 <211> 28
 25 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> cebador
 30 <400> 26
 ctagctagcc ctataccta caacgaca 28
 <210> 27
 <211> 40
 <212> ADN
 35 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> cebador
 40 <400> 27
 gaccgggcc gcctctgtgg gttatgtca agattacaga 40
 45 <210> 28
 <211> 28
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 50 <220>
 <223> cebador
 <400> 28
 55 ctagctagct tttcatgga ccctgaca 28
 <210> 29
 <211> 20
 <212> ADN
 60 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> cebador
 65 <400> 29
 gargtcagc tggaggagtc 20

ES 2 450 933 T3

5	<210> 30 <211> 20 <212> ADN <213> Secuencia artificial <220> <223> cebador	
10	<400> 30 cagstgcagc tgcaggagtc	20
15	<210> 31 <211> 20 <212> ADN <213> Secuencia artificial <220> <223> cebador	
20	<400> 31 caggtacagc tgcagcagtc	20
25	<210> 32 <211> 25 <212> ADN <213> Secuencia artificial <220> <223> cebador	
30	<400> 32 cagrtgcagc tggcagtc tgggg	25
35	<210> 33 <211> 27 <212> ADN <213> Secuencia artificial <220> <223> cebador	
40	<400> 33 gaggtgcagc tggcagtc tggagca	27
50	<210> 34 <211> 25 <212> ADN <213> Secuencia artificial <220> <223> cebador	
55	<400> 34 caggtcagc tggcagtc tggag	25
60	<210> 35 <211> 25 <212> ADN <213> Secuencia artificial <220> <223> cebador	
65	<400> 35 caggtcagc tggcagtc tgggg	25

ES 2 450 933 T3

5	<210> 36 <211> 25 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
	<220> <223> cebador	
10	<400> 36 caggtccagc tggtagcagtc tgggg	25
	<210> 37 <211> 29 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
15	<220> <223> cebador	
20	<400> 37 caggtcacct tgaaggagtc tggctctgt	29
	<210> 38 <211> 29 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
25	<220> <223> cebador	
30	<400> 38 cagatcacct tgaaggagtc tggctctac	29
	<210> 39 <211> 29 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
35	<220> <223> cebador	
40	<400> 39 caggtcacct tgaggagtc tggctctgc	29
	<210> 40 <211> 31 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
45	<220> <223> cebador	
50	<400> 40 gaggtgcagc tggtagcagtc tgggggaggt g	31
55	<210> 41 <211> 25 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
60	<220> <223> cebador	
65	<400> 41 caggtgcagc tacagcagtg gggcg	25

ES 2 450 933 T3

5	<210> 42 <211> 24 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
	<220> <223> cebador	
10	<400> 42 aatacacggc cgtgtcctca gatc	24
	<210> 43 <211> 53 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
15	<220> <223> cebador	
20	<400> 43 aatacacggc cgtgtcctca gatctcaggc tgctcagctc catgtaggct gag	53
	<210> 44 <211> 21 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
25	<220> <223> cebador	
30	<400> 44 agctccatgt aggctgtgc t	21
	<210> 45 <211> 28 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
35	<220> <223> cebador	
40	<400> 45 agctccatgt aggctgtgct catagacc	28
	<210> 46 <211> 28 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
45	<220> <223> cebador	
50	<400> 46 agctccatgt aggctgtgct tgtggaca	28
	<210> 47 <211> 27 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
55	<220> <223> cebador	
60	<400> 47 agctccatgt aggctgtgct tatggag	27
	<210> 48 <211> 27 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
65	<220> <223> cebador	

ES 2 450 933 T3

<210> 48
 <211> 22
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 5
 <220>
 <223> cebador
 <400> 48
 10 aaggaccacc tgctttgga gg 22
 <210> 49
 <211> 38
 <212> ADN
 15 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> cebador
 20
 <400> 49
 aatacacggc cgtgtcctcg gctctcagac tgttcatt 38
 25 <210> 50
 <211> 23
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 30 <220>
 <223> cebador
 <400> 50
 35 aatacacggc ctgtccacgg cgg 23
 <210> 51
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 40 <220>
 <223> cebador
 <400> 51
 45 aatacatggc ggtgtccgag gcct 24
 <210> 52
 <211> 29
 <212> ADN
 50 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> cebador
 <400> 52
 55 gatctgagga cacggcctg tattactgt 29
 <210> 53
 <211> 23
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> cebador
 65
 <400> 53

ES 2 450 933 T3

	cctccaaaag ccagtggtc ctt	23
5	<210> 54 <211> 29 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
10	<220> <223> cebador <400> 54	
15	gagccgagga cacggccgtg tattactgt	29
20	<210> 55 <211> 29 <212> ADN <213> Secuencia artificial <220> <223> cebador	
25	<400> 55 ccgccgtgga cacggccgtg tattactgt	29
30	<210> 56 <211> 29 <212> ADN <213> Secuencia artificial <220> <223> cebador	
35	<400> 56 aggcctcgga caccgcatg tattactgt	29
40	<210> 57 <211> 17 <212> ADN <213> Secuencia artificial <220> <223> cebador	
45	<400> 57 ctgaggagac ggtgacc	17
50	<210> 58 <211> 44 <212> ADN <213> Secuencia artificial <220> <223> cebador	
55	<400> 58 gcgatgccc agccggccat ggcccagrtg cagctgtr agtc	44
60	<210> 59 <211> 44 <212> ADN <213> Secuencia artificial <220> <223> cebador	
65	<220> <223> cebador	

ES 2 450 933 T3

	<400> 59 gcgatgcccc agccggccat ggcccagrtc acctgargg agtc	44
5	<210> 60 <211> 43 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
10	<220> <223> cebador	
15	<400> 60 gcgatgcccc agccggccat ggcccaggtr cagctrcags agt	43
20	<210> 61 <211> 36 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
25	<220> <223> cebador	
30	<400> 61 ggaattcggc ccccgaggcc tgargagacr gtgacc	36
35	<210> 62 <211> 18 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
40	<220> <223> cebador	
45	<400> 62 cagyctgtgc tgactcag	18
50	<210> 63 <211> 19 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
55	<220> <223> cebador	
60	<400> 63 cagcctgtgc tgactcaat	19
65	<210> 64 <211> 18 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
	<220> <223> cebador	
	<400> 64 tcctatgagc tgacwcag	18
	<210> 65 <211> 22 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
	<220>	

ES 2 450 933 T3

<223> cebador
 <400> 65
 5 cagcyctgtgc tgactcagcc gt 22
 <210> 66
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 10 <220>
 <223> cebador
 <400> 66
 15 cagtctgtgc tgacgcagcc g 21
 <210> 67
 <211> 22
 <212> ADN
 20 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> cebador
 25 <400> 67
 cagtctgccc tgactcagcc tc 22
 <210> 68
 <211> 22
 <212> ADN
 30 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> cebador
 35 <400> 68
 cagtctgccc tgactcagcc tg 22
 <210> 69
 <211> 28
 <212> ADN
 40 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> cebador
 45 <400> 69
 cagrctgtgg tgacycagga gccctcac 28
 <210> 70
 <211> 28
 <212> ADN
 50 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> cebador
 55 <400> 70
 60 cagrctgtgg tgacycagga gccatcgt 28
 <210> 71
 <211> 23
 <212> ADN
 65 <213> Secuencia artificial

ES 2 450 933 T3

	<p><220> <223> cebador</p>	
5	<p><400> 71 tcctatgagc tgacwcagcc act</p>	23
10	<p><210> 72 <211> 21 <212> ADN <213> Secuencia artificial</p>	
15	<p><220> <223> cebador</p> <p><400> 72 aattttatgc tgactcagcc c</p>	21
20	<p><210> 73 <211> 36 <212> ADN <213> Secuencia artificial</p>	
25	<p><220> <223> cebador</p> <p><400> 73 cctcctccac ctaggacggt gaccttggtc ccagtt</p>	36
30	<p><210> 74 <211> 36 <212> ADN <213> Secuencia artificial</p>	
35	<p><220> <223> cebador</p> <p><400> 74 cctcctccac ctaggacggt cagcttggtc cctccg</p>	36
40	<p><210> 75 <211> 36 <212> ADN <213> Secuencia artificial</p>	
45	<p><220> <223> cebador</p> <p><400> 75 cctcctccac cgagggcggt cagctgggtg cctcct</p>	36
50	<p><210> 76 <211> 45 <212> ADN <213> Secuencia artificial</p>	
55	<p><220> <223> cebador</p> <p><400> 76 ggtgatcca gcggtgtggg ttccaathtt atgctgactc agccc45</p>	
60	<p><210> 77 <211> 44 <212> ADN <213> Secuencia artificial</p>	
65		

ES 2 450 933 T3

<220>
 <223> cebador

 <400> 77
 5 ggtggatcca gcggtgtggg ttcccagcyct gtgctgactc agcc 44

 <210> 78
 <211> 44
 <212> ADN
 10 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> cebador

 <400> 78
 15 ggtggatcca gcggtgtggg ttcccagcct gtgctgactc aatc 44

 <210> 79
 <211> 44
 20 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> cebador

 <400> 79
 25 ggtggatcca gcggtgtggg ttcccagtct gcctgactc agcc 44

 <210> 80
 <211> 44
 30 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> cebador

 <400> 80
 ggtggatcca gcggtgtggg ttcccagrct gtggtgacyc agga 44

 <210> 81 <211> 42 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> cebador

 <400> 81
 ggtggatcca gcggtgtggg ttctcctat gagctgacwc ag 42

 <210> 82
 <211> 36
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> cebador

 <400> 82
 60 gaattccacg aggctggctc ctccacckag grcggt 36

 <210> 83
 <211> 31
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 <220>

ES 2 450 933 T3

<223> cebador
 <400> 83
 5 gacatccaga tgaccagtc tccatcctcc c 31
 <210> 84
 <211> 30
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 10 <220>
 <223> cebador
 <400> 84
 15 gacatccaga tgaccagtc tccatcctca 30
 <210> 85
 <211> 31
 <212> ADN
 20 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> cebador
 25 <400> 85
 gacatccaga tgaccagtc tccatctcy g 31
 <210> 86
 <211> 28
 <212> ADN
 30 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> cebador
 35 <400> 86
 gacatccaga tgaccagtc tcctcca 28
 <210> 87
 <211> 31
 <212> ADN
 40 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> cebador
 45 <400> 87
 aacatccaga tgaccagtc tccatctgcc a 31
 <210> 88
 <211> 29
 <212> ADN
 50 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> cebador
 55 <400> 88
 aacatccaga tgaccagtc tccatcctt 29
 <210> 89
 <211> 25
 <212> ADN
 60 <213> Secuencia artificial
 65 <220>

ES 2 450 933 T3

<223> cebador
 <400> 89
 5 gccatccagt tgaccagtc tccat 25
 <210> 90
 <211> 30
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 10 <220>
 <223> cebador
 <400> 90
 15 gccatccgga tgaccagtc tccattctcc 30
 <210> 91
 <211> 30
 <212> ADN
 20 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> cebador
 25 <400> 91
 gtcactctgga tgaccagtc tccactctta 30
 <210> 92
 <211> 34
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 30 <220>
 <223> cebador
 <400> 92
 35 gatattgtga tgaccagac tccactctct ctgt 34
 <210> 93
 <211> 34
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 40 <220>
 <223> cebador
 <400> 93
 45 gatattgtga tgaccagac tccactctcc ctgc 34
 <210> 94
 <211> 33
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 50 <220>
 <223> cebador
 <400> 94
 55 gatattgtga tgaccagac tccactctcc tca 33
 <210> 95
 <211> 29
 <212> ADN
 60 <213> Secuencia artificial
 65

ES 2 450 933 T3

<220>
 <223> cebador

5 <400> 95
 gatrttgga tgactcagtc tccactctc 29

10 <210> 96
 <211> 25
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

15 <220>
 <223> cebador

15 <400> 96
 gaaattgtgt tgacrcagtc tccag 25

20 <210> 97

20 <211> 25
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

25 <220>
 <223> cebador

30 <400> 97
 gacatcgtga tgaccagtc tccag 25

30 <210> 98
 <211> 49
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

35 <220>
 <223> cebador

40 <400> 98
 gatgttgga tgactcagtc tccactctcc ctgcccgtca ccctggac 49

45 <210> 99
 <211> 30
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

50 <220>
 <223> cebador

50 <400> 99
 gaaattgtgc tgactcagtc tccagacttt 30

55 <210> 100
 <211> 49
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

60 <220>
 <223> cebador

60 <400> 100
 gacatccaga tgaccagtc tccatcctcc ctgtctgcat ctgtaggag 49

65 <210> 101
 <211> 33
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

ES 2 450 933 T3

<220>
 <223> cebador

 <400> 101
 5 tcctccacgt ttgattcca ccttgggcc ttg 33

 <210> 102
 <211> 31
 <212> ADN
 10 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> cebador
 15
 <400> 102
 tcctccacgt ttgatctcca gcttgggcc c 31

 <210> 103
 <211> 32
 <212> ADN
 20 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> cebador
 25
 <400> 103
 tcctccacgt ttgatctcca ctttgggcc ag 32

 <210> 104
 <211> 33
 <212> ADN
 30 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> cebador
 35
 <400> 104
 40 tcctccacgt ttgatctcca ccttgggcc tcc 33

 <210> 105
 <211> 31
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 45
 <220>
 <223> cebador

 <400> 105
 50 tcctccacgt ttaatctcca gtcgtgcc t 31

 <210> 106
 <211> 47
 <212> ADN
 55 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> cebador

 <400> 106
 60 ggtggatcca gcggtggtgg ttccgacatc cagatgacct agtctcc 47

 <210> 107
 <211> 47
 <212> ADN
 65 <213> Secuencia artificial

ES 2 450 933 T3

<220>
 <223> cebador

5 <400> 107
 ggtgatcca gcggtgtggg ttccgatatt gtgatgaccc agwctcc 47

<210> 108
 <211> 38
 10 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> cebador

15 <400> 108
 gaattccacg aggctggctc ctccacgftt gathcca 38

<210> 109
 <211> 18
 20 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> cebador

25 <400> 109
 cgaatttcta gataacga 18

30 <210> 110
 <211> 41
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

35 <220>
 <223> cebador

<400> 110
 40 cctccggcac tacctctcc tccgaggccc ccgaggcctg a 41

<210> 111
 <211> 54
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

45 <220>
 <223> cebador

<400> 111
 50 ggtagtggcg gaggaggctc cggtgatcc agcgggtgg gttccgatat tgtg 54

<210> 112
 <211> 40
 <212> ADN
 55 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> cebador

60 <400> 112
 ctgaattcc caggaggctg gctctccac gtttgatttc 40

<210> 113
 <211> 15
 <212> ADN

65

ES 2 450 933 T3

<213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> CDR1 de cadena pesada de 6A6
 5
 <400> 113
 agctactgga tgcac 15
 <210> 114
 10 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 15 <223> CDR1 de cadena pesada de 6A6
 <400> 114
 Ser Tyr Trp Met His
 1 5
 20 <210> 115
 <211> 48
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 25 <220>
 <223> CDR2 de cadena pesada de 6A6
 30 <400> 115
 gagattaatc ctggaacgg tcataactac aacgagaagt tcaagtca 48
 <210> 116
 <211> 17
 35 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 40 <223> CDR2 de cadena pesada de 6A6
 <400> 116
 Glu Ile Asn Pro Gly Asn Gly His Thr Asn Tyr Asn Glu Lys Phe Lys
 1 5 10 15
 Ser
 45 <210> 117
 <211> 36
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 50 <220>
 <223> CDR3 de cadena pesada de 6A6
 <400> 117
 attggggcc cgagtctac ttctccctt gactac 36
 55 <210> 118
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 60 <220>

ES 2 450 933 T3

caggtgtggg ataggactag tgagtat 27

5 <210> 124
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> CDR3 de cadena ligera de 6A6

<400> 124

Gln Val Trp Asp Arg Thr Ser Glu Tyr Val
 1 5 10

15 <210> 125
 <211> 363
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <223> cadena pesada variable de 6A6

25 <400> 125

cagatgcagc	tggtgcagtc	tggggctgaa	gtgaagaagc	ctggggcttc	agtgaagctg	60
tcttgcaagg	cttctggcta	caccttcagc	agctactgga	tgcactgggt	gcgccaggcc	120
cctggacaac	gccttgagtg	gatgggagag	attaatcctg	gcaacggtea	tactaactac	180
aacgagaagt	tcaagtcacg	cgtgacaatc	actgtagaca	aatccgcgag	cacagcctac	240
atggagctca	gcagcctgag	atctgaggac	acggccgtgt	attactgtgc	gaaaatttgg	300
ggcccagatc	ttacttctcc	ctttgactac	tggggccagg	gaaccctggt	caccgtctcc	360
tca						363

30 <210> 126
 <211> 121
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

35 <220>
 <223> cadena pesada variable de 6A6

<400> 126

ES 2 450 933 T3

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

<210> 127
 <211> 1443
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

5

<220>
 <223> Cadena pesada de IgG 6A6

10

<400> 127

ES 2 450 933 T3

atgggatgga gctatatcat cctctttttg gtagcaacag ctacagatgt ccaactcggcc 60
 cagccggcca tggcccagat gcagctgggtg cagtctgggg ctgaagtgaa gaagcctggg 120
 gcttcagtga agctgtcctg caaggttctt ggctacacct tcagcagcta ctggatgcac 180
 tgggtgcgcc aggccctgg acaacgcctt gagtggatgg gagagattaa tcctggcaac 240
 ggtcatacta actacaacga gaagttcaag tcacgcgtga caatcaactgt agacaaatcc 300
 gcgagcacag cctacatgga gctcagcagc ctgagatctg aggacacggc cgtgtattac 360
 tgtgcaaaa tttggggccc gagtcttact tctccctttg actactgggg ccagggaacc 420
 ctggtcaccg tctcctcagg cctcgggggc ctgcctagca ccaagggccc atcggctctc 480
 ccctggcac cctcctccaa gagcaactct gggggcacag cggccctggg ctgcctggtc 540
 aaggactact tccccgaacc ggtgacgggtg tcgtggaact caggcgcctt gaccagcggc 600
 gtgcacacct tcccggctgt cctacagtcc tcaggactct actccctcag cagcgtgggtg 660
 accgtgccct ccagcagctt gggcaccag acctacatct gcaacgtgaa tcacaagccc 720
 agcaacacca aggtggacaa gagagttgag cccaaatctt gtgacaaaac tcacacatgc 780
 ccaccgtgcc cagcacctga actcctgggg ggaccgtcag tcttctctt tccccaaaa 840
 cccaaggaca cctcatgat ctcccggacc cctgaggtca catgcgtggg ggtggacgtg 900
 agccacgaag accctgaggt caagttcaac tggtagctgg acggcgtgga ggtgcataat 960
 gccaaagaaa agccgcggga ggagcagtac aacagcacgt accgtgtggg cagcgtcctc 1020
 accgtcctgc accaggactg gctgaatggc aaggagtaca agtgcaaggt ctccaacaaa 1080
 gccctcccag ccccatcga gaaaaccatc tccaaagcca aagggcagcc ccgagaacca 1140
 caggtgtaca cctgcccc atcccgggat gagctgacca agaaccagggt cagcctgacc 1200
 tgcttggta aaggcttcta tcccagcagc atcggcctgg agtgggagag caatgggcag 1260
 ccggagaaca actacaagac cagcctccc gtgctggact ccgacggctc ettcttctc 1320
 tacagcaagc tcaccgtgga caagagcagg tggcagcagg ggaacgtctt ctcatgctcc 1380
 gtgatgcatg aggctctgca caaccactac acgcagaaga gcctctccct gtctccgggt 1440

aaa 1443

<210> 128
 <211> 481
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Cadena pesada de IgG 6A6

<400> 128

5

10

ES 2 450 933 T3

Met Gly Trp Ser Tyr Ile Ile Leu Phe Leu Val Ala Thr Ala Thr Asp
1 5 10 15

Val His Ser Ala Gln Pro Ala Met Ala Gln Met Gln Leu Val Gln Ser
20 25 30

Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala Ser Val Lys Leu Ser Cys Lys
35 40 45

Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Ser Ser Tyr Trp Met His Trp Val Arg Gln
50 55 60

Ala Pro Gly Gln Arg Leu Glu Trp Met Gly Glu Ile Asn Pro Gly Asn
65 70 75 80

Gly His Thr Asn Tyr Asn Glu Lys Phe Lys Ser Arg Val Thr Ile Thr
85 90 95

Val Asp Lys Ser Ala Ser Thr Ala Tyr Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg
100 105 110

Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Lys Ile Trp Gly Pro Ser
115 120 125

Leu Thr Ser Pro Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val
130 135 140

Ser Ser Gly Leu Gly Gly Leu Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe
145 150 155 160

Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu
165 170 175

Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp
180 185 190

Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu
195 200 205

Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser
210 215 220

Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro
225 230 235 240

Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys
245 250 255

ES 2 450 933 T3

Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro
 260 265 270

Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser
 275 280 285

Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp
 290 295 300

Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn
 305 310 315 320

Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val
 325 330 335

Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu
 340 345 350

Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys
 355 360 365

Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr
 370 375 380

Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr
 385 390 395 400

Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu
 405 410 415

Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu
 420 425 430

Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys
 435 440 445

Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu
 450 455 460

Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
 465 470 475 480

Lys

<210> 129

<211> 738

5 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

10 <223> Cadena ligera de IgG 6A6

<400> 129

atgggatgga gctatatcat cctctttttg gtagcaacag ctacagatgt ccaactccagc 60

ggtgtgggtt ccaattttat gctgactcag cccccctcag tgtcagtgtc cccaggaaag 120

ES 2 450 933 T3

acggccagga tcacttgtag gggagataac cttggagatg taaatgttca ctggtaccag 180
cagcggccag gccaggcccc tgtattggtc atgtattatg atgccgaccg gccctcaggg 240
atccctgagc gattctctgg ctccaaactct gggaacacgg ccacactgac catcagcggg 300
gtcgaagccg gggatgaggc cgactactat tgtcaggtgt gggataggac tagtgagtat 360
gtcttcggaa ctgggaccaa ggtcacogtc ctaggtggag gagccagcct cgtggaaaga 420
tctgtggctg caccatctgt ctccatcttc ccgccatctg atgagcagtt gaaatctgga 480
actgcctctg ttgtgtgcct gctgaataac ttctatccca gagaggccaa agtacagtgg 540
aaggtggata acgccctcca atcgggtaac tcccaggaga gtgtcacaga gcaggacagc 600
aaggacagca cctacagcct cagcagcacc ctgacgctga gcaaagcaga ctacgagaaa 660
cacaaagtct acgctgcga agtcacccat cagggcctga gctcgcccgt cacaaagagc 720
ttcaacaggg gagagtgt 738

<210> 130
<211> 246
5 <212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
10 <223> Cadena ligera de IgG 6A6

<400> 130

ES 2 450 933 T3

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

<210> 131
 <211> 318
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

5

<220>
 <223> cebador

10

<400> 131

ES 2 450 933 T3

	gacattgttc tcatccagtc tccagcaatc atgtctgcat ctccagggga gaaggtcacc	60
	ataacctgca gtgccagctc aagtgtaagt tacatgcaact ggttccagca gaagccaggc	120
	acttctccca aactctggat ttatagcaca tccaacctgg cttctggagt cctgctcgc	180
	ttcagtggca gtggatctgg gacctcttac tctctcaca tcagccgaat ggaggctgaa	240
	gatgctgcca cttattactg ccagcaaagg agtagttacc cattcacggt cggctcgggg	300
	acaaagttgg aaataaaa	318
5	<210> 132 <211> 345 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
10	<220> <223> cebador <400> 132	
	caggttcagc tccagcagtc tggggcagag cttgtgaggt caggggcctc agtcaagttg	60
	tcctgcacag cttctggett caacattaa gactactata tgcactgggt gaagcagagg	120
	cctgaacagg gcctggagtg gattggatgg attgatcctg cgaatggtaa tactaaatat	180
	gacccgaagt tccagggcaa ggccactata acagcagaca catcctccaa cacagcctac	240
	ctgcagctca gcagcctgac atctgaggac actgcccgtct attactgtgc tagatgggac	300
	tggtaacttcg atgtctgggg cgcagggacc acggtcaccg tttcc	345
15	<210> 133 <211> 51 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
20	<220> <223> cebador	
25	<400> 133 ctgcagaacc agcgggtgg gttccgacat cgagctcact cagtctccat g 51	
30	<210> 134 <211> 53 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
35	<220> <223> cebador <400> 134 ctgcagaacc acgaggctgg ctctccacg ttttattcc agcttggcc ccg53	
40	<210> 135 <211> 68 <212> ADN <213> Secuencia artificial <220>	

ES 2 450 933 T3

<223> cebador

<400> 135

cggccagcc ggccatggcc caggtcaagc tgcagcagtc tggggcagag cttgtggggt 60

5 cagggggcc 68

<210> 136
<211> 29
<212> ADN
10 <213> Secuencia artificial

<220>
<223> cebador

15 <400> 136
ggctcaaca ttaaagactt ctatatga 29

<210> 137
<211> 55
20 <212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> cebador

25 <400> 137
gattatgcc cgaagtcca gggcaaggcc accatgactg cagactcatc ctcca 55

<210> 138
<211> 45
30 <212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> cebador

35 <400> 138
tactgtaatg catactatgg tgactacgaa ggctactggg gccaa 45

<210> 139
<211> 31
40 <212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> cebador

45 <400> 139
gtctttaatg ttgaagccag aagttgtgca g 31

50

<210> 140
<211> 50
<212> ADN
55 <213> Secuencia artificial

<220>
<223> cebador

60 <400> 140
acttcggggc ataatcagaa tcaccattct caggatcaat ccatccaatc 50

<210> 141

ES 2 450 933 T3

<211> 19
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

5 <220>
<223> cebador

<400> 141
gtatgcatta cagtaatag 19

10 <210> 142
<211> 62
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

15 <220>
<223> cebador

20 <400> 142

ccgaggcccc cgaggcctga ggagacggtg accgtggtcc cttggcccca gtagccttcg 60

ta 62

<210> 143
<211> 864
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

25 <220>
<223> r1C11-ScFv

30 <400> 143

ES 2 450 933 T3

atgaaatacc tattgcctac ggcagccgct ggattggtat tactcgcggc ccagccggcc 60
atggcccagg tcaagctgca gcagtctggg gcagagcttg tggggtcagg ggcctcagtc 120
aaattgtcct gcacaaactt tggettcaac attaaagact tctatatgca ctgggtgaag 180
cagaggcctg aacagggcct ggagtggatt ggatggattg atcctgagaa tgggtgattct 240
gattatgccc cgaagttcca gggcaaggcc accatgactg cagactcatc ctccaacaca 300
gcctacctgc agctcagcag cctgacatct gaggacactg ccgtctatta ctgtaatgca 360
tactatggtg actacgaagg ctactggggc caagggacca cggtcaccgt ctctcaggc 420
ctcggggggc tcggaggagg aggtagtggc ggaggaggct ccggtggatc cagcgggtgtg 480
ggttccgaca tcgagctcac tcagtctcca gcaatcatgt ctgcatctcc aggggagaag 540
gtcaccataa cctgcagtgc cagctcaagt gtaagttaca tgcactggtt ccagcagaag 600
ccaggcactt ctcccaaact ctggatttat agcacatcca acctggatta tggagtcctt 660
gctcgcttca gtggcagtg atctgggacc tcttactctc tcacaatcag ccgaatggag 720
gctgaagatg ctgccactta ttactgccag caaaggagta gttaccatt cacgttcggc 780
tcggggacca agctggaaat aaaacgtgga ggagccagcc tcgtggaatt cgagcagaag 840
ctgatctctg aggaagacct gtag 864

5 <210> 144
<211> 348
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

10 <220>
<223> Cadena pesada de YGKL-136
<400> 144

gaggtgcagc tgggtggagtc tgggggaggc ctggtcaagc ctggggggtc cctgagactc 60
tctgtgcag cctctggatt caccttcagt agctatagca tgaactgggt ccgccaggct 120
ccaggggaagg ggctggagtg ggtctcatcc attagtagta gtagtagtta catacactac 180
gcagactcag tgaagggccg attcaccatc tccagagaca acgccaagaa ctactgtat 240
ctgcaaatga acagtctgag agccgaggac acggccgtgt attactgtgc gagagtcaca 300
gatgcttttg atatctgggg ccccggaacc ctggtcaccg tctctca 348

15 <210> 145
<211> 328
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

20 <220>
<223> Cadena ligera de 6G1
<400> 145

ES 2 450 933 T3

	gacatccaga tgacccagtc tccatcttcc gtgtctgcat ctgtaggaga cagagtcacc	60
	atcacttgtc gggcgagtca gggatttagc agctatttag gctggatca gcagaaacca	120
	gggaaagccc ctaagctcct gatctatgct gcatccaatt tgcaaacagg ggtcccgcc	180
	aggttcagcg gcagtggatc cgggacaagt ttcactctca cctcaataa tgtgcagcct	240
	gaagattctg caacttacta ttgtcaacag gctgacagtt tccctcttcc ggcggaggga	300
	ccaaagtgga aatcaaactg gaggagcc	328
5	<210> 146 <211> 23 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
10	<220> <223> cebador	
	<400> 146 cccagcggg gtgggtccg aca	23
15	<210> 147 <211> 38 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
20	<220> <223> cebador	
	<400> 147 tggtagctct gtctctata gatgcagaca cggatgat	38
25	<210> 148 <211> 22 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
30	<220> <223> cebador	
35	<400> 148 tctataggag acagagtcac ca	22
40	<210> 149 <211> 38 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
45	<220> <223> cebador	
	<400> 149 taccagccta accagttgtc aataccctga ctcgcccg	38
50	<210> 150 <211> 41 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
	<220> <223> cebador	

ES 2 450 933 T3

	<400> 150 ttgacaactg gttaggctgg tatcagcaga aaccagggaa a	41
5	<210> 151 <211> 52 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
10	<220> <223> cebador	
	<400> 151 acctgatgg gaccctctgg tccaaattgg atgcatcata gatcaggagc tt	52
15	<210> 152 <211> 22 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
20	<220> <223> cebador	
25	<400> 152 ccccacgagg ctggctctc ca	22
30	<210> 153 <211> 58 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
	<220> <223> cebador	
35	<400> 153 ccggcccagc cgccatggc cgaggtgcag ctggtgcagt ctgggggagg cctggatca	58
40	<210> 154 <211> 39 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
	<220> <223> cebador	
45	<400> 154 gtagtagtag tagttacata tactacgcag actcagtga	39
50	<210> 155 <211> 50 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
	<220> <223> cebador	
55	<400> 155 ttactgtgag agagtcacag atgctttga tatctggggc caagggacaa	50
60	<210> 156 <211> 37 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
65	<220> <223> cebador	

ES 2 450 933 T3

<400> 156
tcactgagtc tgcgtagtat atgtaactac tactact 37

5 <210> 157
<211> 24
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

10 <220>
<223> cebador

<400> 157
ctgtgactct cgcacagtaa taca 24

15 <210> 158
<211> 49
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

20 <220>
<223> cebador

<400> 158
ccggcccccg aggcctgagg agacggtgac cattgtcct tggccccag 49

25 <210> 159
<211> 864
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

30 <220>
<223> ADN de ScFv r1121

35 <400> 159

ES 2 450 933 T3

atgaaatacc tattgcctac ggcagccgct ggattgttat tactcgcggc ccagccggcc 60
atggccgagg tgcagctggt gcagctctggg ggaggcctgg tcaagcctgg ggggtccctg 120
agactctect gtgcagcctc tggattcacc ttcagtagct atagcatgaa ctgggtccgc 180
caggctccag ggaaggggct ggagtgggtc tcatccatta gtagtagtag tagttacata 240
tactacgcag actcagtga gggccgattc accatctcca gagacaacgc caagaactca 300
ctgtatctgc aatgaacag tctgagagcc gaggacacgg ccgtgtatta ctgtgcgaga 360
gtcacagatg cttttgatat ctggggccaa gggacaatgg tcaccgtctc ctcaggcctc 420
gggggctctg gaggaggagg tagtggcgga ggaggctccg gtggatccag cgggtgsggt 480
tccgacatcc agatgacca gtctccatct tccgtgtctg catctatagg agacagagtc 540
accatcactt gtcgggagag tcagggtatt gacaactggt taggctggta tcagcagaaa 600
cctgggaaag ccctaaact cctgatctac gatgcatcca atttggacac aggggtocca 660
tcaaggttca gtggaagtgg atctgggaca tattttactc tcaccatcag tagcctgcaa 720
gctgaagatt ttgcagttta tttctgtcaa caggctaaag cttttcctcc cactttcggc 780
ggagggacca aggtggacat caaacgtgga ggagccagcc tcgtggaatt cgagcagaag 840
ctgatctctg aggaagacct gtga 864

5 <210> 160
<211> 29
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

10 <220>
<223> cebador

<400> 160
gagccagcct cgtggaattc gaacaaaa 29

15 <210> 161
<211> 55
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

20 <220>
<223> cebador

<400> 161
tgctcgagat tcagatcctc ttctgagatg agttttgtt gaattccagc aggcct 55

25 <210> 162
<211> 21
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

30 <220>
<223> cebador

<400> 162
ccagcctcgt ggaattcgaa c 21

35

ES 2 450 933 T3

<210> 163
 <211> 69
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 5
 <220>
 <223> cebador
 <400> 163
 ccgctcgagg gtggagtcca gacctaatag agggtttggg atcggcttc cattcagatc 60
 10 ctctctga 69
 <210> 164
 <211> 324
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 15
 <220>
 <223> Cadena ligera de TTAC-0002 (KE3)
 20
 <400> 164
 aattttatgc tgactcagcc ccctcagtg tcagtggccc caggaaagac ggccaggatc 60
 acctgtgggg gagacaacat tggaagtcaa agtgtgcact ggtaccagca gcggccaggc 120
 caggcccctg tattggatcat gtattatgat gccgaccggc cctcagggat ccctgagcga 180
 ttctctgggt ccaactctgg gaacacggcc aactgacca tcagcggagt cgaagccggg 240
 gatgaggccg actactattg tcaggtgtgg gataggacta gtgagtatgt cttcggaact 300
 gggaccaagg tcaccgtcct aggt 324
 25
 <210> 165
 <211> 324
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 30
 <220>
 <223> Cadena ligera de TTAC-0003(KE6)
 <400> 165
 aattttatgc tgactcagcc ccctcagtg tcagtggccc caggaaagac ggccgggatt 60
 acctgtgggg gagacgacat tggaagtaaa agtgtgcact ggtaccagca gaagccaggc 120
 caggcccctg tggtggatcat ctattatgat agcgaccggc cctcagggat ccctgagcga 180
 ttctctgggt ccaactctgg gaacacggcc aactgacca tcagcggagt cgaagccggg 240
 gatgaggccg actactattg tcaggtgtgg gataggacta gtgagtatgt cttcggaact 300
 gggaccaagg tcaccgtcct aggt 324
 35
 <210> 166
 <211> 321
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 40
 <220>

ES 2 450 933 T3

<223> Cadena ligera de TTAC-0004 (IE4)

<400> 166

```

tcctatgagc tgactcagcc accctcagtg tcatcggccc caggaaagac ggccaccatt      60
acctgtgagg gaaagaacat tggcagtaaa agtgtgcact ggtaccagca gaagccaggc      120
caggcccctg tgctgctcat ttattatgat caagaccggc cctcagcgat ccctgagcga      180
ttctctggct ccaactctga caacatggcc accctgacca tcagccgggt cgcagccggg      240
gatgaggctg actattactg tcaggtgtgg ggcaacggca aagtgggtgt cggcggaggg      300
5  accaagctga ccgtcctagg t                                             321

```

<210> 167

<211> 324

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Cadena ligera de TTAC-0005(SD5)

<400> 167

```

aattttatgc tgactcagcc cccctccgtg tcagtggccc caggaaagac ggccaggatc      60
acttgtaggg gagataacct tggagatgta aatgttcaact ggtaccagca gcggccaggc      120
caggcccctg tattggctcat gtattatgat gccgaccggc cctcggggat ccctgagcga      180
ttctctggct ccaactctgg gaacacggcc aactgacca tcagcggagt cgaagccggg      240
gatgaggccg actactattg tcaggtgtgg gataggacta gtgagtatgt cttcggagct      300
gggaccaagg tcaccgtcct aggt                                             324

```

<210> 168

<211> 324

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Cadena ligera de TTAC-0006(2KG8)

<400> 168

```

aattttatgc tgactcagcc cccctccgtg tcagtggccc caggaaagac ggccaggatc      60
acttgtaggg gagataacct tggagatgta aatgttcaact ggtaccagca gcggccaggc      120
caggcccctg tattggctcat gtattatgat gccgaccggc cctcggggat ccctgagcga      180
ttctctggct ccaactctgg gaacacggcc aactgacca tcagcggagt cgaagccggg      240
gatgaggccg actactattg tcaggtgtgg gataggacta gtgagtatgt cttcggagct      300
gggaccaagg tcaccgtcct aggt                                             324

```

<210> 169

ES 2 450 933 T3

	<211> 324	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
5	<220>	
	<223> Cadena ligera de TAC-0007(3KE11)	
	<400> 169	
	aatTTTatgc tgactcagcc cccctcagtg tcagtgtccc caggaaagac ggccaggatc	60
	acttGtaggg gagataacct tggagatgta aatgttcaact ggtaccagca gcggccaggc	120
	caggcccctg tattggTcat gtattatgat gccgaccggc cctcagggat ccctgagcga	180
	ttctctggct ccaactctgg gaacacggcc aTactgacca tcagcggagt cgaagccggg	240
	gatgaggccg actactattg tcaggtgtgg gataggacta gtgagtatgt cttcggaact	300
10	gggaccaagg tcaccgtcct aggt	324
	<210> 170	
	<211> 324	
	<212> ADN	
15	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Cadena ligera de TTAC-0008(3KF11)	
20	<400> 170	
	aatTTTatgc tgactcagcc ctcttcagtg tcagtgtccc caggaaagac ggccaggatc	60
	acttGtaggg gagataacct tggagatgta aatgttcaact ggtaccagca gcggccaggc	120
	caggcccctg tattggTcat gtattatgat gccgaccggc cctcagggat ccctgagcga	180
	ttctctggct ccaactctgg gaacacggcc aCactgacca tcagcggagt cgaagcaggg	240
	gatgaggccg actactattg tcaggtgtgg gataggacta gtgagtatgt cttcggaact	300
	gggaccaagg tcaccgtcct aggt	324
25	<210> 171	
	<211> 324	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
30	<220>	
	<223> Cadena ligera de TTAC-0009(3KG3)	
	<400> 171	

ES 2 450 933 T3

aat t t t a t g c t g a c t c a g c c c c a c t c t g t g t c a g t g t c c c c a g g a a a g a c g g c c a g g a t c 60
 a c t t g t a g g g g a g a t a a c c t t g g a g a t g t a a a t g t t c a c t g g t a c c a g c a g c g g c c a g g c 120
 c a g g c c c c t g t a t t g g t c a t g t a t t a t g a t g c c g a c c g g c c c t c a g g g a t c c c t g a g c g a 180
 t t c t c t g g c t c c a a c t c t g g g a a c a c g g c c a c a c t g a c c a t c a g c g g a g t c g a a g c c g g g 240
 g a t g a g g c c g a c t a c t a t t g t c a g g t g t g g g a t a g g a c t a g t g a g t a t g t c t t c g g a a c t 300
 g g g a c c a a g g t c a c c g t c c t a g g t 324

5 <210> 172
 <211> 324
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> Cadena ligera de TTAC-0010(3IG11)
 <400> 172

aat t t t a t g c t g a c t c a g c c c c c t c a g t g t c a g t g t c c c c a g g a a a g a c g g c c a g g a t c 60
 a c t t g t a g g g g a g a t a a c c t t g g a g a t g t a a a t g t t c a c t g g t a c c a g c a g c g g c c a g g c 120
 c a g g c c c c t g t a t t g a t c a t g t a t t a t g a t g c c g a c c g g c c c t c a g g g a t c c c t g a g c g a 180
 t t c t c t g g c t c c a a c t c t g g g a a c a c g g c c a c a c t g a c c a t c a g c g g a g t c g a a g c c g g g 240
 g a t g a g g c c g a c t a c t a t t g t c a g g t g t g g g a t a g g a c t a g t g a g t a t g t c t t c g g a a c t 300
 g g g a c c a a g g t c a c c g t c c t a g g t 324

15 <210> 173
 <211> 324
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <223> Cadena ligera de TTAC-0011(3IG12)
 <400> 173

aat t t t a t g c t g a c t c a g c c c c a c t c t g t g t c a g t g t c c c c a g g a a a g a c g g c c a g g a t c 60
 a c t t g t a g g g g a g a t a a c c t t g g a g a t g t a a a t g t t c a c t g g t a c c a g c a g c g g c c a g g c 120
 c a g g c c c c t g t a t t g g t c a t g t a t t a t g a t g c c g a c c g g c c c t c a g g g a t c c c t g a g c g a 180
 t t c t c t g g c t c c a a c t c t g g g a a c a c g g c c a c a c t g a c c a t c a g c g g a g t c g a a g c c g g g 240
 g a t g a g g c c g a c t a c t a t t g t c a g g t g t g g g a t a g g a c t a g t g a g t a t g t c t t c g g a a c t 300
 g g g a c c a a g g t c a c c g t c c t a g g t 324

25
 30 <210> 174
 <211> 324
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

ES 2 450 933 T3

	<220>		
	<223> Cadena ligera de TTAC-0012 (3IE1)		
	<400> 174		
5	aattttatgc tgactcagcc ctcttcagtg tcagtgcccc caggaaagac ggccaggatc		60
	acttgtaggg gagataacct tggagatgta aatgttcaact ggtaccagca gcggcgaggc		120
	caggccccctg tattggtcac gtattatgat gccgaccggc cctcagggat ccctgagcga		180
	ttctctggct ccaactctgg gaacacggcc aactgacca tcagcggagt cgaagccggg		240
	gatgaggccg actactattg tcaggtgtgg gataggacta gtgagtttgt ctctggaact		300
	gggaccaagg tcaccgtcct aggt		324
	<210> 175		
	<211> 324		
10	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
	<220>		
	<223> Cadena ligera de TTAC-0013 (3IH2)		
15	<400> 175		
	aattttatgc tgactcagcc cccctcaactg tccgtgtccc caggacagac ggccaggatc		60
	acttgtaggg gagacaacct tggagatgta aatgttcaact ggtaccagca gcggccaggc		120
	caggccccctg tattggtcac gtattatgat gccgaccggc cctcagggat ccctgagcga		180
	ttctctggct ccaactctgg gaacacggcc aactgacca tcagcggagt cgaagccggg		240
	gatgaggccg actactattg tcaggtgtgg gataggacta gtgagtatgt ctctggaact		300
	gggaccaagg tcaccgtcct aggt		324
20	<210> 176		
	<211> 324		
	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
25	<220>		
	<223> Cadena ligera de TTAC-0014 (K3F1)		
	<400> 176		
	aattttatgc tgactcagcc cccctctgtg tcagtgcccc caggacagac ggccaggatc		60
	acttgtaggg gagataacct tggagatgta aatgttcaact ggtaccagca gcggccaggc		120
	caggccccctg tattggtcac gtattatgat gccgaccggc cctcagggat ccctgagcga		180
	ttctctggct ccaactctgg gaacacggcc aactgacca tcagcggagt cgaagccggg		240
	gatgaggccg actactattg tcaggtgtgg gataggacta gtgagtatgt ctctggaact		300
30	gggaccaagg tcaccgtcct aggt		324

ES 2 450 933 T3

<210> 177
 <211> 324
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 5 <220>
 <223> Cadena ligera de TTAC-0015 (I2F2) (ADN)
 10 <400> 177
 aatTTTatgc tgactcagcc ccccgCagtg tcagTgtccc caggaaagac ggccaggatc 60
 actTgtaggG gagataacct tggagatgta aatgttcaCt ggtaccagca gcggccaggc 120
 caggccccctg tattggTcat gtattatgat gccgaccggc cctcagggat ccctgagcga 180
 ttctctggct ccaactctgg gaacacggcc aactgacca tcagcggagt cgaagccggg 240
 gatgaggccg actactattg tcaggtgtgg gataggacta gtgagtatgt cttcggaact 300
 gggaccaagg tcaccgtcct aggt 324
 <210> 178
 15 <211> 324
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 20 <223> Cadena ligera de TTAC-0016 (I3A12)
 <400> 178
 aatTTTatgc tgactcagcc cccctcagtg tcagTgtccc caggaaagac ggccaggatc 60
 actTgtaggG gagataacct tggagatgta aatgttcaCt ggtaccagca gcggccaggc 120
 caggccccctg tattggTcat gtattatgat gccgaccggc cctcagggat ccctaagcga 180
 ttctctggct ccaactctgg gaacacggcc aactgacca tcagcggagt cgaagccggg 240
 gatgaggccg actactattg tcaggtgtgg gataggacta gtgagtatgt cttcggaact 300
 gggaccaagg tcaccgtcct aggt 324
 25 <210> 179
 <211> 324
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 30 <220>
 <223> Cadena ligera de TTAC-0017 (I3F2)
 <400> 179
 35

ES 2 450 933 T3

	aatTTtatgc tgactcagcc cccctcagtg tcagtgtccc caggaaagac ggccaggatc	60
	actttaggg gagataacct tggagatgta aatgttcaact ggtaccagca gcggccaggc	120
	caggccccctg tatttgatcat ttattatgat gccgacaggc cctcagggat ccctgagcga	180
	ttctctggct ccaactctgg gaacacggcc aactgacca tcagcggagt cgaagccggg	240
	gatgaggccg actactattg tcaggtgtgg gataggacta gtgagtatgt cttcggaact	300
	gggaccaagg tcaccgtcct aggt	324
	<210> 180	
	<211> 324	
5	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
10	<223> Cadena ligera de TTAC-0018 (4SC3)	
	<400> 180	
	aatTTtatgc tgactcagcc cccctcagtg tcagtgtccc caggaaagac ggccaggatc	60
	actttaggg gagataacct tggagatgta aatgttcaact ggtaccagca gcggccaggc	120
	caggccccctg tatttagtcat gtattatgat gccgaccggc cctcagggat ccctgagcga	180
	ttctctggct ccaactctgg gaacacggcc aactgacca tcagcggagt cgaagccggg	240
	gatgaggccg actactattg tcaggtgtgg gataggacta atgagtatgt cttcggaact	300
	gggaccaagg tcaccgtcct aggt	324
	<210> 181	
	<211> 324	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
20	<223> Cadena ligera de TTAC-0019 (4SC5)	
	<400> 181	
	cagttcgtgc tgactcagcc accctcagtg tcagtggccc caggaaagac ggccaggatt	60
	acctgtgggg gaaacaacat tggaagtaaa agtgtgcaact ggtaccagca gaagccaggc	120
	caggccccctg tgctggatcat ctattatgat agcgaccggc cctcagggat ccctgagcga	180
	ttctctggct ccaactttgg gaacacggcc acctgacca tcagcagggt cgaagccggg	240
	gatgaggccg actattattg tcaggtttgg gatagtagtc gtgattatgt cttcggaact	300
	gggaccaagg tcaccgtcct aggt	324
25		

REIVINDICACIONES

- 5 1. Una molécula de fragmento variable de cadena sencilla (ScFv) que contiene una región variable de cadena ligera representada por una secuencia de aminoácidos de una cualquiera de las SEQ ID NOs: 1 a 19 y actúa neutralizando el receptor del factor de crecimiento endotelial vascular, y donde la molécula de ScFv tiene una región variable de cadena pesada representada por una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 20.
2. Un ADN que codifica la molécula de ScFv (fragmento variable de cadena sencilla) de la reivindicación 1.
- 10 3. Un vector que contiene el ADN de la reivindicación 2.
4. Células recombinantes transformadas con el vector de la reivindicación 3.
- 15 5. Las células recombinantes de acuerdo con la reivindicación 4, donde las células son células bacterianas o animales.
6. Una composición para uso en un método de tratamiento que comprende inhibir la angiogénesis, que contiene la molécula de ScFv de la reivindicación 1.
- 20 7. Una composición para uso en un método para el tratamiento del cáncer, que contiene la molécula de ScFv de la reivindicación 1.
- 25 8. Un IgG que contiene una región variable de cadena ligera representada por una secuencia de aminoácidos de una cualquiera de las SEQ ID NOs: 1 a 19 y que actúa neutralizando el receptor del factor de crecimiento endotelial vascular, y donde la IgG tiene una región variable de cadena pesada representada por una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 20.
- 30 9. Una composición para uso en un método de tratamiento que comprende inhibir la angiogénesis, que contiene la IgG de la reivindicación 8.
10. Una composición para uso en un método para el tratamiento del cáncer, que contiene la IgG de la reivindicación 8.

FIG. 1

MESKVLLAVA LWLCVETRAA SVGLPSVSLD LPRLSIQKDI LTIKANTTLO
 Señal ECD 1
 ITCRGQRDLW WLWPNQSGS EQRVEVTECS DGLFCKTLTI PKVIGNDTGA
 YKCFYRETDL ASVIYVYVQD YRSPFIASVS DQHGUVYITE NKNKTVVIPC
ECD 2
 LGSISNLNVS LCARYPEKRF VPDGNRISWD SKKGFTIPSY MISYAGMVFC
 EAKINDESYQ SIMYIVVVVG YRIYDVVLSP SHGIELSVGE KLVLNCTART
ECD 3
 ELNVGIDFNW EYPSSKHQHK KLVNRDLKTQ SGSEMKKFLS TLTIDGVTRS
 DQGLYTCAAS SGLMTKKNST FVRVHEKASS GLVPRGSDKT HTCPCPAPPE
 LLGGPSVFLF PPKPKDTLMI SRTPEVTCVV VDVSHEDPEV KFNWYVDGVE
 VHNATKPRE EQYNSTYRVV SVLTVLHQDW LNGKEYKCKV SNKALPAPIE
 KTISKAKGQP REPQVYTLPP SRDELTKNOV SLTCLVKGFY PSDIAVEWES
 NGOPENNYKT TPPVLDSGGS FFLYSKLTVD KSRWQOGNVF SCSVMHEALH
 NHYTQKSLSL SPGKEQKLIS EEDL
Sitio de trombina Fc
 Marcador de Myc

FIG. 2

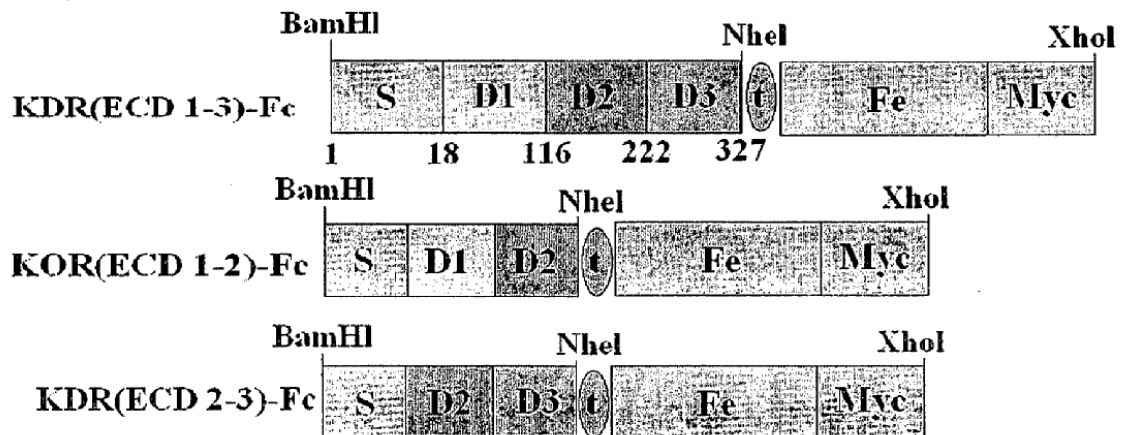


FIG. 3

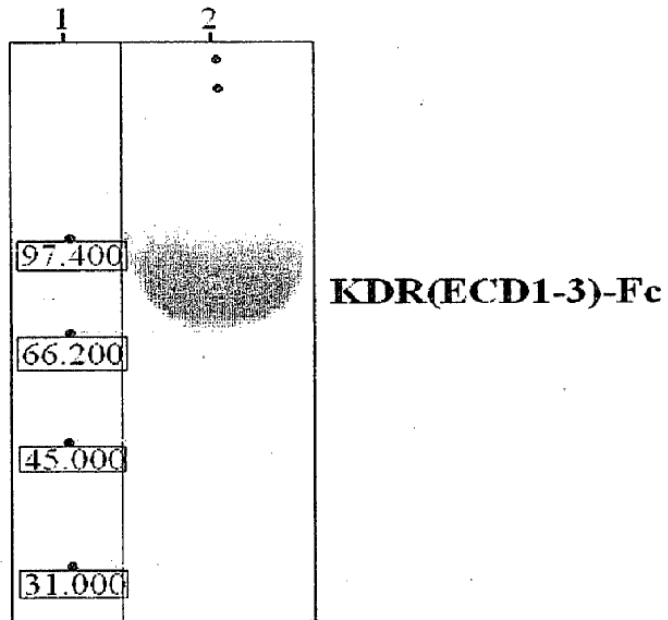


FIG. 4

Ensayo de competición de fago anti-KDR

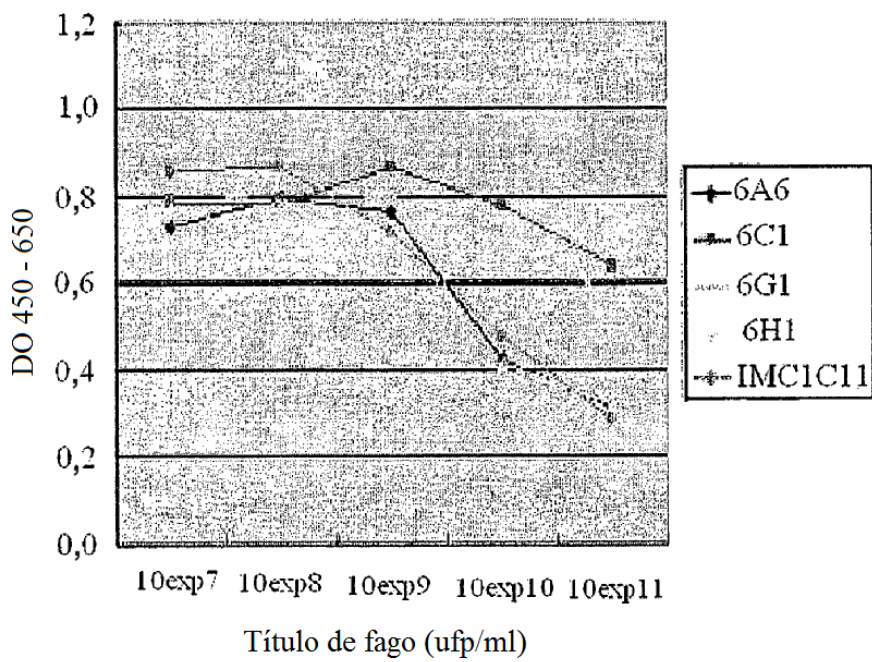


FIG. 5

1	atg aaa tac cta ttg cct acg gca gcc got gga ttg tta tta ctc	45
1	Met Lys Tyr Leu Leu Pro Thr Ala Ala Ala Gly Leu Leu Leu Leu	15
	<u>Lider</u> → SH1	
46	gag gcc cag ccg gcc atg gcc cag atg gag ctg glg cag tcl ggg	90
16	Ala Ala Gln Pro Ala Met Ala Gln Met Gln Leu Val Gln Ser Gly	30
	<u>VH</u> →	
91	gct gaa gtg aag aag cct ggg got tca gtg aag ctg tcc tgc aag	135
31	Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala Ser Val Lys Leu Ser Cys Lys	45
136	gcc tcl gcc cac acc ttc agc agc tcc tgg atg cac tgg glg ccg	180
46	Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Ser Ser Tyr Trp Met His Trp Val Arg	60
	<u>CDR1</u>	
181	cag gcc cct gga caa ccg ctt gag tgg atg gga gag att aat cct	225
61	Gln Ala Pro Gly Gln Arg Leu Glu Trp Met Gly Glu Ile Asn Pro	75
226	ggo aac ggt cat act aac tac aac gag aag ttc aag tca ccg ctg	270
76	Gly Asn Gly His Thr Asn Tyr Asn Glu Lys Phe Lys Ser Arg Val	90
	<u>CDR2</u>	
271	aca atc aot gta gac aaa tcc gog agc aca gcc tac atg gag ctc	315
91	Thr Ile Thr Val Asp Lys Ser Ala Ser Thr Ala Tyr Met Glu Leu	105
316	agc agc ctg aga tct gag gac acg gcc gtg tat tac tgt gcg aaa	360
106	Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Lys	120
361	att tgg gcc ccg agt ctt act tct ccc ttt gac tac tgg gcc cag	405
121	Ile Trp Gly Pro Ser Leu Thr Ser Pro Phe Asp Tyr Trp Gly Gln	135
	<u>CDR3</u>	
406	gga acc ctg gtc acc gtc tcc tca ggc ctc SH1	450
136	Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Leu Gly Gly Leu Gly Gly	150
	SH1	
451	gga ggt agt gcc gga gga gcc tcc ggt gga tcc agc ggt gtg ggt	495
151	Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Ser Ser Gly Val Gly	165
496	tcc aat ttt atg ctg aot cag ccc ccc tca gtg tca gtg tcc cca	540
166	Ser Asn Phe Met Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Val Ser Pro	180
	<u>VH</u> →	
541	gga aag acg gcc agg atc ach tgl agg gca gat aac ctt gga gat	585
181	Gly Lys Thr Ala Arg Ile Thr Cys Arg Gly Asp Asn Leu Gly Asp	195
586	gta aat gtt cac tgg tac cag cag egg cca ggc cag gcc cct gta	630
196	Val Asn Val His Trp Tyr Gln Gln Arg Pro Gly Gln Ala Pro Val	210
	<u>CDR1</u>	
631	tte gto atc tcl tcl gat gcc gac ccg ccc tca ggg ato cct gag	675
211	Leu Val Met Tyr Tyr Asp Ala Asp Arg Pro Ser Gly Ile Pro Glu	225
	<u>CDR2</u>	
676	oga tto tot ggc tcc aac tot ggg aac aag gcc aca ctg acc atc	720
226	Arg Phe Ser Gly Ser Asn Ser Gly Asn Thr Ala Thr Leu Thr Ile	240
721	agc gga gtc gaa gcc ggg gat gag gcc gao tao tat tgt ccg gtg	765
241	Ser Gly Val Glu Ala Gly Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Val	255
766	tgg gat agg act agt gag tat gtc ttc gga act ggg acc aag gtc	810
256	Trp Asp Arg Thr Ser Glu Tyr Val Phe Gly Thr Gly Thr Lys Val	270
	<u>CDR3</u>	
811	acc gtc cta ggt gga gga gcc agc ctc SH1	855
271	Thr Val Leu Gly Gly Gly Ala Ser Leu Val Glu Phe Glu Gln Lys	285
	SH1	
856	ctg atc tct gag gaa gac ctg tga	879
286	Leu Ile Ser Glu Glu Asp Leu *	292
	<u>MarCADor de MvC</u> →	

Ambar

FIG. 6

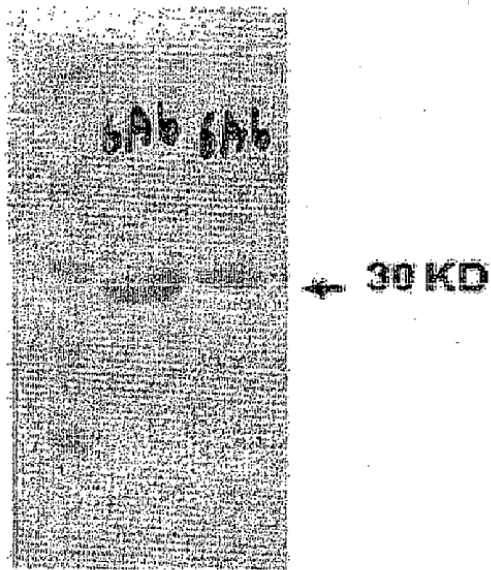


FIG. 7

Ensayo de competición de ScFv anti-KDR

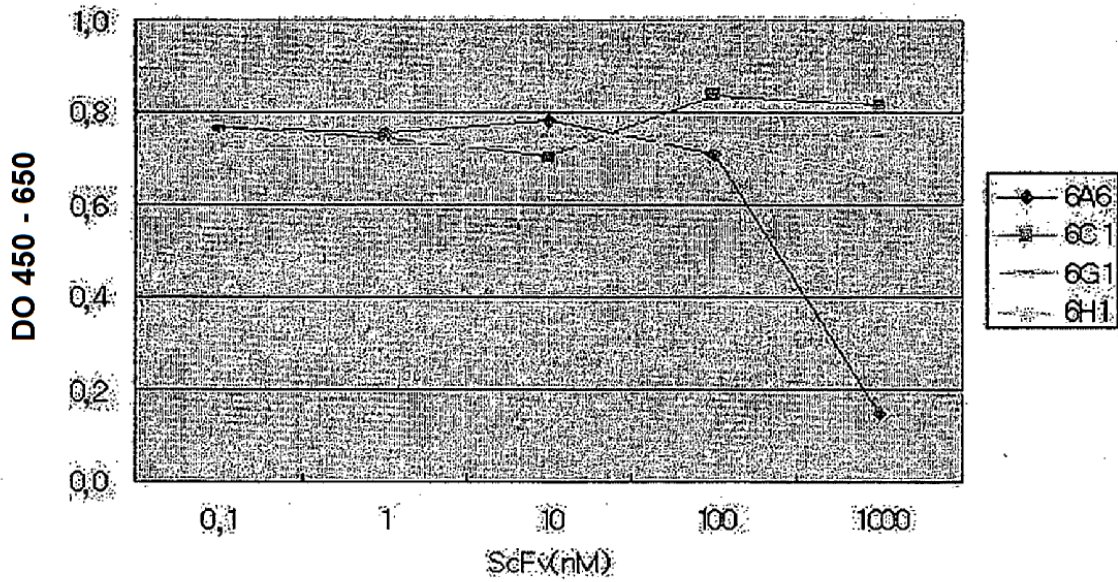


FIG. 8

mapeo de epitopos

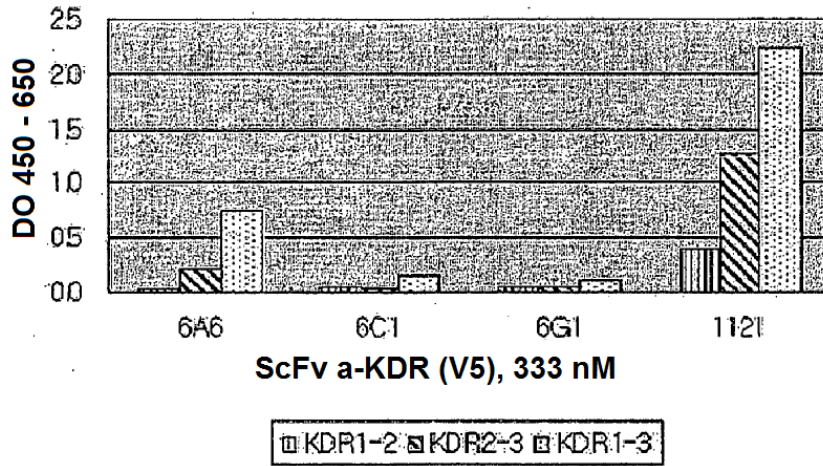


FIG. 9

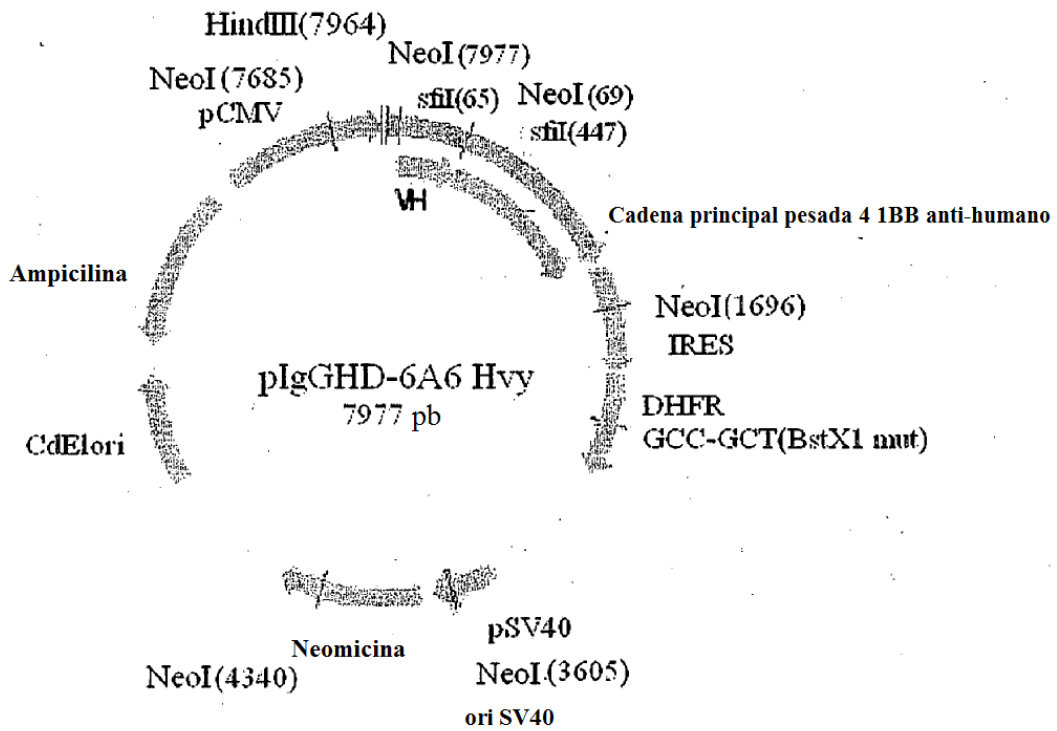


FIG. 10

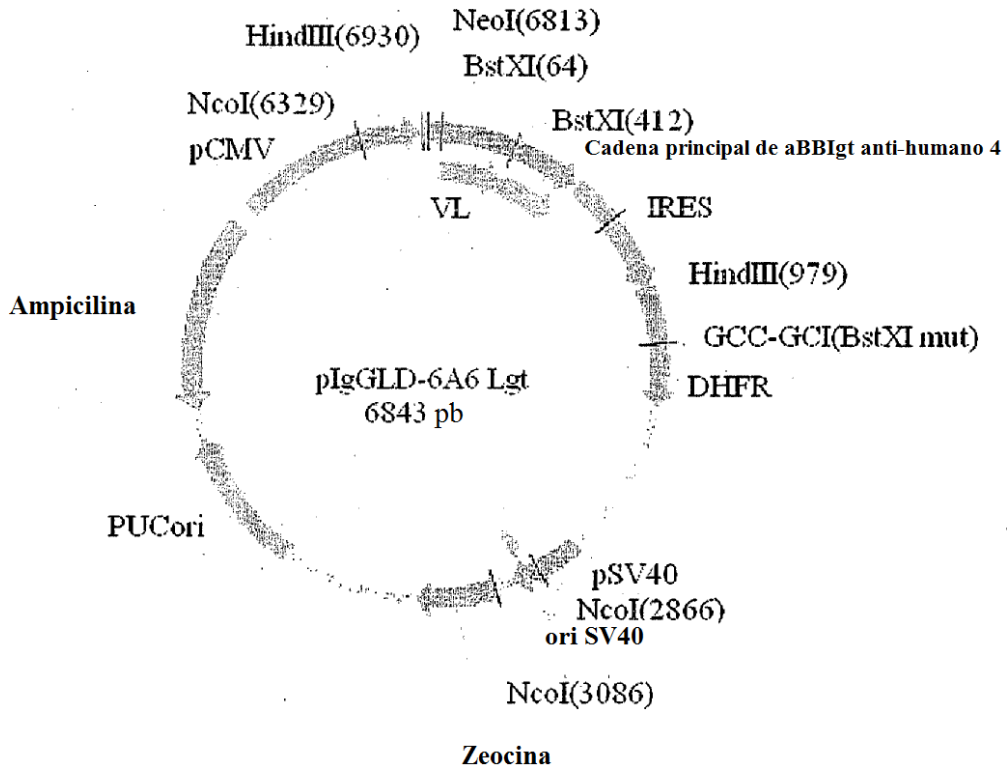


FIG. 11

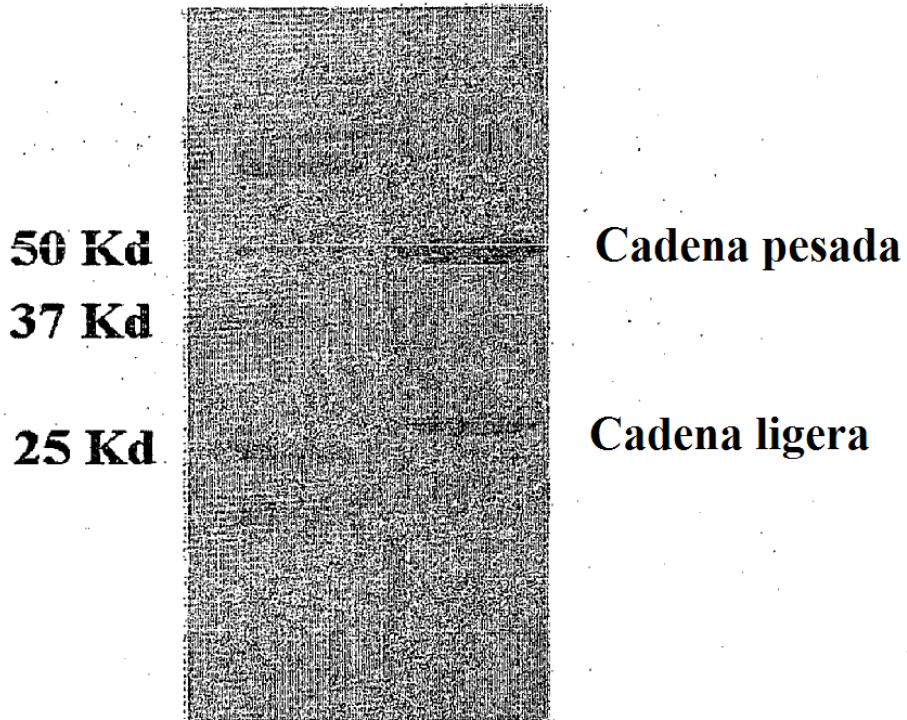


FIG. 12

Competición de IgG a-KDR

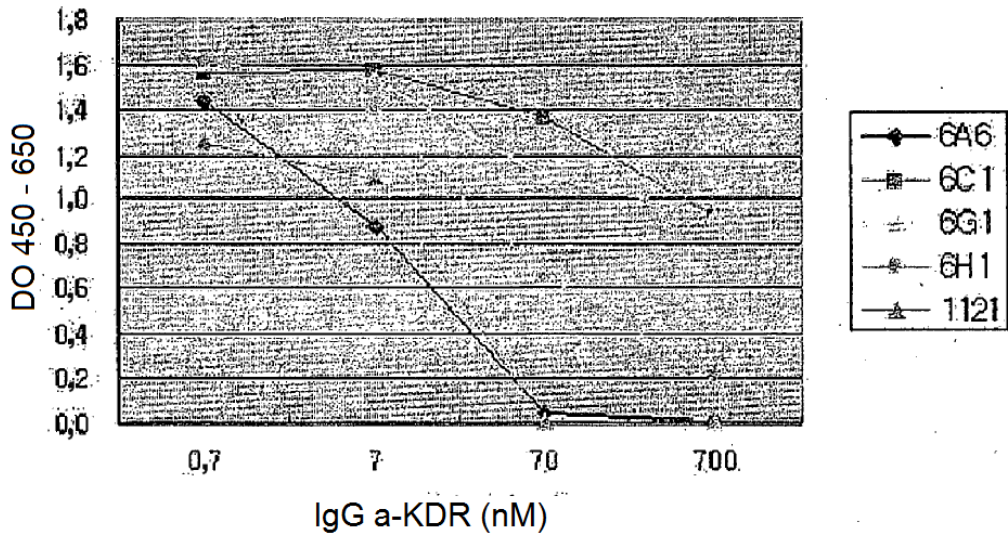


FIG. 13

Ensayo de competición de IgC 6A6

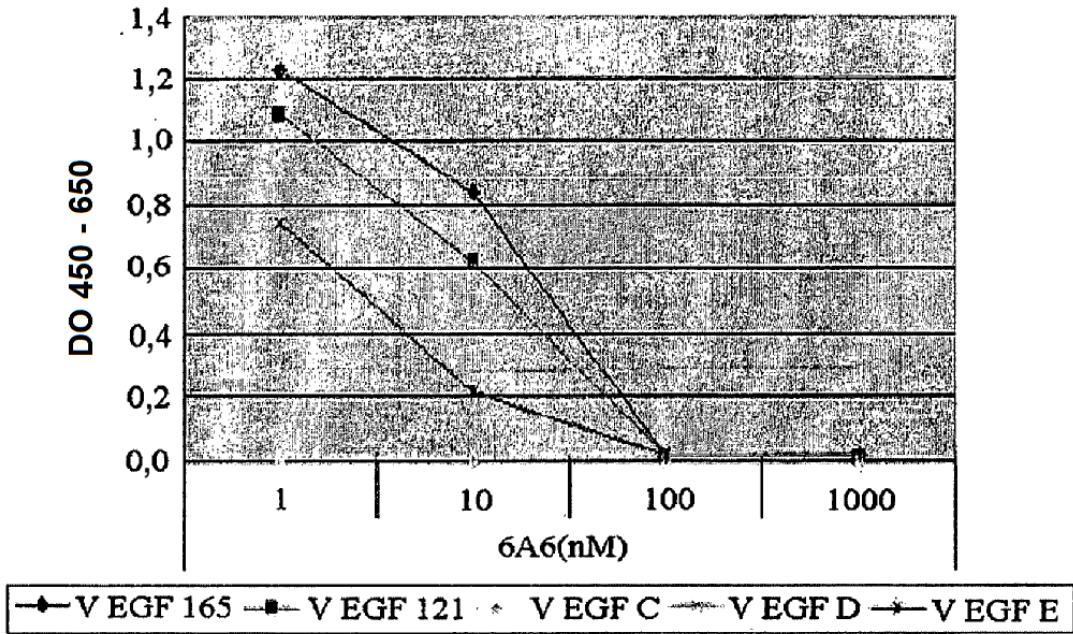


FIG. 14

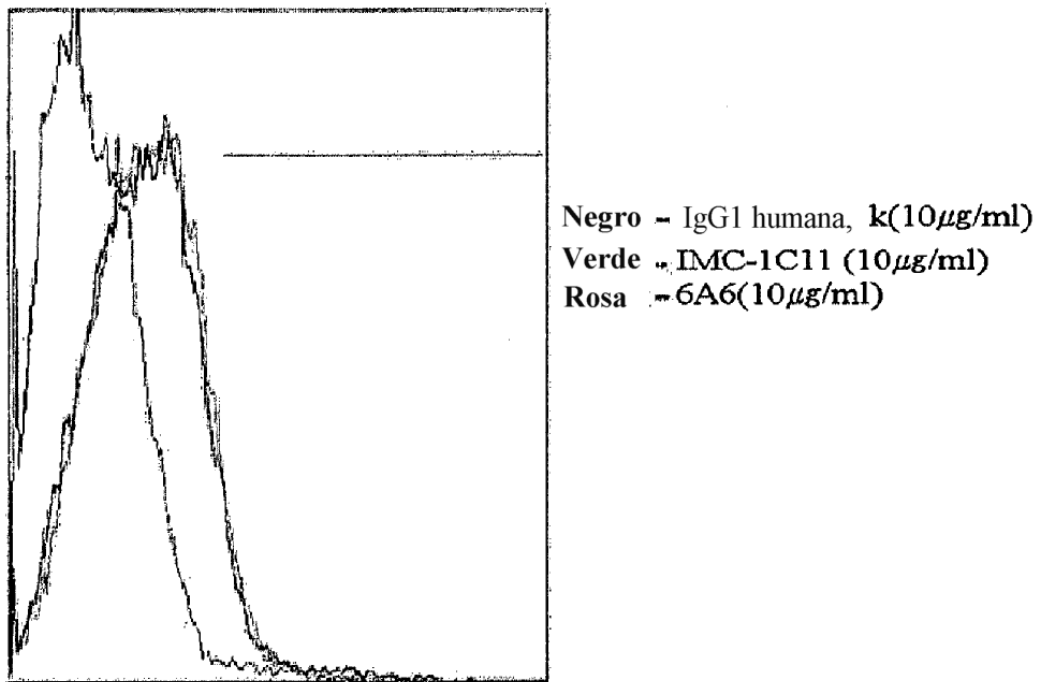


FIG. 15
Expresión de KDR en HUVEC

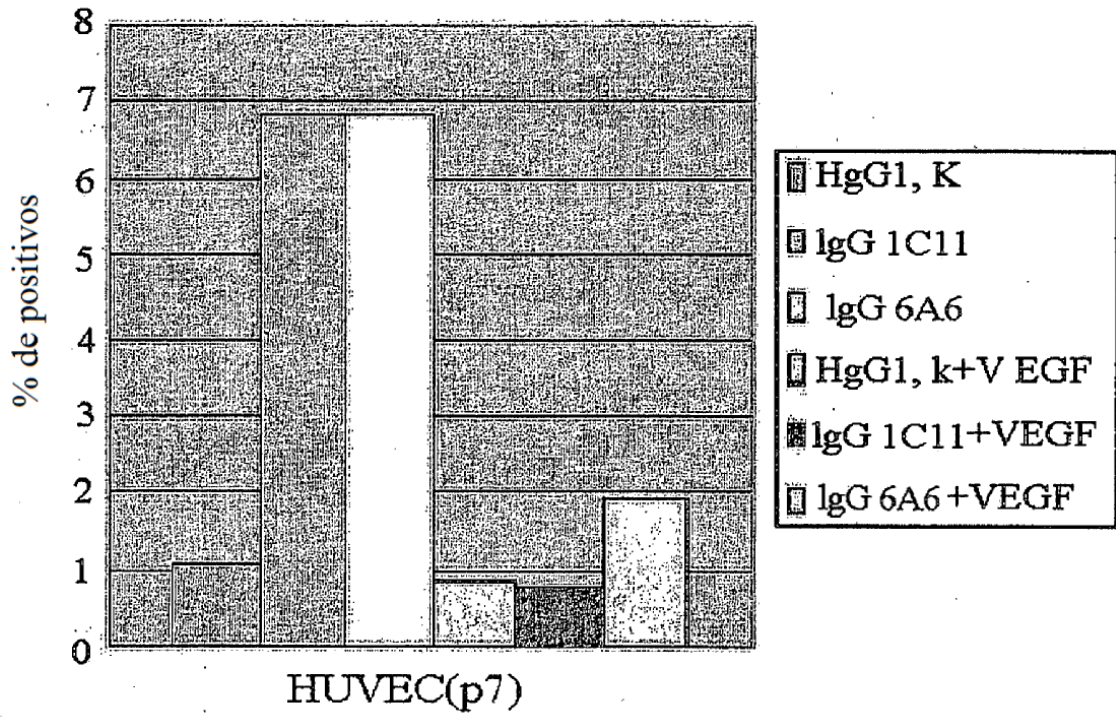


FIG. 16

HV HL60 K562 HV HL60 K562
Con suero **Sin suero**

FIG. 17

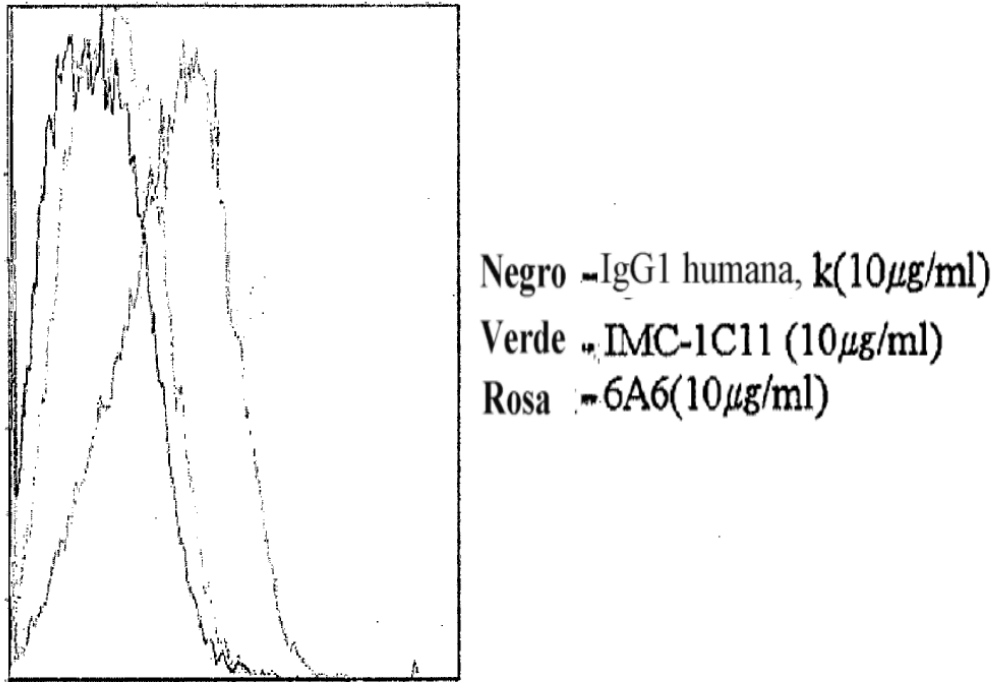


FIG. 18

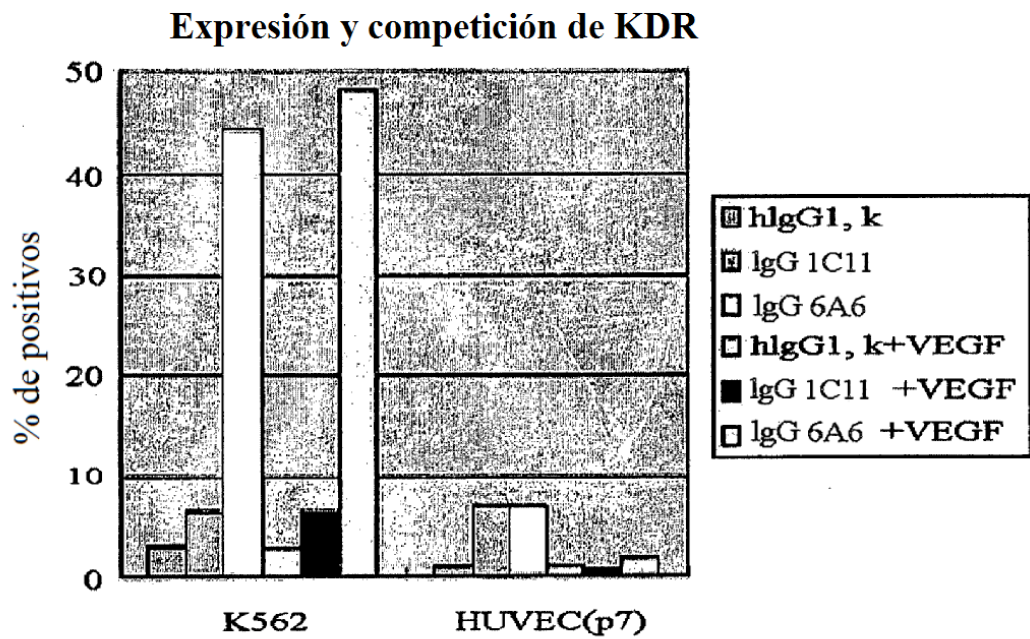


FIG. 19

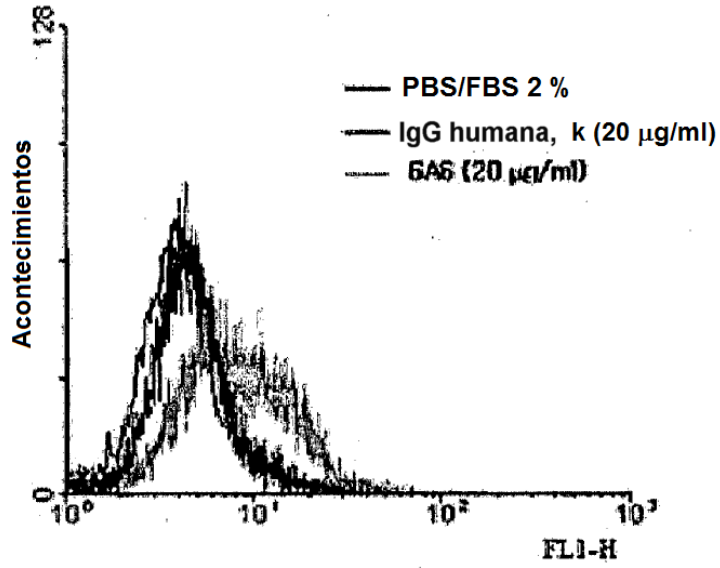


FIG. 20

Inhibición de la proliferación de HUVEC

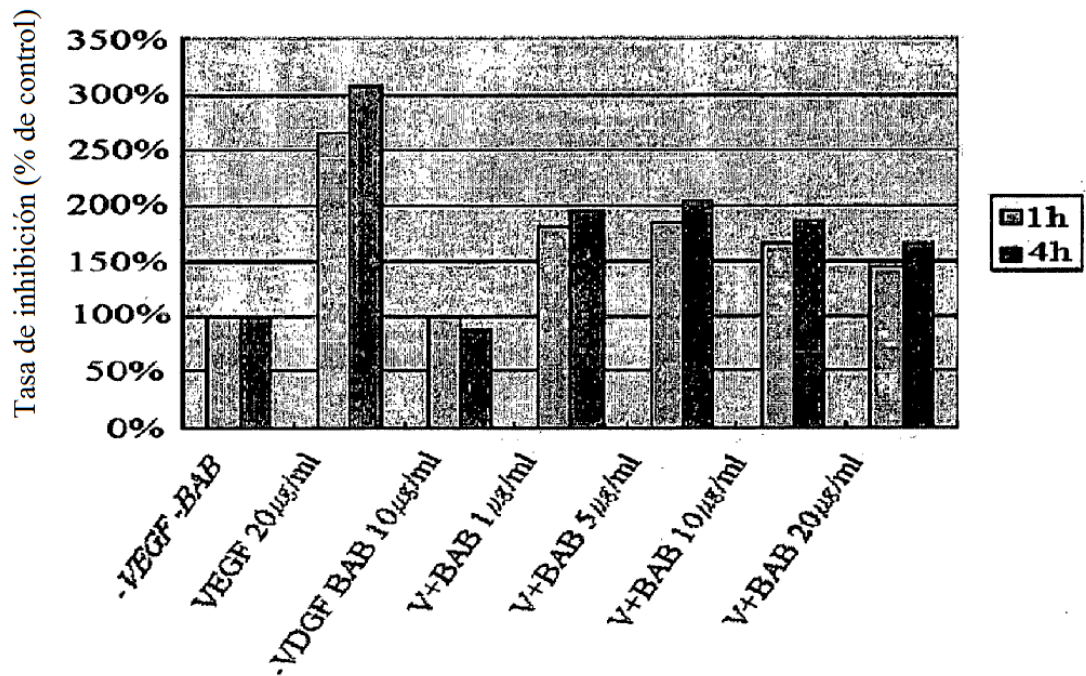


FIG. 21

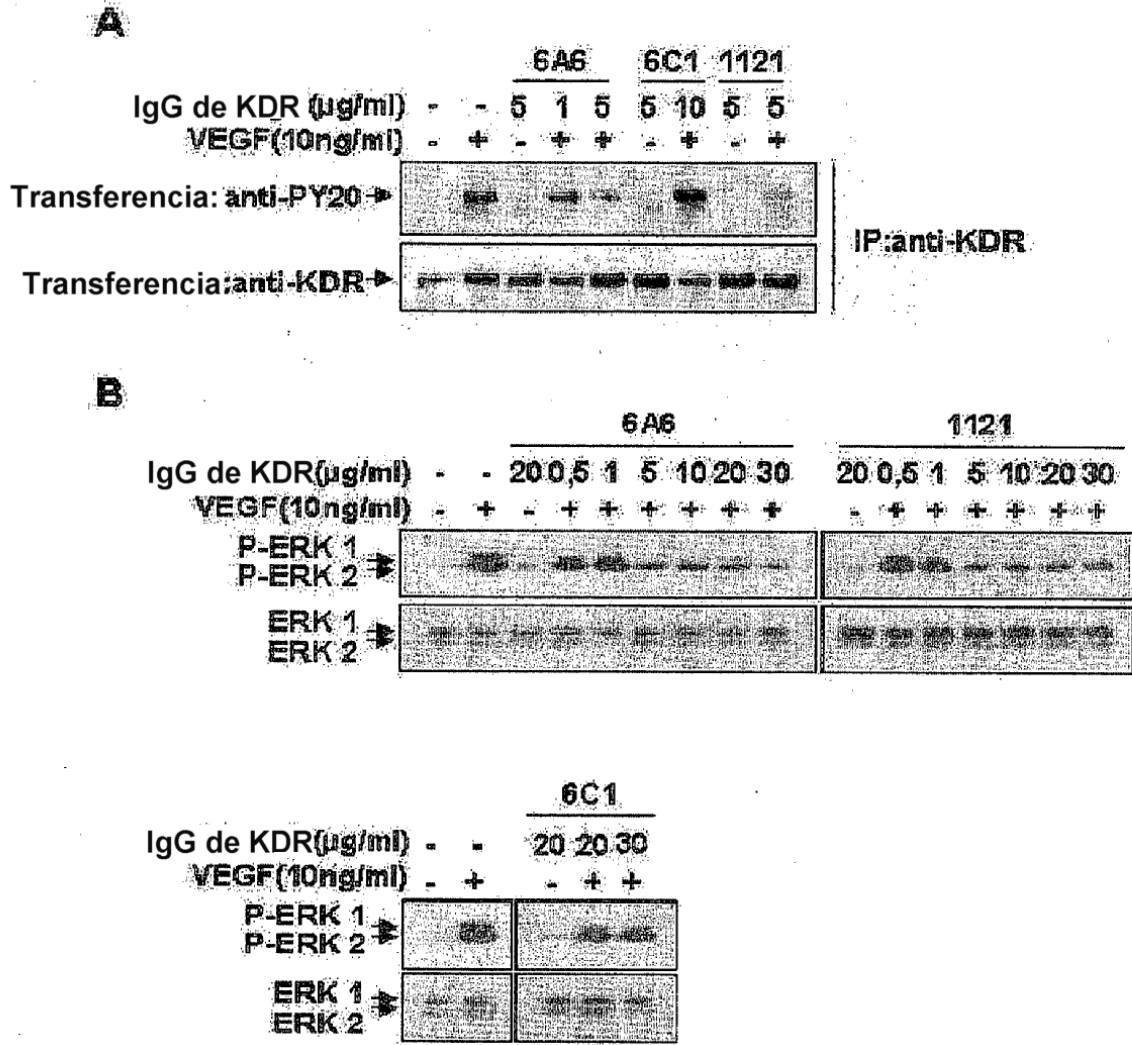


FIG. 22

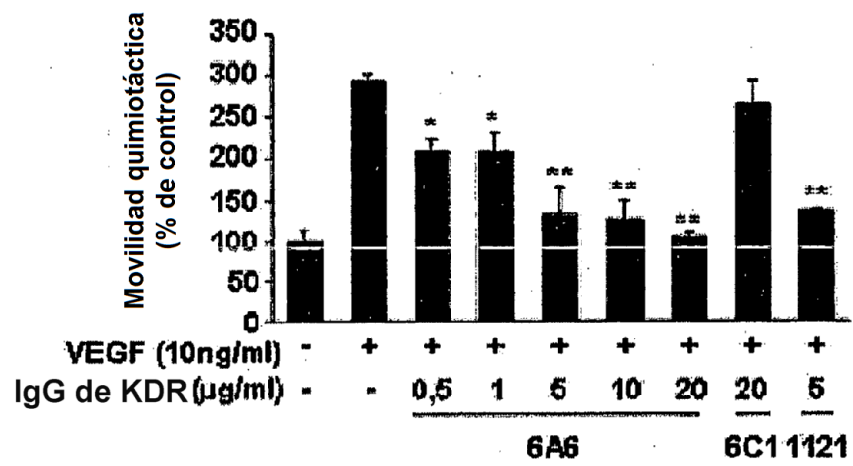
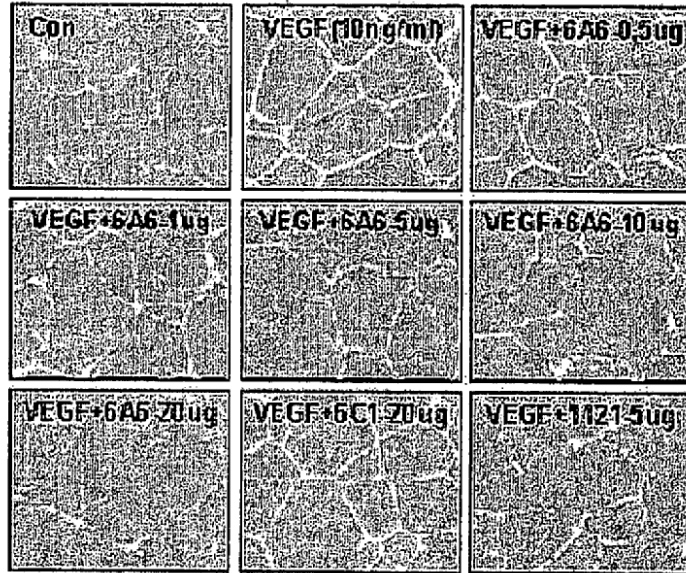


FIG. 23

A



B

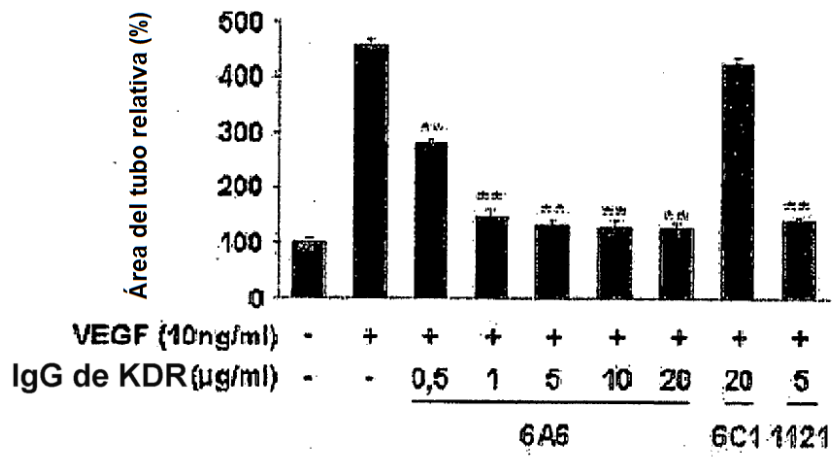
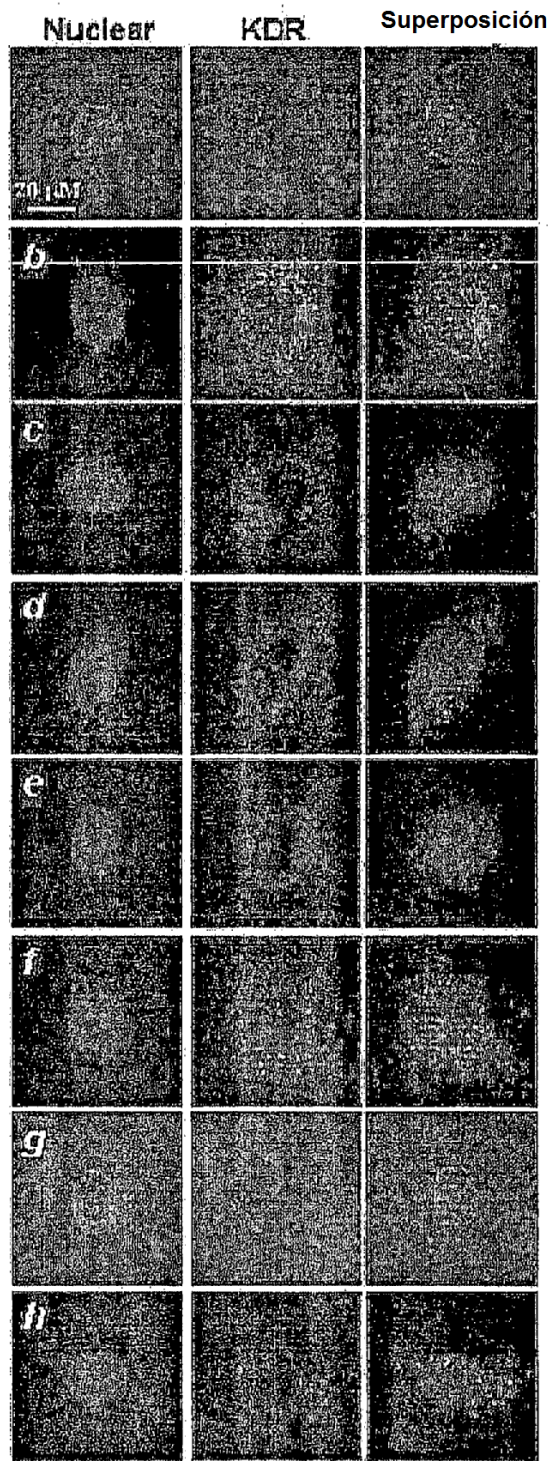


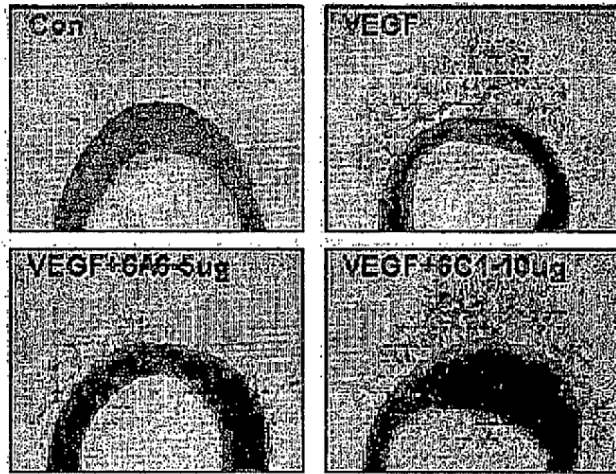
FIG. 24



a; CON, b; VEGF, c; 6A6,
d; VEGF+6A6, e; 6G1, f; VEGF+6G1
g; 1C11, h; VEGF+1C11

FIG. 25

A



B

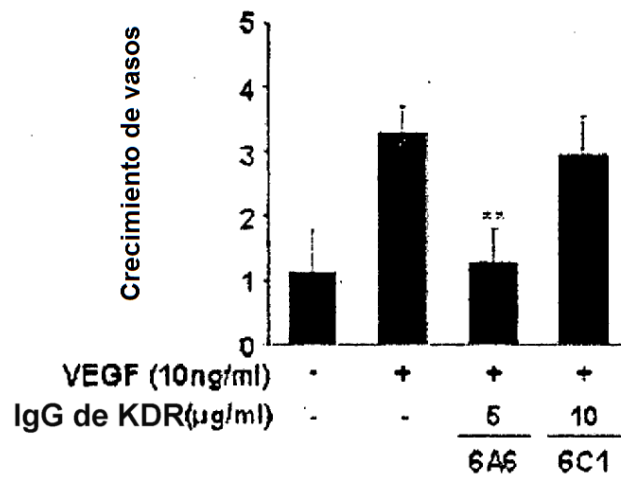
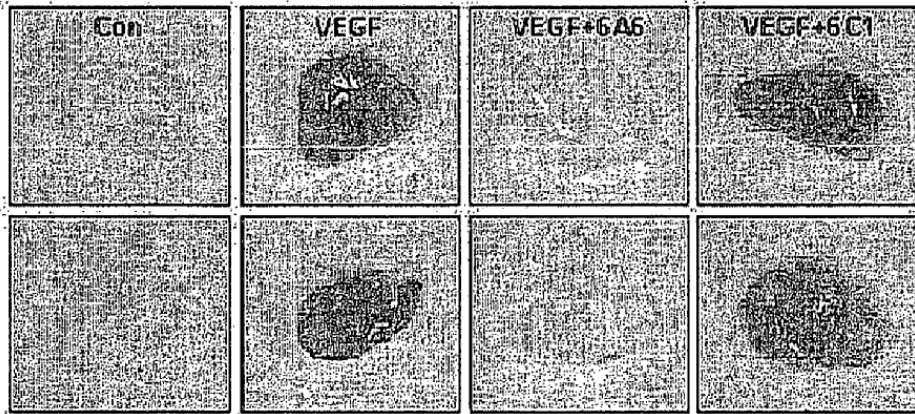


FIG. 26

A



B

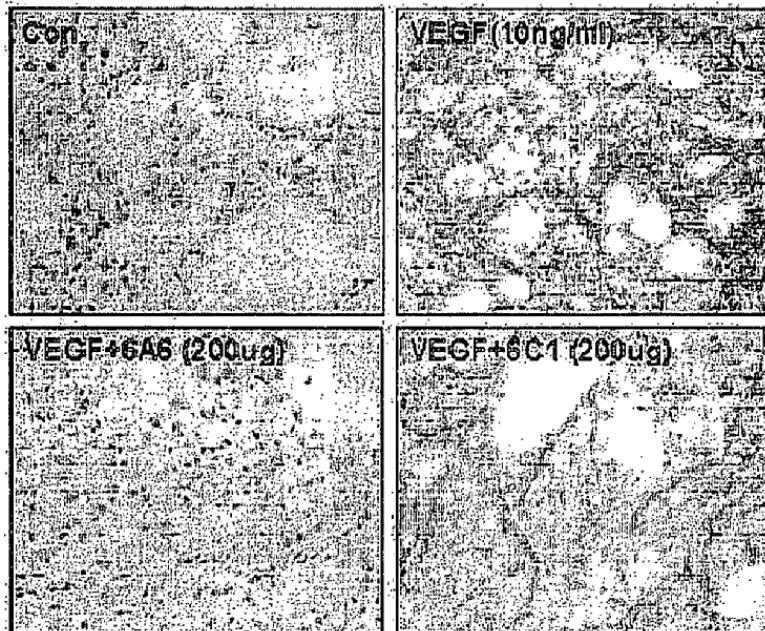


FIG. 27

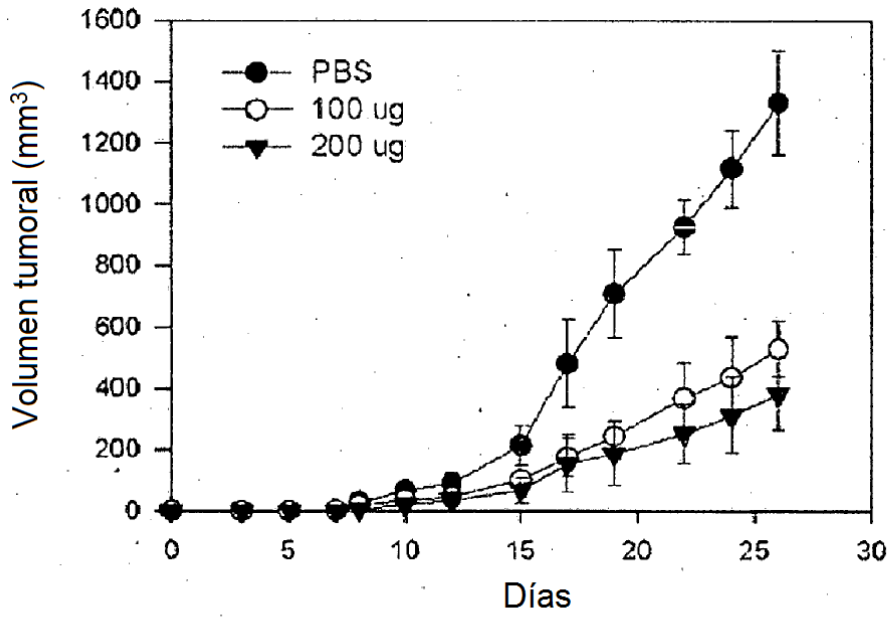


FIG. 28

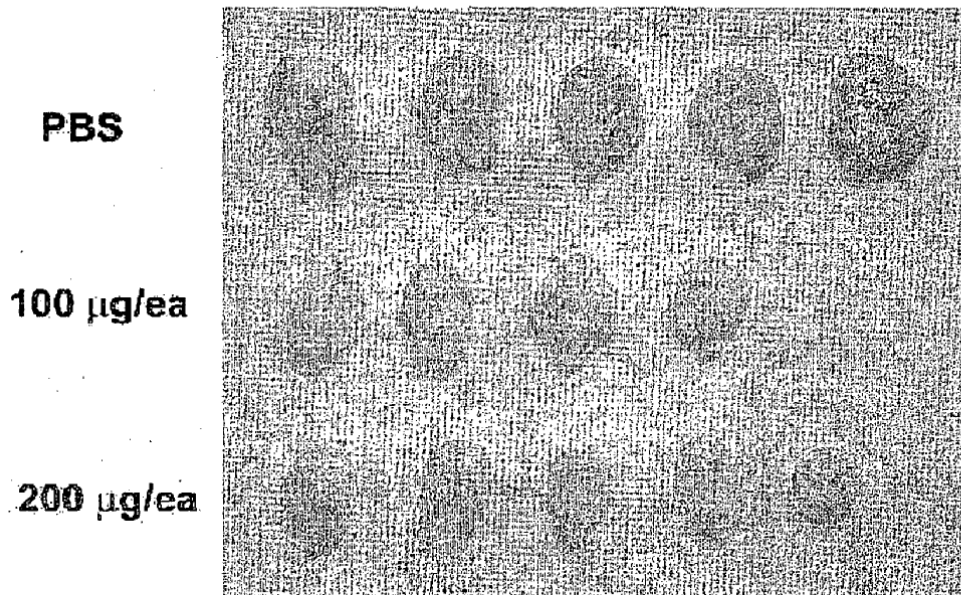


FIG. 29

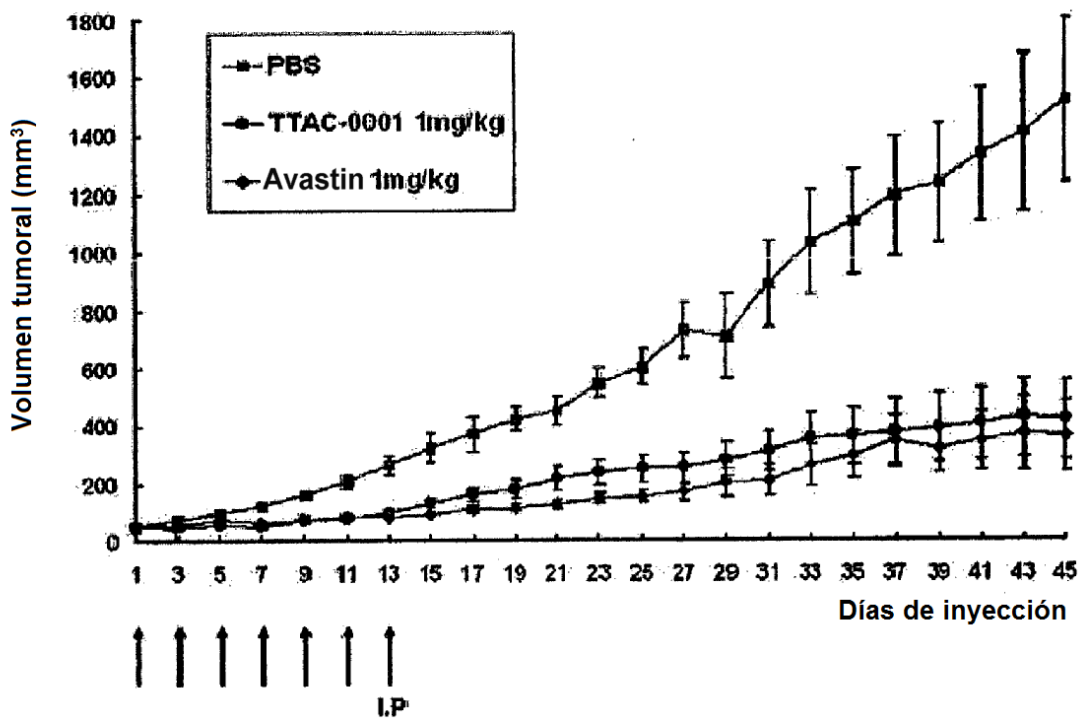


FIG. 30

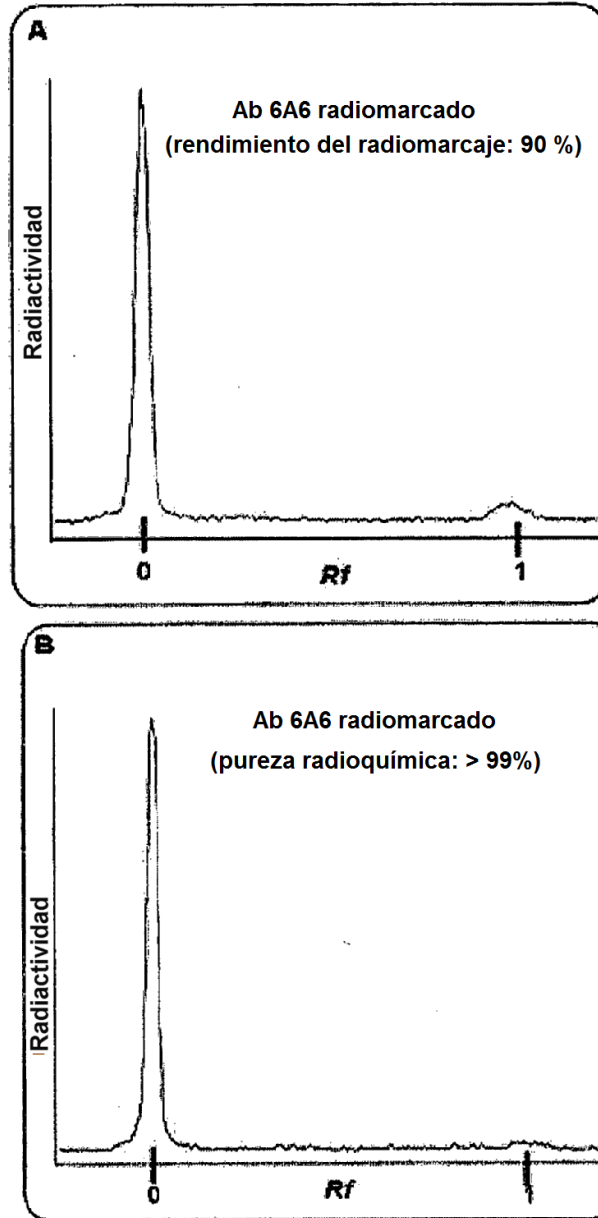


FIG. 31

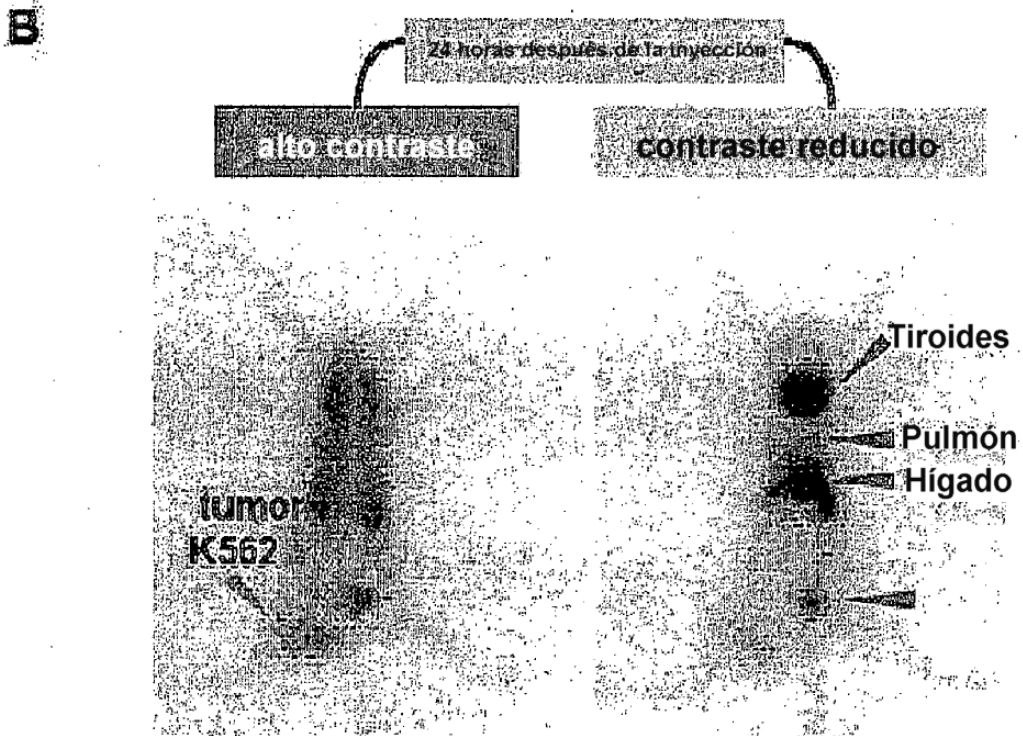
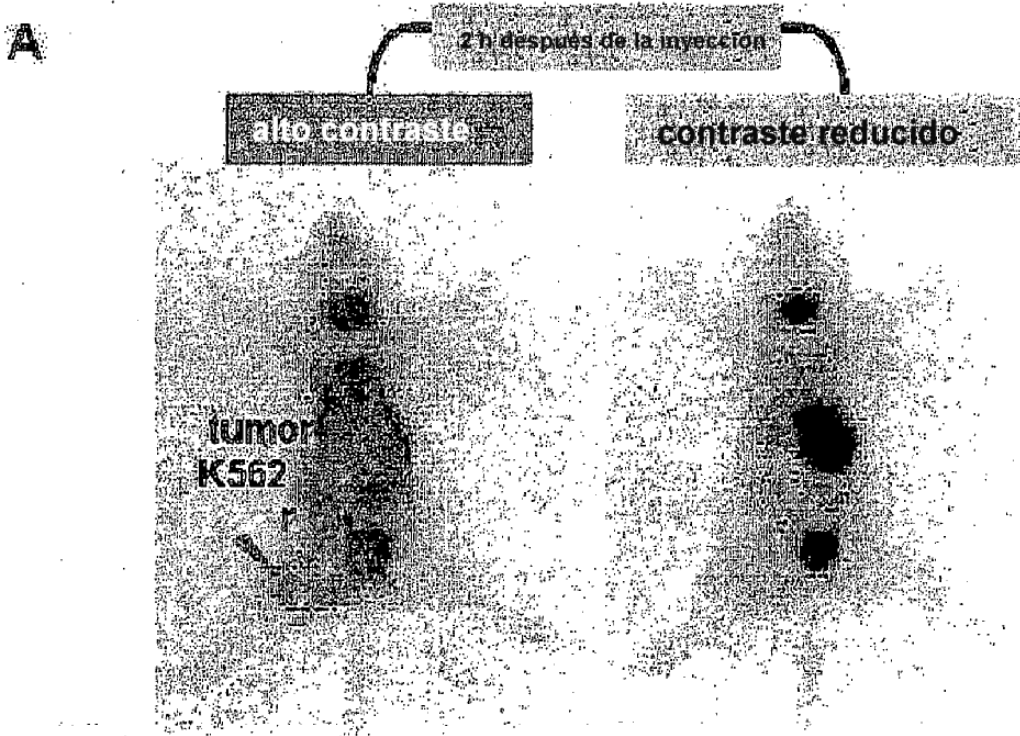


FIG. 32

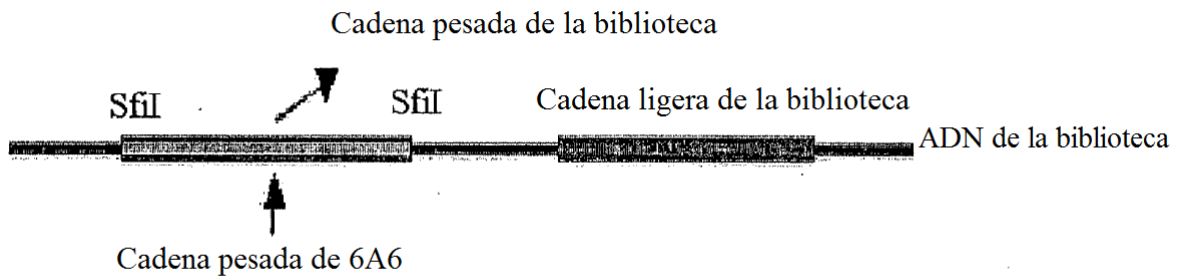


FIG. 33

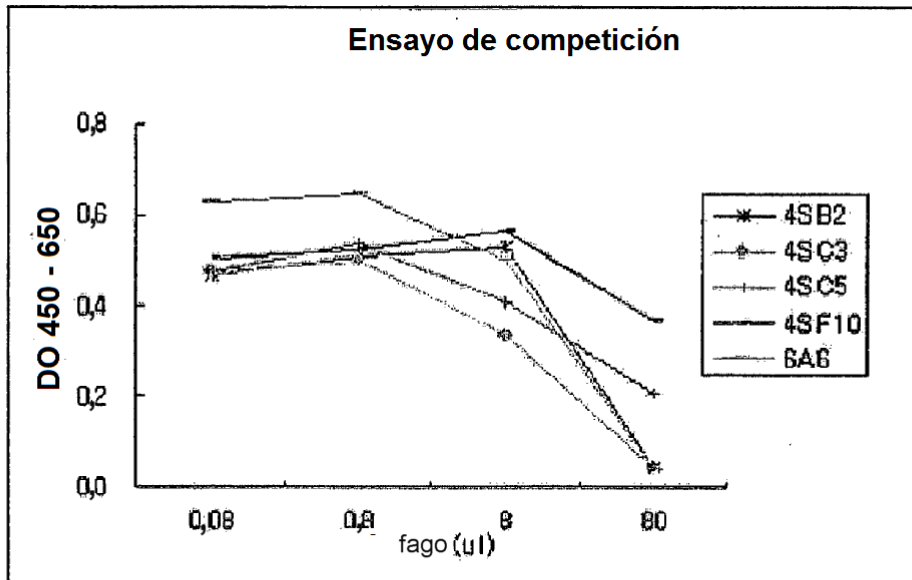


FIG. 34

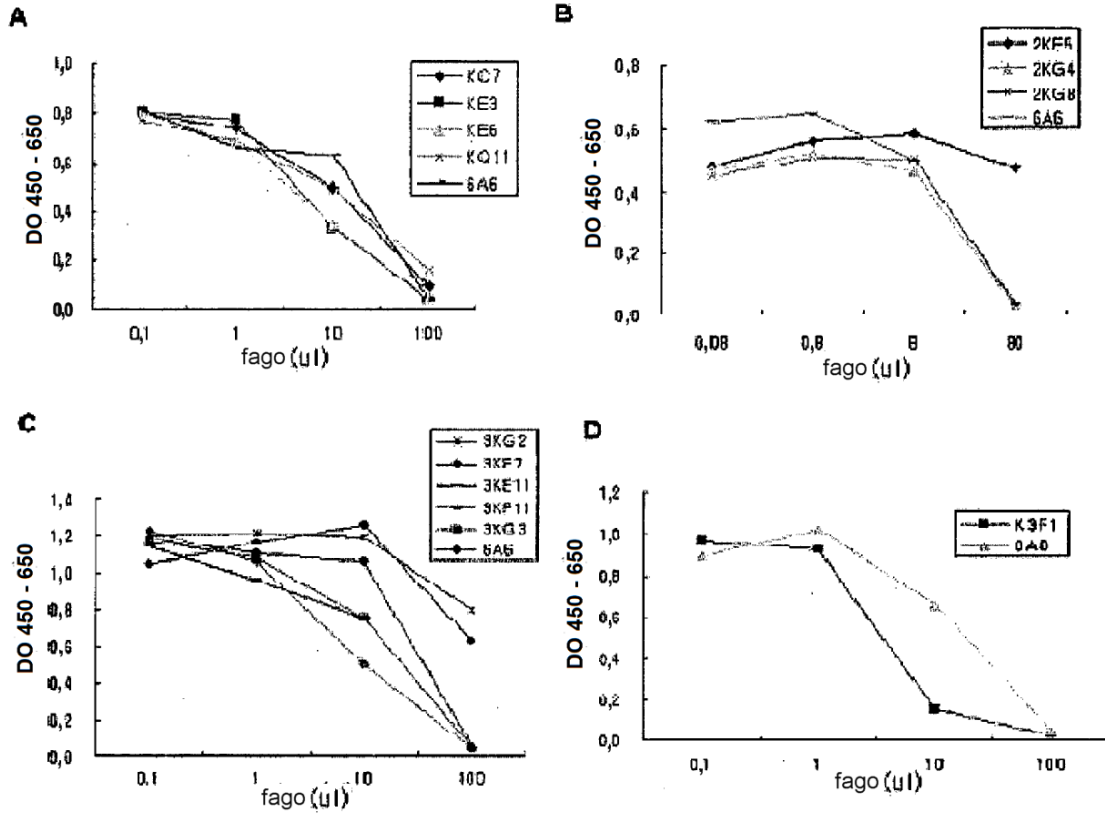


FIG. 35

