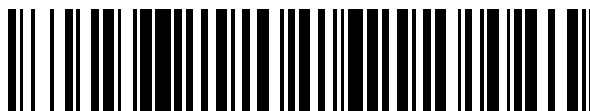


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 456 296**

51 Int. Cl.:

**A61K 39/395** (2006.01)

**A61P 35/00** (2006.01)

**C07K 16/22** (2006.01)

**C07K 16/28** (2006.01)

12

## TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **27.03.2009 E 09724060 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **26.02.2014 EP 2274008**

54 Título: **Composiciones y procedimientos para inhibir PDGFR beta y VEGF-A**

30 Prioridad:

**27.03.2008 US 40068 P**

**14.01.2009 US 144547 P**

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

**21.04.2014**

73 Titular/es:

**ZYMOGENETICS, INC. (100.0%)**

**1201 Eastlake Avenue East  
Seattle, Washington 98102, US**

72 Inventor/es:

**SIVAKUMAR, PALLAVUR V.;**

**GILBERTSON, DEBRA G.;**

**SNAVELY, MARSHALL D.;**

**MABRY, GEORGE R.;**

**YI, EUGENE C.;**

**YAO, YUE y**

**PRESNELL, SCOTT R.**

74 Agente/Representante:

**CARPINTERO LÓPEZ, Mario**

ES 2 456 296 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

Composiciones y procedimientos para inhibir PDGFR beta y VEGF-A

**Antecedentes de la invención****1. Angiogénesis**

La angiogénesis, también llamada neovascularización, implica la formación de brotes desde vasos sanguíneos preexistentes y su invasión en el tejido adyacente. Durante la angiogénesis, las células del endotelio vascular vuelven a entrar en el ciclo celular, degradan la membrana basal subyacente, y migran para formar nuevos brotes capilares. Estas células después se diferencian, y se forman vasos maduros. Este proceso de crecimiento y diferenciación está regulado por un equilibrio de factores pro-angiogénicos y anti-angiogénicos. Un proceso relacionado, la vasculogénesis, implica la diferenciación de células endoteliales y angioblastos que ya están presentes en todo un tejido, y su posterior unión para formar vasos sanguíneos.

La angiogénesis sucede de forma extensiva durante el desarrollo, y también sucede en el organismo sano durante la curación de heridas para restaurar el flujo sanguíneo a los tejidos después de lesión o herida. La angiogénesis, sin embargo, también se ha implicado en el desarrollo de ciertas enfermedades, incluyendo cáncer y formación de tumores. De hecho, la cantidad de vasos sanguíneos en un tejido tumoral es un fuerte indicador pronóstico negativo en cáncer de mama (Weidner y col., J. Natl. Cancer Inst. 84:1875-1887, 1992), cáncer de próstata (Weidner y col., Am. J. Pathol. 143:401-409, 1993), tumores cerebrales (Li y col., Lancet 344:82-86, 1994), y melanoma (Foss y col., Cancer Res. 56:2900-2903, 1996). La angiogénesis también se ha implicado recientemente en otras patologías en muchas áreas de medicina, incluyendo reumatología, dermatología, cardiología y oftalmología. En particular, la angiogénesis específica de tejido indeseable o patológica se ha asociado con ciertas patologías específicas incluyendo, por ejemplo, artritis reumatoide, aterosclerosis, psoriasis, retinopatía diabética, y degeneración macular. (Véase, por ejemplo, Fan y col., Trends Pharmacol. Sci. 16:57, 1995; Folkman, Nature Med. 1:27, 1995.) Además, se cree que la alteración de la permeabilidad vascular desempeña una tarea en procesos fisiológicos tanto normales como patológicos (Cullinan-Bove y col., Endocrinol. 133:829, 1993; Senger y col., Cancer and Metastasis Reviews 12:303, 1993). Aunque el proceso angiogénico en cada una de estas enfermedades probablemente comparte muchas características con la angiogénesis del desarrollo y la angiogénesis tumoral, cada uno también puede tener aspectos únicos conferidos por la influencia de las células adyacentes.

Se han identificado múltiples mediadores moleculares de angiogénesis incluyendo factores de crecimiento de fibroblastos básicos y ácidos (aFGF, bFGF), factores de crecimiento transformante alfa y beta (TGF $\alpha$ , TGF $\beta$ ), factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), angiogenina, factor de crecimiento de células endoteliales derivado de plaquetas (PD-ECGF), interleuquina-8 (IL-8), y factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF). Otros estimuladores implicados en la angiogénesis incluyen angiopoietina-1, Del-1, folistatina, factor estimulador de colonias de granulocitos (G-CSF), factor de crecimiento de hepatocitos (HGF), leptina, midquina, factor de crecimiento placentario, pleiotrofina (PTN), progranulina, proliferina, y factor de necrosis tumoral-alfa (TNF-alfa). Además, el control de la angiogénesis está mediado adicionalmente por varios reguladores negativos de la angiogénesis producidos por el organismo incluyendo angioarrestina, angiostatina (fragmento de plasminógeno), antitrombina III antiangiogénica, inhibidor derivado de cartílago (CDI), fragmento del complemento CD59, endostatina (fragmento de colágeno XVIII), fragmento de fibronectina, gro-beta, heparinasas, fragmento de heparina hexasacárido, gonadotropina coriónica humana (hCG), interferón alfa/beta/gamma, proteína inducible por interferón (IP-10), interleuquina-12, dominio kringle 5 (fragmento de plasminógeno), inhibidores de metaloproteína (TIMP), 2-metoxiestradiol, inhibidor de ribonucleasa placentaria, inhibidor del activador de plasminógeno, factor plaquetario-4 (PF4), fragmento de 16 kD de prolactina, proteína relacionada con proliferina (PRP), retinoides, tetrahydrocortisol-S, trombospondina-1 (TSP-1), vasculostatina, y vasostatina (fragmento de calreticulina).

Entre estos reguladores angiogénicos, parece que VEGF desempeña una tarea clave como regulador positivo de la angiogénesis anormal que acompaña al crecimiento tumoral (revisado en Brown y col., Control of Angiogenesis (Goldberg y Rosen, eds., 1996); Birkhauser y col., J. Biol. Chem. 271:603-606, 1996). Además, recientemente a estado en investigación el papel de la familia de PDGF de moléculas de señalización, ya que parece que desempeña una tarea en la formación, expansión y función apropiada de las células perivasculares, a veces mencionadas como células murales, por ejemplo, músculo liso vascular, células mesangiales, y pericitos.

**II. VEGF-A**

El VEGF-A (secuencias polinucleotídica y polipeptídica mostradas en las SEC ID N<sup>o</sup> 1 y 2, respectivamente) es una glucoproteína homodimérica unida por disulfuro, secretada que pertenece al grupo de VEGF/PDGF (factor de crecimiento derivado de plaquetas) de la superfamilia de nudo de cistina de hormonas y moléculas de señalización extracelular (véase, Vitt y col., Mol. Endocrinol., 15:681-694, 2001), que se caracterizan todas por la presencia de ocho restos conservados de cisteína que forman la estructura típica de nudo de cistina (llamado después cistina, un dímero de dos cisteínas unidas por un enlace disulfuro). Se han descrito cinco isoformas humanas de VEGF-A de 121, 145, 165, 189 ó 206 aminoácidos de longitud (VEGF-A<sub>121-206</sub>), codificadas por distintas variantes de corte y ajuste del ARNm, todas las cuales son capaces de estimular la mitogénesis en células endoteliales. Estas isoformas

difieren en actividad biológica, especificidad de receptor, y afinidad por proteoglicanos de heparán-sulfato asociados a superficie celular y matriz extracelular, que se comportan como receptores de baja afinidad para VEGF-A: VEGF-A<sub>121</sub> no se une ni a heparina ni a heparán-sulfato; VEGF-A<sub>145</sub> y VEGF-A<sub>165</sub> (Nº Acc. GenBank M32977) son ambas capaces de unirse a heparina; y VEGF-A<sub>189</sub> y VEGF-A<sub>206</sub> muestran la mayor afinidad por heparina y heparán-sulfato. VEGF-A<sub>121</sub>, VEGF-A<sub>145</sub>, y VEGF-A<sub>165</sub> se secretan en forma soluble, aunque la mayor parte de VEGF-A<sub>165</sub> está confinada a proteoglicanos de superficie celular y matriz extracelular, mientras que VEGF-A<sub>189</sub> y VEGF-A<sub>206</sub> permanecen asociadas con la matriz extracelular. Tanto VEGF-A<sub>189</sub> y VEGF-A<sub>206</sub> pueden liberarse por tratamiento con heparina o heparinasa, lo que indica que estas isoformas están unidas a la matriz extracelular mediante proteoglicanos. VEGF-A<sub>189</sub> unido a células también puede escindirse mediante proteasas tales como plasmina, provocando la liberación de un VEGF-A<sub>110</sub> soluble activo.

Se observa que la mayoría de los tejidos que expresan VEGF-A expresan varias isoformas de VEGF-A simultáneamente, aunque VEGF-A<sub>121</sub> y VEGF-A<sub>165</sub> son las formas predominantes, mientras que VEGF-A<sub>206</sub> se detecta raramente (véase, Ferrara, J. Mol. Med. 77:527-543, 1999). VEGF-A<sub>145</sub> difiere en que se expresa principalmente en células derivadas de órganos reproductores (véase, Neufeld y col., FASEB J. 13:9-22, 1999). VEGF-A<sub>165</sub> humana, la forma más abundante y biológicamente activa, está glucosilada en Asn74 y normalmente se expresa como un homodímero de 46 kDa de subunidades de 23 kDa.

Se han identificado cuatro receptores de superficie celular que interaccionan con VEGF-A. Éstos incluyen VEGFR-1/Flt-1 (tirosina quinasa-1 tipo fins; Nº Acc. GenBank X51602; De Vries y col., Science 255:989-991, 1992); VEGFR-2/KDR/Flk-1 (receptor que contiene dominio de inserción de quinasa/quinasa hepática fetal-1; Nº Acc. GenBank X59397 (Flk-1) y L04947 (KDR); Terman y col., Biochem. Biophys. Res. Comm. 187:1579-1586, 1992; Matthews y col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88:90269030, 1991); neuropilina-1 (Nº Acc. GenBank NM003873), y neuropilina-2 (Nº Acc. GenBank NM003872). VEGF<sub>121</sub> y VEGF<sub>165</sub> se unen a VEGFR-1; VEGF<sub>121</sub>, VEGF<sub>145</sub>, y VEGF<sub>165</sub> se unen a VEGFR-2; VEGF<sub>165</sub> se une a neuropilina-1; y VEGF<sub>165</sub> y VEGF<sub>145</sub> se unen a neuropilina-2. Véase, por ejemplo, Neufeld y col., FASEB J. 13:9-22, 1999; Stacker y Achen, Growth Factors 17:1-11, 1999; Ortega y col., Fron. Biosci. 4:141-152, 1999; Zachary, Intl. J. Biochem. Cell Bio. 30:1169-1174, 1998; Petrova y col., Exp. Cell Res. 253:117-130, 1999.

La angiogénesis dirigida por VEGF-A tiene un papel principal en la patogénesis de diversas enfermedades humanas, incluyendo cáncer, trastornos oculares, y artritis reumatoide. Véase, Carmeliet y col., Nature 407:249-257, 2000. El reconocimiento de la importancia de VEGF-A para el desarrollo de varias clases importantes de cáncer culminó recientemente en la aprobación de AVASTIN™, un anticuerpo monoclonal humanizado contra VEGF-A, para el tratamiento de cáncer colorrectal metastásico. Véase, Ferrara y col., Nat. Rev. Drug Discov. 2004, 3:391-400, 2004. Asimismo, la importancia de VEGF-A en la patogénesis de trastornos oculares neovasculares se refleja en la reciente aprobación de LUCENTIS™, un fragmento de anticuerpo monoclonal humanizado, para el tratamiento de degeneración macular relacionada con la edad (AMD) neovascular (húmeda).

### III. PDGFRβ

El PDGFRβ (receptor β del factor de crecimiento derivado de plaquetas; secuencias polinucleotídica y polipeptídica mostradas en las SED ID Nº 3 y 4, respectivamente) es uno de dos receptores tirosina quinasa de superficie celular estructuralmente relacionados (PDGFRα y PDGFRβ) que median las actividades biológicas de diversas isoformas del factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF) - PDGF-A, -B, -C, y -D. Los PDGF pertenecen a la familia de PDGF/VEGF (factor de crecimiento del endotelio vascular) que, como se ha indicado anteriormente, se caracteriza por la presencia de ocho restos conservados de cisteína que forman la típica estructura de nudo de cistina. Se sintetizan dos formas de la cadena PDGF-A, que contiene 196 y 211 restos aminoácídicos resultantes de un corte y ajuste diferencial del transcrito, se dimerizan, se procesan proteolíticamente en el extremo N-terminal, y se secretan desde la célula como un dímero de -30 kDa (Bonthron y col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:1492-1496, 1988; Rorsman y col., Mol. Cell. Biol. 8:571-577, 1988). La cadena PDGF-B que codifica 241 restos aminoácídicos se dimeriza, se procesa por proteólisis adicional, y se secreta como un dímero de 24 kDa (Ostman y col., J. Biol. Chem. 263:16202-16208, 1988; Ostman y col., J. Cell. Biol. 118:509519, 1992). Las cadenas A y B son capaces de formar tanto homodímeros como heterodímeros entre sí (PDGF-AA, -BB, y -AB). Las proteínas PDGF-C y -D de longitud completa contienen 345 y 370 restos aminoácídicos respectivamente, y ambas tienen una estructura única de dos dominios con un dominio CUB N-terminal y un dominio PDGF/VEGF C-terminal. Las proformas de PDGF C y D se secretan como un homodímero de aproximadamente 85 kDa después de la escisión de los 22 restos N-terminales del péptido señal. Aunque los PDGF-AA, -BB, y -AB secretados pueden activar fácilmente sus receptores de superficie celular, se requiere la eliminación proteolítica del dominio CUB para que el dominio de factor de crecimiento de los homodímeros PDGF-CC y -DD active los receptores de superficie celular.

Ambos PDGFR (PDGFRα y PDGFRβ) contienen cinco dominios extracelulares tipo inmunoglobulina, un dominio transmembrana, un dominio juxtamembrana, dominios quinasa divididos, un dominio de inserción de quinasa, y una cola citoplásmica. Estos dos receptores comparten una identidad del 31 % en el dominio de unión a ligando, una identidad del 27 % en el dominio de inserción de quinasa y una identidad del 28 % en el extremo C-terminal, mientras que son un 85 % y 75 % idénticos en las dos mitades del dominio de inserción de quinasa (Matsui y col., 1989; Rosenkranz y Kazlauskas, 1999). Los tres receptores diméricos de PDGF (αα, αβ, ββ) median la transducción de señales específica de isoforma de PDGF. PDGF-AA activa de forma eficaz solamente PDGFRαα, PDGF-AB

puede activar PDGFR $\alpha\alpha$  o PDGFR $\alpha\beta$ , mientras que PDGF-BB activa los tres receptores diméricos de PDGF (véase, Claesson-Welsh y col., Mol. Cell. Biol. 8:3476-3486, 1988; Matsui y col., Science 243:800-804, 1989; Claesson-Welsh, J. Biol. Chem. 269, 32023-32026, 1994). El dominio de factor de crecimiento de PDGF-CC activa tanto PDGFR $\alpha\alpha$  como PDGFR $\alpha\beta$ , y el dominio de factor de crecimiento de PDGF-DD activa PDGFR $\beta\beta$  y PDGFR $\alpha\beta$  (véase Li y col., Nature Cell. Biol. 2:302-309, 2000; Bergsten y col., Nature Cell. Biol. 3:512-516, 2001; Gilbertson y col., J. Biol. Chem. 276:27406-27414, 2001; LaRochelle y col., Nat. Cell. Biol. 3:517-521, 2001).

Los PDGF producidos por células endoteliales en los vasos promueven el reclutamiento y la proliferación de células del músculo liso vascular/progenitores de pericitos que expresan PDGFR (Betsholtz y col., 2001). Las actividades quimiotácticas y mitogénicas mediadas por el bucle de señalización paracrina PDGF/PDGFR son cruciales para la formación, ramificación y mantenimiento de los vasos sanguíneos. Como en la embriogénesis, el PDGF desempeña un papel crítico para la angiogénesis en tumores humanos. La angiogénesis tumoral, necesaria para la propagación y metástasis del tumor, es un proceso complejo y altamente regulado que implica muchos tipos celulares y factores extracelulares diferentes. Las células endoteliales y las células del músculo liso son los componentes principales de los vasos sanguíneos, y los miembros de la superfamilia de VEGF/PDGF están entre los mediadores críticos de la angiogénesis tumoral. Estudios clínicos revelaron una correlación entre los recuentos vasculares y la frecuencia de expresión de VEGF y PDGF en tumores (Anan y col., Surgery 119:333-339, 1996). Los PDGF estimulan directa e indirectamente los procesos angiogénicos. El PDGF liberado por las células tumores induce la migración de las células endoteliales y las células del músculo liso vascular (vSMC), y también estimula la proliferación de estas células, lo que sugiere un papel directo de los PDGF en la angiogénesis (Thommen y col., J. Cell. Biochem. 64:403-413, 1997). Los PDGF demostraron inducir la transcripción y secreción de VEGF-A por células endoteliales que expresaban PDGFR $\beta$ , lo que sugiere un papel indirecto para la angiogénesis inducida por PDGF (Wang y col., Cancer Res. 59:1464-1472, 1999). Los PDGF también median el bucle de señalización paracrina entre las células endoteliales y vSMC/pericitos durante procesos angiogénicos tumorales. Aunque PDGF-BB, -AB, y el dominio de factor de crecimiento de PDGF-CC inducen respuestas angiogénicas indistinguibles en ensayos de córnea de ratón, PDGF-AA (que se une a PDGFR $\alpha\alpha$  pero no a PDGFR $\alpha\beta$  o PDGFR $\beta\beta$ ) estimula una respuesta solamente débil (Cao y col., FASEB J. 16:1575-1583, 2002). Esto sugiere que PDGFR $\alpha$  y PDGFR $\beta$  pueden regular de forma diferente los procesos angiogénicos, y apunta a la subunidad PDGFR $\beta$  en particular como un mediador importante de la angiogénesis inducida por PDGF.

La señalización del receptor de PDGF se ha vinculado a diversos procesos en las patologías descritas anteriormente, incluyendo la señalización autocrina del factor de crecimiento en células tumorales, la angiogénesis tumoral y ocular y el reclutamiento de regulación de células estromáticas, concretamente fibroblastos en el tumor, o tejidos de enfermedades oculares. La expresión de casi todos los ligandos de la familia de PDGF en células NIH3T3 conduce a la transformación de la célula en un fenotipo canceroso (Revisado en Ostman y Heldin, Adv in Can Res 97:247-74, 2007). En apoyo a eso, se ha demostrado la co-expresión de diversos ligandos y receptores de PDGF en múltiples enfermedades, incluyendo diversos cánceres (revisado en Ostman Cytokine and Growth Factor Rev 15:275-86, 2004). Además, la activación mutacional de PDGF o receptores de PDGF ahora ha demostrado estar asociada con diferentes neoplasias, incluyendo *dermatofibrosarcoma protuberans* (DFSP), tumores estromáticos gastrointestinales (GIST) y leucemias mieloides crónicas Bcr-Abl-negativas (revisado en Ostman y Heldin, Adv. Cancer Res. 97:247-74, 2007). La familia de PDGF también ha demostrado desempeñar una tarea significativa en la angiogénesis tumoral, especialmente con respecto al reclutamiento de pericitos y células del músculo liso vascular a la vasculatura tumoral y ocular. Se cree que estas células murales (pericitos y células del músculo liso) proporcionan una estructura de apoyo para el crecimiento de células del endotelio vascular. Se ha demostrado que PDGFR $\beta$  es esencial para el reclutamiento de pericitos a la vasculatura tumoral y para la diferenciación de células madre mesenquimáticas en pericitos (Song y col., Nat. Cell Biol. 7:870-79, 2005; Bergers y col., Neuro. Oncol. 7:452-64, 2005). Los antagonistas de PDGFR han demostrado inhibir la angiogénesis no solamente inhibiendo el reclutamiento de pericitos sino también reduciendo el alcance de las células endotelial dentro de los tumores (Bergers y col., J. Clin. Invest. 111:1287-95, 2003). Además, se expresan significativamente PDGF y receptores de PDGF en el estroma de los tumores, concretamente células fibroblásticas dentro de diversos cánceres y múltiples experimentos han demostrado un papel crítico para PDGF-BB y los receptores PDGFR $\beta$  y PDGFR $\alpha$  en el reclutamiento de células estromáticas dentro de los tumores (revisado en Ostman y Heldin, Adv. Cancer Res. 97:247-74, 2007). Una serie de estudios recientes indica una función de estos receptores en el control del transporte transvascular tumoral. Múltiples elementos de prueba apoyan ahora el papel de PDGF y PDGFR en el control de la presión del fluido intersticial (IFP), un parámetro clave que determina el transporte transvascular. La mayoría de los tumores sólidos se caracterizan por una elevada IFP que conduce a una tasa de convección disminuida a través de las paredes capilares y la captación reducida de fármacos (quimioterapia) por los tumores. Los antagonistas del receptor de PDGF han demostrado reducir la IFP del tumor y de este modo permiten una captación aumentada de los fármacos dentro de los tumores, conduciendo a una mejor eficacia anti-tumoral (Pietras y col., Cancer Res. 62:5476-84, 2002; Pietras y col., Cancer Res. 61:2929-34, 2001). Los antagonistas de PDGFR, por lo tanto, proporcionan un procedimiento para inhibir múltiples procesos dentro de la vasculatura tumoral, incluyendo los efectos autocrinos sobre las células tumorales, la angiogénesis y afectando a la IFP mediada por el estroma del tumor. Combinaciones con otros fármacos, concretamente inhibidores anti-angiogénicos como antagonistas de VEGF y/o quimioterapia pueden proporcionar un beneficio adicional a los pacientes de cáncer.

## IV. Inhibición de las vías de VEGF y PDGF

Aunque se han aprobado terapias anti-angiogénicas, incluyendo AVASTINTM, para diversos cánceres (y LUCENTIS™ para AMD), la eficacia es moderada y los pacientes finalmente evolucionan. Un factor limitante de la eficacia es la presencia de otras vías angiogénicas que no se inhiben por estas terapias. En modelos de ratón, se ha demostrado recientemente que se hallan pericitos que expresan PDGFRβ en tumores tratados con antagonistas de VEGF y éstos proporcionan la estructura para que las células endoteliales recién formadas crezcan dentro de los tumores (Mancuso y col., J. Clin. Invest. 116:2610-21, 2006). La inhibición de las vías tanto de VEGF como de PDGFR puede proporcionar inhibición aditiva o sinérgica de la angiogénesis en contextos de enfermedad y, en cáncer, puede proporcionar un suministro potenciado de agentes quimioterapéuticos mediante la normalización de los vasos y la IFP.

Las evidencias científicas apoyan este enfoque terapéutico. Los datos muestran que el co-abordamiento de la señalización tanto de PDGFR como de VEGFR inhibe de forma más eficaz el crecimiento de vasos endoteliales y es más eficaz en la inhibición del crecimiento tumoral en modelos de enfermedad pre-clínica. En un modelo de tumor pancreático espontáneo (RIP-Tag), Bergers y sus colegas demostraron que la combinación con un inhibidor de VEGF (SU5416) y un inhibidor de PDGF (SU6668 o imatinib) inhibía el crecimiento de adenocarcinomas pancreáticos cuando se administraba de forma tardía durante la progresión del tumor (IT o RT), mientras que la inhibición de VEGF en solitario era eficaz solamente cuando se usaba en contextos previos de enfermedad (PT y IT) (Bergers y col., J. Clin. Invest. 111:1287-95, 2003). La disminución en el crecimiento tumoral estaba asociada con una disminución en las células endoteliales y pericitos asociados al tumor y la inhibición de la angiogénesis. Asimismo, en un modelo de xenoinjerto pancreático (BxPC-3), el tratamiento con anticuerpos tanto anti-PDGFRβ como contra VEGFR2 demostró efectos anti-tumores significativos cuando se comparaba con los regímenes de tratamiento de monoterapia (Shen y col., Biochem Biophys Res Commun 357:1142-47, 2007). Pietras y sus colegas demostraron adicionalmente que la eficacia era sustancialmente mayor en el modelo pancreático Rip-Tag cuando se combinaban terapias anti-VEGF y anti-PDGF junto con quimioterapia (Pietras y Hanahan, J. Clin. Oncol. 23:939-52, 2005). La eficacia de combinación también se ha demostrado en modelos de xenoinjerto de carcinoma de ovario combinando inhibidores de PDGFR y VEGFR (Lu y col., Clin. Cancer Res. 13:4209-17, 2007). Estos datos proporcionan fuertes fundamentos de prueba de hipótesis para abordar ambas vías en oncología. Además, la combinación que aborda estas vías también ha demostrado inhibir la neovascularización en un modelo ocular de roedor (Jo y col., Am. J. Pathol. 168:2036-53, 2006), proporcionando apoyo pre-clínico para la posible eficacia en indicaciones de enfermedad ocular, incluyendo AMD.

Lokker N.A. y col., J. Biol. Chem., Vol. 272(52), 26 de diciembre de 1997, páginas 33037-33044, describe la importancia funcional de los dominios extracelulares tipo inmunoglobulina del receptor del factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), y la identificación del sitio de unión a PDGF y anticuerpos monoclonales neutralizantes.

Liang W-C y col., J. Biol. Chem., Vol. 281(2), 13 de enero de 2006, páginas 951-961, describe anticuerpos de bloqueo de VEGF de especie cruzada que inhiben completamente el crecimiento de xenoinjertos de tumor humano y mide la contribución del VEGF estromático.

Jo Nobuo y col., Am. J. Pathology, Vol. 168 (6), 1 de junio de 2006, páginas 2036-2053, informa de que la inhibición de la señalización de PDGF B potencia la eficacia de la terapia anti-factor de crecimiento del endotelio vascular en múltiples modelos de neovascularización ocular.

Jayson G.C. y col., J. Clinical Oncology, Vol. 23(5), 10 de febrero de 2005, páginas 973-981, informa de que el bloqueo del receptor-beta de PDGF por CDP860, un di-Fab' humanizado y PEGilado, conduce a acumulación de fluido y está asociado con un volumen aumentado de tumor vascularizado.

Shen y col., Biochemical and Biophysical Research Communications, Vol. 357(4), 10 de mayo de 2007, páginas 1142-1147, informa de que un anticuerpo dirigido contra el receptor beta de PDGF potencia las actividades antitumorales y anti-angiogénicas de un anticuerpo anti-receptor 2 de VEGF.

Erber, Ralf y col., FASEB Journal, Vol. 18(2), 4 de diciembre de 2004, <http://www.fasebj.org/cgi/reprint/03-0271fjev1.pdf>, informa de que la inhibición combinada de la señalización de VEGF y PDGF fuerza la regresión de los vasos tumorales impidiendo los mecanismos de supervivencia de las células endoteliales mediados por los pericitos.

El documento WO 97137029 describe anticuerpos monoclonales específicos para el receptor beta de PDGF y procedimientos para usar los mismos. El documento US 2003/228307 describe polipéptidos de inmunoglobulina inhibidores contra el receptor beta de PDGF humano.

El documento WO 2007/140534 describe anticuerpos anti-VEGF-B con reactividad cruzada por VEGF-A como antagonistas de la señalización de VEGF-A y VEGF-B. El documento US 2007/059302 describe anticuerpos anti-VEGF.

El documento US 2006/234347 describe el abordamiento de múltiples vías angiogénicas para terapia contra el cáncer usando receptores tirosina quinasa solubles.

En un aspecto, la presente memoria descriptiva describe un anticuerpo que se une específicamente al dominio extracelular de PDGFR $\beta$  y neutraliza la actividad de PDGFR $\beta$ . En algunas realizaciones, un anticuerpo neutralizante anti-PDGFR $\beta$  comprende un dominio V<sub>L</sub> que comprende las CDR LCDR1, LCDR2, y LCDR3 y un dominio V<sub>H</sub> que comprende las CDR HCDR1, HCDR2, y HCDR3, donde LCDR1 tiene la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEC ID N° 433; LCDR2 tiene la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEC ID N° 434; LCDR3 tiene la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEC ID N° 435; HCDR1 tiene la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEC ID N° 436; HCDR2 tiene la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEC ID N° 437; y HCDR3 tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada entre el grupo que consiste en las SEC ID N° 438-442. En algunas de estas realizaciones, LCDR1 tiene la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEC ID N° 443; LCDR3 tiene la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEC ID N° 444; y HCDR1 tiene la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEC ID N° 445. En otras de estas realizaciones, LCDR1 tiene la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEC ID N° 443; LCDR3 tiene la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEC ID N° 444; HCDR1 tiene la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEC ID N° 446; y HCDR2 tiene la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEC ID N° 447. En algunas variaciones, LCDR1 tiene la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEC ID N° 443; LCDR3 tiene la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEC ID N° 444; HCDR1 tiene la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEC ID N° 446; HCDR2 tiene la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEC ID N° 447; y HCDR3 tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada entre el grupo que consiste en las SEC ID N° 441 y 442.

En otras realizaciones, un anticuerpo neutralizante anti-PDGFR $\beta$  comprende un dominio V<sub>L</sub> que comprende las CDR LCDR1, LCDR2, y LCDR3 y un dominio V<sub>H</sub> que comprende las CDR HCDR1, HCDR2, y HCDR3, donde LCDR1 tiene la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEC ID N° 433; LCDR2 tiene la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEC ID N° 434; LCDR3 tiene la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEC ID N° 435; y HCDR1, HCDR2, y HCDR3 tienen las secuencias de aminoácidos mostradas, respectivamente, en (a) los restos 31-35, los restos 50-66, y los restos 99-110 de la SEC ID N° 8; (b) los restos 31-35, los restos 50-66, y los restos 99-110 de la SEC ID N° 12; (c) los restos 31-35, los restos 50-66, y los restos 99-111 de la SEC ID N° 24; (d) los restos 31-35, los restos 50-66, y los restos 99-110 de la SEC ID N° 36; o (e) los restos 31-35, los restos 50-66, y los restos 99-111 de la SEC ID N° 48.

En otras realizaciones, un anticuerpo neutralizante anti-PDGFR $\beta$  comprende un dominio V<sub>L</sub> que comprende las CDR LCDR1, LCDR2, y LCDR3 y un dominio V<sub>H</sub> que comprende las CDR HCDR1, HCDR2, y HCDR3, donde LCDR1 tiene la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEC ID N° 433; LCDR2 tiene la secuencia de aminoácidos mostrada en los restos 56-62 de la SEC ID N° 6 ó 10; LCDR3 tiene la secuencia de aminoácidos mostrada en los restos 95-103 de la SEC ID N° 6, 10, ó 46; HCDR1 tiene la secuencia de aminoácidos mostrada en los restos 31-35 de la SEC ID N° 8, 12, 24, 36, ó 48; HCDR2 tiene la secuencia de aminoácidos mostrada en los restos 50-66 de la SEC ID N° 8, 12, 24, 36, ó 48; y HCDR3 tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada entre el grupo que consiste en las SEC ID N° 438-442. En algunas de estas variaciones, (a) LCDR2 y LCDR3 tienen las secuencias de aminoácidos mostradas, respectivamente, en los restos 56-62 y los restos 95-103 de la SEC ID N° 6; y HCDR1, HCDR2, y HCDR3 tienen las secuencias de aminoácidos mostradas, respectivamente, en los restos 31-35, los restos 50-66, y los restos 99-110 de la SEC ID N° 8; (b) LCDR2 y LCDR3 tienen las secuencias de aminoácidos mostradas, respectivamente, en los restos 56-62 y los restos 95-103 de la SEC ID N° 10; y HCDR1, HCDR2, y HCDR3 tienen las secuencias de aminoácidos mostradas, respectivamente, en los restos 31-35, los restos 50-66, y los restos 99-110 de la SEC ID N° 12; (c) LCDR2 y LCDR3 tienen las secuencias de aminoácidos mostradas, respectivamente, en los restos 56-62 y los restos 95-103 de la SEC ID N° 22; y HCDR1, HCDR2, y HCDR3 tienen las secuencias de aminoácidos mostradas, respectivamente, en los restos 31-35, los restos 50-66, y los restos 99-111 de la SEC ID N° 24; (d) LCDR2 y LCDR3 tienen las secuencias de aminoácidos mostradas, respectivamente, en los restos 56-62 y los restos 95-103 de la SEC ID N° 34; y HCDR1, HCDR2, y HCDR3 tienen las secuencias de aminoácidos mostradas, respectivamente, en los restos 31-35, los restos 50-66, y los restos 99-110 de la SEC ID N° 36; (e) LCDR2 y LCDR3 tienen las secuencias de aminoácidos mostradas, respectivamente, en los restos 56-62 y los restos 95-103 de la SEC ID N° 38; y HCDR1, HCDR2, y HCDR3 tienen las secuencias de aminoácidos mostradas, respectivamente, en los restos 31-35, los restos 50-66, y los restos 99-110 de la SEC ID N° 40; o (f) LCDR2 y LCDR3 tienen las secuencias de aminoácidos mostradas, respectivamente, en los restos 56-62 y los restos 95-103 de la SEC ID N° 46; y HCDR1, HCDR2, y HCDR3 tienen las secuencias de aminoácidos mostradas, respectivamente, en los restos 31-35, los restos 50-66, y los restos 99-111 de la SEC ID N° 48. En algunas realizaciones, LCDR1 tiene la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEC ID N° 433; LCDR2 tiene la secuencia de aminoácidos mostrada en los restos 56-62 de la SEC ID N° 6; LCDR3 tiene la secuencia de aminoácidos mostrada en los restos 95-103 de la SEC ID N° 6; HCDR1 tiene la secuencia de aminoácidos mostrada en los restos 31-35 de la SEC ID N° 8 ó 12; HCDR2 tiene la secuencia de aminoácidos mostrada en los restos 50-66 de la SEC ID N° 8 ó 12; y HCDR3 tiene la secuencia de aminoácidos mostrada en los restos 99-110 de la SEC ID N° 8 ó 12.

En variaciones específicas de un anticuerpo neutralizante anti-PDGFR $\beta$  como los anteriores, los dominios V<sub>L</sub> y V<sub>H</sub> comprenden las secuencias de aminoácidos mostradas, respectivamente, en las SEC ID N° 6 y 8; las SEC ID N° 10 y 12; las SEC ID N° 22 y 24; las SEC ID N° 34 y 36; las SEC ID N° 38 y 40; o las SEC ID N° 46 y 48.

En otras realizaciones, un anticuerpo neutralizante anti-PDGFR $\beta$  comprende un dominio V<sub>L</sub> que comprende las CDR LCDR1, LCDR2, y LCDR3 y un dominio V<sub>H</sub> que comprende las CDR HCDR1, HCDR2, y HCDR3, en el que dicha serie de CDR de V<sub>L</sub> y V<sub>H</sub> tiene 3 o menos de sustituciones de aminoácidos con relación a una segunda serie de CDR seleccionada entre el grupo que consiste en: (a) LCDR1, LCDR2, y LCDR3 que tienen las secuencias de aminoácidos mostradas, respectivamente, en los restos 24-40, los restos 56-62, y los restos 95-103 de la SEC ID N° 6; y HCDR1, HCDR2, y HCDR3 que tienen las secuencias de aminoácidos mostradas, respectivamente, en los restos 31-35, los restos 50-66, y los restos 99-110 de la SEC ID N° 8; (b) LCDR1, LCDR2, y LCDR3 que tienen las secuencias de aminoácidos mostradas, respectivamente, en los restos 24-40, los restos 56-62, y los restos 95-103 de la SEC ID N° 10; y HCDR1, HCDR2, y HCDR3 que tienen las secuencias de aminoácidos mostradas, respectivamente, en los restos 31-35, los restos 50-66, y los restos 99-110 de la SEC ID N° 12; (c) LCDR1, LCDR2, y LCDR3 que tienen las secuencias de aminoácidos mostradas, respectivamente, en los restos 24-40, los restos 56-62, y los restos 95-103 de la SEC ID N° 22; y HCDR1, HCDR2, y HCDR3 que tienen las secuencias de aminoácidos mostradas, respectivamente, en los restos 31-35, los restos 50-66, y los restos 99-111 de la SEC ID N° 24; (d) LCDR1, LCDR2, y LCDR3 que tienen las secuencias de aminoácidos mostradas, respectivamente, en los restos 24-40, los restos 56-62, y los restos 95-103 de la SEC ID N° 34; y HCDR1, HCDR2, y HCDR3 que tienen las secuencias de aminoácidos mostradas, respectivamente, en los restos 31-35, los restos 50-66, y los restos 99-110 de la SEC ID N° 36; (e) LCDR1, LCDR2, y LCDR3 que tienen las secuencias de aminoácidos mostradas, respectivamente, en los restos 24-40, los restos 56-62, y los restos 95-103 de la SEC ID N° 46; y HCDR1, HCDR2, y HCDR3 que tienen las secuencias de aminoácidos mostradas, respectivamente, en los restos 31-35, los restos 50-66, y los restos 99-111 de la SEC ID N° 48. En algunas realizaciones, el anticuerpo comprende ninguna, una, o dos sustituciones de aminoácidos en dicha serie de CDR.

En otras realizaciones más, un anticuerpo neutralizante anti-PDGFR $\beta$  comprende un dominio V<sub>L</sub> que comprende las CDR LCDR1, LCDR2, y LCDR3 y un dominio V<sub>H</sub> que comprende las CDR HCDR1, HCDR2, y HCDR3, en el que dicha serie de CDR de V<sub>L</sub> y V<sub>H</sub> tiene 3 o menos sustituciones de aminoácidos con relación a una segunda serie de CDR en que LCDR1 tiene la secuencia de aminoácidos mostrada en los restos 24-34 de la SEC ID N° 18; LCDR2 tiene la secuencia de aminoácidos mostrada en los restos 50-56 de la SEC ID N° 18; LCDR3 tiene la secuencia de aminoácidos mostrada en los restos 89-97 de la SEC ID N° 18; HCDR1 tiene la secuencia de aminoácidos mostrada en los restos 31-35 de la SEC ID N° 20; HCDR2 tiene la secuencia de aminoácidos mostrada en los restos 50-66 de la SEC ID N° 20; HCDR3 tiene la secuencia de aminoácidos mostrada en los restos 99-115 de la SEC ID N° 20. En algunas realizaciones, el anticuerpo comprende ninguna, una, o dos sustituciones de aminoácidos en dicha serie de CDR. En ciertas variaciones, el anticuerpo comprende ninguna sustitución en dichas CDR. En variaciones específicas, el dominio V<sub>L</sub> comprende una secuencia de aminoácidos mostrada en la SEC ID N° 18 y el dominio V<sub>H</sub> comprende una secuencia de aminoácidos mostrada en la SEC ID N° 20.

En otras realizaciones más, un anticuerpo neutralizante anti-PDGFR $\beta$  se une a un epítipo que comprende uno o más aminoácidos incluidos dentro de una región polipeptídica de PDGFR $\beta$  mostrada en los restos 251-270 de la SEC ID N° 4. Anticuerpos anti-PDGFR $\beta$  a modo de ejemplo que tienen esta especificidad de epítipo incluyen anticuerpos que comprenden dominios variables de cadena ligera y pesada que tienen secuencias de aminoácidos respectivas de V<sub>L</sub> y V<sub>H</sub> seleccionadas entre los siguientes pares de secuencias de V<sub>L</sub>/V<sub>H</sub>: SEC ID N° 6 y 8; SEC ID N° 10 y 12; SEC ID N° 22 y 24; y SEC ID N° 46 y 48. En ciertas realizaciones, el epítipo comprende adicionalmente uno o más aminoácidos incluidos dentro de una segunda región polipeptídica de PDGFR $\beta$  mostrada en los restos 196-205 ó 191-210 de la SEC ID N° 4. Anticuerpos anti-PDGFR $\beta$  a modo de ejemplo de esta clase incluyen anticuerpos que comprenden dominios variables de cadena ligera y pesada que tienen secuencias de aminoácidos respectivas de V<sub>L</sub> y V<sub>H</sub> seleccionadas entre los siguientes pares de secuencias de V<sub>L</sub>/V<sub>H</sub>: SEC ID N° 22 y 24; y SEC ID N° 46 y 48. En ciertas realizaciones, el epítipo anti-PDGFR $\beta$  se un epítipo determinado por mapeo de epítopos en microserie de péptidos que comprende el uso de péptidos de 20 monómeros solapantes de PDGFR $\beta$  (SEC ID N° 4).

En ciertas variaciones, un anticuerpo neutralizante anti-PDGFR $\beta$  como los anteriores es un anticuerpo biespecífico que también se une a VEGF-A. En variaciones preferidas, el anticuerpo biespecífico neutraliza VEGF-A.

En otro aspecto, la presente memoria descriptiva describe un anticuerpo que se une específicamente a VEGF-A y neutraliza la actividad VEGF-A. En algunas realizaciones, un anticuerpo neutralizante anti-VEGF-A comprende un dominio V<sub>L</sub> que comprende las CDR LCDR1, LCDR2, y LCDR3 y un dominio V<sub>H</sub> que comprende las CDR HCDR1, HCDR2, y HCDR3, donde LCDR1 tiene la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEC ID N° 448; LCDR2 tiene la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEC ID N° 449; LCDR3 tiene la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEC ID N° 450; HCDR1 tiene la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEC ID N° 451; HCDR2 tiene la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEC ID N° 452; y HCDR3 tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada entre el grupo que consiste en las SEC ID N° 453-461. En ciertas realizaciones, LCDR1 tiene la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEC ID N° 462; LCDR2 tiene la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEC ID N° 464; LCDR3 tiene la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEC ID N° 466; HCDR1 tiene la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEC ID N° 468; HCDR2 tiene la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEC ID N° 470; y HCDR3 tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada entre el grupo que consiste en las SEC ID N° 453-459. En algunas de estas realizaciones, (a) LCDR1 y LCDR2 tienen las secuencias de aminoácidos mostradas, respectivamente, en los restos 24-34 y los restos 50-56 de la SEC ID N° 170; (b) LCDR1 y LCDR2 tienen

las secuencias de aminoácidos mostradas, respectivamente, en los restos 24-34 y los restos 50-56 de la SEC ID N° 242; (c) LCDR1 y LCDR2 tienen las secuencias de aminoácidos mostradas, respectivamente, en los restos 24-34 y los restos 50-56 de la SEC ID N° 278; (d) LCDR1 y LCDR2 tienen las secuencias de aminoácidos mostradas, respectivamente, en los restos 24-34 y los restos 50-56 de la SEC ID N° 306; (e) LCDR1 y LCDR2 tienen las secuencias de aminoácidos mostradas, respectivamente, en los restos 24-34 y los restos 50-56 de la SEC ID N° 322; (f) LCDR1 y LCDR2 tienen las secuencias de aminoácidos mostradas, respectivamente, en los restos 24-34 y los restos 50-56 de la SEC ID N° 330; (g) LCDR1 y LCDR2 tienen las secuencias de aminoácidos mostradas, respectivamente, en los restos 24-34 y los restos 50-56 de la SEC ID N° 374; (h) LCDR1 y LCDR2 tienen las secuencias de aminoácidos mostradas, respectivamente, en los restos 24-34 y los restos 50-56 de la SEC ID N° 394; o (i) LCDR1 y LCDR2 tienen las secuencias de aminoácidos mostradas, respectivamente, en los restos 24-34 y los restos 50-56 de la SEC ID N° 426. En variaciones particulares de un anticuerpo anti-VEGF-A como los anteriores, HCDR1 tiene la secuencia de aminoácidos mostrada en los restos 31-35 de la SEC ID N° 172, 244, 280, 308, ó 324. En otras variaciones de un anticuerpo anti-VEGF-A como los anteriores, HCDR1 tiene la secuencia de aminoácidos mostrada en los restos 31-35 de la SEC ID N° 280 y HCDR2 tiene la secuencia de aminoácidos mostrada en los restos 50-66 de la SEC ID N° 280, 376, ó 428.

En algunas realizaciones, un anticuerpo neutralizante anti-VEGF-A comprende un dominio  $V_L$  que comprende las CDR LCDR1, LCDR2, y LCDR3 y un dominio  $V_H$  que comprende las CDR HCDR1, HCDR2, y HCDR3, donde CDR1 tiene la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEC ID N° 463; LCDR2 tiene la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEC ID N° 465; LCDR3 tiene la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEC ID N° 467; HCDR1 tiene la secuencia de aminoácidos mostrada en los restos 31-35 de la SEC ID N° 280; HCDR2 tiene la secuencia de aminoácidos mostrada en los restos 50-66 de la SEC ID N° 280; y HCDR3 tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada entre el grupo que consiste en las SEC ID N° 453-459. En algunas realizaciones, HCDR3 tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada entre el grupo que consiste en las SEC ID N° 453, 458, y 459.

En otras realizaciones, un anticuerpo neutralizante anti-VEGF-A comprende un dominio  $V_L$  que comprende las CDR LCDR1, LCDR2, y LCDR3 y un dominio  $V_H$  que comprende las CDR HCDR1, HCDR2, y HCDR3, donde LCDR1 tiene la secuencia de aminoácidos mostrada en los restos 24-34 de la SEC ID N° 170, 330, 394, ó 426; LCDR2 tiene la secuencia de aminoácidos mostrada en los restos 50-56 de la SEC ID N° 170, 242, 322, 330, 394, ó 426; LCDR3 tiene la secuencia de aminoácidos mostrada en los restos 89-97 de la SEC ID N° 170, 242, 278, 394, ó 426; HCDR1 tiene la secuencia de aminoácidos mostrada en los restos 31-35 de la SEC ID N° 172, 244, 280, 308, ó 324; HCDR2 tiene la secuencia de aminoácidos mostrada en los restos 50-66 de la SEC ID N° 172, 244, 280, ó 324; y HCDR3 tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada entre el grupo que consiste en las SEC ID N° 453-459. En algunas de estas realizaciones, (a) LCDR1, LCDR2, y LCDR3 tienen las secuencias de aminoácidos mostradas, respectivamente, en los restos 24-34, los restos 50-56, y los restos 89-97 de la SEC ID N° 170; y HCDR1, HCDR2, y HCDR3 tienen las secuencias de aminoácidos mostradas, respectivamente, en los restos 31-35, los restos 50-66, y los restos 89-97 de la SEC ID N° 172; (b) LCDR1, LCDR2, y LCDR3 tienen las secuencias de aminoácidos mostradas, respectivamente, en los restos 24-34, los restos 50-56, y los restos 89-97 de la SEC ID N° 242; y HCDR1, HCDR2, y HCDR3 tienen las secuencias de aminoácidos mostradas, respectivamente, en los restos 31-35, los restos 50-66, y los restos 89-107 de la SEC ID N° 244; (c) LCDR1, LCDR2, y LCDR3 tienen las secuencias de aminoácidos mostradas, respectivamente, en los restos 24-34, los restos 50-56, y los restos 89-97 de la SEC ID N° 278; y HCDR1, HCDR2, y HCDR3 tienen las secuencias de aminoácidos mostradas, respectivamente, en los restos 31-35, los restos 50-66, y los restos 89-110 de la SEC ID N° 280; (d) LCDR1, LCDR2, y LCDR3 tienen las secuencias de aminoácidos mostradas, respectivamente, en los restos 24-34, los restos 50-56, y los restos 89-97 de la SEC ID N° 306; y HCDR1, HCDR2, y HCDR3 tienen las secuencias de aminoácidos mostradas, respectivamente, en los restos 31-35, los restos 50-66, y los restos 89-110 de la SEC ID N° 308; (e) LCDR1, LCDR2, y LCDR3 tienen las secuencias de aminoácidos mostradas, respectivamente, en los restos 24-34, los restos 50-56, y los restos 89-97 de la SEC ID N° 322; y HCDR1, HCDR2, y HCDR3 tienen las secuencias de aminoácidos mostradas, respectivamente, en los restos 31-35, los restos 50-66, y los restos 89-111 de la SEC ID N° 324; (f) LCDR1, LCDR2, y LCDR3 tienen las secuencias de aminoácidos mostradas, respectivamente, en los restos 24-34, los restos 50-56, y los restos 89-97 de la SEC ID N° 330; y HCDR1, HCDR2, y HCDR3 tienen las secuencias de aminoácidos mostradas, respectivamente, en los restos 31-35, los restos 50-66, y los restos 89-102 de la SEC ID N° 332; (g) LCDR1, LCDR2, y LCDR3 tienen las secuencias de aminoácidos mostradas, respectivamente, en los restos 24-34, los restos 50-56, y los restos 89-97 de la SEC ID N° 374; y HCDR1, HCDR2, y HCDR3 tienen las secuencias de aminoácidos mostradas, respectivamente, en los restos 31-35, los restos 50-66, y los restos 89-108 de la SEC ID N° 376; (h) LCDR1, LCDR2, y LCDR3 tienen las secuencias de aminoácidos mostradas, respectivamente, en los restos 24-34, los restos 50-56, y los restos 89-97 de la SEC ID N° 394; y HCDR1, HCDR2, y HCDR3 tienen las secuencias de aminoácidos mostradas, respectivamente, en los restos 31-35, los restos 50-66, y los restos 89-102 de la SEC ID N° 396; o (i) LCDR1, LCDR2, y LCDR3 tienen las secuencias de aminoácidos mostradas, respectivamente, en los restos 24-34, los restos 50-56, y los restos 89-97 de la SEC ID N° 426; y HCDR1, HCDR2, y HCDR3 tienen las secuencias de aminoácidos mostradas, respectivamente, en los restos 31-35, los restos 50-66, y los restos 89-107 de la SEC ID N° 428. En variaciones específicas, los dominios  $V_L$  y  $V_H$  comprenden las secuencias de aminoácidos mostradas, respectivamente, en las SEC ID N° 170 y 172; las SEC ID N° 242 y 244; las SEC ID N° 278 y 280; las SEC ID N° 306 y 308; las SEC ID N° 322 y 324; las SEC ID N° 330 y 332; las SEC ID N° 374 y 376; las SEC ID N° 394 y 396; o las SEC ID N° 426 y 428.



En otras realizaciones, un anticuerpo neutralizante anti-VEGF-A comprende un dominio  $V_L$  que comprende las CDR LCDR1, LCDR2, y LCDR3 y un dominio  $V_H$  que comprende las CDR HCDR1, HCDR2, y HCDR3, en el que dicha serie de CDR de  $V_L$  y  $V_H$  tiene 3 o menos sustituciones de aminoácidos con relación a una segunda serie de CDR seleccionada entre el grupo que consiste en: (a) LCDR1, LCDR2, y LCDR3 que tienen las secuencias de aminoácidos mostradas, respectivamente, en los restos 24-34, los restos 50-56, y los restos 89-97 de la SEC ID N° 170; y HCDR1, HCDR2, y HCDR3 que tienen las secuencias de aminoácidos mostradas, respectivamente, en los restos 31-35, los restos 50-66, y los restos 99-102 de la SEC ID N° 172; (b) LCDR1, LCDR2, y LCDR3 que tienen las secuencias de aminoácidos mostradas, respectivamente, en los restos 24-34, los restos 50-56, y los restos 89-97 de la SEC ID N° 242; y HCDR1, HCDR2, y HCDR3 que tienen las secuencias de aminoácidos mostradas, respectivamente, en los restos 31-35, los restos 50-66, y los restos 99-107 de la SEC ID N° 244; (c) LCDR1, LCDR2, y LCDR3 que tienen las secuencias de aminoácidos mostradas, respectivamente, en los restos 24-34, los restos 50-56, y los restos 89-97 de la SEC ID N° 278; y HCDR1, HCDR2, y HCDR3 que tienen las secuencias de aminoácidos mostradas, respectivamente, en los restos 31-35, los restos 50-66, y los restos 99-110 de la SEC ID N° 280; (d) LCDR1, LCDR2, y LCDR3 que tienen las secuencias de aminoácidos mostradas, respectivamente, en los restos 24-34, los restos 50-56, y los restos 89-97 de la SEC ID N° 306; y HCDR1, HCDR2, y HCDR3 que tienen las secuencias de aminoácidos mostradas, respectivamente, en los restos 31-35, los restos 50-66, y los restos 99-110 de la SEC ID N° 308; (e) LCDR1, LCDR2, y LCDR3 que tienen las secuencias de aminoácidos mostradas, respectivamente, en los restos 24-34, los restos 50-56, y los restos 89-97 de la SEC ID N° 322; y HCDR1, HCDR2, y HCDR3 que tienen las secuencias de aminoácidos mostradas, respectivamente, en los restos 31-35, los restos 50-66, y los restos 99-111 de la SEC ID N° 324; (f) LCDR1, LCDR2, y LCDR3 que tienen las secuencias de aminoácidos mostradas, respectivamente, en los restos 24-34, los restos 50-56, y los restos 89-97 de la SEC ID N° 330; y HCDR1, HCDR2, y HCDR3 que tienen las secuencias de aminoácidos mostradas, respectivamente, en los restos 31-35, los restos 50-66, y los restos 99-102 de la SEC ID N° 332; (g) LCDR1, LCDR2, y LCDR3 que tienen las secuencias de aminoácidos mostradas, respectivamente, en los restos 24-34, los restos 50-56, y los restos 89-97 de la SEC ID N° 374; y HCDR1, HCDR2, y HCDR3 que tienen las secuencias de aminoácidos mostradas, respectivamente, en los restos 31-35, los restos 50-66, y los restos 99-108 de la SEC ID N° 376; (h) LCDR1, LCDR2, y LCDR3 que tienen las secuencias de aminoácidos mostradas, respectivamente, en los restos 24-34, los restos 50-56, y los restos 89-97 de la SEC ID N° 394; y HCDR1, HCDR2, y HCDR3 que tienen las secuencias de aminoácidos mostradas, respectivamente, en los restos 31-35, los restos 50-66, y los restos 99-102 de la SEC ID N° 396; y (i) LCDR1, LCDR2, y LCDR3 que tienen las secuencias de aminoácidos mostradas, respectivamente, en los restos 24-34, los restos 50-56, y los restos 89-97 de la SEC ID N° 426; y HCDR1, HCDR2, y HCDR3 que tienen las secuencias de aminoácidos mostradas, respectivamente, en los restos 31-35, los restos 50-66, y los restos 99-107 de la SEC ID N° 428. En algunas realizaciones, el anticuerpo comprende ninguna, una, o dos sustituciones de aminoácidos en dicha serie de CDR.

En otras realizaciones más, un anticuerpo neutralizante anti-VEGF-A comprende un dominio  $V_L$  que comprende las CDR LCDR1, LCDR2, y LCDR3 y un dominio  $V_H$  que comprende las CDR HCDR1, HCDR2, y HCDR3, donde LCDR1 tiene la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEC ID N° 462; LCDR2 tiene la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEC ID N° 463; LCDR3 tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada entre el grupo que consiste en las SEC ID N° 464 y 465; HCDR1 tiene la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEC ID N° 466; HCDR2 tiene la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEC ID N° 467; y HCDR3 tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada entre el grupo que consiste en las SEC ID N° 468-470. En algunas de estas realizaciones, LCDR1 tiene la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEC ID N° 471; LCDR2 tiene la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEC ID N° 474; HCDR1 tiene la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEC ID N° 477; HCDR2 tiene la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEC ID N° 478; y HCDR3 tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada entre el grupo que consiste en las SEC ID N° 468 y 469.

En ciertas variaciones, a anticuerpo neutralizante anti-VEGF-A comprende un dominio  $V_L$  que comprende las CDR LCDR1, LCDR2, y LCDR3 y un dominio  $V_H$  que comprende las CDR HCDR1, HCDR2, y HCDR3, donde LCDR1 tiene una secuencia de aminoácidos mostrada en la SEC ID N° 472; LCDR2 tiene la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEC ID N° 475; LCDR3 tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada entre el grupo que consiste en las SEC ID N° 464 y 465; HCDR1 tiene la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEC ID N° 477; HCDR2 tiene la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEC ID N° 478; y HCDR3 tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada entre el grupo que consiste en las SEC ID N° 468 y 469. En algunas realizaciones, HCDR1, HCDR2, y HCDR3 tienen las secuencias de aminoácidos mostradas, respectivamente, en los restos 31-35, los restos 50-66, y los restos 99-102 de la SEC ID N° 248. En algunas de estas realizaciones, LCDR2 tiene la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEC ID N° 479 y LCDR3 tiene la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEC ID N° 480.

En otras realizaciones, un anticuerpo neutralizante anti-VEGF-A comprende un dominio  $V_L$  que comprende las CDR LCDR1, LCDR2, y LCDR3 y un dominio  $V_H$  que comprende las CDR HCDR1, HCDR2, y HCDR3, donde LCDR1 tiene la secuencia de aminoácidos mostrada en los restos 23-35 de la SEC ID N° 214, 246, 274, 286, 310, 338, ó 354; LCDR2 tiene la secuencia de aminoácidos mostrada en los restos 51-37 de la SEC ID N° 214, 246, 274, 286, 310, 338, ó 354; LCDR3 tiene una secuencia de aminoácidos mostrada en la SEC ID N° 465 o en los restos 90-100 de la SEC ID N° 214, 246, 274, 286, 310, ó 338; HCDR1 tiene una secuencia de aminoácidos mostrada en los restos 31-35 de la SEC ID N° 216, 248, ó 356; HCDR2 tiene una secuencia de aminoácidos mostrada en los restos 50-66

de la SEC ID N° 216, 248, ó 356; y HCDR3 tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada entre el grupo que consiste en las SEC ID N° 468-470. En ciertas variaciones, (a) LCDR1, LCDR2, y LCDR3 tienen las secuencias de aminoácidos mostradas, respectivamente, en los restos 23-35, los restos 51-57, y los restos 90-100 de la SEC ID N° 214; y HCDR1, HCDR2, y HCDR3 tienen las secuencias de aminoácidos mostradas, respectivamente, en los restos 31-35, los restos 50-66, y los restos 99-110 de la SEC ID N° 216; (b) LCDR1, LCDR2, y LCDR3 tienen las secuencias de aminoácidos mostradas, respectivamente, en los restos 23-35, los restos 51-57, y los restos 90-100 de la SEC ID N° 246; y HCDR1, HCDR2, y HCDR3 tienen las secuencias de aminoácidos mostradas, respectivamente, en los restos 31-35, los restos 50-66, y los restos 99-102 de la SEC ID N° 248; (c) LCDR1, LCDR2, y LCDR3 tienen las secuencias de aminoácidos mostradas, respectivamente, en los restos 23-35, los restos 51-57, y los restos 90-100 de la SEC ID N° 274; y HCDR1, HCDR2, y HCDR3 tienen las secuencias de aminoácidos mostradas, respectivamente, en los restos 31-35, los restos 50-66, y los restos 99-102 de la SEC ID N° 276; (d) LCDR1, LCDR2, y LCDR3 tienen las secuencias de aminoácidos mostradas, respectivamente, en los restos 23-35, los restos 51-57, y los restos 90-100 de la SEC ID N° 286; y HCDR1, HCDR2, y HCDR3 tienen las secuencias de aminoácidos mostradas, respectivamente, en los restos 31-35, los restos 50-66, y los restos 99-102 de la SEC ID N° 288; (e) LCDR1, LCDR2, y LCDR3 tienen las secuencias de aminoácidos mostradas, respectivamente, en los restos 23-35, los restos 51-57, y los restos 90-100 de la SEC ID N° 310; y HCDR1, HCDR2, y HCDR3 tienen las secuencias de aminoácidos mostradas, respectivamente, en los restos 31-35, los restos 50-66, y los restos 99-102 de la SEC ID N° 312; (f) LCDR1, LCDR2, y LCDR3 tienen las secuencias de aminoácidos mostradas, respectivamente, en los restos 23-35, los restos 51-57, y los restos 90-100 de la SEC ID N° 338; y HCDR1, HCDR2, y HCDR3 tienen las secuencias de aminoácidos mostradas, respectivamente, en los restos 31-35, los restos 50-66, y los restos 99-102 de la SEC ID N° 340; o (g) LCDR1, LCDR2, y LCDR3 tienen las secuencias de aminoácidos mostradas, respectivamente, en los restos 31-35, los restos 50-66, y los restos 99-106 de la SEC ID N° 354; y HCDR1, HCDR2, y HCDR3 tienen las secuencias de aminoácidos mostradas, respectivamente, en los restos 31-35, los restos 50-66, y los restos 99-107 de la SEC ID N° 356. En variaciones específicas, los dominios  $V_L$  y  $V_H$  comprenden las secuencias de aminoácidos mostradas, respectivamente, en las SEC ID N° 214 y 216; las SEC ID N° 246 y 248; las SEC ID N° 274 y 276; las SEC ID N° 286 y 288; las SEC ID N° 310 y 312; las SEC ID N° 338 y 340; o las SEC ID N° 354 y 356.

En otras realizaciones más, un anticuerpo neutralizante anti-VEGF-A comprende un dominio  $V_L$  que comprende las CDR LCDR1, LCDR2, y LCDR3 y un dominio  $V_H$  que comprende las CDR HCDR1, HCDR2, y HCDR3, en el que dicha serie de CDR de  $V_L$  y  $V_H$  tiene 3 o menos sustituciones de aminoácidos con relación a una segunda serie de CDR seleccionada entre el grupo que consiste en: (a) LCDR1, LCDR2, y LCDR3 que tienen las secuencias de aminoácidos mostradas, respectivamente, en los restos 23-35, los restos 51-57, y los restos 90-100 de la SEC ID N° 214; y HCDR1, HCDR2, y HCDR3 que tienen las secuencias de aminoácidos mostradas, respectivamente, en los restos 31-35, los restos 50-66, y los restos 99-110 de la SEC ID N° 216; (b) LCDR1, LCDR2, y LCDR3 que tienen las secuencias de aminoácidos mostradas, respectivamente, en los restos 23-35, los restos 51-57, y los restos 90-100 de la SEC ID N° 246; y HCDR1, HCDR2, y HCDR3 que tienen las secuencias de aminoácidos mostradas, respectivamente, en los restos 31-35, los restos 50-66, y los restos 99-102 de la SEC ID N° 248; (c) LCDR1, LCDR2, y LCDR3 que tienen las secuencias de aminoácidos mostradas, respectivamente, en los restos 23-35, los restos 51-57, y los restos 90-100 de la SEC ID N° 274; y HCDR1, HCDR2, y HCDR3 que tienen las secuencias de aminoácidos mostradas, respectivamente, en los restos 31-35, los restos 50-66, y los restos 99-102 de la SEC ID N° 276; (d) LCDR1, LCDR2, y LCDR3 que tienen las secuencias de aminoácidos mostradas, respectivamente, en los restos 23-35, los restos 51-57, y los restos 90-100 de la SEC ID N° 286; y HCDR1, HCDR2, y HCDR3 que tienen las secuencias de aminoácidos mostradas, respectivamente, en los restos 31-35, los restos 50-66, y los restos 99-102 de la SEC ID N° 288; (e) LCDR1, LCDR2, y LCDR3 que tienen las secuencias de aminoácidos mostradas, respectivamente, en los restos 23-35, los restos 51-57, y los restos 90-100 de la SEC ID N° 310; y HCDR1, HCDR2, y HCDR3 que tienen las secuencias de aminoácidos mostradas, respectivamente, en los restos 31-35, los restos 50-66, y los restos 99-102 de la SEC ID N° 312; (f) LCDR1, LCDR2, y LCDR3 que tienen las secuencias de aminoácidos mostradas, respectivamente, en los restos 23-35, los restos 51-57, y los restos 90-100 de la SEC ID N° 338; y HCDR1, HCDR2, y HCDR3 que tienen las secuencias de aminoácidos mostradas, respectivamente, en los restos 31-35, los restos 50-66, y los restos 99-102 de la SEC ID N° 340; y (g) LCDR1, LCDR2, y LCDR3 que tienen las secuencias de aminoácidos mostradas, respectivamente, en los restos 23-35, los restos 51-57, y los restos 90-106 de la SEC ID N° 354; y HCDR1, HCDR2, y HCDR3 que tienen las secuencias de aminoácidos mostradas, respectivamente, en los restos 31-35, los restos 50-66, y los restos 99-107 de la SEC ID N° 356. En algunas realizaciones, el anticuerpo comprende ninguna, una, o dos sustituciones de aminoácidos en dicha serie de CDR.

En ciertas realizaciones, un anticuerpo neutralizante anti-VEGF-A se une a un epítipo que comprende (a) uno o más aminoácidos incluidos dentro de una primera región polipeptídica de VEGF-A mostrada en los restos aminoacídicos 42-52 de la SEC ID N° 2 y (b) uno o más aminoácidos incluidos dentro de una segunda región polipeptídica de VEGF-A mostrada en los restos aminoacídicos 72-82 de la SEC ID N° 2. Los anticuerpos anti-VEGF-A a modo de ejemplo que tienen esta especificidad de epítipo incluyen anticuerpos que comprenden dominios variables de cadena ligera y pesada que tienen secuencias de aminoácidos respectivas de  $V_L$  y  $V_H$  seleccionadas entre los siguientes pares de secuencias de  $V_L/V_H$ : SEC ID N° 170 y 172; SEC ID N° 242 y 244; SEC ID N° 246 y 248; y SEC ID N° 278 y 280.

En ciertas realizaciones de un anticuerpo anti-VEGF-A que se une a un epítipo que comprende (a) y (b) como

anteriormente, el epítipo no comprende un aminoácido incluido dentro de una región polipeptídica de VEGF-A mostrada en los restos 90 a 132 de la SEC ID N° 2 (EGLECVPTESNITMQIMRIKPHQGQHIGEMSFLQHNKCECRP). Un anticuerpo anti-VEGF-A a modo de ejemplo de esta clase comprende dominios variables de cadena ligera y pesada que tienen las secuencias de aminoácidos mostradas en las SEC ID N° 246 y 248, respectivamente.

En otras realizaciones de un anticuerpo anti-VEGF-A que se une a un epítipo que comprende (a) y (b) como anteriormente, el epítipo comprende adicionalmente (c) uno o más aminoácidos incluidos dentro de una tercera región polipeptídica de VEGF-A mostrada en los restos 98-114 de la SEC ID N° 2. Anticuerpos anti-VEGF-A a modo de ejemplo de esta clase incluyen anticuerpos que comprenden dominios variables de cadena ligera y pesada que tienen secuencias de aminoácidos respectivas de  $V_L$  y  $V_H$  seleccionadas entre los siguientes pares de secuencias de  $V_L/V_H$ : SEC ID N° 170 y 172; SEC ID N° 242 y 244; y SEC ID N° 278 y 280.

En algunas realizaciones de un anticuerpo anti-VEGF-A que se une a un epítipo que comprende (a), (b), y (c) como anteriormente, el anticuerpo no se une a VEGF-A humano y de ratón con valores  $K_d$  dentro del factor 10 del otro. Anticuerpos anti-VEGF-A a modo de ejemplo de esta clase incluyen anticuerpos que comprenden dominios variables de cadena ligera y pesada que tienen secuencias de aminoácidos respectivas de  $V_L$  y  $V_H$  seleccionadas entre los siguientes pares de secuencias de  $V_L/V_H$ : SEC ID N° 242 y 244; y SEC ID N° 278 y 280.

En ciertas realizaciones, un epítipo anti-VEGF-A como el anterior es un epítipo determinado por mapeado de epítipos en microserie de péptidos que comprende el uso de péptidos de 13 monómeros solapantes de VEGF-A (SEC ID N° 2).

En ciertas variaciones, un anticuerpo neutralizante anti-VEGF-A como los anteriores es un anticuerpo biespecífico que también se une a un dominio extracelular de PDGFR $\beta$ . En variaciones preferidas, el anticuerpo biespecífico neutraliza PDGFR $\beta$ .

En algunas realizaciones, un anticuerpo neutralizante anti-PDGFR $\beta$  o anticuerpo neutralizante anti-VEGF-A como los anteriores, es un fragmento de anticuerpo que comprende una región de unión a antígeno. Los fragmentos adecuados de anticuerpo incluyen Fv, Fab, Fab', F(ab) $_2$ , F(ab') $_2$ , scFv, o diacuerpo. En algunas realizaciones preferidas, un anticuerpo anti-PDGFR $\beta$  o anti-VEGF-A es un scFv. En algunas realizaciones, un anticuerpo anti-PDGFR $\beta$  o anti-VEGF-A está PEGilado.

En otro aspecto, la presente memoria descriptiva describe una composición de unión biespecífica que neutraliza tanto PDGFR $\beta$  como VEGF-A. Dichas composiciones de unión biespecíficas normalmente comprenden (a) un anticuerpo anti-PDGFR $\beta$  aislado como se ha descrito anteriormente y (b) un anticuerpo anti-VEGF-A aislado como se ha descrito anteriormente. En algunas realizaciones, el anticuerpo anti-PDGFR $\beta$  y el anticuerpo anti-VEGF-A están unidos covalentemente mediante un enlazador. Enlazadores particularmente adecuados incluyen enlazadores polipeptídicos. En algunas variaciones, los anticuerpos anti-PDGFR $\beta$  y anti-VEGF-A son Fv de cadena sencilla unidos covalentemente para formar un Fv de cadena sencilla en tándem (tascFv) o un bi-Fv de cadena sencilla (biscFv). En algunas realizaciones, las composiciones de unión biespecíficas comprenden adicionalmente un vehículo farmacéuticamente aceptable.

En un aspecto relacionado, la presente invención proporciona un anticuerpo biespecífico que neutraliza tanto PDGFR $\beta$  como VEGF-A, como se indica en las reivindicaciones. El anticuerpo biespecífico comprende (a) una región de unión a antígeno de un anticuerpo anti-PDGFR $\beta$  como se indica en las reivindicaciones y (b) una región de unión a antígeno de un anticuerpo anti-VEGF-A como se indica en las reivindicaciones. En ciertas realizaciones, el anticuerpo biespecífico comprende una región constante de cadena pesada de inmunoglobulina tal como, por ejemplo, un fragmento Fc. Fragmentos Fc adecuados incluyen regiones Fc modificadas para reducir o eliminar una o más funciones efectoras. En algunas variaciones preferidas, el anticuerpo biespecífico es un tascFv, un biscFv, o un biAb. En algunas realizaciones, un anticuerpo biespecífico está PEGilado.

En algunas realizaciones, un anticuerpo biespecífico que neutraliza tanto PDGFR $\beta$  como VEGF-A incluye (I) una primera región de unión a antígeno que se une específicamente al dominio extracelular de PDGFR $\beta$  y neutraliza la actividad PDGFR $\beta$ , en el que la región de unión a PDGFR $\beta$  se une a un epítipo que comprende uno o más aminoácidos incluidos dentro de una región polipeptídica de PDGFR $\beta$  mostrada en los restos 251-270 de la SEC ID N° 4, y que comprende opcionalmente uno o más aminoácidos incluidos dentro de una segunda región polipeptídica de PDGFR $\beta$  mostrada en los restos 196-205 de la SEC ID N° 4; y (II) una segunda región de unión a antígeno que se une específicamente a VEGF-A y neutraliza la actividad VEGF-A, en el que la región de unión a VEGF-A se une a un epítipo que comprende (a) uno o más aminoácidos incluidos dentro de una primera región polipeptídica de VEGF-A mostrada en los restos 42-52 de la SEC ID N° 2 y (b) uno o más aminoácidos incluidos dentro de una segunda región polipeptídica de VEGF-A mostrada en los restos 72-82 de la SEC ID N° 2. En algunas de estas realizaciones, el epítipo anti-VEGF-A (i) no comprende un aminoácido incluido dentro de una región polipeptídica de VEGF-A mostrada en los restos 90 a 132 de la SEC ID N° 2; o (ii) comprende adicionalmente uno o más aminoácidos incluidos dentro de una tercera región polipeptídica de VEGF-A mostrada en los restos 98-114 de la SEC ID N° 2.

En variaciones particulares de un anticuerpo biespecífico como los anteriores, (I) la región de unión a PDGFR $\beta$  incluye un dominio  $V_L$  ( $V_{L-PDGFR}$ ) que comprende las CDR LCDR1 $_{PDGFR}$ , LCDR2 $_{PDGFR}$ , y LCDR3 $_{PDGFR}$  y un dominio  $V_H$  ( $V_{H-PDGFR}$ ) que comprende las CDR HCDR1 $_{PDGFR}$ , HCDR2 $_{PDGFR}$ , y HCDR3 $_{PDGFR}$ , en el que LCDR1 $_{PDGFR}$  tiene la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEC ID N° 433; LCDR2 $_{PDGFR}$  tiene la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEC ID N° 434; LCDR3 $_{PDGFR}$  tiene la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEC ID N° 435; HCDR1 $_{PDGFR}$  tiene la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEC ID N° 436; HCDR2 $_{PDGFR}$  tiene la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEC ID N° 437; HCDR3 $_{PDGFR}$  tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada entre el grupo que consiste en las SEC ID N° 438-442; y (II) la región de unión a VEGF-A incluye un dominio  $V_L$  ( $V_{L-VEGF}$ ) que comprende las CDR LCDR1 $_{VEGF}$ , LCDR2 $_{VEGF}$ , y LCDR3 $_{VEGF}$  y un dominio  $V_H$  ( $V_{H-VEGF}$ ) que comprende las CDR HCDR1 $_{VEGF}$ , HCDR2 $_{VEGF}$ , y HCDR3 $_{VEGF}$ , en el que (A) LCDR1 $_{VEGF}$  tiene la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEC ID N° 448; LCDR2 $_{VEGF}$  tiene la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEC ID N° 449; LCDR3 $_{VEGF}$  tiene la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEC ID N° 450; HCDR1 $_{VEGF}$  tiene la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEC ID N° 451; HCDR2 $_{VEGF}$  tiene la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEC ID N° 452; HCDR3 $_{VEGF}$  tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada entre el grupo que consiste en las SEC ID N° 453-461; o (B) LCDR1 $_{VEGF}$  tiene la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEC ID N° 462; LCDR2 $_{VEGF}$  tiene la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEC ID N° 463; LCDR3 $_{VEGF}$  tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada entre el grupo que consiste en las SEC ID N° 464 y 465; HCDR1 $_{VEGF}$  tiene la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEC ID N° 466; HCDR2 $_{VEGF}$  tiene la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEC ID N° 467; HCDR3 $_{VEGF}$  tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada entre el grupo que consiste en las SEC ID N° 468-470. En ciertas realizaciones, LCDR1 $_{PDGFR}$ , LCDR2 $_{PDGFR}$ , y LCDR3 $_{PDGFR}$  tienen las secuencias de aminoácidos mostradas, respectivamente, en los restos 24-40, los restos 56-62, y los restos 95-103 de la SEC ID N° 46; y HCDR1 $_{PDGFR}$ , HCDR2 $_{PDGFR}$ , y HCDR3 $_{PDGFR}$  tienen las secuencias de aminoácidos mostradas, respectivamente, en los restos 31-35, los restos 50-66, y los restos 99-111 de la SEC ID N° 48. En algunas realizaciones alternativas, LCDR1 $_{PDGFR}$ , LCDR2 $_{PDGFR}$ , y LCDR3 $_{PDGFR}$  tienen las secuencias de aminoácidos mostradas, respectivamente, en los restos 24-40, los restos 56-62, y los restos 95-103 de la SEC ID N° 6; y HCDR1 $_{PDGFR}$ , HCDR2 $_{PDGFR}$ , y HCDR3 $_{PDGFR}$  tienen las secuencias de aminoácidos mostradas, respectivamente, en (a) los restos 31-35, los restos 50-66, y los restos 99-110 de la SEC ID N° 8, o (b) los restos 31-35, los restos 50-66, y los restos 99-110 de la SEC ID N° 12. En variaciones más específicas,  $V_{L-PDGFR}$  y  $V_{H-PDGFR}$  comprenden las secuencias de aminoácidos mostradas en las SEC ID N° 46 y 48, respectivamente; o, como alternativa,  $V_{L-PDGFR}$  comprende la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEC ID N° 6, y  $V_{H-PDGFR}$  comprende la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEC ID N° 8 o SEC ID N° 12.

En algunas realizaciones de un anticuerpo biespecífico como los anteriores, la región de unión a VEGF-A comprende las CDR expuestas en (II)(A). En variaciones particulares, (a) LCDR1 $_{VEGF}$ , LCDR2 $_{VEGF}$ , y LCDR3 $_{VEGF}$  tienen las secuencias de aminoácidos mostradas, respectivamente, en los restos 24-34, los restos 50-56, y los restos 89-97 de la SEC ID N° 242; y HCDR1 $_{VEGF}$ , HCDR2 $_{VEGF}$ , y HCDR3 $_{VEGF}$  tienen las secuencias de aminoácidos mostradas, respectivamente, en los restos 31-35, los restos 50-66, y los restos 99-107 de la SEC ID N° 244; o (b) LCDR1 $_{VEGF}$ , LCDR2 $_{VEGF}$ , y LCDR3 $_{VEGF}$  tienen las secuencias de aminoácidos mostradas, respectivamente, en los restos 24-34, los restos 50-56, y los restos 89-97 de la SEC ID N° 278; y HCDR1 $_{VEGF}$ , HCDR2 $_{VEGF}$ , y HCDR3 $_{VEGF}$  tienen las secuencias de aminoácidos mostradas, respectivamente, en los restos 31-35, los restos 50-66, y los restos 99-110 de la SEC ID N° 280. En variaciones más específicas,  $V_{L-VEGF}$  y  $V_{H-VEGF}$  comprenden (a) las secuencias de aminoácidos mostradas en las SEC ID N° 242 y 244, respectivamente, o (b) las secuencias de aminoácidos mostradas en las SEC ID N° 278 y 280, respectivamente.

En otras realizaciones de un anticuerpo biespecífico como los anteriores, la región de unión a VEGF-A comprende las CDR expuestas en (II)(B). En variaciones particulares, LCDR1 $_{VEGF}$ , LCDR2 $_{VEGF}$ , y LCDR3 $_{VEGF}$  tienen las secuencias de aminoácidos mostradas, respectivamente, en los restos 23-35, los restos 51-57; y los restos 90-100 de la SEC ID N° 246; y HCDR1 $_{VEGF}$ , HCDR2 $_{VEGF}$ , y HCDR3 $_{VEGF}$  tienen las secuencias de aminoácidos mostradas, respectivamente, en los restos 31-35, los restos 50-66, y los restos 99-102 de la SEC ID N° 248. En variaciones más específicas,  $V_{L-VEGF}$  comprende la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEC ID N° 246 y  $V_{H-VEGF}$  comprende la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEC ID N° 248.

Anticuerpos biespecíficos adecuados como los anteriores incluyen aquellos en un formato bi-Fv de cadena sencilla (biscFv) o biAb. En algunas realizaciones preferidas, en que el anticuerpo biespecífico es un biscFv, el biscFv comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada entre el grupo que consiste en (i) los restos aminoácidos 20-770 de la SEC ID N° 624, y (ii) los restos aminoácidos 20-773 de la SEC ID N° 628, y (iii) los restos aminoácidos 20-768 de la SEC ID N° 626. En otras realizaciones preferidas, en que el anticuerpo biespecífico es un biAb, el biAb incluye una cadena ligera de inmunoglobulina que comprende  $V_{L-PDGFR}$  como su dominio  $V_L$  y una cadena pesada de inmunoglobulina que comprende  $V_{H-PDGFR}$  como su dominio  $V_H$ , en el que la cadena pesada está fusionada en su extremo C-terminal con un Fv de cadena sencilla (scFv) que comprende  $V_{L-VEGF}$  y  $V_{H-VEGF}$  para formar una fusión IgG-scFv. En variaciones específicas de dicho biAb, la cadena ligera de inmunoglobulina comprende la secuencia de aminoácidos mostrada en los restos 20-239 de la SEC ID N° 537; y la fusión IgG-scFv comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada entre el grupo que consiste en (i) los restos aminoácidos 20-729 de la SEC ID N° 630, (ii) los restos aminoácidos 20-732 de la SEC ID N° 634, (iii) los restos aminoácidos 20-729 de la SEC ID N° 636, (iv) los restos aminoácidos 20-732 de la SEC ID N° 640, (v) los restos aminoácidos 20-727 de la SEC ID N° 632, y (vi) los restos aminoácidos 20-727 de la SEC ID N° 638.

En otro aspecto más, la presente memoria descriptiva describe una composición farmacéutica que comprende un anticuerpo descrito en el presente documento y un vehículo farmacéuticamente aceptable. En ciertas realizaciones, una composición farmacéutica comprende un anticuerpo neutralizante anti-PDGFR $\beta$ . En otras realizaciones, una composición farmacéutica comprende un anticuerpo neutralizante anti-VEGF-A. En ciertas variaciones preferidas, una composición farmacéutica comprende tanto un anticuerpo neutralizante de PDGFR $\beta$  como un anticuerpo neutralizante de VEGF-A. Las composiciones farmacéuticas de acuerdo con la presente invención comprenden un anticuerpo biespecífico que se une y neutraliza tanto PDGFR $\beta$  como VEGF-A, como se define en las reivindicaciones.

En otro aspecto, la presente memoria descriptiva describe un polinucleótido que codifica el dominio V<sub>L</sub> y/o V<sub>H</sub> de un anticuerpo descrito anteriormente. En algunas realizaciones, la presente invención proporciona un polinucleótido que codifica un anticuerpo biespecífico que se une y neutraliza tanto PDGFR $\beta$  como VEGF-A. La presente invención proporciona adicionalmente un vector de expresión que comprende un polinucleótido como se define en las reivindicaciones, así como una célula huésped que comprende dicho vector de expresión y que puede usarse en procedimientos para producir un anticuerpo de la presente invención. Dicho procedimiento para producir un anticuerpo de la invención normalmente comprende cultivar la célula huésped en condiciones en que se expresa el anticuerpo y aislar el anticuerpo de la célula huésped.

En otro aspecto más, la presente memoria descriptiva describe un procedimiento para inhibir la angiogénesis en un sujeto mediante la administración de al menos uno de un antagonista de PDGFR $\beta$  y un antagonista de VEGF-A. En ciertas realizaciones, el procedimiento incluye administrar a un sujeto que tiene angiogénesis una cantidad eficaz de un anticuerpo anti-PDGFR $\beta$  como se ha descrito anteriormente, y opcionalmente comprende adicionalmente administrar al sujeto una cantidad eficaz de un antagonista de VEGF-A. En otras realizaciones, el procedimiento incluye administrar a un sujeto que tiene angiogénesis una cantidad eficaz de un anticuerpo anti-VEGF-A como se ha descrito anteriormente, y opcionalmente comprende adicionalmente administrar al sujeto una cantidad eficaz de un antagonista de PDGFR $\beta$ . En ciertas realizaciones preferidas, el procedimiento incluye administrar a un sujeto que tiene angiogénesis una cantidad eficaz de un anticuerpo anti-PDGFR $\beta$  y una cantidad eficaz de un anticuerpo anti-VEGF-A. Cuando el procedimiento incluye la administración tanto de un antagonista de PDGFR como de un antagonista de VEGF-A, el antagonista de PDGFR $\beta$  y el antagonista de VEGF-A pueden administrarse, por ejemplo, por separado o simultáneamente. En algunas variaciones, la administración del antagonista de PDGFR $\beta$  y el antagonista de VEGF-A comprende administrar una composición de unión biespecífica que comprende tanto un anticuerpo neutralizante anti-PDGFR $\beta$  como un anticuerpo neutralizante anti-VEGF-A. En otras variaciones, la administración del antagonista de PDGFR $\beta$  y el antagonista de VEGF-A comprende administrar un anticuerpo biespecífico que se une a y neutraliza tanto PDGFR $\beta$  como VEGF-A.

En un aspecto relacionado, la presente memoria descriptiva describe un procedimiento para tratar un trastorno neovascular en un sujeto mediante la administración de al menos uno de un antagonista de PDGFR $\beta$  y un antagonista de VEGF-A. En ciertas realizaciones, el procedimiento incluye administrar a un sujeto que tiene un trastorno neovascular una cantidad eficaz de un anticuerpo anti-PDGFR $\beta$  como se ha descrito anteriormente, y opcionalmente comprende adicionalmente administrar al sujeto una cantidad eficaz de un antagonista de VEGF-A. En otras realizaciones, el procedimiento incluye administrar a un sujeto que tiene un trastorno neovascular una cantidad eficaz de un anticuerpo anti-VEGF-A como se ha descrito anteriormente, y opcionalmente comprende adicionalmente administrar al sujeto una cantidad eficaz de un antagonista de PDGFR $\beta$ . En ciertas realizaciones preferidas, el procedimiento incluye administrar a un sujeto que tiene un trastorno neovascular una cantidad eficaz de un anticuerpo anti-PDGFR $\beta$  y una cantidad eficaz de un anticuerpo anti-VEGF-A. Cuando el procedimiento incluye la administración tanto de un antagonista de PDGFR como de un antagonista de VEGF-A, el antagonista de PDGFR y el antagonista de VEGF-A pueden administrarse, por ejemplo, por separado o simultáneamente. En algunas variaciones, la administración del antagonista de PDGFR $\beta$  y el antagonista de VEGF-A comprende administrar una composición de unión biespecífica que comprende tanto un anticuerpo neutralizante anti-PDGFR $\beta$  como un anticuerpo neutralizante anti-VEGF-A. En la presente invención, el anticuerpo biespecífico se une a y neutraliza tanto PDGFR $\beta$  como VEGF-A, como se define en las reivindicaciones.

En algunas realizaciones para tratar un trastorno neovascular, el trastorno neovascular es un cáncer caracterizado por crecimiento de tumor sólido. En algunas variaciones específicas, el cáncer es un cáncer pancreático, carcinoma de células renales (RCC), cáncer colorrectal, cáncer pulmonar no microcítico (NSCLC), tumor estromático gastrointestinal (GIST), o glioblastoma.

En otras realizaciones para tratar un trastorno neovascular, el trastorno neovascular es un trastorno ocular neovascular. En variaciones específicas, el trastorno ocular neovascular es degeneración macular relacionada con la edad, retinopatía diabética, neovascularización del iris, glaucoma neovascular, o vitrorretinopatía proliferativa.

La invención definida en las reivindicaciones llegará a ser evidente tras la referencia a la siguiente descripción detallada de la invención y los dibujos adjuntos.

## DEFINICIONES

Salvo que se definan de otro modo, todos los términos técnicos y científicos usados en el presente documento tienen el mismo significado que el habitualmente comprendido por un especialista en la técnica correspondiente a los procedimientos y composiciones descritos. Como se usa en el presente documento, los siguientes términos y expresiones tienen los significados atribuidos a los mismos salvo que se especifique de otro modo.

Un "polipéptido" es un polímero de restos aminoacídicos unido por enlaces peptídicos, ya sea producido de forma natural o sintéticamente. Los polipéptidos de menos de aproximadamente 10 restos aminoacídicos se mencionan habitualmente como "péptidos".

Una "proteína" es una macromolécula que comprende una o más cadenas polipeptídicas. Una proteína también puede comprender componentes no peptídicos, tales como grupos carbohidrato. Los carbohidratos y otros sustituyentes no peptídicos pueden añadirse a una proteína mediante la célula en que se produce la proteína, y variarán con el tipo de célula. Las proteínas se definen en el presente documento en términos de sus estructuras troncales de aminoácidos; sustituyentes tales como grupos carbohidrato generalmente no se especifican, pero no obstante pueden estar presentes.

Las expresiones "amino-terminal" y "carboxilo-terminal" se usan en el presente documento para indicar posiciones dentro de los polipéptidos. Cuando el contexto lo permite, estas expresiones se usan con referencia a una secuencia o parte particular de un polipéptido para indicar proximidad o posición relativa. Por ejemplo, una cierta secuencia posicionada de forma carboxilo-terminal a una secuencia de referencia dentro de un polipéptido se localiza proximal al extremo carboxilo de la secuencia de referencia, pero no está necesariamente en el extremo carboxilo del polipéptido completo.

Como se usa en el presente documento, "ácido nucleico" o "molécula de ácido nucleico" se refiere a polinucleótidos, tales como ácido desoxirribonucleico (ADN) o ácido ribonucleico (ARN), oligonucleótidos, fragmentos generados por la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), y fragmentos generados por cualquiera de ligamiento, escisión, acción de endonucleasa, y acción de exonucleasa. Las moléculas de ácido nucleico pueden estar compuestas por monómeros que son nucleótidos de origen natural (tal como ADN y ARN), o análogos de nucleótidos de origen natural (por ejemplo, formas  $\alpha$ -enantioméricas de nucleótidos de origen natural), o una combinación de ambos. Los nucleótidos modificados pueden tener alteraciones en restos de azúcar y/o en restos de bases de pirimidina o purina. Las modificaciones de azúcar incluyen, por ejemplo, remplazo de uno o más grupos hidroxilo con halógenos, grupos alquilo, aminas, y grupos azido, o los azúcares pueden funcionalizarse como éteres o ésteres. Además, el resto de azúcar completo puede remplazarse con estructuras estérica y electrónicamente similares, tales como aza-azúcares y análogos carbocíclicos de azúcar. Ejemplos de modificaciones en un resto básico incluyen purinas y pirimidinas alquiladas, purinas o pirimidinas aciladas, u otros sustitutos heterocíclicos bien conocidos. Los monómeros de ácido nucleico pueden unirse por enlaces fosfodiéster o análogos de dichos enlaces. Los análogos de enlaces fosfodiéster incluyen fosforotioato, fosforoditioato, fosforoselenoato, fosforodiselenoato, fosforoanilitioato, fosforanilidato, fosforamidato, y similares. La expresión "molécula de ácido nucleico" también incluye los llamados "ácidos péptido nucleicos", que comprenden bases de ácido nucleico de origen natural o modificadas unidas a una estructura poliamida. Los ácidos nucleicos pueden ser monocatenarios o bicatenarios.

Como se usa en el presente documento, el término "antagonista" se refiere a un compuesto que reduce la actividad de otro compuesto en un entorno biológico. Por tanto, un antagonista de VEGF-A es un compuesto que reduce la actividad biológica de VEGF-A, y un antagonista de PDGFR $\beta$  es un compuesto que reduce la actividad biológica de PDGFR $\beta$ . Como las actividades tanto de VEGF-A como de PDGFR $\beta$  son dependientes de las interacciones de múltiples moléculas (incluyendo ligando, receptor, y transductores de señales), los antagonistas pueden reducir la actividad actuando directamente sobre VEGF-A o PDGFR $\beta$ , o actuando sobre otra molécula en la vía biológica afín. Por ejemplo, un antagonista de PDGFR $\beta$  puede reducir la actividad PDGFR $\beta$ , por ejemplo, uniéndose al propio receptor, uniéndose a uno de sus ligandos, impidiendo la dimerización del receptor, o impidiendo la fosforilación del receptor. Los antagonistas incluyen, sin limitación, anticuerpos, receptores solubles, y compuestos no proteicos que se unen a un ligando o su receptor, o interfieren de otro modo con las interacciones ligando-receptor y/u otras funciones del receptor.

El término "anticuerpo" se usa en el presente documento para indicar proteínas producidas por el organismo en respuesta a la presencia de un antígeno y que se unen al antígeno, así como fragmentos de unión a antígeno y variantes modificadas por ingeniería de los mismos. Por tanto, los términos "anticuerpo" y "anticuerpos", incluyen anticuerpos policlonales, anticuerpos policlonales purificados por afinidad, anticuerpos monoclonales, y fragmentos de anticuerpo de unión a antígeno, tales como fragmentos F(ab')<sub>2</sub> y Fab. También se incluyen anticuerpos intactos y fragmentos modificados por ingeniería genética, tales como anticuerpos quiméricos, anticuerpos humanizados, fragmentos Fv de cadena sencilla, anticuerpos de cadena sencilla, diacuerpos, minicuerpos, anticuerpos lineales, anticuerpos híbridos multivalentes o multispecíficos, y similares. Por tanto, el término "anticuerpo" se usa de forma expansiva para incluir cualquier proteína que comprenda un sitio de unión a antígeno de un anticuerpo y sea capaz de unirse a su antígeno.

La expresión "anticuerpos modificados por ingeniería genética" significa anticuerpos en los que la secuencia de aminoácidos se ha variado a partir de la de un anticuerpo nativo. A causa de la relevancia de las técnicas de ADN recombinante en la generación de anticuerpos, no es necesario limitarse a las secuencias de aminoácidos halladas en anticuerpos naturales; los anticuerpos pueden rediseñarse para obtener características deseadas. Las posibles variaciones son muchas y varían desde el cambio de solamente uno o unos pocos aminoácidos hasta el rediseño completo de, por ejemplo, la región variable o constante. Los cambios en la región constante, en general, se harán para mejorar o alterar características, tales como la fijación del complemento, la interacción con células y otras funciones efectoras. Normalmente, los cambios en la región variable se harán para mejorar las características de unión al antígeno, mejorar la estabilidad de la región variable, o reducir el riesgo de inmunogenicidad.

Un "sitio de unión a antígeno de un anticuerpo" es esa parte de un anticuerpo que se suficiente para unirse a su antígeno. El mínimo de dicha región es normalmente un dominio variable o una variante modificada por ingeniería genética del mismo. Pueden generarse sitios de unión de un único dominio a partir de anticuerpos de camélidos (véase Muyldermans y Lauwereys, J. Mol. Recog. 12:131-140, 1999; Nguyen y col., EMBO J. 19:921-930, 2000) o a partir de dominios  $V_H$  de otras especies para producir anticuerpos de un único dominio ("dAb"; véase Ward y col., Nature 341:544-546, 1989; patente de Estados Unidos Nº 6.248.516 de Winter y col.). En ciertas variaciones, un sitio de unión a antígeno es una región polipeptídica que tiene solamente 2 regiones determinantes de complementariedad (CDR) de un dominio variable de cadena pesada o dominio variable de cadena ligera de origen natural o no natural (por ejemplo, mutagenizado), o combinación de los mismos (véase, por ejemplo, Pessi y col., Nature 362:367-369, 1993; Qiu y col., Nature Biotechnol. 25:921-929, 2007). Más habitualmente, un sitio de unión a antígeno de un anticuerpo comprende tanto un dominio variable de cadena pesada como un dominio variable de cadena ligera que se unen a un epítipo común. Dentro de la presente invención, una molécula que "comprende un sitio de unión a antígeno de un anticuerpo" puede comprender adicionalmente uno o más de un segundo sitio de unión a antígeno de un anticuerpo (que puede unirse al mismo epítipo o uno diferente o al mismo antígeno o uno diferente), un enlazador peptídico, un dominio constante de inmunoglobulina, una bisagra de inmunoglobulina, una hélice anfipática (véase, Pack y Pluckthun, Biochem. 31:1579-1584, 1992), un enlazador no peptídico, un oligonucleótido (véase Chaudri y col., FEBS Letters 450:23-26, 1999), y similares, y puede ser una proteína monomérica o multimérica. Ejemplos de moléculas que comprenden un sitio de unión a antígeno de un anticuerpo son conocidos en la técnica e incluyen, por ejemplo, fragmentos Fv, fragmentos Fv de cadena sencilla (scFv), fragmentos Fab, diacuerpos, minicuerpos, fusiones Fab-scFv, (scFv)<sub>4</sub>-IgG biespecíficos, y (scFv)<sub>2</sub>-Fab biespecíficos. (Véase, por ejemplo, Hu y col., Cancer Res. 56:3055-3061, 1996; Atwell y col., Molecular Immunology 33:1301-1312, 1996; Carter y Merchant, Curr. Opin. Biotechnol. 8:449-454, 1997; Zuo y col., Protein Engineering 13:361-367, 2000; y Lu y col., J. Immunol. Methods 267:213-226, 2002.)

Como se usa en el presente documento, el término "inmunoglobulina" se refiere a una proteína que consta de uno o más polipéptidos sustancialmente codificados por el gen o genes de inmunoglobulina. Una forma de inmunoglobulina constituye la unidad estructural básica de un anticuerpo. Esta forma es un tetrámero y consta de dos pares idénticos de cadenas de inmunoglobulina, teniendo cada par una cadena ligera y una pesada. En cada par, las regiones variables de cadena ligera y pesada juntas son responsables de la unión a un antígeno, y las regiones constantes son responsables de las funciones efectoras del anticuerpo. Las inmunoglobulinas normalmente funcionan como anticuerpos en un organismo vertebrado. Se han identificado cinco clases de proteínas inmunoglobulina (IgG, IgA, IgM, IgD, e IgE) en vertebrados superiores. La IgG comprende la clase principal; normalmente existe como la segunda proteína más abundante hallada en plasma. En seres humanos, la IgG consta de cuatro subclases, denominadas IgG 1, IgG2, IgG3, e IgG4. Las regiones constantes de cadena pesada de la clase IgG se identifican con el símbolo griego  $\gamma$ . Por ejemplo, las inmunoglobulinas de la subclase IgG1 contienen una región constante de cadena pesada  $\gamma_1$ . Cada cadena pesada de inmunoglobulina posee una región constante que consta de dominios proteicos de región constante ( $C_{H1}$ , bisagra,  $C_{H2}$ , y  $C_{H3}$ ; IgG3 también contiene un dominio  $C_{H4}$ ) que son esencialmente invariables para una subclase dada en una especie. Las secuencias de ADN que codifican cadenas de inmunoglobulina humanas y no humanas son conocidas en la técnica. (Véase, por ejemplo, Ellison y col., DNA 1:11-18, 1981; Ellison y col., Nucleic Acids Res. 10:4071-4079, 1982; Kenten y col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 79:6661-6665, 1982; Seno y col., Nuc. Acids Res. 11:719-726, 1983; Riechmann y col., Nature 332:323-327, 1988; Amster y col., Nuc. Acids Res. 8:2055-2065, 1980; Rusconi y Kohler, Nature 314:330-334, 1985; Boss y col., Nuc. Acids Res. 12:3791-3806, 1984; Bothwell y col., Nature 298:380-382, 1982; van der Loo y col., Immunogenetics 42:333-341, 1995; Karlin y col., J. Mol. Evol. 22:195-208, 1985; Kindsvogel y col., DNA 1:335-343, 1982; Breiner y col., Gene 18:165-174, 1982; Kondo y col., Eur. J. Immunol. 23:245-249, 1993; y Nº de acceso a GenBank J00228.) Para una revisión de la estructura y función de las inmunoglobulinas véase Putnam, The Plasma Proteins, Vol V, Academic Press, Inc., 49-140, 1987; y Padlan, Mol. Immunol. 31:169-217, 1994. El término "inmunoglobulina" se usa en el presente documento por su significado común, indicando un anticuerpo intacto, sus cadenas componentes, o fragmentos de cadenas, dependiendo del contexto.

Las "cadenas ligeras" de inmunoglobulina de longitud completa (aproximadamente 25 Kd o 214 aminoácidos) se codifican por un gen de región variable en el extremo  $NH_2$  (que codifica aproximadamente 110 aminoácidos) y por un gen de región constante kappa o lambda en el extremo  $COOH$ . Las "cadenas pesadas" de inmunoglobulina de longitud completa (aproximadamente 50 Kd o 446 aminoácidos) se codifican por un gen de región variable (que codifica aproximadamente 116 aminoácidos) y un gen de región constante gamma, mu, alfa, delta, o épsilon (que codifica aproximadamente 330 aminoácidos), definiendo éste último el isotipo del anticuerpo como IgG, IgM, IgA,

IgD, o IgE, respectivamente. Dentro de las cadenas ligera y pesada, las regiones variable y constante están unidas por una región "J" de aproximadamente 12 o más aminoácidos, incluyendo además cadena pesada una región "D" de aproximadamente 10 o más aminoácidos. (Véase en líneas generales *Fundamental Immunology* (Paul, ed., Raven Press, N.Y., 2ª ed. 1989, Cap. 7.)

- 5 Un fragmento "Fv" de inmunoglobulina contiene un dominio variable de cadena pesada ( $V_H$ ) y un dominio variable de cadena ligera ( $V_L$ ), que se mantienen juntos por interacciones no covalentes. Un fragmento Fv de inmunoglobulina por tanto contiene un único sitio de unión a antígeno. La estructura dimérica de un fragmento Fv puede estabilizarse adicionalmente mediante la introducción de un enlace disulfuro mediante mutagénesis. (Véase Almog y col., *Proteins* 31:128-138, 1998.)
- 10 Como se usa en el presente documento, las expresiones "Fv de cadena sencilla" y "anticuerpo de cadena sencilla" se refieren a fragmentos de anticuerpo que comprenden, dentro de una única cadena polipeptídica, las regiones variables tanto de la cadena pesada como de la ligera, pero carecen de regiones constantes. En general, un anticuerpo de cadena sencilla comprende adicionalmente un enlazador polipeptídico entre los dominios  $V_H$  y  $V_L$ , que le posibilita formar la estructura deseada que permite la unión al antígeno. Los anticuerpos de cadena sencilla se analizan en detalle por, por ejemplo, Pluckthun en *The Pharmacology of Monoclonal Antibodies*, vol. 113 (Rosenburg y Moore eds., Springer-Verlag, Nueva York, 1994), pág. 269-315. (Véase también, la publicación WIPO WO 88/01649; las patentes de Estados Unidos N° 4.946.778 y 5.260.203; Bird y col., *Science* 242:423-426, 1988.) Los anticuerpos de cadena sencilla también pueden ser bi-específicos y/o humanizados.

- 20 Un "fragmento Fab" contiene una cadena ligera y las regiones  $C_{H1}$  y variable de una cadena pesada. La cadena pesada de un fragmento Fab no puede formar un enlace disulfuro con otra molécula de cadena pesada.

Un "fragmento Fab" contiene una cadena ligera y una cadena pesada que contiene más de la región constante, entre los dominios  $C_{H1}$  y  $C_{H2}$ , de modo que puede formarse el enlace disulfuro intercatenario entre dos cadenas pesadas para formar una molécula  $F(ab')_2$ .

- 25 Un "fragmento  $F(ab')_2$ " contiene dos cadenas ligeras y dos cadenas pesadas que contienen una parte de la región constante entre los dominios  $C_{H1}$  y  $C_{H2}$ , de modo que se forma un enlace disulfuro intercatenario entre dos cadenas pesadas.

- 30 Un "fragmento Fc" (o dominio Fc) de inmunoglobulina es la parte de un anticuerpo que es responsable de la unión a receptores de anticuerpo en células y el componente C1q del complemento. Fc significa "fragmento cristalino"; el fragmento de un anticuerpo que formará fácilmente un cristal de proteína. Distintos fragmentos de proteína, que se describieron originalmente por digestión proteolítica, pueden definir la estructura general global de una proteína inmunoglobulina. Como se definió originalmente en la bibliografía, el fragmento Fc consta de las regiones bisagra de cadena pesada ligadas por disulfuro, los dominios  $C_{H2}$ , y  $C_{H3}$ . Sin embargo, más recientemente el término se ha aplicado a una cadena sencilla que consta de  $C_{H3}$ ,  $C_{H2}$ , y al menos una parte de la bisagra suficiente para formar un dímero ligado por disulfuro con una segunda cadena de este tipo. Para una revisión de la estructura y función de la inmunoglobulina, véase Putnam, *The Plasma Proteins*, Vol. V (Academic Press, Inc., 1987), pág. 49-140; y Padlan, *Mol. Immunol.* 31:169-217, 1994. Como se usa en el presente documento, el término Fc incluye variantes de secuencias de origen natural.

- 40 Una región variable de cadena ligera o pesada de inmunoglobulina consta de una región "flanqueante" interrumpida por tres regiones hipervariables. Por tanto, la expresión "región hipervariable" se refiere a los restos aminoácidos de un anticuerpo que son responsables de la unión al antígeno. La región hipervariable comprende restos aminoácidos de una "región determinante de complementariedad" o "CDR" (por ejemplo, en seres humanos, los restos 24-34 (L1), 50-56 (L2), y 89-97 (L3) en el dominio variable de cadena ligera y los restos 31-35 (H1), 50-65 (H2) y 95-102 (H3) en el dominio variable de cadena pesada (números de la secuencia de aminoácidos basados en el índice EU; véase Kabat y col., *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5ª Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1991)) y/o aquellos restos de un "bucle hipervariable" (en seres humanos, los restos 26-32 (L1), 50-52 (L2) y 91-96 (L3) en el dominio variable de cadena ligera y 26-32 (H1), 53-55 (H2) y 96-101 (H3) en el dominio variable de cadena pesada; Chotia y Lesk, *J. Mol. Biol.* 196: 901-917, 1987) (ambos cuales se incorporan en el presente documento por referencia). Los restos de la "región flanqueante" o "FR" son aquellos restos del dominio variable diferentes de los restos de la región hipervariable definidos en el presente documento. Las secuencias de las regiones flanqueantes de diferentes cadenas ligeras y pesadas están relativamente conservadas dentro de una especie. Por tanto, una "región flanqueante humana" es una región flanqueante que es sustancialmente idéntica (aproximadamente un 85 % o más, habitualmente un 90-95 % o más) a la región flanqueante de una inmunoglobulina humana de origen natural. La región flanqueante de un anticuerpo, es decir, las regiones flanqueantes combinadas de las cadenas ligera y pesada constituyentes, sirve para posicionar y
- 55 alinear las CDR. Las CDR son principalmente responsables de la unión a un epítipo de un antígeno. Las CDR L1, L2, y L3 del dominio  $V_L$  también se mencionan en el presente documento, respectivamente, como LCDR1, LCDR2, y LCDR3; las CDR H1, H2, y H3 del dominio  $V_H$  también se mencionan en el presente documento, respectivamente, como HCDR1, HCDR2, y HCDR3.



- Los "anticuerpos quiméricos" son anticuerpos cuyos genes de cadena ligera y pesada se han construido, normalmente, por ingeniería genética, a partir de genes de región variable y constante de inmunoglobulina que pertenecen a diferentes especies. Por ejemplo, los segmentos variables de los genes de un anticuerpo monoclonal de ratón pueden unirse a segmentos que codifican la región constante humana (por ejemplo, los genes de cadena pesada gamma 1 o gamma 3 humana, y los genes de cadena ligera kappa humana). Un anticuerpo quimérico terapéutico es, por tanto, una proteína híbrida, normalmente compuesta por los dominios variables o de unión a antígeno de un anticuerpo de ratón y los dominios constantes de un anticuerpo humano, aunque pueden usarse otras especies de mamífero. Específicamente, un anticuerpo quimérico se produce por tecnología de ADN recombinante en que todo o parte de la región bisagra y constante de una cadena ligera de inmunoglobulina, cadena pesada, o ambas, se ha sustituido por las regiones correspondientes de cadena ligera o cadena pesada de inmunoglobulina de otro animal. De este modo, la parte de unión a antígeno del anticuerpo monoclonal precursor se injerta en la estructura del anticuerpo de otra especie. Los anticuerpos quiméricos opcionalmente pueden "envolverse" con una superficie tipo humana por remplazo de los restos expuestos, cuyo resultado es un "anticuerpo estratificado".
- Como se usa en el presente documento, la expresión "anticuerpo humano" incluye un anticuerpo que tiene una secuencia de aminoácidos de una inmunoglobulina humana e incluye anticuerpos aislados de bibliotecas de inmunoglobulinas humanas o de animales transgénicos para uno o más genes de inmunoglobulina humana y que no expresan inmunoglobulinas endógenas, como se describe, por ejemplo, en la patente de Estados Unidos N° 5.939.598 de Kucherlapati y col.
- La expresión "inmunoglobulina humanizada" se refiere a una inmunoglobulina que comprende una región flanqueante humana y una o más CDR de una inmunoglobulina no humana (por ejemplo, un ratón o rata). La inmunoglobulina no humana que proporciona las CDR se llama "donante" y la inmunoglobulina humana que proporciona la región flanqueante se llama "aceptora". Las regiones constantes no necesitan estar presentes, pero si lo están, deben ser sustancialmente idénticas a las regiones constantes de inmunoglobulina humana, es decir, al menos aproximadamente un 85-90 %, preferentemente aproximadamente un 95 % o más idénticas. Por tanto, todas las partes de una inmunoglobulina humanizada, excepto posiblemente las CDR, son sustancialmente idénticas a las partes correspondientes de secuencias naturales de inmunoglobulina humana. En algunos casos, los anticuerpos humanizados puede retener restos no humanos dentro de los dominios flanqueantes de la región variable humana para potenciar las apropiadas características de unión (por ejemplo, pueden ser necesarias mutaciones en las regiones flanqueantes para conservar la afinidad de unión cuando se humaniza un anticuerpo). Un "anticuerpo humanizado" es un anticuerpo que comprende una inmunoglobulina de cadena ligera humanizada y una cadena pesada humanizada. Por ejemplo, un anticuerpo humanizado no abarcaría un anticuerpo quimérico típico definido anteriormente porque, por ejemplo, la región variable completa de un anticuerpo quimérico es no humana.
- Un anticuerpo "biespecífico" o "bifuncional" es un anticuerpo híbrido que tiene dos diferentes pares de cadena pesada/ligera y dos sitios diferentes de unión. Los anticuerpos biespecíficos pueden producirse mediante diversos procedimientos incluyendo, aunque sin limitación, fusión de hibridomas o ligamiento de fragmentos Fab'. Véase, por ejemplo, Songvilai y Lachmann, Clin. Exp. Immunol. 79:315-321, 1990; Kostelny y col., J. Immunol. 148:1547-1553, 1992.
- Un "anticuerpo bivalente" diferente a un anticuerpo "multiespecífico" o "multifuncional", en ciertas realizaciones, es un anticuerpo que comprende dos sitios de unión que tienen idéntica especificidad antigénica.
- El término "diacuerpos" se refiere pequeños fragmentos de anticuerpo con dos sitios de unión a antígeno, comprendiendo dichos fragmentos un dominio variable de cadena pesada ( $V_H$ ) conectado a un dominio variable de cadena ligera ( $V_L$ ) en la misma cadena polipeptídica ( $V_H-V_L$ ). Usando un enlazador que es demasiado corto para permitir el apareamiento entre los dos dominios en la misma cadena, se fuerza a que los dominios aparezcan con los dominios complementarios de otra cadena y creen dos sitios de unión a antígeno. Los diacuerpos se describen más completamente en, por ejemplo, el documento EP 404,097; el documento WO 93/11161; y Hollinger y col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:6444-6448, 1993.
- El término "minicuerpo" se refiere en el presente documento a un polipéptido que codifica solamente 2 regiones determinantes de complementariedad (CDR) de un dominio variable de cadena pesada o dominio variable de cadena ligera de origen natural o no natural (por ejemplo, mutagenizado), o combinación de los mismos. Ejemplos de minicuerpos se describen por, por ejemplo, Pessi y col., Nature 362:367-369, 1993; y Qiu y col., Nature Biotechnol. 25:921-929, 2007.
- La expresión "anticuerpos lineales" se refiere a los anticuerpos descritos en Zapata y col., Protein Eng. 8:1057-1062, 1995. En resumen, estos anticuerpos comprenden un par de segmentos Fd en tándem ( $V_H-C_{H1}-V_H-C_{H1}$ ) que forman un par de regiones de unión a antígeno. Los anticuerpos lineales pueden ser biespecíficos o monoespecíficos.
- La expresión "anticuerpo monoclonal" como se usa en el presente documento no se limita a anticuerpos producidos a través de tecnología de hibridoma. La expresión "anticuerpo monoclonal" se refiere a un anticuerpo que se obtiene de un único clon, incluyendo cualquier clon eucariota, procariota, o fago, y no al procedimiento por el cual se produce.

La expresión "anticuerpo precursor" como se usa en el presente documento se refiere a un anticuerpo que está codificado por una secuencia de aminoácidos usada para la preparación de la variante. Preferentemente, el anticuerpo precursor tiene una región flanqueante humana y, si está presente, tiene la región o regiones constantes de anticuerpo humano. Por ejemplo, el anticuerpo precursor puede ser un anticuerpo humanizado o humano.

- 5 Un anticuerpo anti-PDGFR $\beta$  o anti-VEGF-A "variante", se refiere en el presente documento a una molécula que difiere en secuencia de aminoácidos de una secuencia de aminoácidos del anticuerpo anti-PDGFR $\beta$  o anti-VEGF-A "precursor" en virtud de adición, delección y/o sustitución de uno o más restos aminoacídicos en la secuencia del anticuerpo precursor. En la realización preferida, la variante comprende una o más sustituciones de aminoácido en una o más regiones hipervariables del anticuerpo precursor. Por ejemplo, la variante puede comprender al menos una, por ejemplo, de aproximadamente una a aproximadamente diez, y preferentemente de aproximadamente dos a aproximadamente cinco, sustituciones en una o más regiones hipervariables del anticuerpo precursor. Normalmente, la variante tendrá una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 75 % de identidad de secuencia de aminoácidos con las secuencias de dominio variable de cadena pesada o ligera del anticuerpo precursor, más preferentemente al menos un 80 %, más preferentemente al menos un 85 %, más preferentemente al menos un 90 %, y mucho más preferentemente al menos un 95 %. La identidad u homología con respecto a esta secuencia se define en el presente documento como el porcentaje de restos aminoacídicos en la secuencia candidata que son idénticos a los restos del anticuerpo precursor, después de alinear las secuencias e introducir huecos, si fuera necesario, para conseguir el máximo porcentaje de identidad de secuencia. Se entenderá que ninguna extensión, delección o inserción N-terminal, C-terminal, o interna en la secuencia del anticuerpo afecta a la identidad u homología de secuencia. La variante retiene la capacidad de unirse a PDGFR $\beta$  o VEGF-A humano y preferentemente tiene propiedades que son superiores a las del anticuerpo precursor. Por ejemplo, la variante puede tener una afinidad de unión más fuerte, capacidad potenciada para inhibir la actividad biológica inducida por PDGFR $\beta$  o inducida por VEGF-A (por ejemplo, angiogénesis). Para analizar dichas propiedades, debe compararse una forma Fab de la variante con una forma Fab del anticuerpo precursor o una forma de longitud completa de la variante con una forma de longitud completa del anticuerpo precursor, por ejemplo, ya que se ha descubierto que el formato de un anticuerpo anti-PDGFR $\beta$  o anti-VEGF-A afecta a su actividad en los ensayos de actividad biológica desvelados en el presente documento. El anticuerpo variante de particular interés en el presente documento es uno que presenta una potenciación de aproximadamente al menos 3 veces, 5 veces, 10 veces, 20 veces, o 50 veces, en la actividad biológica en comparación con el anticuerpo precursor.
- 30 El término "epítipo" incluye cualquier determinante proteico con capacidad de unión específica a una inmunoglobulina o receptor de linfocito T. Los determinantes epitópicos habitualmente constan de agrupaciones superficiales químicamente activas de moléculas tales como aminoácidos o cadenas laterales de azúcar y habitualmente tienen características estructurales tridimensionales específicas, así como características de carga específicas. Más específicamente, la expresión "epítipo de PDGFR $\beta$ " o "epítipo de VEGF-A" como se usa en el presente documento se refiere a una parte del polipéptido PDGFR $\beta$  o VEGF-A que tiene actividad antigénica o inmunogénica en un animal, preferentemente en un mamífero, y mucho más preferentemente en un ratón o un ser humano. Un epítipo que tiene actividad inmunogénica es una parte de un polipéptido PDGFR $\beta$  o VEGF-A que provoca una respuesta de anticuerpos en un animal. Un epítipo que tiene actividad antigénica es una parte de un polipéptido PDGFR $\beta$  o VEGF-A a la cual se une inmunoespecíficamente un anticuerpo que se determina por cualquier procedimiento bien conocido en la técnica, por ejemplo, por inmunoensayos. Los epítipos antigénicos no necesariamente tienen que ser inmunogénicos.

- 45 Un "vector de clonación" es una molécula de ácido nucleico, tal como un plásmido, cósmido, o bacteriófago, que tiene la capacidad de replicarse de forma autónoma en una célula huésped. Los vectores de clonación normalmente contienen uno o una cantidad pequeña de sitios de reconocimiento por endonucleasas de restricción que permiten la inserción de una molécula de ácido nucleico de un modo determinable sin pérdida de una función biológica esencial del vector, así como secuencias de nucleótidos que codifican un gen marcador que es adecuado para su uso en la identificación y selección de células transformadas con el vector de clonación. Los genes marcadores normalmente incluyen genes que proporcionan resistencia a tetraciclina o resistencia a ampicilina.

- 50 El término "expresión" se refiere a la biosíntesis de un producto codificado por un ácido nucleico. Por ejemplo, en el caso de un segmento de ácido nucleico que codifica un polipéptido de interés, la expresión implica la transcripción del segmento de ácido nucleico en ARNm y la traducción del ARNm en uno o más polipéptidos.

- 55 Las expresiones "unidad de expresión" y "casete de expresión" se usan de forma intercambiable en el presente documento e indican un segmento de ácido nucleico que codifica un polipéptido de interés y capaz de proporcionar la expresión del segmento de ácido nucleico en una célula huésped. Una unidad de expresión normalmente comprende un promotor de transcripción, una fase de lectura abierta que codifica el polipéptido de interés, y un terminador de la transcripción, todos en configuración funcional. Además de un promotor y terminador de la transcripción, una unidad de expresión puede incluir adicionalmente otros segmentos de ácido nucleico tales como, por ejemplo, un potenciador o una señal de poliadenilación.

- 60 La expresión "vector de expresión", como se usa en el presente documento, se refiere a una molécula de ácido nucleico, lineal o circular, que comprende una o más unidades de expresión. Además de una o más unidades de

expresión, un vector de expresión también puede incluir segmentos adicionales de ácido nucleico tales como, por ejemplo, uno o más orígenes de replicación o uno o más marcadores de selección. Los vectores de expresión generalmente se obtienen de ADN plasmídico o viral, o pueden contener elementos de ambos.

5 Con respecto a proteínas descritas en el presente documento, referencias a restos aminoacídicos correspondientes a aquellos especificados por la SEC ID N° incluyen modificaciones post-traduccionales de dichos restos.

Los términos "neovascularización" y "angiogénesis", se usan de forma intercambiable en el presente documento. Neovascularización y angiogénesis se refieren a la generación de nuevos vasos sanguíneos en células, tejido, u órganos. El control de la angiogénesis normalmente se altera en ciertas patologías y, en muchos casos, el daño patológico asociado con la enfermedad está relacionado con angiogénesis alterada o no regulada. Sucede  
10 angiogénesis no regulada persistente en diversas patologías, incluyendo aquellas caracterizadas por el crecimiento anormal de células endoteliales, y da soporte a los daños patológicos observados en estas afecciones incluyendo filtración y permeabilidad de los vasos sanguíneos.

La expresión "trastorno neovascular", como se usa en el presente documento, se refiere a cualquier enfermedad o trastorno que tiene una patología que está mediada, al menos en parte, por actividad aumentada o no regulada de angiogénesis. Ejemplos de dichas enfermedades o trastornos incluyen diversos cánceres que comprenden tumores sólidos (por ejemplo, cáncer pancreático, carcinoma de células renales (RCC), cáncer colorrectal, cáncer pulmonar no microcítico (NSCLC), y tumor estromático gastrointestinal (GIST)) así como ciertas enfermedades oculares que implican neovascularización ("trastornos oculares neovasculares"). Dichas enfermedades o trastornos son particularmente susceptibles a ciertos procedimientos de tratamiento para la inhibición de la angiogénesis, como se describe adicionalmente en el presente documento.  
15  
20

"Trastorno ocular neovascular", como se usa en el presente documento, se refiere a un trastorno neovascular que implica al ojo de un paciente (es decir, una enfermedad o trastorno que tiene una patología que está mediada, al menos en parte, por actividad aumentada o no regulada de angiogénesis en el ojo del paciente). Ejemplos de trastornos oculares neovasculares susceptibles a tratamiento de acuerdo con la presente invención incluyen degeneración macular relacionada con la edad, retinopatía diabética, neovascularización del iris, glaucoma neovascular, vitrorretinopatía proliferativa, neovascularización del disco óptico, neovascularización de la córnea, neovascularización vítreo, paño, pterigión, edema macular, edema macular diabético, retinopatía vascular, degeneración de la retina, uveítis, y enfermedades inflamatorias de la retina.  
25

La expresión "cantidad eficaz", en el contexto de tratamiento de un trastorno neovascular mediante la administración de un antagonista de PDGFRβ y/o VEGF-A a un sujeto como se describe en el presente documento, se refiere a una cantidad de dicho agente que es suficiente para inhibir la angiogénesis en el sujeto para inhibir la aparición o mejorar uno o más síntomas del trastorno neovascular. Una cantidad eficaz de un agente se administra de acuerdo con los procedimientos de la presente invención en un régimen "eficaz". La expresión "régimen eficaz" se refiere a una combinación de cantidad del agente que se está administrando y frecuencia de dosificación adecuada para conseguir el tratamiento o prevención de la enfermedad o trastorno.  
30  
35

El término "paciente" o "sujeto", en el contexto del tratamiento de una enfermedad o trastorno como se describe en el presente documento, incluye mamíferos tales como, por ejemplo, seres humanos y otros primates. El término también incluye animales domesticados tales como, por ejemplo, vacas, cerdos, ovejas, caballos, perros, y gatos.

Dos secuencias de aminoácidos tienen un "100 % de identidad de secuencia de aminoácidos" si los restos aminoacídicos de las dos secuencias de aminoácidos son los mismos cuando se alinean para su máxima correspondencia. Asimismo, dos secuencias de nucleótidos tienen un "100 % de identidad de secuencia de nucleótidos" si los restos nucleotídicos de las dos secuencias de nucleótidos son los mismos cuando se alinean para su máxima correspondencia. Pueden realizarse comparaciones de secuencia usando programas convencionales de software tales como los incluidos en el paquete de bioinformática LASERGENE, producido por DNASTAR (Madison, Wisconsin). Otros procedimientos para comparar dos secuencias de nucleótidos o aminoácidos determinando la alineación óptima son bien conocidos para los especialistas en la técnica. (Véase, por ejemplo, Peruski y Peruski, The Internet and the New Biology: Tools for Genomic and Molecular Research (ASM Press, Inc. 1997); Wu y col. (eds.), "Information Superhighway and Computer Databases of Nucleic Acids and Proteins," en Methods in Gene Biotechnology 123-151 (CRC Press, Inc. 1997); Bishop (ed.), Guide to Human Genome Computing (2ª ed., Academic Press, Inc. 1998).) Se consideran que dos secuencias de nucleótidos o aminoácidos tienen "identidad de secuencia sustancialmente similar" o "identidad de secuencia sustancial" si las dos secuencias tienen al menos un 80 %, al menos un 90 %, o al menos un 95 % de identidad de secuencia una respecto a la otra.  
40  
45  
50

El porcentaje de identidad de secuencia se determina por procedimientos convencionales. Véase, por ejemplo, Altschul y col., Bull. Math. Bio. 48:603, 1986, y Henikoff y Henikoff, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:10915, 1992. Por ejemplo, dos secuencias de aminoácidos pueden alinearse para optimizar los valores de alineación usando una penalización por abertura de hueco de 10, una penalización por extensión de hueco de 1, y la matriz de valores "BLOSUM62" de Henikoff y Henikoff, *supra*, que se muestra en la Tabla 1 (los aminoácidos se indican por los códigos convencionales de una letra). El porcentaje de identidad entonces se calcula como: ([Cantidad total de coincidencias idénticas]/ [longitud de la secuencia más larga más la cantidad de huecos introducidos en la secuencia  
55

más larga para alinear las dos secuencias]](100).

**Tabla 1:** Matriz de valores BLOSUM62

	A	R	N	D	C	Q	E	G	H	I	L	K	M	F	P	S	T	W	Y	V
A	4																			
R	-1	5																		
N	-2	0	6																	
D	-2	-2	1	6																
C	0	-3	-3	-3	9															
Q	-1	1	0	0	-3	5														
E	-1	0	0	2	-4	2	5													
G	0	-2	0	-1	-3	-2	-2	6												
H	-2	0	1	-1	-3	0	0	-2	8											
I	-1	-3	-3	-3	-1	-3	-3	-4	-3	4										
L	-1	-2	-3	-4	-1	-2	-3	-4	-3	2	4									
K	-1	2	0	-1	-3	1	1	-2	-1	-3	-2	5								
M	-1	-1	-2	-3	-1	0	-2	-3	-2	1	2	-1	5							
F	-2	-3	-3	-3	-2	-3	-3	-3	-1	0	0	-3	0	6						
P	-1	-2	-2	-1	-3	-1	-1	-2	-2	-3	-3	-1	-2	-4	7					
S	1	-1	1	0	-1	0	0	0	-1	-2	-2	0	-1	-2	-1	4				
T	0	-1	0	-1	-1	-1	-1	-2	-2	-1	-1	-1	-1	-2	-1	1	5			
W	-3	-3	-4	-4	-2	-2	-3	-2	-2	-3	-2	-3	-1	1	-4	-3	-2	11		
Y	-2	-2	-2	-3	-2	-1	-2	-3	2	-1	-1	-2	-1	3	-3	-2	-2	2	7	
V	0	-3	-3	-3	-1	-2	-2	-3	-3	3	1	-2	1	-1	-2	-2	0	-3	-1	4

Los especialistas en la técnica apreciarán que hay muchos algoritmos establecidos disponibles para alinear dos secuencias de aminoácidos. El algoritmo de búsqueda de similitud "FASTA" de Pearson y Lipman es un procedimiento adecuado de alineación de proteínas para examinar el nivel de identidad compartido por una secuencia de aminoácidos desvelada en el presente documento y una segunda secuencia de aminoácidos. El algoritmo FASTA se describe por Pearson y Lipman, *Proc. Nat'l Acad. Sci. USA* 85:2444, 1988, y por Pearson, *Meth. Enzymol.* 183:63, 1990. En resumen, FASTA primero caracteriza la similitud de secuencia identificando regiones compartidas por la secuencia de consulta (por ejemplo, los restos 25-266 de la SEC ID N° 2) y una secuencia de ensayo que tienen la mayor densidad de identidades (si la variable ktup es 1,) o pares de identidades (si ktup=2), sin considerar sustituciones conservativas, inserciones o deleciones de aminoácidos. Las diez regiones con la mayor densidad de identidades después se vuelven a valorar comparando la similitud de todos los aminoácidos emparejados usando una matriz de sustitución de aminoácidos, y los extremos de las regiones se "recortan" para que incluyan solamente aquellos restos que contribuyan al valor más elevado. Si existen varias regiones con valores mayores que el valor de "punto de corte" (calculado mediante una fórmula predeterminada basada en la longitud de la secuencia y el valor ktup), entonces se examinan las regiones iniciales recortadas para determinar si las regiones pueden unirse para formar una alineación aproximada con huecos. Finalmente, las regiones con la valoración más elevada de las dos secuencias de aminoácidos se alinean usando una modificación del algoritmo de Needleman-Wunsch-Sellers (Needleman y Wunsch, *J. Mol. Biol.* 48:444, 1970; Sellers, *SIAM J. Appl. Math.* 26:787, 1974), que permite inserciones y deleciones de aminoácidos. Parámetros ilustrativos para el análisis FASTA son: ktup=1, penalización por abertura de hueco=10, penalización por extensión de hueco=1, y matriz de sustitución=BLOSUM62. Estos parámetros pueden introducirse en un programa FASTA modificando el archivo de matriz de valores ("SMATRIX"), como se explica en el Apéndice 2 de Pearson, *Meth. Enzymol.* 183:63, 1990.

FASTA también puede usarse para determinar la identidad de secuencia de moléculas de ácido nucleico usando una proporción como se ha desvelado anteriormente. Para comparaciones de secuencias de nucleótidos, el valor ktup puede variar entre uno y seis, preferentemente de tres a seis, mucho más preferentemente tres, con los otros parámetros establecidos como se ha descrito anteriormente.

## 5 **Breve descripción de las figuras**

Las Figuras 1A-1C ilustran las secuencias de aminoácidos de ciertos polipéptidos de Fc de inmunoglobulina. Los números de secuencia de aminoácidos se basan en el índice EU (Kabat y col., Sequences of Proteins of Immunological Interest, US Department of Health and Human Services, NIH, Bethesda, 1991). Las secuencias ilustradas incluyen una secuencia humana de tipo silvestre ("wt"; SEC ID N° 531) y cinco secuencias variantes, denominadas Fc-488 (SEC ID N° 532), Fc4 (SEC ID N° 533), Fc5 (SEC ID N° 492), Fc6 (SEC ID N° 534), y Fc7 (SEC ID N° 535). Se indican los restos Cys normalmente implicados en la formación de enlaces disulfuro para la región constante de cadena ligera (LC) y la región constante de cadena pesada (HC). A indica identidad con el tipo silvestre en esa posición. \*\*\* indica el codón de parada; el resto Lys C-terminal se ha retirado de Fc6. Se muestran los límites de los dominios bisagra, C<sub>H</sub>2, y C<sub>H</sub>3.

Las Figuras 2A-2C representan formados tetravalentes, biespecíficos de fusión Fc y Mab que tienen regiones Fv con especificidad por dos dianas diferentes (mencionadas en el presente documento como dianas X e Y). Los dominios Fv frente a la diana X se indican por un relleno de bandas, los dominios Fv frente a la diana Y se indican por un relleno gris, y los dominios constantes de Ig se indican por un relleno de puntos. La Figura 2A muestra una fusión de Fv de cadena sencilla y Fc en tándem (tascFv-Fc); la Figura 2B muestra una fusión bi-Fv de cadena sencilla Fc (biscFv-Fc); y la Figura 2C muestra un anticuerpo monoclonal complejo con un Fv de cadena sencilla (scFv) fusionado al extremo carboxilo (BiAb).

La Figura 3 representan la inhibición del brote de células endoteliales por antagonistas biespecíficos de PDGFRβ/VEGF-A en un ensayo de brote en co-cultivo *in vitro* en un contexto profiláctico. Se incorporaron perlas Cytodex-3 recubiertas con HUVEC en gel de fibrina junto con células madre mesenquimáticas humanas y se cultivaron con medio completo EGM-2 y medio condicionado de fibroblastos D551 (1:1) con HGF humano recombinante. (Véase el Ejemplo 75.) Se añadieron antagonistas - anti-VEGF-A (Bevacizumab, Genentech); una combinación de anti-VEGF-A + mAb anti-PDGFRβ E9899; o un anticuerpo biespecífico para PDGFRβ/VEGF-A (biscFv c1035/c868, biscFv c1035/c1039, biAb c597/c1039, o biAb c600/c1039) - al cultivo en el día 2 (desde el inicio del co-cultivo) a las concentraciones indicadas. A los 7 días después de la adición de los antagonistas, las células se fijaron y tiñeron con anticuerpos anti-PECAM o anti-SMA seguidos de anticuerpo secundario. Las células después se visualizaron mediante un microscopio invertido de fluorescencia y se analizaron para la longitud del brote de células endoteliales como se describe en el Ejemplo 75.

Las Figuras 4A-4D representan la inhibición del brote de células endoteliales por antagonistas biespecíficos de PDGFRβ/VEGF-A en un ensayo de brote en co-cultivo *in vitro* en un contexto terapéutico. Se incorporaron perlas Cytodex-3 recubiertas con HLTVEC en gel de fibrina junto con células madre mesenquimáticas humanas y se cultivaron con medio completo EGM-2 y medio condicionado de fibroblastos D551 (1:1) con HGF humano recombinante. (Véase el Ejemplo 75.) Se añadieron antagonistas - anti-VEGF-A (Bevacizumab, Genentech) o un anticuerpo biespecífico para PDGFRβ/VEGF-A (biscFv c1035/c868 (**4A**), biscFv c1035/c1039 (**4B**), biAb c597/c1039 (**4C**), o biAb c600/c1039 (**4D**)) - al cultivo en el día 8 (después de formarse los brotes de EC y el recubrimiento de pericitos) a las concentraciones indicadas. A los 7 días después de la adición de los antagonistas, las células se fijaron y tiñeron con anticuerpos anti-PECAM o anti-SMA seguidos de anticuerpo secundario. Las células después se visualizaron mediante un microscopio invertido de fluorescencia y se analizaron para la longitud del brote de células endoteliales como se describe en el Ejemplo 75.

## **Descripción de la invención**

### **I. Visión global**

La presente invención aborda la necesidad en la técnica de proporcionar más agentes terapéuticos para tratar trastornos neovasculares, incluyendo cánceres y trastornos oculares neovasculares. La presente memoria descriptiva describe antagonistas de VEGF-A y PDGFRβ, particularmente anticuerpos neutralizantes anti-VEGF-A y anti-PDGFRβ, que inhiban la señalización a través de receptores de VEGF-A y PDGFRβ. La inhibición de señales angiogénicas a través de VEGF-A y/o PDGFRβ usando dichos antagonistas es útil para el tratamiento de diversos trastornos que tienen una patología caracterizada al menos en parte por neovascularización. Por ejemplo, la inhibición de señales angiogénicas a través de VEGF-A y/o PDGFRβ en y alrededor de tumores reduce la capacidad del tumor de vascularizar, crecer, y metastatizar. Además, la inhibición de señales angiogénicas a través de VEGF-A y/o PDGFRβ reduce la neovascularización características de diversas enfermedades oculares incluyendo, por ejemplo, degeneración macular relacionada con la edad (AMD), retinopatía diabética, vitrorretinopatía proliferativa (PVR), neovascularización del iris, y glaucoma neovascular. Como se describe en el presente documento, los antagonistas de VEGF-A y PDGFRβ son particularmente eficaces cuando se usan en combinación. Por consiguiente, la invención proporciona anticuerpos biespecíficos, que son capaces de neutralizar tanto VEGF-A como PDGFRβ, así como usos relacionados de dichos anticuerpos biespecíficos para el tratamiento de trastornos

relacionados con la angiogénesis, como se define en las reivindicaciones.

Los antagonistas de VEGF-A descritos en el presente documento incluyen moléculas que se unen a VEGF-A o un receptor de VEGF-A y de este modo reducen la actividad de VEGF-A en células que expresan el receptor tal como, por ejemplo, VEGFR-1, VEGFR-2, neuropilina-1, y/o neuropilina-2. En particular, los antagonistas de VEGF-A incluyen anticuerpos anti-VEGF-A. Otros antagonistas adecuados de VEGF-A incluyen receptores solubles de VEGF-A que comprenden un dominio extracelular de VEGFR, así como antagonistas de molécula pequeña capaces de inhibir la interacción de VEGF-A con su receptor o capaces de otro modo de inhibir la señalización intracelular inducida por VEGF-A a través de un receptor de VEGF-A. Además, pueden emplearse proteínas de unión basadas en estructuras no de anticuerpo. (Véase, por ejemplo, Koide y col., J. Mol. Biol. 284:1141-1151, 1998; Hosse y col. Protein Sci. 15:14-27, 2006, y referencias en los mismos.) Antagonistas preferidos de VEGF-A incluyen anticuerpos que se unen específicamente a VEGF-A, incluyendo anticuerpos biespecíficos que también comprenden un sitio de unión para PDGFR $\beta$ . Los anticuerpos que son específicos para VEGF-A se unen al menos a las formas secretadas solubles de VEGF-A, y preferentemente también se unen a formas asociadas a la superficie celular.

Los antagonistas de PDGFR $\beta$  descritos en el presente documento incluyen moléculas que se unen a PDGFR $\beta$  o sus ligandos y reducen de este modo la actividad de PDGF en células que expresan el receptor. Los ligandos para PDGFR $\beta$  incluyen PDGF-B, PDGF-C, y PDGF-D. En particular, los antagonistas de PDGFR $\beta$  incluyen anticuerpos anti-PDGFR $\beta$ . Otros antagonistas adecuados de PDGFR $\beta$  incluyen anticuerpos contra ligandos de PDGFR $\beta$  (es decir, anticuerpos contra PDGF-B, PDGF-C, y/o PDGF-D), PDGFR $\beta$  soluble, y antagonistas de molécula pequeña capaces de inhibir la interacción de PDGFR $\beta$  con sus ligandos o capaces de otro modo de inhibir la señalización intracelular a través de PDGFR $\beta$ . Además, pueden emplearse proteínas de unión basadas en estructuras no de anticuerpo. (Véase, por ejemplo, Koide y col., J. Mol. Biol. 284:1141-1151, 1998; Hosse y col., Protein Sci. 15:14-27, 2006, y referencias en los mismos.) Antagonistas de PDGFR $\beta$  preferidos incluyen anticuerpos que se unen específicamente a PDGFR $\beta$ , incluyendo anticuerpos biespecíficos que también comprenden un sitio de unión para VEGF-A.

## II. Anticuerpos anti-PDGFR $\beta$ , anticuerpos anti-VEGF-A, y composiciones de unión biespecíficas relacionadas

En ciertas realizaciones preferidas, los antagonistas de VEGF-A y/o PDGFR $\beta$  son anticuerpos que se unen específicamente a VEGF-A (los restos 27-191 de la SEC ID N° 2) y/o al dominio extracelular de PDGFR $\beta$  (los restos 33-531 de la SEC ID N° 4). Los anticuerpos particularmente preferidos neutralizan la actividad biológica de VEGF-A, PDGFR $\beta$ , o tanto de VEGF-A como de PDGFR $\beta$ .

Se considera que los anticuerpos se unen específicamente si (1) muestran un nivel umbral de actividad de unión, y (2) no reaccionan de forma cruzada significativamente con moléculas polipeptídicas de control. Por ejemplo, un nivel umbral de unión se determina si un anticuerpo anti-VEGF-A se une a un polipéptido, péptido o epítipo de VEGF-A con una afinidad al menos 10 veces mayor que la afinidad de unión para un polipéptido de control (no VEGF-A). Se prefiere que los anticuerpos usados dentro de la invención muestren una afinidad de unión ( $K_a$ ) de  $10^6 \text{ M}^{-1}$  o mayor, preferentemente  $10^7 \text{ M}^{-1}$  o mayor, más preferentemente  $10^8 \text{ M}^{-1}$  o mayor, y mucho más preferentemente  $10^9 \text{ M}^{-1}$  o mayor. La afinidad de unión de un anticuerpo puede determinarla fácilmente un especialista en la técnica, habitualmente por resonancia de plasmón superficial usando un equipo automatizado. Se conocen otros procedimientos en la técnica, por ejemplo el análisis de Scatchard (Scatchard, Ann. NY Acad. Sci. 51:660-672, 1949).

Los anticuerpos descritos en el presente documento comprenden o constan de partes de anticuerpos intactos que retienen la especificidad de unión a antígeno. Los anticuerpos adecuados incluyen, por ejemplo, anticuerpos completamente humanos; anticuerpos humanizados; anticuerpos quiméricos; fragmentos de anticuerpo tales como, por ejemplo, fragmentos de anticuerpo Fab, Fab', F(ab) $_2$ , F(ab') $_2$  y Fv; anticuerpos de cadena sencilla; y monómeros o dímeros de cadenas pesada o ligera de anticuerpo o mezclas de los mismos. Los anticuerpos preferidos son anticuerpos monoclonales. Los anticuerpos que comprenden una cadena ligera pueden comprender cadena ligera kappa o lambda.

En ciertas realizaciones, los anticuerpos incluyen inmunoglobulinas intactas de cualquier isotipo incluyendo IgA, IgG, IgE, IgD, o IgM (incluyendo subtipos de los mismos). Las inmunoglobulinas intactas preferentemente incluyen IgG intacta (por ejemplo, IgG 1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1, o IgA2 intacta).

Los procedimientos para preparar y aislar anticuerpos policlonales, anticuerpos monoclonales, y fragmentos de anticuerpo de unión a antígeno de los mismos son bien conocidos en la técnica. Véase, por ejemplo, Current Protocols in Immunology, (Cooligan y col. eds., John Wiley and Sons, Inc. 2006); Sambrook y col., Molecular Cloning: A Laboratory Manual (Cold Spring Harbor, NY, 2ª ed. 1989); y Monoclonal Hybridoma Antibodies: Techniques and Applications (Hurrell ed., CRC Press, inc., Boca Raton, FL, 1982). Los fragmentos de unión a antígeno, incluyendo scFv, pueden prepararse usando bibliotecas de presentación en fagos de acuerdo con procedimientos conocidos en la técnica. La presentación en fagos también puede emplearse para la preparación de proteínas de unión basadas en estructuras no de anticuerpo (Koide y col., *supra.*). Los procedimientos para preparar anticuerpos policlonales humanos recombinantes se desvelan por Wiberg y col., Biotechnol Bioeng. 94:396-405,

2006; Meijer y col., J. Mol. Biol. 358:764-772, 2006; Haurum y col., publicación de solicitud de patente de Estados Unidos N° 2002/0009453; y Haurum y col., publicación de solicitud de patente de Estados Unidos N° 2005/0180967. Como será evidente para los especialistas en la técnica, estos procedimientos son igualmente aplicables para la producción de anticuerpos contra VEGF-A, receptores de VEGF-A, PDGFR $\beta$ , y ligados PDGF.

5 Como sería evidente para un especialista en la técnica, los anticuerpos policlonales pueden generarse inoculando cualquiera de diversos animales de sangre caliente tales como caballos, vacas, cabras, ovejas, perros, pollos, conejos, ratones, y ratas con un polipéptido o fragmento de polipéptido inmunogénico. La inmunogenicidad de un polipéptido inmunogénico puede aumentarse a través del uso de un adyuvante, tal como alumbre (hidróxido de aluminio) o adyuvante completo o incompleto de Freund. Los polipéptidos útiles para inmunización también incluyen  
10 polipéptidos de fusión, tales como fusiones de VEGF-A, PDGFR $\beta$ , o una parte de los mismos con un polipéptido de inmunoglobulina o con una proteína de unión a maltosa. El inmunógeno polipeptídico puede ser una molécula de longitud completa o una parte de la misma. Si la parte polipeptídica es tipo hapteno, puede unirse o ligarse ventajosamente a un vehículo macromolecular (tal como hemocianina de lapa californiana (KLH), albúmina sérica bovina (BSA) o toxoide tetánico) para inmunización.

15 Además, los anticuerpos pueden explorarse frente a polipéptidos conocidos relacionados con la diana del anticuerpo (por ejemplo, ortólogos, parálogos, o variantes de secuencia de, por ejemplo, VEGF-A o PDGFR $\beta$ ) para aislar una población de anticuerpos que sea altamente específica para su unión a la proteína o polipéptido diana. Dichas poblaciones altamente específicas incluyen, por ejemplo, anticuerpos que se unen a VEGF-A humano pero no a VEGF-A de ratón. Dicha ausencia de reactividad cruzada con moléculas polipeptídicas relacionadas se muestra, por  
20 ejemplo, por el anticuerpo que detecta un polipéptido VEGF-A pero no polipéptidos relacionados conocidos usando un análisis convencional de transferencia de Western (Current Protocols in Molecular Biology (Ausubel y col. eds., Green and Wiley and Sons, NY 1993)) o ELISA (inmunoensayo enzimático) (Immunoassay, A Practical Guide (Chan ed., Academic Press, Inc. 1987)). En otro ejemplo, se adsorben anticuerpos creados contra un polipéptido de VEGF-A a polipéptidos relacionados adheridos a matriz insoluble; anticuerpos que sin altamente específicos para el  
25 polipéptido de VEGF-A fluirán a través de la matriz en condiciones apropiadas de tampón. La exploración permite el aislamiento de anticuerpos policlonales y monoclonales sin reactividad cruzada por polipéptidos conocidos muy relacionados (Antibodies: A Laboratory Manual. (Harlow y Lane eds., Cold Spring Harbor Laboratory Press 1988); Current Protocols in Immunology (Cooligan y col. eds., National Institutes of Health, John Wiley and Sons, Inc. 1995). La exploración y aislamiento de anticuerpos específicos es bien conocido en la técnica. Véase Fundamental Immunology (Paul ed., Raven Press 1993); Getzoff y col., Adv. in Immunol. 43:1-98, 1988; Monoclonal Antibodies: Principles and Practice (Goding ed., Academic Press Ltd. 1996); Benjamin y col., Ann. Rev. Immunol. 2:67-101, 1984.

Pueden prepararse anticuerpos monoclonales nativos ("mAb"), por ejemplo, inmunizando animales objeto (por ejemplo, ratas o ratones) con una proteína inmunogénica purificada o fragmento de la misma. En un procedimiento  
35 típico, se da a cada animal una inyección intraperitoneal (IP) inicial de la proteína o fragmento purificado, normalmente en combinación con un adyuvante (por ejemplo, adyuvante completo de Freund o adyuvante RIBI (disponible en Sigma-Aldrich, St. Louis, MO)) seguido de inyecciones IP de refuerzo de la proteína purificada a, por ejemplo, intervalos de dos semanas. De siete a diez días después de la administración de la tercera inyección de refuerzo, se exanguina a los animales y se recoge el suero. Pueden darse refuerzos adicionales según sea  
40 necesario. Se recogen los esplenocitos y las células de los ganglios linfáticos de animales de elevado título y se fusionan a células de mieloma (por ejemplo, células de ratón SP2/0 o Ag8) usando procedimientos convencionales. La mezcla de fusión después se cultiva en una capa de alimentación de timocitos o se cultiva con suplementos apropiados de medio (incluyendo suplementos disponibles en el mercado tales como suplementos de fusión de hibridoma y clonación; Roche Diagnostics, Indianapolis, IN). Aproximadamente 10 días después de la fusión, se  
45 identifican combinaciones de hibridoma que producen anticuerpo específico usando ensayos convencionales (por ejemplo, ELISA). Las combinaciones positivas pueden analizarse adicionalmente para su capacidad de bloquear o reducir la actividad de la proteína diana. Las combinaciones positivas se clonan por dilución limitante.

En ciertos aspectos, la memoria descriptiva describe el uso de múltiples anticuerpos monoclonales que son  
50 específicos para diferentes epítomos en una única molécula diana. El uso de dichos múltiples anticuerpos en combinación puede reducir los efectos del vehículo observados con anticuerpos individuales y también puede aumentar las tasas de eliminación mediante el receptor de Fc y mejorar la ADCC. Pueden usarse dos, tres, o más anticuerpos monoclonales en combinación.

La secuencia de aminoácidos de un anticuerpo nativo puede variarse a través de la aplicación de técnicas de ADN recombinante. Por tanto, los anticuerpos pueden rediseñarse para obtener características deseadas. Los  
55 anticuerpos modificados pueden proporcionar, por ejemplo, mejorada estabilidad y/o eficacia terapéutica relativas a su forma no modificada. Las variaciones posibles son muchas y varían desde el cambio de solamente uno o unos pocos aminoácidos al rediseño completo de, por ejemplo, la región variable o constante. Los cambios en la región constante se harán, en general, para mejorar o alterar características, tales como fijación del complemento, interacción con membranas, y otras funciones efectoras. Ejemplos de secuencias modificadas por ingeniería de  
60 región constante se muestran en las Fig. 1A-1C (SEC ID N° 492 y 532-535). Normalmente, los cambios en la región variable se harán para mejorar las características de unión a antígeno, mejorar la estabilidad de la región variable, o reducir el riesgo de inmunogenicidad. También pueden emplearse técnicas de presentación en fagos. Véase, por

ejemplo, Huse y col., Science 246:1275-1281, 1989; Ladner y col., patente de Estados Unidos Nº 5.571.698.

Para anticuerpos terapéuticos para su uso en seres humanos, habitualmente es deseable humanizar regiones no humanas de un anticuerpo de acuerdo con procedimientos conocidos. Los procedimientos para preparar anticuerpos humanizados se desvelan, por ejemplo, en las patentes de Estados Unidos Nº 5.530.101; 5.821.337; 5.585.089; 5.693.762; y 6.180.370. Normalmente, un anticuerpo humanizado anti-PDGFR $\beta$  o anti-VEGF-A comprende las regiones determinantes de complementariedad (CDR) de una inmunoglobulina donante de ratón y regiones flanqueantes de cadena pesada y cadena ligera de una inmunoglobulina aceptora humana. A menudo, los restos flanqueantes en las regiones flanqueantes humanas se sustituirán con el resto correspondiente del anticuerpo donante de CDR para alterar, preferentemente mejorar, la unión a antígeno. Estas sustituciones flanqueantes se identifican por procedimientos bien conocidos en la técnica, por ejemplo, por modelado de las interacciones de la CDR y los restos flanqueantes para identificar los restos flanqueantes importante para la unión de antígeno y comparación de secuencia para identificar restos flanqueantes inusuales en posiciones particulares. (Véase, por ejemplo, Queen y col., patente de Estados Unidos Nº 5.585.089; Riechmann y col., Nature 332:323, 1988).

También pueden usarse anticuerpos quiméricos no humanizados de forma terapéutica (por ejemplo, en pacientes inmunosuprimidos). Por consiguiente, en algunas variaciones, un anticuerpo es un anticuerpo quimérico obtenido, *inter alia*, de un anticuerpo no humano anti-PDGFR $\beta$  o anti-VEGF-A. Preferentemente, un anticuerpo quimérico comprende una región variable obtenida de un anticuerpo de ratón o rata y una región constante obtenida de un ser humano de modo que el anticuerpo quimérico tiene una semi-vida más larga y es menor inmunogénico cuando se administra a un sujeto humano. Los procedimientos para producir anticuerpos quiméricos son conocidos en la técnica. (Véase, por ejemplo, Morrison, Science 229:1202, 1985; Oi y col., BioTechniques 4:214, 1986; Gillies y col., J. Immunol. Methods 125:191-202, 1989; patentes de Estados Unidos Nº 5.807.715; 4.816.567; y 4.816.397.)

La presente memoria descriptiva describe anticuerpos completamente humanos tales como aquellos obtenidos de células mononucleares de sangre periférica de pacientes con cáncer de ovario, de mama, renal, colorrectal, pulmonar, de endometrio, o cerebral. Dichas células pueden fusionarse con células de mieloma, por ejemplo, para formar células de hibridoma que producen anticuerpos completamente humanos contra PDGFR $\beta$  o VEGF-A. Los anticuerpos humanos también pueden prepararse en animales transgénicos no humanos, habitualmente ratones. Véase, por ejemplo, Tomizuka y col., patente de Estados Unidos Nº 7.041.870. En general, un mamífero no humano se hace transgénico para un locus de cadena pesada humana y un locus de cadena ligera humana, y se inactivan los correspondientes loci endógenos de inmunoglobulina.

Los anticuerpos pueden especificarse en términos de un epítipo o parte de un polipéptido VEGF-A o PDGFR $\beta$  que reconocen o al que se unen específicamente. Un epítipo o parte polipeptídica puede especificarse, por ejemplo, por las posiciones N-terminales y C-terminales del epítipo u otra parte del polipéptido VEGF-A mostrado en la SEC ID Nº 2 o del polipéptido PDGFR $\beta$  mostrado en la SEC ID Nº 4.

Los anticuerpos descritos en el presente documento tienen afinidades de unión que incluyen una constante de disociación ( $K_d$ ) menor de  $5 \times 10^{-2}$  M, menor de  $10^{-2}$  M, menor de  $5 \times 10^{-3}$  M, menor de  $10^{-3}$  M, menor de  $5 \times 10^{-4}$  M, menor de  $10^{-4}$  M, menor de  $5 \times 10^{-5}$  M, menor de  $10^{-5}$  M, menor de  $5 \times 10^{-6}$  M, menor de  $10^{-6}$  M, menor de  $5 \times 10^{-7}$  M, menor de  $10^{-7}$  M, menor de  $5 \times 10^{-8}$  M, menor de  $10^{-8}$  M, menor de  $5 \times 10^{-9}$  M, menor de  $10^{-9}$  M, menor de  $5 \times 10^{-10}$  M, menor de  $10^{-10}$  M, menor de  $5 \times 10^{-11}$  M, menor de  $10^{-11}$  M, menor de  $5 \times 10^{-12}$  M, menor de  $10^{-12}$  M, menor de  $5 \times 10^{-13}$  M, menor de  $10^{-13}$  M, menor de  $5 \times 10^{-14}$  M, menor de  $10^{-14}$  M, menor de  $5 \times 10^{-15}$  M, o menor de  $10^{-15}$  M.

Los anticuerpos descritos en el presente documento incluyen adicionalmente derivados que se modifican, por ejemplo, mediante la unión covalente de cualquier tipo de molécula al anticuerpo de modo que la unión covalente no evite la unión del anticuerpo a su epítipo. Modificaciones adecuadas incluyen, por ejemplo, fucosilación, glucosilación, acetilación, pegilación, fosforilación, y amidación. Los anticuerpos y derivados de los mismos pueden derivatizarse en sí mismos por grupos protectores/bloqueantes conocidos, escisión proteolítica, unión a un ligando celular u otras proteínas, y similares. En algunas realizaciones, al menos una cadena pesada del anticuerpo está fucosilada. En variaciones particulares, la fucosilación es ligada a N. En algunas realizaciones preferidas determinadas, al menos una cadena pesada del anticuerpo comprende un oligosacárido fucosilado, ligado a N.

Los anticuerpos pueden usarse solos o como as inmunoconjugados con un agente citotóxico. En algunas realizaciones, el agente es un agente quimioterapéutico. En otras realizaciones, el agente es un radioisótopo tal como, por ejemplo, plomo-212, bismuto-212, astato-211, yodo-131, escandio-47, renio-186, renio-188, itrio-90, yodo-123, yodo-125, bromo-77, indio-111, o un núclido fisionable tal como boro-10 o un actínido. En otras realizaciones más, el agente es una toxina o fármaco citotóxico tal como, por ejemplo, ricina, enterotoxina A modificada de Pseudomonas, caliqueamicina, adriamicina, 5-fluorouracilo, una auristatina (por ejemplo auristatina E), maitansina, o similares. Los procedimientos de conjugación de anticuerpos y fragmentos de anticuerpo con dichos agentes son conocidos en la técnica.

Los anticuerpos descritos en el presente documento incluyen variantes que tienen sustituciones, delecciones, adiciones o remplazos de uno o múltiples aminoácidos relativos a un anticuerpo de referencia (por ejemplo, un anticuerpo de referencia que tiene secuencias VL y/o VH como se muestra en la Tabla 2 o Tabla 4), de modo que la variante retenga una o más propiedades biológicas del anticuerpo de referencia (por ejemplo, bloqueo de la unión de



PDGFR $\beta$  y/o VEGF-A a sus respectivas contra-estructuras (un ligando PDGF o receptor de VEGF-A), bloqueo de la actividad biológica de PDGFR $\beta$  y/o VEGF-A, afinidad de unión). Los especialistas en la técnica pueden producir variantes que tienen sustituciones, deleciones, adiciones o remplazos de uno o múltiples aminoácidos. Estas variantes pueden incluir, por ejemplo: (a) variantes en que uno o más restos aminoacídicos están sustituidos con aminoácidos conservativos o no conservativos, (b) variantes en que uno o más aminoácidos están añadidos a o deleccionados del polipéptido, (c) variantes en que uno o más aminoácidos incluyen un grupo sustituyente, y (d) variantes en que el polipéptido está fusionado con otro péptido o polipéptido tal como un compañero de fusión, una marca proteica u otro resto químico, que puede conferir propiedades útiles al polipéptido, tal como, por ejemplo, un epítopo para un anticuerpo, una secuencia de polihistidina, un resto de biotina, y similares. Los anticuerpos pueden incluir variantes en que restos aminoacídicos de una especie están sustituidos por el resto correspondiente en otra especie, en las posiciones conservadas o no conservadas. En otra realización, se sustituyen restos aminoacídicos en posiciones no conservadas con restos conservativos o no conservativos. Las técnicas para obtener estas variantes, incluyendo técnicas genéticas (supresiones, deleciones, mutaciones, etc.), químicas, y enzimáticas, son conocidas para los especialistas en la técnica.

La presente invención abarca anticuerpos biespecíficos (definidos en las reivindicaciones) que se unen tanto a PDGFR $\beta$  como a VEGF-A. Dichos anticuerpos biespecíficos contra PDGFR $\beta$ /VEGF-A se describen adicionalmente en el presente documento.

Se han identificado ejemplos de anticuerpos que se unen a PDGFR $\beta$  y VEGF-A por exploración de una biblioteca de presentación en fagos. Los procedimientos para explorar por presentación en fagos se describen en detalle en textos convencionales de referencia, tales como Babas, Phage Display: A Laboratory Manual (Cold Spring Harbor Lab Press, 2001) y Lo, Benny K.C., A., Antibody Engineering (2004). Dichas bibliotecas de presentación en fagos pueden usarse para presentar proteínas expresadas sobre la superficie de una célula u otra sustancia de modo que pueda aislarse de forma funcional la entidad de unión complementaria. En una de estas bibliotecas de presentación en fagos, la región variable de cadena ligera del anticuerpo y una parte de la región variable de cadena pesada se combinan con secuencias sintéticas de anticuerpo humano que codifican ADN, que después se presentan en bibliotecas de fagos y fagómidos como fragmentos de anticuerpo Fab (Dyax® Human Antibody Libraries, Dyax Corp., Cambridge, MA.). Por tanto, los fragmentos de cadena ligera y pesada variable de los anticuerpos pueden aislarse en un formato Fab. Estas regiones variables después pueden manipularse para generar anticuerpos, incluyendo fragmentos de unión a antígeno, tales como scFv, scFv biespecíficos, y antagonistas multiespecíficos y multifuncionales de PDGFR $\beta$  y/o VEGF-A.

Usando esta tecnología, se han identificado regiones variables de Fab a modo de ejemplo por sus características de unión y/o neutralización de PDGFR $\beta$  o VEGF-A en ensayos descritos en el presente documento. (Véanse los Ejemplos, *infra*.) Estas regiones variables se manipularon para generar diversas entidades de unión, incluyendo scFv que se unen y/o neutralizan PDGFR $\beta$  o VEGF-A. Las siguientes Tablas 2 y 4 muestran denominaciones de SEC ID N° de nucleótidos y aminoácidos para grupos de anticuerpos anti-PDGFR $\beta$  y anti-VEGF-A identificados por su capacidad de unirse y neutralizar PDGFR $\beta$  y VEGF-A, mientras que las Tablas 3 y 5 enumeran las posiciones de los restos aminoacídicos correspondientes a las regiones flanqueantes y CDR de los anticuerpos anti-PDGFR $\beta$  y anti-VEGF-A enumerados en las Tablas 2 y 4.

**Tabla 2: Designaciones de SEC ID N° para grupos de anticuerpos anti-PDGFR $\beta$**

N° de grupo	SEC ID N° de nucleótidos de V <sub>L</sub>	SEC ID N° de polipéptido de V <sub>L</sub>	SEC ID N° de nucleótidos de V <sub>H</sub>	SEC ID N° de polipéptido de V <sub>H</sub>
597	5	6	7	8
600	9	10	11	12
607	13	14	15	16
613	17	18	19	20
941	21	22	23	24
946	25	26	27	28
947	29	30	31	32
949	33	34	35	36
975	37	38	39	40
997	41	42	43	44

# ES 2 456 296 T3

(continuación)

<u>Nº de grupo</u>	<u>SEC ID Nº de nucleótidos de V<sub>L</sub></u>	<u>SEC ID Nº de polipéptido de V<sub>L</sub></u>	<u>SEC ID Nº de nucleótidos de V<sub>H</sub></u>	<u>SEC ID Nº de polipéptido de V<sub>H</sub></u>
1035	45	46	47	48
1223	49	50	51	52
1228	53	54	55	56
1230	57	58	59	60
1231	61	62	63	64
1236	65	66	67	68
1238	69	70	71	72
1244	73	74	75	76
1245	77	78	79	80
1299	81	82	83	84
1312	85	86	87	88
1314	89	90	91	92
1317	93	94	95	96
1322	97	98	99	100
1323	101	102	103	104
1330	105	106	107	108
1334	109	110	111	112
1345	113	114	115	116
1346	117	118	119	120
1359	121	122	123	124
1365	125	126	127	128
1402	129	130	131	132
1515	133	134	135	136
1531	137	138	139	140
1535	141	142	143	144
1541	145	146	147	148
1550	149	150	151	152
1564	153	154	155	156
1601	157	158	159	160
1629	161	162	163	164

**Tabla 3: Posiciones de restos aminoacídicos\* correspondientes a las regiones flanqueante y CDR de anticuerpos anti-PDGF $\beta$**

Nº de grupo	Intervalo VL	Intervalo VL CDR1	Intervalo VL FR2	Intervalo VL CDR2	Intervalo VL FR3	Intervalo VL CDR3	Intervalo VL FR4	Intervalo VH FR1	Intervalo VH CDR1	Intervalo VH FR2	Intervalo VH CDR2	Intervalo VH FR3	Intervalo VH CDR3	Intervalo VH FR4
<b>597</b>	1-23	24-40	41-55	56-62	63-94	95-103	104-113	1-30	31-35	36-49	50-66	67-98	99-110	111-121
<b>600</b>	1-23	24-40	41-55	56-62	63-94	95-103	104-113	1-30	31-35	36-49	50-66	67-98	99-110	111-121
<b>607</b>	1-23	24-40	41-55	56-62	63-94	95-103	104-113	1-30	31-35	36-49	50-66	67-98	99-110	111-121
<b>613</b>	1-23	24-34	35-49	50-56	57-88	89-97	98-107	1-30	31-35	36-49	50-66	67-98	99-115	116-126
<b>941</b>	1-23	24-40	41-55	56-62	63-94	95-103	104-113	1-30	31-35	36-49	50-66	67-98	99-111	112-122
<b>946</b>	1-23	24-40	41-55	56-62	63-94	95-103	104-113	1-30	31-35	36-49	50-66	67-98	99-110	111-121
<b>947</b>	1-23	24-40	41-55	56-62	63-94	95-103	104-113	1-30	31-35	36-49	50-66	67-98	99-110	111-121
<b>949</b>	1-23	24-40	41-55	56-62	63-94	95-103	104-113	1-30	31-35	36-49	50-66	67-98	99-110	111-121
<b>975</b>	1-23	24-40	41-55	56-62	63-94	95-103	104-113	1-30	31-35	36-49	50-66	67-98	99-110	111-121
<b>997</b>	1-23	24-40	41-55	56-62	63-94	95-103	104-113	1-30	31-35	36-49	50-66	67-98	99-110	111-121
<b>1035</b>	1-23	24-40	41-55	56-62	63-94	95-103	104-113	1-30	31-35	36-49	50-66	67-98	99-111	112-122
<b>1223</b>	1-23	24-40	41-55	56-62	63-94	95-103	104-113	1-30	31-35	36-49	50-66	67-98	99-110	111-121
<b>1228</b>	1-23	24-40	41-55	56-62	63-94	95-103	104-113	1-30	31-35	36-49	50-66	67-98	99-110	111-121
<b>1230</b>	1-23	24-40	41-55	56-62	63-94	95-103	104-113	1-30	31-35	36-49	50-66	67-98	99-111	112-122
<b>1231</b>	1-23	24-40	41-55	56-62	63-94	95-103	104-113	1-30	31-35	36-49	50-66	67-98	99-111	112-122
<b>1236</b>	1-23	24-40	41-55	56-62	63-94	95-103	104-113	1-30	31-35	36-49	50-66	67-98	99-111	112-122
<b>1238</b>	1-23	24-40	41-55	56-62	63-94	95-103	104-113	1-30	31-35	36-49	50-66	67-98	99-110	111-121
<b>1244</b>	1-23	24-40	41-55	56-62	63-94	95-103	104-113	1-30	31-35	36-49	50-66	67-98	99-110	111-121
<b>1245</b>	1-23	24-40	41-55	56-62	63-94	95-103	104-113	1-30	31-35	36-49	50-66	67-98	99-110	111-121
<b>1299</b>	1-23	24-40	41-55	56-62	63-94	95-103	104-113	1-30	31-35	36-49	50-66	67-98	99-110	111-121
<b>1312</b>	1-23	24-40	41-55	56-62	63-94	95-103	104-113	1-30	31-35	36-49	50-66	67-98	99-111	112-122

(continuación)

Nº de grupo	Intervalo VL	Intervalo VL CDR1	Intervalo VL FR2	Intervalo VL CDR2	Intervalo VL FR3	Intervalo VL CDR3	Intervalo VL FR4	Intervalo VH FR1	Intervalo VH CDR1	Intervalo VH FR2	Intervalo VH CDR2	Intervalo VH FR3	Intervalo VH CDR3	Intervalo VH FR4
<b>1314</b>	1-23	24-40	41-55	56-62	63-94	95-103	104-113	1-30	31-35	36-49	50-66	67-98	99-110	111-121
<b>1317</b>	1-23	24-40	41-55	56-62	63-94	95-103	104-113	1-30	31-35	36-49	50-66	67-98	99-110	111-121
<b>1322</b>	1-23	24-40	41-55	56-62	63-94	95-103	104-113	1-30	31-35	36-49	50-66	67-98	99-110	111-121
<b>1323</b>	1-23	24-40	41-55	56-62	63-94	95-103	104-113	1-30	31-35	36-49	50-66	67-98	99-110	111-121
<b>1330</b>	1-23	24-40	41-55	56-62	63-94	95-103	104-113	1-30	31-35	36-49	50-66	67-98	99-110	111-121
<b>1334</b>	1-23	24-40	41-55	56-62	63-94	95-103	104-113	1-30	31-35	36-49	50-66	67-98	99-110	111-121
<b>1345</b>	1-23	24-40	41-55	56-62	63-94	95-103	104-113	1-30	31-35	36-49	50-66	67-98	99-110	111-121
<b>1346</b>	1-23	24-40	41-55	56-62	63-94	95-103	104-113	1-30	31-35	36-49	50-66	67-98	99-111	112-122
<b>1359</b>	1-23	24-40	41-55	56-62	63-94	95-103	104-113	1-30	31-35	36-49	50-66	67-98	99-111	112-122
<b>1365</b>	1-23	24-40	41-55	56-62	63-94	95-103	104-113	1-30	31-35	36-49	50-66	67-98	99-111	112-122
<b>1402</b>	1-23	24-40	41-55	56-62	63-94	95-103	104-113	1-30	31-35	36-49	50-66	67-98	99-111	112-122
<b>1515</b>	1-23	24-40	41-55	56-62	63-94	95-103	104-113	1-30	31-35	36-49	50-66	67-98	99-110	111-121
<b>1531</b>	1-23	24-40	41-55	56-62	63-94	95-103	104-113	1-30	31-35	36-49	50-66	67-98	99-111	112-120
<b>1535</b>	1-23	24-40	41-55	56-62	63-94	95-103	104-113	1-30	31-35	36-49	50-66	67-98	99-110	111-121
<b>1541</b>	1-23	24-40	41-55	56-62	63-94	95-103	104-113	1-30	31-35	36-49	50-66	67-98	99-110	111-121
<b>1550</b>	1-23	24-40	41-55	56-62	63-94	95-103	104-113	1-30	31-35	36-49	50-66	67-98	99-110	111-121
<b>1564</b>	1-23	24-40	41-55	56-62	63-94	95-103	104-113	1-30	31-35	36-49	50-66	67-98	99-111	112-122
<b>1601</b>	1-23	24-40	41-55	56-62	63-94	95-103	104-113	1-30	31-35	36-49	50-66	67-98	99-111	112-122
<b>1629</b>	1-23	24-40	41-55	56-62	63-94	95-103	104-113	1-30	31-35	36-49	50-66	67-98	99-111	112-122

\* Números de posición de restos mostrados (indicados como un "intervalo" de posiciones de restos de cualquiera del polipéptido de cadena ligera variable (VL) o pesada variable (VH)) son de acuerdo con las secuencias polipeptídicas VL o VH para el número de grupo de anticuerpos correspondiente, cuyas SEC ID N° de aminoácidos se indican en la Tabla 2.

**Tabla 4: Designaciones de SEC ID N° para grupos de anticuerpos anti-VEGF-A**

<u>N° de grupo</u>	<u>SEC ID N° de nucleótidos de V<sub>L</sub></u>	<u>SEC ID N° de polipéptido de V<sub>L</sub></u>	<u>SEC ID N° de nucleótidos de V<sub>H</sub></u>	<u>SEC ID N° de polipéptido de V<sub>H</sub></u>
<b>635</b>	165	166	167	168
<b>636</b>	169	170	171	172
<b>638</b>	173	174	175	176
<b>656</b>	177	178	179	180
<b>665</b>	181	182	183	184
<b>668</b>	185	186	187	188
<b>669</b>	189	190	191	192
<b>679</b>	193	194	195	196
<b>695</b>	197	198	199	200
<b>709</b>	201	202	203	204
<b>710</b>	205	206	207	208
<b>741</b>	209	210	211	212
<b>752</b>	213	214	215	216
<b>772</b>	217	218	219	220
<b>779</b>	221	222	223	224
<b>799</b>	225	226	227	228
<b>830</b>	229	230	231	232
<b>844</b>	233	234	235	236
<b>847</b>	237	238	239	240
<b>868</b>	241	242	243	244
<b>870</b>	245	246	247	248
<b>883</b>	249	250	251	252
<b>887</b>	253	254	255	256
<b>901</b>	257	258	259	260
<b>905</b>	261	262	263	264
<b>909</b>	265	266	267	268
<b>928</b>	269	270	271	272
<b>1036</b>	273	274	275	276
<b>1039</b>	277	278	279	280
<b>1040</b>	281	282	283	284
<b>1044</b>	285	286	287	288
<b>1048</b>	289	290	291	292

# ES 2 456 296 T3

(continuación)

<u>Nº de grupo</u>	<u>SEC ID Nº de nucleótidos de V<sub>L</sub></u>	<u>SEC ID Nº de polipéptido de V<sub>L</sub></u>	<u>SEC ID Nº de nucleótidos de V<sub>H</sub></u>	<u>SEC ID Nº de polipéptido de V<sub>H</sub></u>
<b>1056</b>	293	294	295	296
<b>1064</b>	297	298	299	300
<b>1080</b>	301	302	303	304
<b>1092</b>	305	306	307	308
<b>1094</b>	309	310	311	312
<b>1096</b>	313	314	315	316
<b>1107</b>	317	318	319	320
<b>1111</b>	321	322	323	324
<b>1123</b>	325	326	327	328
<b>1135</b>	329	330	331	332
<b>1142</b>	333	334	335	336
<b>1155</b>	337	338	339	340
<b>1250</b>	341	342	343	344
<b>1252</b>	345	346	347	348
<b>1254</b>	349	350	351	352
<b>1257</b>	353	354	355	356
<b>1264</b>	357	358	359	360
<b>1266</b>	361	362	363	364
<b>1268</b>	365	366	367	368
<b>1269</b>	369	370	371	372
<b>1270</b>	373	374	375	376
<b>1281</b>	377	378	379	380
<b>1283</b>	381	382	383	384
<b>1285</b>	385	386	387	388
<b>1409</b>	389	390	391	392
<b>1410</b>	393	394	395	396
<b>1413</b>	397	398	399	400
<b>1416</b>	401	402	403	404
<b>1420</b>	405	406	407	408
<b>1428</b>	409	410	411	412
<b>1437</b>	413	414	415	416
<b>1449</b>	417	418	419	420

(continuación)

<u>Nº de grupo</u>	<u>SEC ID Nº de nucleótidos de V<sub>L</sub></u>	<u>SEC ID Nº de polipéptido de V<sub>L</sub></u>	<u>SEC ID Nº de nucleótidos de V<sub>H</sub></u>	<u>SEC ID Nº de polipéptido de V<sub>H</sub></u>
<b>1458</b>	421	422	423	424
<b>1476</b>	425	426	427	428
<b>1479</b>	429	430	431	432

Tabla 5: Posiciones de restos aminoacídicos\*\* correspondientes a las regiones flanqueante y CDR de anticuerpos anti-VEGF-A

Nº de grupo	Intervalo ligera FR1	Intervalo ligera CDR1	Intervalo ligera FR2	Intervalo ligera CDR2	Intervalo ligera FR3	Intervalo ligera CDR3	Intervalo ligera FR4	Intervalo pesada FR1	Intervalo pesada CDR1	Intervalo pesada FR2	Intervalo pesada CDR2	Intervalo pesada FR3	Intervalo pesada CDR3	Intervalo pesada FR4
<b>635</b>	1-23	24-34	35-49	50-56	57-88	89-97	98-107	1-30	31-35	36-49	50-66	67-98	99-110	111-121
<b>636</b>	1-23	24-34	35-49	50-56	57-88	89-97	98-107	1-30	31-35	36-49	50-66	67-98	99-102	103-113
<b>638</b>	1-23	24-34	35-49	50-56	57-88	89-97	98-107	1-30	31-35	36-49	50-66	67-98	99-110	111-121
<b>656</b>	1-23	24-34	35-49	50-56	57-88	89-97	98-107	1-30	31-35	36-49	50-66	67-98	99-110	111-121
<b>665</b>	1-23	24-34	35-49	50-56	57-88	89-97	98-107	1-30	31-35	36-49	50-66	67-98	99-110	111-121
<b>668</b>	1-23	24-34	35-49	50-56	57-88	89-97	98-107	1-30	31-35	36-49	50-66	67-98	99-110	111-121
<b>669</b>	1-23	24-34	35-49	50-56	57-88	89-97	98-107	1-30	31-35	36-49	50-66	67-98	99-110	111-121
<b>679</b>	1-23	24-34	35-49	50-56	57-88	89-97	98-107	1-30	31-35	36-49	50-66	67-98	99-110	111-121
<b>695</b>	1-23	24-34	35-49	50-56	57-88	89-97	98-107	1-30	31-35	36-49	50-66	67-98	99-110	111-121
<b>709</b>	1-23	24-34	35-49	50-56	57-88	89-97	98-107	1-30	31-35	36-49	50-66	67-98	99-110	111-121
<b>710</b>	1-23	24-34	35-49	50-56	57-88	89-97	98-107	1-30	31-35	36-49	50-66	67-98	99-110	111-121
<b>741</b>	1-23	24-34	35-49	50-56	57-88	89-97	98-107	1-30	31-35	36-49	50-66	67-98	99-110	111-121
<b>752</b>	1-22	23-35	36-50	51-57	58-89	90-100	101-110	1-30	31-35	36-49	50-66	67-98	99-110	111-121
<b>772</b>	1-23	24-34	35-49	50-56	57-88	89-97	98-107	1-30	31-35	36-49	50-66	67-98	99-110	111-121
<b>779</b>	1-23	24-34	35-49	50-56	57-88	89-97	98-107	1-30	31-35	36-49	50-66	67-98	99-110	111-121
<b>799</b>	1-23	24-34	35-49	50-56	57-88	89-97	98-107	1-30	31-35	36-49	50-66	67-98	99-110	111-121
<b>830</b>	1-23	24-34	35-49	50-56	57-88	89-96	97-106	1-30	31-35	36-49	50-66	67-98	99-110	111-121
<b>844</b>	1-22	23-35	36-50	51-57	58-89	90-100	101-110	1-30	31-35	36-49	50-66	67-98	99-102	103-113
<b>847</b>	1-23	24-34	35-49	50-56	57-88	89-97	98-107	1-30	31-35	36-49	50-66	67-98	99-110	111-121
<b>868</b>	1-23	24-34	35-49	50-56	57-88	89-97	98-107	1-30	31-35	36-49	50-66	67-98	99-107	108-118



(continuación)

Nº de grupo	Intervalo ligera FR1	Intervalo ligera CDR1	Intervalo ligera FR2	Intervalo ligera CDR2	Intervalo ligera FR3	Intervalo ligera CDR3	Intervalo ligera FR4	Intervalo pesada FR1	Intervalo pesada CDR1	Intervalo pesada FR2	Intervalo pesada CDR2	Intervalo pesada FR3	Intervalo pesada CDR3	Intervalo pesada FR4
<b>870</b>	1-22	23-35	36-50	51-57	58-89	90-100	101-110	1-30	31-35	36-49	50-66	67-98	99-102	103-113
<b>883</b>	1-23	24-34	35-49	50-56	57-88	89-97	98-107	1-30	31-35	36-49	50-66	67-98	99-110	111-121
<b>887</b>	1-23	24-34	35-49	50-56	57-88	89-96	97-106	1-30	31-35	36-49	50-66	67-98	99-110	111-121
<b>901</b>	1-23	24-34	35-49	50-56	57-88	89-97	98-107	1-30	31-35	36-49	50-66	67-98	99-110	111-121
<b>905</b>	1-23	24-34	35-49	50-56	57-88	89-97	98-107	1-30	31-35	36-49	50-66	67-98	99-110	111-121
<b>909</b>	1-23	24-34	35-49	50-56	57-88	89-97	98-107	1-30	31-35	36-49	50-66	67-98	99-110	111-121
<b>928</b>	1-23	24-34	35-49	50-56	57-88	89-97	98-107	1-30	31-35	36-49	50-66	67-98	99-110	111-121
<b>1036</b>	1-22	23-35	36-50	51-57	58-89	90-100	101-110	1-30	31-35	36-49	50-66	67-98	99-102	103-113
<b>1039</b>	1-23	24-34	35-49	50-56	57-88	89-97	98-107	1-30	31-35	36-49	50-66	67-98	99-110	111-121
<b>1040</b>	1-23	24-34	35-49	50-56	57-88	89-97	98-107	1-30	31-35	36-49	50-66	67-98	99-107	108-118
<b>1044</b>	1-22	23-35	36-50	51-57	58-89	90-100	101-110	1-30	31-35	36-49	50-66	67-98	99-102	103-113
<b>1048</b>	1-23	24-34	35-49	50-56	57-88	89-97	98-107	1-30	31-35	36-49	50-66	67-98	99-110	111-121
<b>1056</b>	1-23	24-34	35-49	50-56	57-88	89-97	98-107	1-30	31-35	36-49	50-66	67-98	99-110	111-121
<b>1064</b>	1-23	24-34	35-49	50-56	57-88	89-96	97-106	1-30	31-35	36-49	50-66	67-98	99-110	111-121
<b>1080</b>	1-22	23-35	36-50	51-57	58-89	90-100	101-110	1-30	31-35	36-49	50-66	67-98	99-102	103-113
<b>1092</b>	1-23	24-34	35-49	50-56	57-88	89-97	98-107	1-30	31-35	36-49	50-66	67-98	99-110	111-121
<b>1094</b>	1-22	23-35	36-50	51-57	58-89	90-100	101-110	1-30	31-35	36-49	50-66	67-98	99-102	103-113
<b>1096</b>	1-23	24-34	35-49	50-56	57-88	89-97	98-107	1-30	31-35	36-49	50-66	67-98	99-110	111-121
<b>1107</b>	1-22	23-35	36-50	51-57	58-89	90-100	101-110	1-30	31-35	36-49	50-66	67-98	99-102	103-113
<b>1111</b>	1-23	24-34	35-49	50-56	57-88	89-97	98-107	1-30	31-35	36-49	50-66	67-98	99-111	112-122

(continuación)

Nº de grupo	Intervalo ligera FR1	Intervalo ligera CDR1	Intervalo ligera FR2	Intervalo ligera CDR2	Intervalo ligera FR3	Intervalo ligera CDR3	Intervalo ligera FR4	Intervalo pesada FR1	Intervalo pesada CDR1	Intervalo pesada FR2	Intervalo pesada CDR2	Intervalo pesada FR3	Intervalo pesada CDR3	Intervalo pesada FR4
<b>1123</b>	1-23	24-34	35-49	50-56	57-88	89-97	98-107	1-30	31-35	36-49	50-66	67-98	99-110	111-121
<b>1135</b>	1-23	24-34	35-49	50-56	57-88	89-97	98-107	1-30	31-35	36-49	50-66	67-98	99-102	103-113
<b>1142</b>	1-23	24-34	35-49	50-56	57-88	89-97	98-107	1-30	31-35	36-49	50-66	67-98	99-107	108-118
<b>1155</b>	1-22	23-35	36-50	51-57	58-89	90-100	101-110	1-30	31-35	36-49	50-66	67-98	99-102	103-113
<b>1250</b>	1-23	24-34	35-49	50-56	57-88	89-97	98-107	1-30	31-35	36-49	50-66	67-98	99-110	111-121
<b>1252</b>	1-23	24-34	35-49	50-56	57-88	89-97	98-107	1-30	31-35	36-49	50-66	67-98	99-107	108-118
<b>1254</b>	1-23	24-34	35-49	50-56	57-88	89-97	98-107	1-30	31-35	36-49	50-66	67-98	99-107	108-118
<b>1257</b>	1-22	23-35	36-50	51-57	58-89	90-106	107-116	1-30	31-35	36-49	50-66	67-98	99-107	108-118
<b>1264</b>	1-23	24-34	35-49	50-56	57-88	89-97	98-107	1-30	31-35	36-49	50-66	67-98	99-110	111-121
<b>1266</b>	1-23	24-34	35-49	50-56	57-88	89-97	98-107	1-30	31-35	36-49	50-66	67-98	99-110	111-121
<b>1268</b>	1-23	24-34	35-49	50-56	57-88	89-97	98-107	1-30	31-35	36-49	50-66	67-98	99-110	111-121
<b>1269</b>	1-23	24-34	35-49	50-56	57-88	89-97	98-107	1-30	31-35	36-49	50-66	67-98	99-110	111-121
<b>1270</b>	1-23	24-34	35-49	50-56	57-88	89-97	98-107	1-30	31-35	36-49	50-66	67-98	99-108	109-119
<b>1281</b>	1-23	24-34	35-49	50-56	57-88	89-97	98-107	1-30	31-35	36-49	50-66	67-98	99-107	108-118
<b>1283</b>	1-23	24-34	35-49	50-56	57-88	89-97	98-107	1-30	31-35	36-49	50-66	67-98	99-107	108-118
<b>1285</b>	1-23	24-34	35-49	50-56	57-88	89-97	98-107	1-30	31-35	36-49	50-66	67-98	99-107	108-118
<b>1409</b>	1-23	24-34	35-49	50-56	57-88	89-97	98-107	1-30	31-35	36-49	50-66	67-98	99-107	108-118
<b>1410</b>	1-23	24-34	35-49	50-56	57-88	89-97	98-107	1-30	31-35	36-49	50-66	67-98	99-102	103-113
<b>1413</b>	1-23	24-34	35-49	50-56	57-88	89-97	98-107	1-30	31-35	36-49	50-66	67-98	99-107	108-118
<b>1416</b>	1-23	24-34	35-49	50-56	57-88	89-97	98-107	1-30	31-35	36-49	50-66	67-98	99-107	108-118

(continuación)

Nº de grupo	Intervalo ligera FR1	Intervalo ligera CDR1	Intervalo ligera FR2	Intervalo ligera CDR2	Intervalo ligera FR3	Intervalo ligera CDR3	Intervalo ligera FR4	Intervalo pesada FR1	Intervalo pesada CDR1	Intervalo pesada FR2	Intervalo pesada CDR2	Intervalo pesada FR3	Intervalo pesada CDR3	Intervalo pesada FR4
<b>1420</b>	1-23	24-34	35-49	50-56	57-88	89-97	98-107	1-30	31-35	36-49	50-66	67-98	99-110	111-121
<b>1428</b>	1-23	24-34	35-49	50-56	57-88	89-97	98-107	1-30	31-35	36-49	50-66	67-98	99-107	108-116
<b>1437</b>	1-23	24-34	35-49	50-56	57-88	89-97	98-107	1-30	31-35	36-49	50-66	67-98	99-110	111-121
<b>1449</b>	1-23	24-34	35-49	50-56	57-88	89-97	98-107	1-30	31-35	36-49	50-66	67-98	99-102	103-113
<b>1458</b>	1-23	24-34	35-49	50-56	57-88	89-97	98-107	1-30	31-35	36-49	50-66	67-98	99-110	111-121
<b>1476</b>	1-23	24-34	35-49	50-56	57-88	89-97	98-107	1-30	31-35	36-49	50-66	67-98	99-107	108-118
<b>1479</b>	1-23	24-34	35-49	50-56	57-88	89-97	98-107	1-30	31-35	36-49	50-66	67-98	99-102	103-113
* Números de posición de restos mostrados (indicados como un "intervalo" de posiciones de restos de cualquiera del polipéptido de cadena ligera variable (VL) o pesada variable (VH)) son de acuerdo con las secuencias polipeptídicas VL o VH para el número de grupo de anticuerpos correspondiente, cuyas SEC ID N° de aminoácidos se indican en la Tabla 4.														

Los anticuerpos anti-PDGFR $\beta$  y anti-VEGF-A enumerados en las Tablas 2-5 se agruparon en familias de CDR consenso. La siguiente Tabla 6 muestra las CDR consenso para anticuerpos anti-PDGFR $\beta$  y VEGF-A.

Tabla 6: CDR consenso para anticuerpos anti-PDGFR $\beta$  y anti-VEGF-A

<u>Familia</u> <u>CDR/Ag</u> <u>diana</u>	<u>LCDR1</u>	<u>LCDR2</u>	<u>LCDR3</u>	<u>HCDR1</u>	<u>HCDR2</u>	<u>HCDR3</u>
A/ PDGFR $\beta$	KSSOSX <sub>1</sub> LYSX <sub>2</sub> NX <sub>3</sub> KNYLA (X <sub>1</sub> es V o L; X <sub>2</sub> es S, A, o P; X <sub>3</sub> es N o K) (SEC ID N° 433) (X <sub>1</sub> es V; X <sub>2</sub> es S; X <sub>3</sub> es N) (SEC ID N° 443)	X <sub>1</sub> ASTRES (X <sub>1</sub> es W o R) (SEC ID N° 434)	QYYYSX <sub>1</sub> PX <sub>2</sub> I (X <sub>1</sub> es T o I; X <sub>2</sub> es Y, F, W, o I) (SEC ID N° 435) (X <sub>1</sub> es T; X <sub>2</sub> es Y, W, o I) (SEC ID N° 444)	X <sub>1</sub> YX <sub>2</sub> MX <sub>3</sub> (X <sub>1</sub> es K, Q, R, M, G, o N; X <sub>2</sub> es K, M, V, F, I, S, R, o P; X <sub>3</sub> es L, Q, T, S, E, V, o G) (SEC ID N° 436) (X <sub>1</sub> es K, Q, R, o M; X <sub>2</sub> es K, M, V, o F; X <sub>3</sub> es L, Q, T, o S) (SEC ID N° 445) (X <sub>1</sub> es K; X <sub>2</sub> es K; X <sub>3</sub> es L o Q) (SEC ID N° 446)	X <sub>1</sub> IX <sub>2</sub> PSGGX <sub>3</sub> TX <sub>4</sub> YADSVKG (X <sub>1</sub> es S o G; X <sub>2</sub> es Y, S, o W; X <sub>3</sub> es V, I, L, o M; X <sub>4</sub> es F, T, o V) (SEC ID N° 437) (X <sub>1</sub> es S; X <sub>2</sub> es Y o S; X <sub>3</sub> es V o L; X <sub>4</sub> es F) (SEC ID N° 447)	DGIPLSIAAPIDY (SEC ID N° 438) DRPTGKTGYFQH (SEC ID N° 439) AYSSGWSLPFDY (SEC ID N° 440) ARRMRSLWEAFDI (SEC ID N° 441) DGEMISGSFFDS (SEC ID N° 442)
B/ VEGF-A	FX <sub>1</sub> SX <sub>2</sub> X <sub>3</sub> IX <sub>4</sub> X <sub>5</sub> X <sub>6</sub> X <sub>7</sub> N (X <sub>1</sub> es A, T, o S; X <sub>2</sub> es Q o E; X <sub>3</sub> es S, G, T, o N; X <sub>4</sub> es S, D, R, o N; X <sub>5</sub> es S, T, R, G, o N; X <sub>6</sub> es Y o F; X <sub>7</sub> es L o V) (SEC ID N° 448) (X <sub>1</sub> es A o S; X <sub>2</sub> es Q; X <sub>3</sub> es S, T, o N; X <sub>4</sub> es S, D, o N; X <sub>5</sub> es S, T, o N; X <sub>6</sub> es Y o F; X <sub>7</sub> es L o V) (SEC ID N° 462) (X <sub>1</sub> es A; X <sub>2</sub> es Q; X <sub>3</sub> es S; X <sub>4</sub> es S, D; X <sub>5</sub> es S o T; X <sub>6</sub> es Y;	X <sub>1</sub> X <sub>2</sub> SX <sub>3</sub> LX <sub>4</sub> X <sub>5</sub> (X <sub>1</sub> es A, G, D, o T; X <sub>2</sub> es A o R; X <sub>3</sub> es S, T, K, N o R; X <sub>4</sub> es Q, E, K, o R; X <sub>5</sub> es S, D, o G) (SEC ID N° 449) (X <sub>1</sub> es A, D, o T; X <sub>2</sub> es A; X <sub>3</sub> es S, N o R; X <sub>4</sub> es Q, K, o R; X <sub>5</sub> es S o G) (SEC ID N° 464) (X <sub>1</sub> es A o T; X <sub>2</sub> es A; X <sub>3</sub> es S o N; X <sub>4</sub> es Q;	QQSYX <sub>1</sub> X <sub>2</sub> X <sub>3</sub> X <sub>4</sub> I (X <sub>1</sub> es T o S; X <sub>2</sub> es T, A, o S; X <sub>3</sub> es P o S; X <sub>4</sub> es L, Y, P, I, R, V, o F o está ausente) (SEC ID N° 450) (X <sub>1</sub> es T o S; X <sub>2</sub> es T; X <sub>3</sub> es P o S; X <sub>4</sub> es L, Y, o F) (SEC ID N° 466) (X <sub>1</sub> es S; X <sub>2</sub> es T; X <sub>3</sub> es P; X <sub>4</sub> es L, Y, o F) (SEC ID N° 467)	X <sub>1</sub> YX <sub>2</sub> MX <sub>3</sub> (X <sub>1</sub> es K, G, R, H, o W; X <sub>2</sub> es D, I, o E; X <sub>3</sub> es H, W, E, G, V, D, o A) (SEC ID N° 451) (X <sub>1</sub> es K, G, H, o W; X <sub>2</sub> es D, I, o E; X <sub>3</sub> es H, W, E, V, o D) (SEC ID N° 468)	X <sub>1</sub> ISX <sub>2</sub> GGX <sub>3</sub> X <sub>4</sub> YADX <sub>6</sub> VKG (X <sub>1</sub> es V, S, o Y; X <sub>2</sub> es P o S; X <sub>3</sub> es W o D; X <sub>4</sub> es T o A; X <sub>5</sub> es S, W, A, o T; X <sub>6</sub> es S o P) (SEC ID N° 452) (X <sub>1</sub> es V o Y; X <sub>2</sub> es P o S; X <sub>3</sub> es W o D; X <sub>4</sub> es T; X <sub>5</sub> es S, W, o A; X <sub>6</sub> es S) (SEC ID N° 470) (X <sub>1</sub> es V; X <sub>2</sub> es P; X <sub>3</sub> es W; X <sub>4</sub> es T; X <sub>5</sub> es S; X <sub>6</sub> es S) (SEC ID N° 538)	DHSGYDSEYFDY (SEC ID N° 453) DDYSKGRDAFDI (SEC ID N° 454) DSSGYYSPPDAFDI (SEC ID N° 455) AGDY (SEC ID N° 456) ASSGDAFDI (SEC ID N° 457) ADSDYDSFDY (SEC ID N° 458)

<b>Familia CDR/Aq diana</b>	<b><u>LCDR1</u></b>	<b><u>LCDR2</u></b>	<b><u>LCDR3</u></b>	<b><u>HCDR1</u></b>	<b><u>HCDR2</u></b>	<b><u>HCDR3</u></b>
	X <sub>7</sub> es L (SEC ID N° 463)	X <sub>5</sub> es S) (SEC ID N° 465)		(X <sub>1</sub> es W; X <sub>2</sub> es D; X <sub>3</sub> es V) (SEC ID N° 469)		IGYADAFDI (SEC ID N° 459) IDYADAFDI (SEC ID N° 460) DGYSKGRDAFDI (SEC ID N° 461)
C/VEGF-A	SGX <sub>1</sub> SSNIGX <sub>2</sub> NX <sub>3</sub> VX <sub>4</sub> (X <sub>1</sub> es S o V; X <sub>2</sub> es K, S, X <sub>3</sub> o A; X <sub>3</sub> es A, T, P, N, S, Y, o I; X <sub>4</sub> es H, N, Q, T, o S) (SEC ID N° 462) (X <sub>1</sub> es S; X <sub>2</sub> es S o R; X <sub>3</sub> es T, P, N, o I; X <sub>4</sub> es N o Q) (SEC ID N° 471) (X <sub>1</sub> es S o V; X <sub>2</sub> es K, S, o R; X <sub>3</sub> es A, T, P, N, o S; X <sub>4</sub> es H, N, Q, o T) (SEC ID N° 472) (X <sub>1</sub> es S; X <sub>2</sub> es S, o R; X <sub>3</sub> es T, P, o N; X <sub>4</sub> es N o Q) (SEC ID N° 473)	X <sub>1</sub> X <sub>2</sub> X <sub>3</sub> X <sub>4</sub> X <sub>5</sub> PX <sub>6</sub> (X <sub>1</sub> es Y, G, S, R, o T; X <sub>2</sub> es N o D; X <sub>3</sub> es N, R, o D; X <sub>4</sub> es L, Q, o R; X <sub>5</sub> es L o R; X <sub>6</sub> es P o S) (SEC ID N° 463) (X <sub>1</sub> es G o S; X <sub>2</sub> es N o D; X <sub>3</sub> es N, R, o D; X <sub>4</sub> es Q o R; X <sub>5</sub> es R; X <sub>6</sub> es P o S) (SEC ID N° 474) (X <sub>1</sub> es Y, G, S, o R; X <sub>2</sub> es N o D; X <sub>3</sub> es N o D; X <sub>4</sub> es L, Q, o R; X <sub>5</sub> es L o R; X <sub>6</sub> es P o S) (SEC ID N° 475) (X <sub>1</sub> es G o S; X <sub>2</sub> es N o D; X <sub>3</sub> es N o D; X <sub>4</sub> es R; X <sub>5</sub> es R; X <sub>6</sub> es P o S) (SEC ID N° 476) (X <sub>1</sub> es Y, G, S, o R; X <sub>2</sub> es N o D; X <sub>3</sub> es N o D; X <sub>4</sub> es L, Q, o R; X <sub>5</sub> es L o R; X <sub>6</sub> es P) (SEC ID N° 479)	X <sub>1</sub> X <sub>2</sub> WDDX <sub>3</sub> LX <sub>4</sub> X <sub>5</sub> X <sub>6</sub> V (X <sub>1</sub> es A o T; X <sub>2</sub> es A o T; X <sub>3</sub> es N o S; X <sub>4</sub> es N o S; X <sub>5</sub> es G o V; y X <sub>6</sub> es P, W, o V) (SEC ID N° 464) (X <sub>1</sub> es A; X <sub>2</sub> es A o T; X <sub>3</sub> es S; X <sub>4</sub> es N o S; X <sub>5</sub> es G o V; y X <sub>6</sub> es W o V) (SEC ID N° 480)	X <sub>1</sub> YX <sub>2</sub> MX <sub>3</sub> (X <sub>1</sub> es D, G, o H; X <sub>2</sub> es L, I, o E; X <sub>3</sub> es V, W, o A) (SEC ID N° 465) (X <sub>1</sub> es D o G; X <sub>2</sub> es L o I; X <sub>3</sub> es V o W) (SEC ID N° 477) AAWDDDS PTGDDSLSSVY (SEC ID N° 466)	X <sub>1</sub> SPSGGX <sub>2</sub> TX <sub>3</sub> ADSVKG (X <sub>1</sub> es Y o V; X <sub>2</sub> es W o D; X <sub>3</sub> es A, W, o S) (SEC ID N° 467) (X <sub>1</sub> es Y o V; X <sub>2</sub> es W o D; X <sub>3</sub> es A o W) (SEC ID N° 478)	AGDY (SEC ID N° 468) VVVELRAGDAFDI (SEC ID N° 469) EGPLDAFDI (SEC ID N° 470)

En ciertas realizaciones, un anticuerpo anti-PDGFR $\beta$  o anti-VEGF-A descrito en el presente documento comprende una o más CDR consenso como se muestra para la familia de CDR A, B, o C en la Tabla 6. Por ejemplo, en ciertas realizaciones, el anticuerpo comprende una CDR consenso de cadena pesada (al menos una de las regiones HCDR1, HCDR2, y HCDR3) y/o una correspondiente CDR consenso de cadena ligera (al menos una de las regiones LCDR1, LCDR2, y LCDR3) como se muestra para la familia de CDR A, B, o C en la Tabla 6. En realizaciones típicas, el anticuerpo anti-PDGFR $\beta$  tiene dos o tres CDR consenso de cadena pesada y/o dos o tres CDR consenso de cadena ligera como se muestra para la familia de CDR A, B, o C en la Tabla 6. En ciertas realizaciones, donde un anticuerpo anti-PDGFR $\beta$  o anti-VEGF-A tiene al menos una CDR consenso de cadena pesada como se muestra para la familia de CDR A, B, o C en la Tabla 6, el anticuerpo comprende adicionalmente al menos una CDR consenso de cadena ligera de la misma familia de CDR.

En algunas realizaciones, un anticuerpo anti-PDGFR $\beta$  o anti-VEGF-A descrito en el presente documento comprende una o más CDR de un anticuerpo anti-PDGFR $\beta$  o anti-VEGF-A enumerado en la Tabla 2 o Tabla 4 (límites de las correspondientes regiones CDR mostradas en las Tablas 3 y 5, respectivamente). Por ejemplo, en ciertas variaciones, el anticuerpo comprende una CDR de cadena pesada (al menos una de las regiones HCDR1, HCDR2, y HCDR3) y/o una correspondiente CDR de cadena ligera (al menos una de las regiones LCDR1, CDR2, y LCDR3) de un anticuerpo enumerado en la Tabla 2 o Tabla 4. En realizaciones típicas, el anticuerpo anti-PDGFR $\beta$  o anti-VEGF-A tiene dos o tres CDR de cadena pesada y/o dos o tres CDR de cadena ligera de un anticuerpo enumerado en la Tabla 2 o Tabla 4. En algunas variaciones, donde un anticuerpo anti-PDGFR $\beta$  o anti-VEGF-A tiene al menos una CDR de cadena pesada de un anticuerpo enumerado en la Tabla 2 o Tabla 4, el anticuerpo comprende adicionalmente al menos una CDR de cadena ligera correspondiente.

En ciertas realizaciones típicas, un anticuerpo anti-PDGFR $\beta$  o anti-VEGF-A incluye un dominio variable de cadena pesada y/o ligera, teniendo el dominio variable de cadena pesada o ligera (a) una serie de tres CDR correspondiente a las CDR consenso de cadena pesada o ligera mostradas para la familia de CDR A, B, o C en la Tabla 6, y (b) una serie de cuatro regiones flanqueantes.

En variaciones particulares, un anticuerpo anti-PDGFR $\beta$  o anti-VEGF-A incluye un dominio variable de cadena pesada y/o ligera, teniendo el dominio variable de cadena pesada o ligera (a) una serie de tres CDR correspondiente a las CDR de cadena pesada o ligera mostradas para un anticuerpo enumerado en la Tabla 2 o Tabla 4, y (b) una serie de cuatro regiones flanqueantes. Por ejemplo, un anticuerpo anti-PDGFR $\beta$  o anti-VEGF-A puede incluir un dominio variable de cadena pesada y/o ligera, donde el dominio variable de cadena pesada o ligera tiene (a) una serie de tres CDR, en que la serie de CDR es de un anticuerpo enumerado en la Tabla 2 o Tabla 4, y (b) una serie de cuatro regiones flanqueantes, en que la serie de regiones flanqueantes es idéntica a o diferente de la serie de regiones flanqueantes del mismo anticuerpo enumerado en la Tabla 2 o Tabla 4.

En realizaciones específicas, un anticuerpo anti-PDGFR $\beta$  o anti-VEGF-A incluye una región variable de cadena pesada y/o región variable de cadena ligera que es sustancialmente idéntica a las regiones variables de cadena pesada y/o ligera de un anticuerpo enumerado en la Tabla 2 o Tabla 4.

Por consiguiente, en ciertas realizaciones, un anticuerpo anti-PDGFR $\beta$  tiene (a) un dominio variable de cadena pesada que es al menos un 80 %, al menos un 85 %, al menos un 90 %, al menos un 95 %, al menos un 96 %, al menos un 97 %, al menos un 98 %, al menos un 99 %, o al menos un 99,5 % idéntico a la secuencia de aminoácidos de un polipéptido V<sub>H</sub> enumerado en la Tabla 2 y/o (b) un dominio variable de cadena ligera que es al menos un 80 %, al menos un 85 %, al menos un 90 %, al menos un 95 %, al menos un 96 %, al menos un 97 %, al menos un 98 %, al menos un 99 %, o al menos un 99,5 % idéntico a la secuencia de aminoácidos de un polipéptido V<sub>L</sub> enumerado en la Tabla 2. En ciertas realizaciones, el anticuerpo anti-PDGFR $\beta$  incluye (a) una región variable de cadena pesada que tiene la secuencia de aminoácidos de un polipéptido V<sub>H</sub> enumerado en la Tabla 2 y/o (b) una región variable de cadena ligera que tiene la secuencia de aminoácidos de un polipéptido V<sub>L</sub> enumerado en la Tabla 2. Normalmente, cuando un anticuerpo comprende tanto un dominio variable de cadena pesada como un dominio variable de cadena ligera, las cadenas pesada y ligera corresponden al mismo anticuerpo de referencia de la Tabla 2. Por ejemplo, en ciertas realizaciones, un anticuerpo anti-PDGFR $\beta$  comprende dominios variables de cadena ligera y pesada que tienen respectivas secuencias de aminoácidos de VL y VH seleccionadas entre los siguientes pares de secuencias de V<sub>L</sub>/V<sub>H</sub>: SEC ID N° 6 y 8; SEC ID N° 10 y 12; SEC ID N° 14 y 16; SEC ID N° 18 y 20; SEC ID N° 22 y 24; SEC ID N° 26 y 28; SEC ID N° 30 y 32; SEC ID N° 34 y 36; SEC ID N° 38 y 40; SEC ID N° 42 y 44; SEC ID N° 46 y 48; SEC ID N° 50 y 52; SEC ID N° 54 y 56; SEC ID N° 58 y 60; SEC ID N° 62 y 64; SEC ID N° 66 y 68; SEC ID N° 70 y 72; SEC ID N° 74 y 76; SEC ID N° 78 y 80; SEC ID N° 82 y 84; SEC ID N° 86 y 88; SEC ID N° 90 y 92; SEC ID N° 94 y 96; SEC ID N° 98 y 100; SEC ID N° 102 y 104; SEC ID N° 106 y 108; SEC ID N° 110 y 112; SEC ID N° 114 y 116; SEC ID N° 118 y 120; SEC ID N° 122 y 124; SEC ID N° 126 y 128; SEC ID N° 130 y 132; SEC ID N° 134 y 136; SEC ID N° 138 y 140; SEC ID N° 142 y 144; SEC ID N° 146 y 148; SEC ID N° 150 y 152; SEC ID N° 154 y 156; SEC ID N° 158 y 160; y SEC ID N° 162 y 164.

En otras realizaciones, un anticuerpo anti-VEGF-A tiene (a) un dominio variable de cadena pesada que es al menos un 80 %, al menos un 85 %, al menos un 90 %, al menos un 95 %, al menos un 96 %, al menos un 97 %, al menos un 98 %, al menos un 99 %, o al menos un 99,5 % idéntico a la secuencia de aminoácidos de un polipéptido V<sub>H</sub> enumerado en la Tabla 4 y/o (b) un dominio variable de cadena ligera que es al menos un 80 %, al menos un 85 %, al menos un 86 %, al menos un 87 %, al menos un 88 %, al menos un 89 %, al menos un 90 %, al menos un 91 %, al menos un 92 %, al menos un 93 %, al menos un 94 %, al menos un 95 %, al menos un 96 %, al menos un 97 %, al menos un 98 %, al menos un 99 %, o al menos un 99,5 % idéntico a la secuencia de aminoácidos de un polipéptido V<sub>L</sub> enumerado en la Tabla 4.

al menos un 90 %, al menos un 95 %, al menos un 96 %, al menos un 97 %, al menos un 98 %, al menos un 99 %, o al menos un 99,5 % idéntico a la secuencia de aminoácidos de un polipéptido  $V_L$  enumerado en la Tabla 4. En ciertas realizaciones, el anticuerpo anti-VEGF-A incluye (a) una región variable de cadena pesada que tiene la secuencia de aminoácidos de un polipéptido  $V_H$  enumerado en la Tabla 4 y/o (b) una región variable de cadena ligera que tiene la secuencia de aminoácidos de un polipéptido  $V_L$  enumerado en la Tabla 4. Normalmente, cuando un anticuerpo comprende tanto un dominio variable de cadena pesada como un dominio variable de cadena ligera, las cadenas pesada y ligera corresponden al mismo anticuerpo de referencia de la Tabla 4. Por ejemplo, en ciertas realizaciones, un anticuerpo anti-VEGF-A comprenden dominios variables de cadena ligera y pesada que tienen las respectivas secuencias de aminoácidos de  $V_L$  y  $V_H$  seleccionadas entre los siguientes pares de secuencias de  $V_L/V_H$ :

5 SEC ID N° 166 y 168; SEC ID N° 170 y 172; SEC ID N° 174 y 176; SEC ID N° 178 y 180; SEC ID N° 182 y 184; SEC ID N° 186 y 188; SEC ID N° 190 y 192; SEC ID N° 194 y 196; SEC ID N° 198 y 200; SEC ID N° 202 y 204; SEC ID N° 206 y 208; SEC ID N° 210 y 212; SEC ID N° 214 y 216; SEC ID N° 218 y 220; SEC ID N° 222 y 224; SEC ID N° 226 y 228; SEC ID N° 230 y 232; SEC ID N° 234 y 236; SEC ID N° 238 y 240; SEC ID N° 242 y 244; SEC ID N° 246 y 248; SEC ID N° 250 y 252; SEC ID N° 254 y 256; SEC ID N° 258 y 260; SEC ID N° 262 y 264; SEC ID N° 266 y 268; SEC ID N° 270 y 272; SEC ID N° 274 y 276; SEC ID N° 278 y 280; SEC ID N° 282 y 284; SEC ID N° 286 y 288; SEC ID N° 290 y 292; SEC ID N° 294 y 296; SEC ID N° 298 y 300; SEC ID N° 302 y 304; SEC ID N° 306 y 308; SEC ID N° 310 y 312; SEC ID N° 314 y 316; SEC ID N° 318 y 320; SEC ID N° 322 y 324; SEC ID N° 326 y 328; SEC ID N° 330 y 332; SEC ID N° 334 y 336; SEC ID N° 338 y 340; SEC ID N° 342 y 344; SEC ID N° 346 y 348; SEC ID N° 350 y 352; SEC ID N° 354 y 356; SEC ID N° 358 y 360; SEC ID N° 362 y 364; SEC ID N° 366 y 368; SEC ID N° 370 y 372; SEC ID N° 374 y 376; SEC ID N° 378 y 380; SEC ID N° 382 y 384; SEC ID N° 386 y 388; SEC ID N° 390 y 392; SEC ID N° 394 y 396; SEC ID N° 398 y 400; SEC ID N° 402 y 404; SEC ID N° 406 y 408; SEC ID N° 410 y 412; SEC ID N° 414 y 416; SEC ID N° 418 y 420; SEC ID N° 422 y 424; SEC ID N° 426 y 428; y SEC ID N° 430 y 432.

En algunas realizaciones, un anticuerpo descrito en el presente documento incluye una región variable de cadena pesada y/o ligera que comprende al menos una CDR que tiene cero, una, dos, tres o cuatro sustituciones de aminoácidos relativas a una CDR de un polipéptido  $V_L$  o  $V_H$  enumerado en las Tablas 2 ó 4 (intervalos de aminoácidos de CDR mostrados en las Tablas 3 y 5, respectivamente). En ciertas variaciones, por ejemplo, un anticuerpo anti-PDGFR $\beta$  comprende las CDR de cadena pesada HCDR1, HCDR2, y HCDR3, en las que al menos una de HCDR1, HCDR2, y HCDR3 comprende cero, una, dos, tres o cuatro sustituciones de aminoácidos relativas a un polipéptido  $V_H$  enumerado en la Tabla 2. En otras variaciones, un anticuerpo anti-PDGFR $\beta$  comprende las CDR de cadena ligera LCDR1, LCDR2, y LCDR3, en las que al menos una de LCDR1, LCDR2, y LCDR3 comprende cero, una, dos, tres o cuatro sustituciones de aminoácidos relativas a un polipéptido  $V_L$  enumerado en la Tabla 2. En ciertas realizaciones, un anticuerpo anti-PDGFR $\beta$  comprende ambas series de CDR de cadena pesada y cadena ligera que las anteriores. Anticuerpos anti-PDGFR $\beta$  particularmente adecuados comprenden un dominio variable de cadena ligera que comprende las CDR LCDR1, LCDR2, y LCDR3 y un dominio variable de cadena pesada que comprende las CDR HCDR1, HCDR2, y HCDR3, en los que dicha serie de CDR de cadena pesada y ligera tiene 6 o menos, normalmente cinco o menos, más normalmente cuatro o menos, y mucho más normalmente 3 o menos sustituciones de aminoácidos relativas a las CDR de cadena pesada y ligera de un anticuerpo enumerado en la Tabla 2.

En otras variaciones, un anticuerpo anti-VEGF-A descrito en el presente documento comprende las CDR de cadena pesada HCDR1, HCDR2, y HCDR3, en las que al menos una de HCDR1, HCDR2, y HCDR3 comprende cero, una, dos, tres o cuatro sustituciones de aminoácidos relativas a un polipéptido  $V_H$  enumerado en la Tabla 4. En otras variaciones, un anticuerpo anti-VEGF-A comprende las CDR de cadena ligera LCDR1, LCDR2, y LCDR3, en las que al menos una de LCDR1, LCDR2, y LCDR3 comprende cero, una, dos, tres o cuatro sustituciones de aminoácidos relativas a un polipéptido  $V_L$  enumerado en la Tabla 4. En ciertas realizaciones, un anticuerpo anti-VEGF-A comprende ambas series de CDR de cadena pesada y cadena ligera que las anteriores. Anticuerpos anti-VEGF-A particularmente adecuados comprenden un dominio variable de cadena ligera que comprende las CDR LCDR1, LCDR2, y LCDR3 y un dominio variable de cadena pesada que comprende las CDR HCDR1, HCDR2, y HCDR3, en los que dicha serie de CDR de cadena pesada y ligera tiene 6 o menos, normalmente cinco o menos, más normalmente cuatro o menos, y mucho más normalmente 3 o menos sustituciones de aminoácidos relativas a las CDR de cadena pesada y ligera de un anticuerpo enumerado en la Tabla 4.

En ciertas realizaciones, un anticuerpo anti-PDGFR $\beta$  descrito en el presente documento comprende un dominio  $V_L$  que comprende las CDR LCDR1, LCDR2, y LCDR3 y un dominio  $V_H$  que comprende las CDR HCDR1, HCDR2, y HCDR3, donde LCDR1 tiene la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEC ID N° 433; LCDR2 tiene la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEC ID N° 434; LCDR3 tiene la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEC ID N° 435; HCDR1 tiene la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEC ID N° 436; HCDR2 tiene la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEC ID N° 437; y HCDR3 tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada entre el grupo que consiste en las SEC ID N° 438-442. En algunas de estas realizaciones de un anticuerpo anti-PDGFR $\beta$ , LCDR1 tiene la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEC ID N° 443; LCDR3 tiene la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEC ID N° 444; y HCDR1 tiene la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEC ID N° 445. Por ejemplo, en algunas variaciones, LCDR1 tiene la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEC ID N° 443; LCDR2 tiene la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEC ID N° 434; LCDR3 tiene la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEC ID N° 444; HCDR1 tiene la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEC ID N° 446; HCDR2 tiene la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEC ID N° 447, y HCDR3 tiene una secuencia de



aminoácidos expuesta en la SEC ID N° 441 o SEC ID N° 442. En otras variaciones, LCDR1 tiene la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEC ID N° 443; LCDR2 tiene la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEC ID N° 434; LCDR3 tiene la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEC ID N° 444; y HCDR1, HCDR2, y HCDR3 tienen las secuencias de CDR de cadena pesada de un anticuerpo seleccionado entre el grupo que consiste en c597, 975, c600, c941, c949, y c1035.

En otras realizaciones de un anticuerpo anti-PDGFR $\beta$ , LCDR1 tiene la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEC ID N° 433; LCDR2 tiene la secuencia de aminoácidos de LCDR2 de un anticuerpo seleccionado entre el grupo que consiste en c597 y c600 (los restos 56-62 de la SEC ID N° 6 ó 10); LCDR3 tiene la secuencia de aminoácidos de LCDR3 de un anticuerpo seleccionado entre el grupo que consiste en c597, c600, y c1035 (los restos 95-103 de la SEC ID N° 6, 10, ó 46); HCDR1 tiene la secuencia de aminoácidos de HCDR1 de un anticuerpo seleccionado entre el grupo que consiste en c597, c600, c941, c949, y c1035 (los restos 31-35 de la SEC ID N° 8, 12, 24, 36, ó 48); HCDR2 tiene la secuencia de aminoácidos de HCDR2 de un anticuerpo seleccionado entre el grupo que consiste en c597, c600, c941, c949, y c1035 (los restos 50-66 de la SEC ID N° 8, 12, 24, 36, ó 48); y HCDR3 tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada entre el grupo que consiste en las SEC ID N° 438-442. En algunas de estas realizaciones, LCDR2, LCDR3, HCDR1, HCDR2, y HCDR3 tienen las secuencias de aminoácidos de LCDR2, LCDR3, HCDR1, HCDR2, y HCDR3 de un anticuerpo seleccionado entre el grupo que consiste en c597, c600, c941, c949, c975, y c1035. En variaciones específicas, el anticuerpo comprende los dominios V<sub>L</sub> y V<sub>H</sub> de un anticuerpo seleccionado entre el grupo que consiste en c597, c600, c941, c949, c975, y c1035.

En otras realizaciones, un anticuerpo anti-PDGFR $\beta$  descrito en el presente documento comprende un dominio V<sub>L</sub> que comprende las CDR LCDR1, LCDR2, y LCDR3 y un dominio V<sub>H</sub> que comprende las CDR HCDR1, HCDR2, y HCDR3, en el que dicha serie de CDR de V<sub>L</sub> y V<sub>H</sub> tiene 3 o menos sustituciones de aminoácidos con relación a una segunda serie de CDR, donde dicha segunda serie de CDR tiene las secuencias de aminoácidos de LCDR1, LCDR2, LCDR3, HCDR1, HCDR2, y HCDR3 de un anticuerpo seleccionado entre el grupo que consiste en c597, c600, c941, c949, c975, y c1035. En variaciones particulares, el anticuerpo comprende ninguna, una, o dos sustituciones de aminoácidos en dicha serie de CDR.

En otras realizaciones más, un anticuerpo anti-PDGFR $\beta$  descrito en el presente documento comprende un dominio V<sub>L</sub> que comprende las CDR LCDR1, LCDR2, y LCDR3 y un dominio V<sub>H</sub> que comprende las CDR HCDR1, HCDR2, y HCDR3, en el que dicha serie de CDR de V<sub>L</sub> y V<sub>H</sub> tiene 3 o menos sustituciones de aminoácidos con relación a una segunda serie de CDR en que las secuencias de aminoácidos de LCDR1, LCDR2, LCDR3, HCDR1, HCDR2, y HCDR3 del anticuerpo tienen la designación de grupo c613. En variaciones particulares, el anticuerpo comprende ninguna, una, o dos sustituciones de aminoácidos en dicha serie de CDR. En algunas realizaciones, el anticuerpo comprende las CDR del anticuerpo c613. Por ejemplo, en una variación específica, el anticuerpo comprende los dominios V<sub>L</sub> y V<sub>H</sub> del anticuerpo c613 (es decir, el dominio V<sub>L</sub> comprende una secuencia de aminoácidos mostrada en la SEC ID N° 18 y el dominio V<sub>H</sub> comprende una secuencia de aminoácidos mostrada en la SEC ID N° 20).

En ciertas realizaciones, un anticuerpo anti-VEGF-A descrito en el presente documento comprende un dominio V<sub>L</sub> que comprende las CDR LCDR1, LCDR2, y LCDR3 y un dominio V<sub>H</sub> que comprende las CDR HCDR1, HCDR2, y HCDR3, donde LCDR1 tiene la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEC ID N° 448; LCDR2 tiene la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEC ID N° 449; LCDR3 tiene la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEC ID N° 450; HCDR1 tiene la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEC ID N° 451; HCDR2 tiene la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEC ID N° 452; y HCDR3 tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada entre el grupo que consiste en las SEC ID N° 453-461. En algunas de estas realizaciones de un anticuerpo VEGF-A, LCDR1 tiene la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEC ID N° 462; LCDR2 tiene la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEC ID N° 464; LCDR3 tiene la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEC ID N° 466; HCDR1 tiene la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEC ID N° 468; HCDR2 tiene la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEC ID N° 470; y HCDR3 tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada entre el grupo que consiste en las SEC ID N° 453-459. En variaciones específicas de dicho anticuerpo anti-VEGF-A, LCDR1 y LCDR2 tienen las secuencias de aminoácidos de LCDR1 y LCDR2 de un anticuerpo seleccionado entre el grupo que consiste en c636, c868, c1039, c1092, c1111, c1135, c1270, c1410, y c1476 (secuencias de aminoácidos mostradas, respectivamente, en los restos 24-34 y los restos 50-56 de la SEC ID N° 170, SEC ID N° 242, SEC ID N° 278, SEC ID N° 306, SEC ID N° 322, SEC ID N° 330, SEC ID N° 374, SEC ID N° 394, o SEC ID N° 426). En algunas de estas variaciones, HCDR1 tiene la secuencia de aminoácidos de HCDR1 de un anticuerpo seleccionado entre el grupo que consiste en c636, c868, c1039, c1092, y c1111 (los restos 31-35 de la SEC ID N° 172, 244, 280, 308, ó 324); en realizaciones particulares en que HCDR1 tiene la secuencia de aminoácidos de HCDR1 del anticuerpo c1039, HCDR2 opcionalmente tiene la secuencia de aminoácidos de HCDR2 de un anticuerpo seleccionado entre el grupo que consiste en c1039, c1270, y c1476 (los restos 50-66 de la SEC ID N° 280, 376, ó 428).

En algunas realizaciones de un anticuerpo anti-VEGF-A descrito en el presente documento, LCDR1 tiene la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEC ID N° 463; LCDR2 tiene la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEC ID N° 465; LCDR3 tiene la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEC ID N° 467; HCDR1 tiene la secuencia de aminoácidos de HCDR1 del anticuerpo c1039 (los restos 31-35 de la SEC ID N° 280); HCDR2 tiene la secuencia de aminoácidos de HCDR2 del anticuerpo c1039 (los restos 50-66 de la SEC ID N° 280); y HCDR3 tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada entre el grupo que consiste en las SEC ID N° 453-461. En algunas de estas realizaciones, HCDR3 tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada entre el grupo que consiste en las

SEC ID N° 453, 458, y 459.

En otras realizaciones de un anticuerpo anti-VEGF-A descrito en el presente documento, LCDR1 tiene la secuencia de aminoácidos de LCDR1 de un anticuerpo seleccionado entre el grupo que consiste en c636, c1135, c1410, y c1476 (los restos 24-34 de la SEC ID N° 170, 330, 394, ó 426); LCDR2 tiene la secuencia de aminoácidos de LCDR2 de un anticuerpo seleccionado entre el grupo que consiste en c636, c868, c1111, c1135, c1410, y c1476 (los restos 50-56 de la SEC ID N° 170, 242, 322, 330, 394, ó 426); LCDR3 tiene la secuencia de aminoácidos de LCDR3 de un anticuerpo seleccionado entre el grupo que consiste en c636, c868, c1039, c1410, y c1476 (los restos 89-97 de la SEC ID N° 170, 242, 278, 394, ó 426); HCDR1 tiene la secuencia de aminoácidos de HCDR1 de un anticuerpo seleccionado entre el grupo que consiste en c636, c868, c1039, c1092, y c1111 (los restos 31-35 de la SEC ID N° 172, 244, 280, 308, ó 324); HCDR2 tiene la secuencia de aminoácidos de HCDR2 de un anticuerpo seleccionado entre el grupo que consiste en c636, c868, c1039, y c1111 (los restos 50-66 de la SEC ID N° 172, 244, 280, ó 324); y HCDR3 tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada entre el grupo que consiste en las SEC ID N° 453-461. En variaciones específicas, el anticuerpo anti-VEGF-A tiene las CDR LCDR1, LCDR2, LCDR3, HCDR1, HCDR2, y HCDR3 de un anticuerpo seleccionado entre el grupo que consiste en las CDR de c636, c868, c1039; c1092; c1111; c1135; c1270; c1410; y c1476. Por ejemplo, en realizaciones particulares, el anticuerpo anti-VEGF-A tiene los dominios variables de cadena ligera y pesada ( $V_L$  y  $V_H$ ) de un anticuerpo seleccionado entre el grupo que consiste en las CDR de c636, c868, c1039; c1092; c1111; c1135; c1270; c1410; y c1476.

En otras realizaciones, un anticuerpo anti-VEGF-A descrito en el presente documento comprende un dominio  $V_L$  que comprende las CDR LCDR1, LCDR2, y LCDR3 y un dominio  $V_H$  que comprende las CDR HCDR1, HCDR2, y HCDR3, en el que dicha serie de CDR de  $V_L$  y  $V_H$  tiene 3 o menos sustituciones de aminoácidos con relación a una segunda serie de CDR, donde dicha segunda serie de CDR tiene las secuencias de aminoácidos de LCDR1, LCDR2, LCDR3, HCDR1, HCDR2, y HCDR3 de un anticuerpo seleccionado entre el grupo que consiste en las CDR de c636, c868, c1039; c1092; c1111; c1135; c1270; c1410; y c1476. En variaciones particulares, el anticuerpo comprende ninguna, una, o dos sustituciones de aminoácidos en dicha serie de CDR.

En algunas realizaciones, un anticuerpo anti-VEGF-A descrito en el presente documento comprende un dominio  $V_L$  que comprende las CDR LCDR1, LCDR2, y LCDR3 y un dominio  $V_H$  que comprende las CDR HCDR1, HCDR2, y HCDR3, donde LCDR1 tiene la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEC ID N° 462; LCDR2 tiene la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEC ID N° 463; LCDR3 tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada entre el grupo que consiste en las SEC ID N° 464 y 465; HCDR1 tiene la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEC ID N° 466; HCDR2 tiene la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEC ID N° 467; y HCDR3 tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada entre el grupo que consiste en las SEC ID N° 468-470. En algunas de estas realizaciones, LCDR1 tiene la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEC ID N° 471; LCDR2 tiene la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEC ID N° 474; HCDR1 tiene la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEC ID N° 477; HCDR2 tiene la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEC ID N° 478; y HCDR3 tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada entre el grupo que consiste en las SEC ID N° 468 y 469.

En otra de estas realizaciones de un anticuerpo anti-VEGF-A, LCDR1 tiene una secuencia de aminoácidos mostrada en la SEC ID N° 472; LCDR2 tiene la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEC ID N° 475; HCDR1 tiene la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEC ID N° 477; HCDR2 tiene la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEC ID N° 478; y HCDR3 tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada entre el grupo que consiste en las SEC ID N° 468 y 469. En variaciones particulares, HCDR1, HCDR2, y HCDR3 tienen las secuencias de aminoácidos de HCDR1, HCDR2, y HCDR3 del anticuerpo c870 (mostradas respectivamente en los restos 31-35, los restos 50-66, y los restos 99-102 de la SEC ID N° 248). En algunas de estas variaciones, LCDR2 tiene la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEC ID N° 479 y LCDR3 tiene la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEC ID N° 480.

En otras realizaciones de un anticuerpo anti-VEGF-A descrito en el presente documento, LCDR1 tiene la secuencia de aminoácidos de LCDR1 de un anticuerpo seleccionado entre el grupo que consiste en c752, c870, c1036, c1044, c1094, c1155, y c1257 (los restos 23-35 de la SEC ID N° 214, 246, 274, 286, 310, 338, ó 354); LCDR2 tiene la secuencia de aminoácidos de LCDR2 de un anticuerpo seleccionado entre el grupo que consiste en c752, c870, c1036, c1044, c1094, c1155, y c1257 (los restos 51-57 de la SEC ID N° 214, 246, 274, 286, 310, 338, ó 354); LCDR3 tiene la secuencia de aminoácidos de LCDR3 de un anticuerpo seleccionado entre el grupo que consiste en c752, c870, c1036, c1044, c1094, c1155, y c1257 (los restos 90-100 de la SEC ID N° 214, 246, 274, 286, 310, ó 338); HCDR1 tiene la secuencia de aminoácidos de HCDR1 de un anticuerpo seleccionado entre el grupo que consiste en c752, c870, y c1257 (los restos 31-35 de la SEC ID N° 216, 248, ó 356); y HCDR2 tiene la secuencia de aminoácidos de HCDR2 de un anticuerpo seleccionado entre el grupo que consiste en c752, c870, y c1257 (los restos 50-66 de la SEC ID N° 216, 248, ó 356). En variaciones específicas, el anticuerpo anti-VEGF-A tiene las CDR LCDR1, LCDR2, LCDR3, HCDR1, HCDR2, y HCDR3 de un anticuerpo seleccionado entre el grupo que consiste en c752, c870, c1036, c1044, c1094, c1155, y c1257. Por ejemplo, en realizaciones particulares, el anticuerpo anti-VEGF-A tiene los dominios variables de cadena ligera y pesada ( $V_L$  y  $V_H$ ) de un anticuerpo seleccionado entre el grupo que consiste en c752, c870, c1036, c1044, c1094, c1155, y c1257.

En otras realizaciones más, un anticuerpo anti-VEGF-A descrito en el presente documento comprende un dominio  $V_L$  que comprende las CDR LCDR1, LCDR2, y LCDR3 y un dominio  $V_H$  que comprende las CDR HCDR1, HCDR2, y

HCDR3, en el que dicha serie de CDR de  $V_L$  y  $V_H$  tiene 3 o menos sustituciones de aminoácidos con relación a una segunda serie de CDR, donde dicha segunda serie de CDR tiene las secuencias de aminoácidos de LCDR1, LCDR2, LCDR3, HCDR1, HCDR2, y HCDR3 de un anticuerpo seleccionado entre el grupo que consiste en c752, c870, c1036, c1044, c1094, c1155, y c1257. En variaciones particulares, el anticuerpo comprende ninguna, una, o dos sustituciones de aminoácidos en dicha serie de CDR.

Los epítomos reconocidos por anticuerpos anti-PDGFR $\beta$  descritos en el presente documento normalmente incluyen cinco o más aminoácidos del dominio extracelular de PDGFR $\beta$  humano (los restos 33-531 de la SEC ID N° 4). Los epítomos preferidos comprenden al menos un aminoácido incluido dentro de una o más de las siguientes regiones polipeptídicas de PDGFR $\beta$ : LVVTLHEKKGDVALPVPYDH (los restos 156-175 de la SEC ID N° 4); DREVDSDAYY (restos aminoacídicos 196-205 de la SEC ID N° 4); KTTIGDREVDSDAYYVYRLQ (los restos 191-210 de la SEC ID N° 4); ITLMCIVIGNEVWNFEWTYP (los restos 231-250 de la SEC ID N° 4); y RKESGRLVEPVTFLLDMPY (los restos 251-270 de la SEC ID N° 4). En ciertas realizaciones, el epítomo comprende al menos dos, al menos tres, al menos cuatro, al menos cinco, al menos seis, o al menos siete aminoácidos de una o más de las regiones polipeptídicas de PDGFR $\beta$  mostradas en los restos 196-205 y 251-270 de la SEC ID N° 4. En algunas variaciones, dichos epítomos de PDGFR $\beta$  son epítomos determinados por mapeado de epítomos en microserie de péptidos que comprende el uso de péptidos solapantes de PDGFR $\beta$  (por ejemplo, péptidos de 20 monómeros con, por ejemplo, 5 desplazamientos de aminoácido entre cada par de péptidos secuenciales).

En algunas variaciones relacionadas, un anticuerpo anti-PDGFR $\beta$  descrito en el presente documento se une a un epítomo que comprende uno o más aminoácidos incluidos dentro de una primera región polipeptídica de PDGFR $\beta$  mostrada en los restos aminoacídicos 251-270 de la SEC ID N° 4. Los anticuerpos anti-PDGFR $\beta$  a modo de ejemplo que tienen esta especificidad de epítomo incluyen anticuerpos que comprenden dominios variables de cadena ligera y pesada que tienen respectivas secuencias de aminoácidos de  $V_L$  y  $V_H$  seleccionadas entre los siguientes pares de secuencias de  $V_L/V_H$ : SEC ID N° 6 y 8; SEC ID N° 10 y 12; SEC ID N° 22 y 24; y SEC ID N° 46 y 48. En ciertas realizaciones, el epítomo comprende adicionalmente uno o más aminoácidos incluidos dentro de una segunda región polipeptídica de PDGFR $\beta$  mostrada en los restos aminoacídicos 196-205 ó 191-210 de la SEC ID N° 4. Anticuerpos anti-PDGFR $\beta$  a modo de ejemplo de esta clase incluyen anticuerpos que comprenden dominios variables de cadena ligera y pesada que tienen respectivas secuencias de aminoácidos de  $V_L$  y  $V_H$  seleccionadas entre los siguientes pares de secuencias de  $V_L/V_H$ : SEC ID N° 22 y 24; y SEC ID N° 46 y 48.

En otras realizaciones relacionadas, un anticuerpo anti-PDGFR $\beta$  descrito en el presente documento es capaz de unirse específicamente a un péptido inmovilizado derivado de PDGFR $\beta$  correspondiente a una o más de las regiones polipeptídicas de PDGFR $\beta$  especificadas anteriormente. Normalmente, el anticuerpo anti-PDGFR $\beta$  es capaz de unirse a dicho péptido derivado de PDGFR $\beta$  en que cualquier aminoácido correspondiente a un resto de cisteína en la SEC ID N° 4 está sustituido con serina. En algunas realizaciones, el péptido derivado de PDGFR $\beta$  consta de 10, 15, 20, 22, 25, 27, ó 30 aminoácidos contiguos de la SEC ID N° 4, en el que cualquier aminoácido correspondiente a un resto de cisteína está sustituido con serina.

En ciertas variaciones, un anticuerpo anti-PDGFR $\beta$  es capaz de unirse a un péptido derivado de PDGFR $\beta$  que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada entre las siguientes: DREVDSDAYY (SEC ID N° 583); RKESGRLVEPVTFLLDMPY (SEC ID N° 569); LVVTLHEKKGDVALPVPYDH (SEC ID N° 649); y ITLMCIVIGNEVWNFEWTYP (SEC ID N° 650). En variaciones específicas de un anticuerpo anti-PDGFR $\beta$  capaz de unirse a un péptido derivado de PDGFR $\beta$  que comprende la secuencia de aminoácidos DREVDSDAYY, el péptido derivado de PDGFR $\beta$  comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada entre las siguientes: RSYISKTTIGDREVDSDAYY (SEC ID N° 566); KTTIGDREVDSDAYYVYRLQ (SEC ID N° 567); y DREVDSDAYYVYRLQVSSIN (SEC ID N° 568). En variaciones particulares, el péptido derivado de PDGFR $\beta$  consta de una secuencia de aminoácidos seleccionada entre las SEC ID N° 566, 567, 568, 569, 649, y 650.

En variaciones relacionadas, un anticuerpo anti-PDGFR $\beta$  descrito en el presente documento es capaz de unirse a un primer péptido inmovilizado que consta de la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEC ID N° 569. Anticuerpos anti-PDGFR $\beta$  a modo de ejemplo que tienen esta especificidad de epítomo incluyen anticuerpos que comprenden dominios variables de cadena ligera y pesada que tienen respectivas secuencias de aminoácidos de  $V_L$  y  $V_H$  seleccionadas entre los siguientes pares de secuencias de  $V_L/V_H$ : SEC ID N° 6 y 8; SEC ID N° 10 y 12; SEC ID N° 22 y 24; y SEC ID N° 46 y 48. En ciertas realizaciones, dicho anticuerpo anti-PDGFR $\beta$  es adicionalmente capaz de unirse a un segundo péptido inmovilizado que consta de la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEC ID N° 566, 567, o 568. Anticuerpos anti-PDGFR $\beta$  a modo de ejemplo de esta clase incluyen anticuerpos que comprenden dominios variables de cadena ligera y pesada que tienen respectivas secuencias de aminoácidos de  $V_L$  y  $V_H$  seleccionadas entre los siguientes pares de secuencias de  $V_L/V_H$ : SEC ID N° 22 y 24; y SEC ID N° 46 y 48.

Los epítomos reconocidos por anticuerpos anti-VEGF-A descritos en el presente documento normalmente incluyen cinco o más aminoácidos de VEGF-A<sub>165</sub> humano (los restos 27-191 de la SEC ID N° 2). Los epítomos preferidos comprenden al menos un aminoácido incluido dentro de una o más de las siguientes regiones polipeptídicas de VEGF-A: HEVVKFMDVYQRSYCHPIETL (restos aminoacídicos 38-58 de la SEC ID N° 2), EYIFKPSCVPLMRG (restos aminoacídicos 70-84 de la SEC ID N° 2), EESNITMQIMRIKPHQG (restos aminoacídicos 98-114 de la SEC

ID N° 2), y PCGPCSERRKHLF (restos aminoácidos 142-154). En ciertas realizaciones, el epítipo comprende al menos dos, al menos tres, al menos cuatro, al menos cinco, al menos seis, o al menos siete aminoácidos de una o más de las regiones polipeptídicas de VEGF-A mostradas en los restos 38-58, 70-84, 98-114, y 142-154 de la SEC ID N° 2. En algunas variaciones, dichos epítipos de VEGF-A son epítipos determinados por mapeado de epítipos en microserie de péptidos que comprende el uso de péptidos solapantes de VEGF-A (por ejemplo, péptidos de 13 monómeros con, por ejemplo, 2 desplazamientos de aminoácidos entre cada par de péptidos secuenciales).

En variaciones particulares de un anticuerpo anti-VEGF-A como los anteriores, el epítipo anti-VEGF-A comprende al menos un aminoácido incluido dentro de una o más de las siguientes regiones polipeptídicas de VEGF-A: KFMDVYQRSYC (restos aminoácidos 42-52 de la SEC ID N° 2), IFKPSCVPLMR (restos aminoácidos 72-82 de la SEC ID N° 2), IMRIKPHQG (restos aminoácidos 106-114 de la SEC ID N° 2), y PCGPCSERRKHLF (restos aminoácidos 142-154). En ciertas realizaciones, el epítipo comprende al menos dos, al menos tres, al menos cuatro, al menos cinco, al menos seis, o al menos siete aminoácidos de una o más de las regiones polipeptídicas de VEGF-A mostradas en los restos 42-52, 72-82, 106-114, y 142-154 de la SEC ID N° 2.

En algunas variaciones relacionadas, un anticuerpo anti-VEGF-A descrito en el presente documento se une a un epítipo que comprende (a) uno o más aminoácidos incluidos dentro de una primera región polipeptídica de VEGF-A mostrada en los restos aminoácidos 38-58 ó 42-52 de la SEC ID N° 2 y (b) uno o más aminoácidos incluidos dentro de una segunda región polipeptídica de VEGF-A mostrada en los restos aminoácidos 70-84 ó 72-82 de la SEC ID N° 2. Anticuerpos anti-VEGF-A a modo de ejemplo que tienen esta especificidad de epítipo incluyen anticuerpos que comprenden dominios variables de cadena ligera y pesada que tienen respectivas secuencias de aminoácidos de  $V_L$  y  $V_H$  seleccionadas entre los siguientes pares de secuencias de  $V_L/V_H$ : SEC ID N° 170 y 172; SEC ID N° 242 y 244; SEC ID N° 246 y 248; y SEC ID N° 278 y 280.

En ciertas realizaciones de un anticuerpo anti-VEGF-A que se une a un epítipo que comprende (a) y (b) como anteriormente, el epítipo no comprende un aminoácido incluido dentro de una región polipeptídica de VEGF-A mostrada en los restos 90 a 132 de la SEC ID N° 2 (EGLECVPTESNITMQIMRIKPHQGQHIGEMSFLQHNKCECR P). Un anticuerpo anti-VEGF-A a modo de ejemplo de esta clase comprende dominios variables de cadena ligera y pesada que tienen las secuencias de aminoácidos mostradas en las SEC ID N° 246 y 248, respectivamente.

En otras realizaciones de un anticuerpo anti-VEGF-A que se une a un epítipo que comprende (a) y (b) como anteriormente, el epítipo comprende adicionalmente (c) uno o más aminoácidos incluidos dentro de una tercera región polipeptídica de VEGF-A mostrada en los restos 96-114 ó 106-114 de la SEC ID N° 2. Anticuerpos anti-VEGF-A a modo de ejemplo de esta clase incluyen anticuerpos que comprenden dominios variables de cadena ligera y pesada que tienen respectivas secuencias de aminoácidos de  $V_L$  y  $V_H$  seleccionadas entre los siguientes pares de secuencias de  $V_L/V_H$ : SEC ID N° 170 y 172; SEC ID N° 242 y 244; y SEC ID N° 278 y 280.

En algunas realizaciones de un anticuerpo anti-VEGF-A que se une a un epítipo que comprende (a), (b), y (c) como anteriormente, el anticuerpo no se une a VEGF-A humano y de ratón con valores de  $K_d$  dentro del factor 10 del otro. Anticuerpos anti-VEGF-A a modo de ejemplo de esta clase incluyen anticuerpos que comprenden dominios variables de cadena ligera y pesada que tienen respectivas secuencias de aminoácidos de  $V_L$  y  $V_H$  seleccionadas entre los siguientes pares de secuencias de  $V_L/V_H$ : SEC ID N° 242 y 244; y SEC ID N° 278 y 280.

En otras variaciones más de un anticuerpo anti-VEGF-A que se une a un epítipo que comprende (a) y (b) como anteriormente, el epítipo comprende adicionalmente (d) uno o más aminoácidos incluidos dentro de una cuarta región polipeptídica de VEGF-A mostrada en los restos 142-154 de la SEC ID N° 2. Anticuerpos anti-VEGF-A a modo de ejemplo de esta clase incluyen anticuerpos que comprenden dominios variables de cadena ligera y pesada que tienen respectivas secuencias de aminoácidos de  $V_L$  y  $V_H$  seleccionadas entre los siguientes pares de secuencias de  $V_L/V_H$ : SEC ID N° 242 y 244; y SEC ID N° 278 y 280.

En otras realizaciones relacionadas, un anticuerpo anti-VEGF-A descrito en el presente documento es capaz de unirse específicamente a un péptido inmovilizado derivado de VEGF-A correspondiente a una o más de las regiones polipeptídicas de VEGF-A especificadas anteriormente. Normalmente, el anticuerpo anti-VEGF-A es capaz de unirse a dicho péptido derivado de VEGF-A en que cualquier aminoácido correspondiente a un resto de cisteína en la SEC ID N° 2 está sustituido con serina. En algunas realizaciones, el péptido derivado de VEGF-A consta de 10, 11, 13, 15, 17, 20, ó 25 aminoácidos contiguos de la SEC ID N° 2, en el que cualquier aminoácido correspondiente a un resto de cisteína está sustituido con serina. En variaciones particulares, un anticuerpo anti-VEGF-A es capaz de unirse a un péptido derivado de VEGF-A que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada entre las siguientes: KFMDVYQRS (SEC ID N° 579), IFKPSSVPLMR (SEC ID N° 580), IMRIKPHQG (SEC ID N° 581), y GPSSERRKHLF (SEC ID N° 582). En algunas de estas variaciones, el péptido derivado de VEGF-A es un péptido que consta de una secuencia de aminoácidos seleccionada entre el grupo que consiste en HEVVKFMDVYQRS (SEC ID N° 544), VVKFMDVYQRSYS (SEC ID N° 545), KFMDVYQRSYSH (SEC ID N° 546), EYIFKPSSVPLMR (SEC ID N° 552), IFKPSSVPLMRSG (SEC ID N° 553), ITMQIMRIKPHQG (SEC ID N° 558), IMRIKPHQGQHIG (SEC ID N° 559), y PSGPSSERRKHLF (SEC ID N° 560).

En otras variaciones, un anticuerpo anti-VEGF-A es capaz de unirse a un péptido derivado de VEGF-Ha seleccionado entre los expuestos en la Tabla 33, *infra*.

En variaciones relacionadas, un anticuerpo anti-VEGF-A descrito en el presente documento es capaz de unirse a (a) un primer péptido inmovilizado derivado de VEGF-A que consta de 13 aminoácidos y que comprende la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEC ID N° 579; y (b) un segundo péptido inmovilizado derivado de VEGF-A que consta de 13 aminoácidos y que comprende la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEC ID N° 580.

5 Anticuerpos anti-VEGF-A a modo de ejemplo que tienen esta especificidad de epítipo incluyen anticuerpos que comprenden dominios variables de cadena ligera y pesada que tienen respectivas secuencias de aminoácidos de  $V_L$  y  $V_H$  seleccionadas entre los siguientes pares de secuencias de  $V_L/V_H$ : SEC ID N° 170 y 172; SEC ID N° 242 y 244; SEC ID N° 246 y 248; y SEC ID N° 278 y 280.

10 En ciertas realizaciones de un anticuerpo anti-VEGF-A que se une al primero y al segundo péptido como anteriormente, el anticuerpo anti-VEGF-A no se une a un péptido (por ejemplo, un péptido que consta de 13 aminoácidos) derivado de una región de VEGF-A incluida dentro de los restos aminoacídicos 90 a 132 de la SEC ID N° 2. Un anticuerpo anti-VEGF-A a modo de ejemplo de esta clase comprende dominios variables de cadena ligera y pesada que tienen las secuencias de aminoácidos mostradas en las SEC ID N° 246 y 248, respectivamente.

15 En otras realizaciones más de un anticuerpo anti-VEGF-A que se une al primero y al segundo péptido como anteriormente, el anticuerpo es adicionalmente capaz de unirse a un tercer péptido inmovilizado derivado de VEGF-A que consta de 13 aminoácidos y que comprende la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEC ID N° 581. En algunas de estas realizaciones, el anticuerpo no se une a VEGF-A humano y de ratón con valores de  $K_d$  dentro del factor 10 del otro. Anticuerpos anti-VEGF-A a modo de ejemplo de esta clase incluyen anticuerpos que comprenden dominios variables de cadena ligera y pesada que tienen respectivas secuencias de aminoácidos de  $V_L$  y  $V_H$  seleccionadas entre los siguientes pares de secuencias de  $V_L/V_H$ : SEC ID N° 242 y 244; y SEC ID N° 278 y 280.

20 En ciertas realizaciones, un anticuerpo anti-PDGFR $\beta$  o anti-VEGF-A es un fragmento de anticuerpo tal como, por ejemplo, un Fv, Fab, Fab', F(ab)<sub>2</sub>, F(ab')<sub>2</sub>, scFv, o diacuerpo. En algunas realizaciones preferidas, un anticuerpo anti-PDGFR $\beta$  o anti-VEGF-A es un scFv. Las entidades scFv que se unen a PDGFR $\beta$  o VEGF-A pueden estar orientadas con la región ligera variable ( $V_L$ ) de forma amino terminal a la región pesada variable ( $V_H$ ) o de forma carboxilo terminal a la misma. En algunas variaciones, un scFv anti-PDGFR $\beta$  tiene las CDR de un anticuerpo anti-PDGFR $\beta$  enumerado en la Tabla 2 y/o un scFv anti-VEGF-A tiene las CDR de un anticuerpo anti-VEGF-A enumerado en la Tabla 4. En variaciones particulares, un scFv anti-PDGFR $\beta$  tiene los dominios  $V_L$  y  $V_H$  de un anticuerpo anti-PDGFR $\beta$  enumerado en la Tabla 2 y/o un scFv anti-VEGF-A tiene los dominios  $V_L$  y  $V_H$  de un anticuerpo anti-VEGF-A enumerado en la Tabla 4. En ciertas realizaciones, las CDR o los dominios  $V_L$  y  $V_H$  de un scFv anti-PDGFR $\beta$  son los de un anticuerpo anti-PDGFR $\beta$  seleccionado entre c597, c600, c941, c949, c975, c1035, y c613. En otras realizaciones, las CDR o los dominios  $V_L$  y  $V_H$  de un scFv anti-VEGF-A son los de un anticuerpo anti-VEGF-Ha seleccionado entre c636, c868, c1039, c1092, c1111, c1135, c1270, c 1410, c1476, c1155, c752, c870, c1036, c1094, c1044, y c1257. En variaciones específicas de un scFv anti-VEGF-A, el scFv comprende una secuencia de aminoácidos expuesta en la SEC ID N° 498 (scFv c1111.1; secuencia de nucleótidos mostrada en la SEC ID N° 497); SEC ID N° 500 (scFv c870.1; secuencia de nucleótidos mostrada en la SEC ID N° 499); SEC ID N° 502 (scFv c1092.1; secuencia de nucleótidos mostrada en la SEC ID N° 501); SEC ID N° 504 (scFv c1039.1; secuencia de nucleótidos mostrada en la SEC ID N° 503); SEC ID N° 506 (scFv c868.1; secuencia de nucleótidos mostrada en la SEC ID N° 505); o SEC ID N° 508 (scFv c1081.1; secuencia de nucleótidos mostrada en la SEC ID N° 507). Además, los scFv pueden proporcionarse en cualquiera de diversos formatos de anticuerpo biespecífico tales como, por ejemplo, scFv en tándem (tascFv), bi-Fv de cadena sencilla (biscFv), y anticuerpo monoclonal completo con un Fv de cadena sencilla (scFv) fusionado al extremo carboxilo (biAb) (véase *infra*).

40 En ciertos aspectos, un anticuerpo anti-PDGFR $\beta$  o anti-VEGF-A descrito en el presente documento se proporciona como una composición de unión biespecífica. Como se usa en el presente documento, la expresión "composición de unión biespecífica" se refiere a una composición capaz de unirse específicamente a al menos dos moléculas diana diferentes mediante al menos dos entidades de unión que tienen diferentes especificidades de unión. Las entidades de unión pueden ser, por ejemplo, una proteína (por ejemplo, anticuerpo o receptor soluble) o molécula pequeña. Las entidades de unión de una composición de unión biespecífica pueden estar o no unidas físicamente.

45 En ciertas realizaciones, una composición de unión biespecífica descrita en el presente documento neutraliza tanto PDGFR $\beta$  como una actividad biológica de una segunda molécula diana y comprende un anticuerpo anti-PDGFR $\beta$  descrito en el presente documento. En otras realizaciones, una composición de unión biespecífica de la invención neutraliza tanto VEGF-A como una actividad biológica de una segunda molécula diana y comprende un anticuerpo anti-VEGF-A descrito en el presente documento. Composiciones de unión biespecíficas preferidas son aquellas capaces de neutralizar tanto PDGFR $\beta$  como VEGF-A. Por consiguiente, en variaciones particulares, una composición de unión biespecífica comprende un anticuerpo anti-PDGFR $\beta$  descrito en el presente documento y una segunda entidad de unión capaz de neutralizar la actividad de VEGF-A. En otras variaciones, una composición de unión biespecífica comprende un anticuerpo anti-VEGF-A descrito en el presente documento y una segunda entidad de unión capaz de neutralizar la actividad de PDGFR $\beta$ . Las composiciones de unión biespecíficas particularmente preferidas descritas en el presente documento comprenden tanto un anticuerpo anti-PDGFR $\beta$  descrito en el presente documento como un anticuerpo anti-VEGF-A descrito en el presente documento.

60

En ciertas realizaciones, se unen dos o más entidades diferentes de una composición de unión biespecífica mediante un enlazador para formar un multímero (por ejemplo, un dímero). Por ejemplo, en el caso de una composición de unión biespecífica que comprende una fusión de al menos dos componentes polipeptídicos (por ejemplo, un anticuerpo anti-PDGFR $\beta$  y otro componente polipeptídico; o un anticuerpo anti-VEGF-A y otro componente polipeptídico), puede emplearse una secuencia de enlazador peptídico para separar, por ejemplo, los componentes polipeptídicos por una distancia suficiente para asegurar que cada polipéptido se pliegue en sus estructuras secundaria y terciaria. Las proteínas de fusión pueden prepararse generalmente usando técnicas convencionales, incluyendo conjugación química. Las proteínas de fusión también pueden expresarse como proteínas recombinantes en un sistema de expresión por técnicas convencionales. Los enlazadores adecuados se describen adicionalmente en el presente documento, *infra*.

Un enlazador puede ser de origen natural, sintético, o una combinación de ambos. Por ejemplo, un enlazador sintético puede ser un enlazador aleatorizado, por ejemplo, tanto en secuencia como en tamaño. En un aspecto, el enlazador aleatorizado puede comprender una secuencia completamente aleatorizada, u opcionalmente, el enlazador aleatorizado puede estar basado en secuencias naturales de enlazador. El enlazador puede comprender, por ejemplo, un resto no polipeptídico (por ejemplo, un polinucleótido), un polipéptido, o similares.

Un enlazador puede ser rígido, o como alternativa, flexible, o una combinación de ambos. La flexibilidad del enlazador puede ser una función de la composición tanto del enlazador como de las subunidades con que el enlazador interacciona. El enlazador junta dos entidades de unión seleccionadas (por ejemplo, dos polipéptidos o proteínas diferentes, tales como dos anticuerpos diferentes) y mantiene las entidades independientes y separadas. El enlazador puede permitir que los dominios independientes y separados cooperen manteniendo aún sus propiedades separadas tales como múltiples sitios de unión diferentes para la misma diana en un multímero o, por ejemplo, múltiples sitios de unión diferentes para diferentes dianas en un multímero. En algunos casos, existe un puente disulfuro entre dos entidades de unión unidas o entre un enlazador y una entidad de unión.

La elección de un enlazador adecuado para un caso específico donde tienen que conectarse dos o más entidades de unión puede depender de diversos parámetros incluyendo, por ejemplo, la naturaleza de las entidades de unión, la estructura y naturaleza de la diana a la que debe unirse la composición biespecífica, y/o la estabilidad del enlazador (por ejemplo, enlazador peptídico) hacia la proteólisis y la oxidación.

Los enlazadores polipéptidos particularmente adecuados predominantemente incluyen restos aminoácidos seleccionados entre glicina (Gly), serina (Ser), alanina (Ala), y treonina (Thr). Por ejemplo, el enlazador peptídico puede contener al menos un 75 % (calculado basándose en la cantidad total de restos presentes en el enlazador peptídico), tal como al menos un 80 %, al menos un 85 %, o al menos un 90 % de los restos aminoácidos seleccionados entre Gly, Ser, Ala, y Thr. El enlazador peptídico también puede constar de restos Gly, Ser, Ala y/o Thr solamente. El polipéptido enlazador debe tener una longitud que sea adecuada para unir dos entidades de unión de tal modo que asuman la conformación correcta relativa una a la otra de modo que retengan la actividad deseada, tal como la unión a una molécula diana así como otras actividades que puedan estar asociadas con dicha unión a la diana (por ejemplo, actividad agonista o antagonista para una biomolécula dada).

Una longitud adecuada para este fin es, por ejemplo, una longitud de al menos uno y normalmente menos de aproximadamente 50 restos aminoácidos, tal como 2-25 restos aminoácidos, 5-20 restos aminoácidos, 5-15 restos aminoácidos, 8-12 restos aminoácidos u 11 restos. Otros tamaños adecuados de enlazador polipeptídico pueden incluir, por ejemplo, de aproximadamente 2 a aproximadamente 15 aminoácidos, de aproximadamente 3 a aproximadamente 15, de aproximadamente 4 a aproximadamente 12, aproximadamente 10, aproximadamente 8, o aproximadamente 6 aminoácidos. Los restos aminoácidos seleccionados para su inclusión en el enlazador polipéptido deben mostrar propiedades que no interfieran significativamente con la actividad o función del multímero polipeptídico. Por tanto, el enlazador peptídico debe, en conjunto, no mostrar una carga que fuera inconsistente con la actividad o función del multímero, o interfiriera con el plegamiento interno, o formara enlaces u otras interacciones con restos aminoácidos en uno o más de los dominios que impidieran seriamente la unión del multímero a la diana en cuestión.

El uso de enlazadores peptídicos de origen natural así como artificiales para conectar polipéptidos en nuevos polipéptidos de fusión unidos es bien conocido en la técnica. (Véase, por ejemplo, Hallewell y col., J. Biol. Chem. 264, 5260-5268, 1989; Alfthan y col., Protein Eng. 8, 725-731, 1995; Robinson y Sauer, Biochemistry 35, 109-116, 1996; Khandekar y col., J. Biol. Chem. 272, 32190-32197, 1997; Fares y col., Endocrinology 139, 2459-2464, 1998; Smallshaw y col., Protein Eng. 12, 623-630, 1999; patente de Estados Unidos Nº 5.856.456.)

Un ejemplo donde está extendido el uso de enlazadores peptídicos es para la producción de anticuerpos de cadena sencilla donde las regiones variables de una cadena ligera ( $V_L$ ) y una cadena pesada ( $V_H$ ) se unen a través de un enlazador artificial, y existe una gran cantidad de publicaciones dentro de este campo particular. Un enlazador peptídico ampliamente usado es un oligómero de 15 monómeros que consta de tres repeticiones de una secuencia de aminoácidos Gly-Gly-Gly-Ser ((Gly<sub>4</sub>Ser)<sub>3</sub>) (SEC ID Nº 539). Se han usado otros enlazadores, y se ha usado la tecnología de presentación en fagos, así como la tecnología de fagos infecciosos selectivos, para diversificar y seleccionar las secuencias apropiadas de enlazador (Tang y col., J. Biol. Chem. 271, 15682-15686, 1996; Hennecke y col., Protein Eng. 11, 405-410, 1998). Los enlazadores peptídicos se han usado para conectar cadenas

individuales en proteínas hetero- y homo-diméricas tales como el receptor de linfocitos T, el represor Cro de lambda, el represor Arc del fago P22, IL-12, TSH, FSH, IL-5, e interferón- $\gamma$ . Los enlazadores peptídicos también se han usado para crear polipéptidos de fusión. Se ha usado diversos enlazadores y, en el caso del represor Arc, se ha usado presentación en fagos para optimizar la longitud y composición del enlazador para una estabilidad aumentada de la proteína de cadena sencilla (véase Robinson y Sauer, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95, 5929-5934, 1998).

Otros modo más de obtener un enlazador adecuado es optimizando un enlazador simple (por ejemplo,  $(\text{Gly}_4\text{Ser})_n$ ) a través de mutagénesis aleatoria.

Como se ha analizado anteriormente, generalmente se prefiere que el enlazador peptídico posea al menos alguna flexibilidad. Por consiguiente, en algunas variaciones, el enlazador peptídico contiene 1-25 restos de glicina, 5-20 restos de glicina, 5-15 restos de glicina, o 8-12 restos de glicina. Los enlazadores peptídicos particularmente adecuados normalmente contienen al menos un 50 % de restos de glicina, tal como al menos un 75 % de restos de glicina. En algunas realizaciones, un enlazador peptídico comprende solamente restos de glicina.

En ciertas variaciones, el enlazador peptídico comprende otros restos en además de glicina. Los restos preferidos además de glicina incluyen Ser, Ala, y Thr, particularmente Ser. Un ejemplo de un enlazador peptídico específico incluye un enlazador peptídico que tiene la secuencia de aminoácidos  $\text{Gly}_x\text{-Xaa-Gly}_y\text{-Xaa-Gly}_z$  (SEC ID N° 540), en la que cada Xaa se selecciona independientemente entre alanina (Ala), valina (Val), leucina (Leu), isoleucina (Ile), metionina (Met), fenilalanina (Phe), triptófano (Trp), prolina (Pro), glicina (Gly), serina (Ser), treonina (Thr), cisteína (Cys), tirosina (Tyr), asparagina (Asn), glutamina (Gln), lisina (Lys), arginina (Arg), histidina (His), aspartato (Asp), y glutamato (Glu), y en la que x, y, y z son cada uno números enteros en el intervalo de 1-5. En algunas realizaciones, cada Xaa se selecciona independientemente entre el grupo que consiste en Ser, Ala, y Thr. En una variación específica, cada uno de x, y, y z es igual a 3 (produciendo de este modo un enlazador peptídico que tiene la secuencia de aminoácidos  $\text{Gly-Gly-Gly-Xaa-Gly-Gly-Gly-Xaa-Gly-Gly-Gly}$  (SEC ID N° 541), en la que cada Xaa se selecciona como anteriormente).

En algunos casos, puede ser deseable o necesario proporcionar alguna rigidez al enlazador peptídico. Esto puede conseguirse incluyendo restos de prolina en la secuencia de aminoácidos del enlazador peptídico. Por tanto, en otra realización, un enlazador peptídico comprende al menos un resto de prolina en la secuencia de aminoácidos del enlazador peptídico. Por ejemplo, un enlazador peptídico puede tener una secuencia de aminoácidos en la que al menos el 25 % (por ejemplo, al menos el 50 % o al menos el 75 %) de los restos aminoácidos son restos de prolina. En una realización particular, el enlazador peptídico comprende solamente restos de prolina.

En algunas realizaciones, un enlazador peptídico se modifica de tal modo que se introduzca un resto aminoacídico que comprende un grupo de unión para un resto no polipeptídico. Ejemplos de dichos restos aminoacídicos pueden ser un resto de cisteína o lisina (al que posteriormente se une el resto no polipeptídico). Otra alternativa es incluir una secuencia de aminoácidos que tenga un sitio de N-glucosilación *in vivo* (uniendo de este modo un resto de azúcar (*in vivo*) al enlazador peptídico). Una opción adicional es incorporar genéticamente aminoácidos no naturales usando ARNt y ARNt sintetasas desarrolladas (véase, por ejemplo, la publicación de solicitud de patente de Estados Unidos 2003/0082575) en una entidad de unión polipeptídica o enlazador peptídico. Por ejemplo, la inserción de ceto-tirosina permite el acoplamiento específico de sitio a un polipéptido expresado.

En ciertas variaciones, un enlazador peptídico comprende al menos un resto de cisteína, tal como un resto de cisteína. Por ejemplo, en algunas realizaciones, un enlazador peptídico comprende al menos un resto de cisteína y restos aminoacídicos seleccionados entre el grupo que consiste en Gly, Ser, Ala, y Thr. En algunas de estas realizaciones, un enlazador peptídico comprende restos de glicina y restos de cisteína, tales como restos de glicina y restos de cisteína solamente. Normalmente, se incluirá solamente un resto de cisteína por enlazador peptídico. Un ejemplo de un enlazador peptídico específico que comprende un resto de cisteína incluye un enlazador peptídico que tiene la secuencia de aminoácidos  $\text{Gly}_n\text{-Cys-Gly}_m$  (SEC ID N° 542), en la que n y m son cada uno números enteros de 1-12, por ejemplo, de 3-9, de 4-8, o de 4-7. En una variación específica, dicho enlazador peptídico tiene la secuencia de aminoácidos  $\text{GGGGG-C-GGGGG}$  (SEC ID N° 543).

Como se ha indicado anteriormente, en ciertas realizaciones, una composición de unión biespecífica comprende un anticuerpo anti-PDGFR $\beta$  y un anticuerpo anti-VEGF-A. En algunas de estas realizaciones, los anticuerpos anti-PDGFR $\beta$  y anti-VEGF-A se unen covalentemente (por ejemplo, mediante un enlazador peptídico) para formar un anticuerpo biespecífico. En algunas variaciones, el anticuerpo biespecífico comprende una región constante de cadena pesada de inmunoglobulina tal como, por ejemplo, un fragmento Fc. Fragmento Fc particularmente adecuados incluyen, por ejemplo, fragmentos Fc que comprenden una región Fc modificada para reducir o eliminar una o más funciones efectoras (por ejemplo, Fc5, que tiene la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEC ID N° 492).

Por ejemplo, la presente invención proporciona un anticuerpo biespecífico definido en las reivindicaciones que neutraliza tanto PDGFR $\beta$  como VEGF-A y comprende una región de unión a antígeno de un anticuerpo anti-PDGFR $\beta$  enumerado en las reivindicaciones y una región de unión a antígeno de un anticuerpo anti-VEGF-A enumerado en las reivindicaciones. En ciertas realizaciones, la memoria descriptiva describe un anticuerpo biespecífico que comprende una primera región de unión a antígeno que tiene CDR anti-PDGFR $\beta$  de la familia

consenso A enumerada en la Tabla 6 y una segunda región de unión a antígeno que tiene CDR anti-VEGF-A de la familia consenso B o C enumeradas en la Tabla 6. En realizaciones de la presente invención definidas en las reivindicaciones, un anticuerpo biespecífico comprende una primera región de unión a antígeno que tiene las CDR de un anticuerpo anti-PDGFR $\beta$  enumerado en la Tabla 2 y una segunda región de unión a antígeno que tiene las CDR de un anticuerpo anti-VEGF-A enumerado en la Tabla 4. En variaciones particulares de la presente invención definidas en las reivindicaciones, un anticuerpo biespecífico comprende una primera región de unión a antígeno que tiene los dominios V<sub>L</sub> y V<sub>H</sub> de un anticuerpo anti-PDGFR $\beta$  enumerado en la Tabla 2 y una segunda región de unión a antígeno que tiene los dominios V<sub>L</sub> y V<sub>H</sub> de un anticuerpo anti-VEGF-A enumerado en la Tabla 4. La memoria descriptiva describe las CDR o los dominios V<sub>L</sub> y V<sub>H</sub> de la primera región de unión a antígeno de un anticuerpo anti-PDGFR $\beta$  seleccionado entre c597, c600, c941, c949, c975, c1035, y c613; y las CDR o los dominios V<sub>L</sub> y V<sub>H</sub> de la segunda región de unión a antígeno de un anticuerpo anti-VEGF-Ha seleccionado entre c636, c868, c1039, c1092, c1111, c1135, c1270, c1410, c1476, c1155, c752, c870, c1036, c1094, c1044, y c1257. En ciertas realizaciones preferidas, un anticuerpo biespecífico de acuerdo con la presente invención es un Fv de cadena sencilla en tándem (tascFv), bi-Fv de cadena sencilla (biscFv), o un anticuerpo monoclonal completo con un Fv de cadena sencilla (scFv) fusionado al extremo carboxilo (biAb), como se define en las reivindicaciones.

Para la molécula tascFv, se construyen dos moléculas scFv de modo que un scFv esté amino terminal al otro en una configuración en tándem. Esto puede hacerse en cada orientación. Las moléculas scFv en tándem pueden prepararse con un enlazador entre las entidades scFv. En algunas realizaciones, el enlazador es un enlazador Gly-Ser que comprende una serie de restos de glicina y serina, y opcionalmente incluyendo aminoácidos adicionales. En otras realizaciones, el enlazador es una prolongación lambda, prolongación kappa, o una prolongación CH1, cada una de las cuales se obtiene de la secuencia nativa justo después de la región V en el Fab. El tascFv puede construirse adicionalmente como una proteína de fusión para que contenga un componente Fc ("tascFvFc"). En algunas de estas realizaciones, dicho fragmento Fc comprende una región Fc modificada para reducir o eliminar una o más funciones efectoras (por ejemplo, Fc5, que tiene la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEC ID N° 492).

La molécula biscFv no es una configuración en tándem. En su lugar, tiene un scFv en el extremo N terminal y otro en el extremo C terminal de un Fc ("biscFvFc"). Estas moléculas pueden prepararse con el scFv N terminal directamente fusionado a la bisagra Fc y con un enlazador corto o largo en el extremo C terminal conectando con el segundo scFv. Estos enlazadores normalmente son enlazadores Gly-Ser. En algunas realizaciones, el fragmento Fc comprende una región Fc modificada para reducir o eliminar una o más funciones efectoras (por ejemplo, Fc5, que tiene la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEC ID N° 492). En ciertas variaciones, un biscFv comprende un scFv anti-PDGFR $\beta$  N-terminal y un scFv anti-VEGF-A C-terminal. En variaciones particulares, el scFv anti-PDGFR $\beta$  comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada entre el grupo que consiste en las SEC ID N° 603 (scFv c941.1) y SEC ID N° 605 (scFv c1035.1); y el scFv anti-VEGF-A comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada entre el grupo que consiste en las SEC ID N° 608 (scFv c868.1), SEC ID N° 610 (scFv c870.1), y SEC ID N° 12 (scFv c1039.1). En algunas variaciones específicas, un biscFv descrito en el presente documento tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada entre el grupo que consiste en los restos 20-770 de la SEC ID N° 618 (biscFv c941.1-c868.1); los restos 20-768 de la SEC ID N° 620 (biscFv c941.1-c870.1); los restos 20-773 de la SEC ID N° 622 (biscFv c941.1-c1039.1); los restos 20-770 de la SEC ID N° 624 (biscFv c1035.1-c868.1); los restos 20-768 de la SEC ID N° 626 (biscFv c1035.1-c870.1). En una realización definida en las reivindicaciones, el biscFv tiene los restos aminoácidos 20-773 de la SEC ID N° 628 (biscFv c1035.1-c1039.1). Un biscFv puede incluir adicionalmente una secuencia señal de secreción tal como la mostrada, por ejemplo, en los restos 1-19 de la SEC ID N° 614, los restos 1-19 de la SEC ID N° 616, o los restos 1-19 de la SEC ID N° 618.

La molécula biAb tampoco es un formato en tándem. Comprende un anticuerpo monoclonal completo con un scFv fusionado al extremo C terminal de la cadena pesada. Estas moléculas pueden prepararse, por ejemplo, convirtiendo un scFv de nuevo en una cadena ligera (kappa o lambda) y una cadena pesada gamma con el segundo scFv conectado mediante un enlazador Gly-Ser corto o largo. Estas moléculas pueden prepararse con un anticuerpo monoclonal anti-PDGFR $\beta$  completo fusionado a un scFv anti-VEGF-A o, como alternativa, con un anticuerpo monoclonal anti-VEGF-A completo fusionado a un scFv anti-PDGFR $\beta$ . En algunas realizaciones particulares, un biAb comprende un anticuerpo monoclonal anti-PDGFR $\beta$  completo (IgG1) con el extremo C-terminal de la cadena pesada fusionado a un scFv anti-VEGF-A que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada entre el grupo que consiste en las SEC ID N° 498 (scFv c111.1), SEC ID N° 500 (scFv c870.1), SEC ID N° 502 (scFv c1092.1), SEC ID N° 504 (scFv c1039.1), SEC ID N° 506 (scFv c868.1), SEC ID N° 508 (scFv c1081.1), SEC ID N° 607 (scFv c868.1), SEC ID N° 609 (scFv c870.1), o SEC ID N° 611 (scFv c1039.1). En algunas de estas variaciones, el anticuerpo anti-PDGFR $\beta$  tiene los dominios V<sub>L</sub> y V<sub>H</sub> del anticuerpo anti-PDGFR $\beta$  c597 (SEC ID N° 6 y 8, respectivamente). En algunas variaciones específicas, un biAb comprende un primer polipéptido que tiene la secuencia de aminoácidos mostrada en los restos 20-239 de la SEC ID N° 537 o SEC ID N° 614 (cadena ligera c597.1 o c600.1) y un segundo polipéptido que tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada entre el grupo que consiste en los restos 20-734 de la SEC ID N° 512 (cadena pesada de IgG 1 c597.1 con fusión C-terminal a scFv c1111.1); los restos 20-727 de la SEC ID N° 514 (cadena pesada de IgG1 c597.1 con fusión C-terminal a scFv c870.1); los restos 20-733 de la SEC ID N° 516 (cadena pesada de IgG1 c597.1 con fusión C-terminal a scFv c1092.1); los restos 20-733 de la SEC ID N° 518 (cadena pesada de IgG1 c597.1 con fusión C-terminal a scFv c1039.1); los restos 20-730 de la SEC ID N° 20 (cadena pesada de IgG1 c597.1 con fusión C-terminal a scFv c868.1); los restos 20-731 de la SEC ID N° 22 (cadena pesada de IgG1 c597.1 con fusión C-terminal a scFv c1081.1); los restos 20-729 de la SEC ID N° 630 (cadena



pesada de IgG1.1 c597.1 con fusión C-terminal a scFv c868.1); los restos 20-727 de la SEC ID N° 632 (cadena pesada de IgG1.1 c597.1 con fusión C-terminal a scFv c870.1); los restos 20-732 de la SEC ID N° 634 (cadena pesada de IgG1.1 c597.1 con fusión C-terminal a scFv c1039.1); los restos 20-729 de la SEC ID N° 636 (cadena pesada de IgG1.1 c600.1 con fusión C-terminal a scFv c868.1); los restos 20-727 de la SEC ID N° 638 (cadena pesada de IgG1.1 c600.1 con fusión C-terminal a scFv c870.1); y los restos 20-732 de la SEC ID N° 640 (cadena pesada de IgG1.1 c600.1 con fusión C-terminal a scFv c1039.1). Un primer y/o segundo polipéptido de biAb como los anteriores pueden incluir adicionalmente una secuencia señal de secreción tal como se muestra, por ejemplo, en los restos 1-19 de la SEC ID N° 614, los restos 1-19 de la SEC ID N° 616, o los restos 1-19 de la SEC ID N° 618.

### III. Ácidos nucleicos, células huésped, y procedimientos para producir anticuerpos

La invención también incluye ácidos nucleicos que codifican la cadena pesada y/o cadena ligera de los anticuerpos de la invención, definidos en las reivindicaciones. Los ácidos nucleicos de la invención incluyen ácidos nucleicos que tienen una región que es sustancialmente idéntica a un polinucleótido que codifica  $V_L$  y/o  $V_H$  enumerado en la Tabla 2 ó 4, *supra* (como se define en las reivindicaciones). Un ácido nucleico definido en el presente documento puede tener al menos un 80 %, normalmente al menos aproximadamente un 90 %, y más normalmente al menos aproximadamente un 95 % o al menos aproximadamente un 98 % de identidad con un polinucleótido que codifica  $V_L$  y/o  $V_H$  enumerado en la Tabla 2 ó 4. Los ácidos nucleicos descritos en el presente documento también incluyen ácidos nucleicos complementarios. En algunos casos, las secuencias serán completamente complementarias (sin desapareamientos) cuando se alinean. En otros casos, pueden estar hasta aproximadamente un 20 % desapareadas en las secuencias. En algunas realizaciones de la invención se proporcionan ácidos nucleicos que codifican tanto una cadena pesada como una cadena ligera de un anticuerpo de la invención, como se define en las reivindicaciones. Las secuencias de ácido nucleico proporcionadas en el presente documento pueden explotarse usando técnicas de optimización de codones, secuencia degenerada, mutaciones silenciosas, y otras técnicas de ADN para optimizar la expresión en un huésped particular, y la presente invención abarca dichas modificaciones de secuencia.

Por tanto, en algunos aspectos, la memoria descriptiva describe uno o más polinucleótidos (por ejemplo, ADN o ARN) que codifican un anticuerpo anti-PDGFR $\beta$  y/o anti-VEGF-A. En algunas realizaciones, un polinucleótido de la presente invención codifica un anticuerpo anti-PDGFR $\beta$  tal como, por ejemplo, un scFv anti-PDGFR $\beta$ . En otras realizaciones, un polinucleótido codifica un anticuerpo anti-VEGF-A tal como, por ejemplo, un scFv anti-VEGF-A. En algunas variaciones, un polinucleótido de la presente invención (definido en las reivindicaciones) codifica un anticuerpo biespecífico que se une a y neutraliza tanto PDGFR $\beta$  como VEGF-A. En variaciones particulares, el anticuerpo biespecífico codificado es un tascFv, bscFv, o biAb. Los especialistas en la técnica apreciarán fácilmente que, en vista de la degeneración del código genético, es posible una variación considerable de secuencia entre estas moléculas polinucleotídicas.

Las moléculas polinucleotídicas que comprende una secuencia polinucleotídica proporcionada en el presente documento se propagan colocando la molécula en un vector. Se usan vectores virales y no virales, incluyendo plásmidos. La elección del plásmido dependerá del tipo de célula en que se desea la propagación y el propósito de la propagación. Ciertos vectores son útiles para amplificar y preparar grandes cantidades de la secuencia de ADN deseada. Otros vectores son adecuados para su expresión en células en cultivo. Otros vectores más son adecuados para su transferencia y expresión en células en un animal completo o persona. La elección del vector apropiado pertenece a las habilidades de la técnica. Muchos de estos vectores están disponibles en el mercado. El polinucleótido de longitud parcial o completa se inserta en un vector normalmente mediante unión por ADN ligasa a un sitio de enzimas de restricción escindido en el vector. Como alternativa, la secuencia deseada de nucleótidos puede insertarse por recombinación homóloga *in vivo*. Normalmente esto se consigue uniendo regiones de homología al vector en los flancos de la secuencia deseada de nucleótidos. Se añaden regiones de homología por ligamiento de oligonucleótidos, o por reacción en cadena de la polimerasa usando cebadores que comprenden tanto la región de homología como una parte de la secuencia deseada de nucleótidos, por ejemplo.

Para la expresión, puede emplearse un casete o sistema de expresión. Para expresar un ácido nucleico que codifica un polipéptido desvelado en el presente documento, se introduce una molécula de ácido nucleico que codifica el polipéptido, unida de forma funcional a secuencias reguladoras que controlan la expresión transcripcional en un vector de expresión, en una célula huésped. Además de secuencias reguladoras de la transcripción, tales como promotores y potenciadores, los vectores de expresión pueden incluir secuencias reguladoras de la traducción y un gen marcador que es adecuado para la selección de células que portan el vector de expresión. El producto génico codificado por un polinucleótido de la invención se expresa en cualquier sistema de expresión conveniente incluyendo, por ejemplo, sistemas bacterianos, de levadura, de insecto, de anfibio y de mamífero. Los vectores y células huésped adecuados se describen, por ejemplo, en la patente de Estados Unidos N° 5.654.173. En el vector de expresión, el polinucleótido que codifica el polipéptido está unido a secuencias reguladoras apropiadas para obtener las propiedades deseadas de expresión. Estas pueden incluir promotores, potenciadores, terminadores, operadores, represores, y inductores. Los promotores pueden regularse (por ejemplo, el promotor del vector pIND inducible por esteroides (Invitrogen)) o ser constitutivos (por ejemplo, promotores de CMV, SV40, factor de elongación, o secuencias LTR). En algunas situaciones, puede ser deseable usar promotores condicionalmente activos, tales como promotores específicos de tejido o específicos de la fase del desarrollo. Estos se unen a la secuencia deseada de nucleótidos usando las técnicas descritas anteriormente para su unión a vectores. Puede

usarse cualquier técnica conocida en la técnica. Por consiguiente, el vector de expresión generalmente proporcionará una región de inicio de la transcripción y la traducción, que puede ser inducible o constitutiva, donde la región codificante está unida de forma funcional bajo el control transcripcional de la región de inicio de la transcripción, y una región de terminación de la transcripción y la traducción.

- 5 Puede introducirse un casete de expresión ("unidad de expresión") en diversos vectores, por ejemplo, plásmidos, BAC, YAC, bacteriófagos tales como lambda, P1, M13, etc., vectores virales de plantas o animales (por ejemplo, vectores basados en retrovirus, vectores de adenovirus), y similares, donde los vectores normalmente se caracterizan por la capacidad de proporcionar selección de células que comprenden los vectores de expresión. Los vectores pueden proporcionar mantenimiento extracromosómico, particularmente en forma de plásmidos o virus, o
- 10 integración en el cromosoma del huésped. Cuando se desea mantenimiento extracromosómico, se proporciona una secuencia de origen para la replicación del plásmido, que puede ser de bajo o alto número de copias. Está disponible una amplia diversidad de marcadores para la selección, particularmente aquellos que protegen contra toxinas, más particularmente contra antibióticos. El marcador particular que se elige se selecciona de acuerdo con la naturaleza del huésped, donde en algunos casos, puede emplearse complementación con huéspedes auxotróficos.
- 15 La introducción de la construcción de ADN puede usar cualquier procedimiento conveniente incluyendo, por ejemplo, conjugación, transformación bacteriana, ADN precipitado con calcio, electroporación, fusión, transfección, infección con vectores virales, biolística, y similares.

- Por consiguiente, las proteínas para su uso dentro de la presente invención pueden producirse en células huésped modificadas por ingeniería genética de acuerdo con técnicas convencionales. Las células huésped adecuadas son
- 20 aquellos tipos celulares que pueden transformarse o transfectarse con ADN exógeno y cultivarse en cultivo, e incluyen bacterias, células fúngicas, y células eucariotas superiores cultivadas (incluyendo células cultivadas de organismos multicelulares), particularmente células de mamífero cultivadas. Se desvelan técnicas para manipular moléculas de ADN clonadas e introducir ADN exógeno en diversas células huésped por Sambrook y col., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (2ª ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 1989), y Ausubel y col., *supra*.
- 25

- Por ejemplo, para la expresión recombinante de un anticuerpo anti-VEGF-A y/o anti-PDGFR $\beta$ , un vector de expresión puede codificar una cadena pesada y/o ligera del mismo, o un dominio variable de cadena pesada y/o ligera, unido de forma funcional a un promotor. Un vector de expresión puede incluir, por ejemplo, la secuencia de nucleótidos que codifica la región o regiones constantes de la molécula de anticuerpo (véase, por ejemplo, la
- 30 publicación PCT WO 86/05807; la publicación PCT WO 89/01036; y la patente de Estados Unidos Nº 5.122.464), y el dominio o dominios variables del anticuerpo pueden clonarse en dicho vector para la expresión de la cadena pesada y/o ligera completa. El vector de expresión se transfiere a una célula huésped mediante técnicas convencionales, y las células transfectadas después se cultivan por técnicas convencionales para producir el anticuerpo anti-VEGF-A y/o anti-PDGFR $\beta$ . En ciertas realizaciones para la expresión de anticuerpos de doble
- 35 cadena, las cadenas pesada y ligera se co-expresan a partir de vectores diferentes en la célula huésped para la expresión de la molécula de inmunoglobulina completa. En otras realizaciones para la expresión de anticuerpos de doble cadena, las cadenas pesada y ligera se co-expresan a partir de unidades de expresión diferentes en el mismo vector en la célula huésped para la expresión de la molécula de inmunoglobulina completa.

- En ciertas variaciones, se expresa un anticuerpo biespecífico contra VEGF-A y también contra PDGFR $\beta$ . En algunas
- 40 de estas variaciones, donde los sitios de unión a antígeno tanto para un anticuerpo anti-VEGF-A como un anticuerpo anti-PDGFR $\beta$  están presentes en una única cadena polipeptídica (tal como, por ejemplo, en el caso de un tascFv o biscFv), un vector de expresión incluye una unidad de expresión que comprende un promotor de la transcripción, un segmento de ácido nucleico que codifica la cadena polipeptídica, y un terminador de la transcripción, tofos en configuración funcional. En realizaciones específicas para la expresión de un biscFv, el polipéptido codificado por el
- 45 segmento de ácido nucleico comprende un aminoácido seleccionado entre el grupo que consiste en los restos 20-770 de la SEC ID Nº 618 (biscFv c941.1-c868.1); los restos 20-768 de la SEC ID Nº 620 (biscFv c941.1-c870.1); los restos 20-773 de la SEC ID Nº 622 (biscFv c941.1-c1039.1); los restos 20-770 de la SEC ID Nº 624 (biscFv c1035.1-c868.1); los restos 20-768 de la SEC ID Nº 626 (biscFv c1035.1-c870.1); y los restos 20-773 de la SEC ID Nº 628 (biscFv c1035.1-c1039.1).

- En otras variaciones, donde el anticuerpo biespecífico incluye al menos dos cadenas polipeptídicas diferentes para
- 50 formar una molécula que tiene sitios de unión a antígeno tanto anti-VEGF-A como anti-PDGFR $\beta$  (tal como, por ejemplo, en el caso de un biAb), pueden usarse unidades de expresión diferentes, cada una capaz de expresar una de las cadenas polipeptídicas. Para la co-expresión dentro de una célula huésped, dichas unidades de expresión diferentes pueden estar presentes en vectores de expresión diferentes o, como alternativa, un único vector. Por
- 55 ejemplo, en algunas realizaciones para la expresión de un biAb que comprende (i) una cadena ligera de inmunoglobulina y (ii) una cadena pesada y de inmunoglobulina con un scFv fusionado en el extremo carboxilo (fusión IgG-scFv), un vector de expresión incluye una primera y segunda unidades de expresión, en el que la primera unidad de expresión comprende, en combinación funcional, un primer promotor de la transcripción, un primer segmento de ADN que codifica la cadena ligera de inmunoglobulina, y un primer terminador de la
- 60 transcripción; y en el que la segunda unidad de expresión comprende, en combinación funcional, un segundo promotor de la transcripción, un segundo segmento de ADN que codifica la fusión IgG-scFv, y un segundo

terminador de la transcripción. En algunas realizaciones alternativas para la expresión de un biAb como el anterior, la primera y segunda unidades de expresión están presentes en vectores de expresión diferentes. Los segmentos de ADN que codifican la cadena ligera de inmunoglobulina y la fusión IgG-scFv, ya sea en el mismo vector o vectores diferentes, pueden co-expresarse dentro de una célula huésped para producir el biAb. En algunas realizaciones específicas para la expresión de un biAb, el primer segmento de ADN codifica una cadena ligera de inmunoglobulina que comprende la secuencia de aminoácidos mostrada en los restos 20-239 de la SEC ID N° 537, y el segundo segmento de ADN codifica una fusión IgG-scFv que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada entre el grupo que consiste en los restos aminoácidos 20-729 de la SEC ID N° 630, los restos aminoácidos 20-732 de la SEC ID N° 634, los restos aminoácidos 20-729 de la SEC ID N° 636, y los restos aminoácidos 20-732 de la SEC ID N° 640. En otras realizaciones específicas para la expresión de un biAb, el primer segmento de ADN codifica una cadena ligera de inmunoglobulina que comprende la secuencia de aminoácidos mostrada en los restos 20-239 de la SEC ID N° 537, y el segundo segmento de ADN codifica una fusión IgG-scFv que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada entre el grupo que consiste en los restos aminoácidos 20-727 de la SEC ID N° 632 y los restos aminoácidos 20-727 de la SEC ID N° 638.

Para dirigir una proteína recombinante en la vía de secreción de una célula huésped, se proporciona una secuencia señal de secreción (también conocida como secuencia líder, secuencia prepro o secuencia pre) en el vector de expresión. La secuencia señal de secreción puede ser la de la forma nativa de la proteína recombinante, o puede obtenerse de otra proteína secretada (por ejemplo, t-PA; véase la patente de Estados Unidos N° 5.641.655) o puede sintetizarse *de novo*. La secuencia señal de secreción se une de forma funcional a la secuencia de ADN que codifica la proteína, es decir, las dos secuencias se unen en la fase de lectura correcta y se posicionan para que dirijan al polipéptido recién sintetizado a la vía de secreción de la célula huésped. Las secuencias señal de secreción se posicionan habitualmente 5' a la secuencia de ADN que codifica el polipéptido de interés, aunque pueden posicionarse ciertas secuencias señal en otra parte en la secuencia de ADN de interés (véase, por ejemplo, Welch y col., patente de Estados Unidos N° 5.037.743; Holland y col., patente de Estados Unidos N° 5.143.830). En variaciones particulares, una secuencia señal de secreción para su uso como se describe en el presente documento tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada entre el grupo que consiste en los restos 1-19 de la SEC ID N° 614, los restos 1-19 de la SEC ID N° 616, y los restos 1-19 de la SEC ID N° 618; secuencias de nucleótidos a modo de ejemplo que codifican estas secuencias de aminoácidos se muestran, respectivamente, en los restos 1-57 de la SEC ID N° 613, los restos 1-57 de la SEC ID N° 615, y los restos 1-57 de la SEC ID N° 617.

Las células de mamífero cultivadas son huéspedes adecuados para la producción de proteínas recombinantes para su uso dentro de la presente invención. Los procedimientos para introducir ADN exógeno en células huésped de mamífero incluyen transfección mediada por fosfato de calcio (Wigler y col., Cell 14:725, 1978; Corsaro y Pearson, Somatic Cell Genetics 7:603, 1981; Graham y Van der Eb, Virology 52:456, 1973), electroporación (Neumann y col., EMBO J. 1:841-845, 1982), transfección mediada por DEAE-dextrano (Ausubel *et al.*, *supra*), y transfección mediada por liposoma (Hawley-Nelson y col., Focus 15:73, 1993; Ciccarone y col., Focus 15:80, 1993). La producción de polipéptidos recombinantes en células de mamífero cultivadas se desvela por, por ejemplo, Levinson y col., patente de Estados Unidos N° 4.713.339; Hagen y col., patente de Estados Unidos N° 4.784.950; Palmiter y col., patente de Estados Unidos N° 4.579.821; y Ringold, patente de Estados Unidos N° 4.656.134. Ejemplos de células huésped de mamífero adecuadas incluyen células renales de mono verde africano (Vero; ATCC CRL 1587), células renales embrionarias humanas (293-HEK; ATCC CRL 1573), células renales de cría de hámster (BHK-21, BHK-570; ATCC CRL 8544, ATCC CRL 10314), células renales caninas (MDCK; ATCC CCL 34), células de ovario de hámster chino (CHO-K1; ATCC CCL61; CHO DG44; CHO DXB11 (Hyclone, Logan, UT); véase también, por ejemplo, Chasin y col., Som. Cell. Molec. Genet. 12:555, 1986), células de pituitaria de rata (GH1; ATCC CCL82), células HeLa S3 (ATCC CCL2.2), células de hepatoma de rata (H-4-II-E; ATCC CRL 1548), células renales de mono transformadas con SV40 (COS-1; ATCC CRL 1650) y células embrionarias murinas (NIH-3T3; ATCC CRL 1658). Se conocen en la técnica líneas celulares adicionales y están disponibles en depósitos públicos tales como la American Type Culture Collection, Manassas, Virginia. Pueden usarse promotores de la transcripción potentes, tales como promotores de SV-40 o citomegalovirus. Véase, por ejemplo, la patente de Estados Unidos N° 4.956.288. Otros promotores adecuados incluyen aquellos de genes de metalotioneína (patentes de Estados Unidos N° 4.579.821 y 4.601.978) y el promotor tardío principal de adenovirus.

Generalmente se usa selección con fármacos para seleccionar células de mamífero cultivadas en que se ha insertado ADN foráneo. Dichas células habitualmente se mencionan como "transfectantes". Las células que se han cultivado en presencia del agente selectivo y son capaces de pasar el gen de interés a su descendencia se mencionan como "transfectantes estables". Los marcadores de selección a modo de ejemplo incluyen un gen que codifica resistencia al antibiótico neomicina, que permite realizar la selección en presencia de un fármaco tipo neomicina, tal como G-418 o similar; el gen gpt para la xantina-guanina fosforribosil transferasa, que permite que la célula huésped crezca en presencia de ácido micofenólico/xantina; y marcadores que proporcionan resistencia a zeocina, bleomicina, blastomicina, e higromicina (véase, por ejemplo, Gatignol y col., Mol. Gen. Genet. 207:342, 1987; Drocourt y col., Nucl. Acids Res. 18:4009, 1990). También pueden usarse sistemas de selección para aumentar el nivel de expresión del gen de interés, un proceso mencionado como "amplificación". La amplificación se realiza cultivando transfectantes en presencia de un bajo nivel del agente selectivo y después aumentando la cantidad de agente selectivo para seleccionar células que producen elevados niveles de los productos de los genes introducidos. Un marcador de selección amplificable a modo de ejemplo es dihidrofolato reductasa, que confiere

resistencia a metotrexato. También pueden usarse otros genes de resistencia a fármacos (por ejemplo, resistencia a higromicina, resistencia a múltiples fármacos, puromicina acetiltransferasa).

También pueden usarse como huéspedes otras células eucariotas superiores, incluyendo células de insecto, células vegetales y células aviares. El uso de *Agrobacterium rhizogenes* como vector para expresar genes en células vegetales se ha revisado por Sinkar y col., J. Biosci. (Bangalore) 11:47-58, 1987. La transformación de células de insecto y la producción de polipéptidos foráneos en las mismas se desvela por Guarino y col., patente de Estados Unidos N° 5.162.222 y publicación WIPO WO 94/06463.

Las células de insecto pueden infectarse con baculovirus recombinante, habitualmente obtenido del virus de la polihedrosis nuclear de *Autographa californica* (AcNPV). Véase King y Possee, The Baculovirus Expression System: A Laboratory Guide (Chapman y Hall, Londres); O'Reilly y col., Baculovirus Expression Vectors: A Laboratory Manual (Oxford University Press., Nueva York 1994); y Baculovirus Expression Protocols. Methods in Molecular Biology (Richardson ed., Humana Press, Totowa, NJ, 1995). El baculovirus recombinante también puede producirse a través del uso de un sistema basado en transposón descrito por Luckow y col. (J. Virol. 67:4566-4579, 1993). Este sistema, que usa vectores de transferencia, está disponible en el mercado en forma de kit (kit BAC-TO-BAC; Life Technologies, Gaithersburg, MD). El vector de transferencia (por ejemplo, PFASTBAC1; Life Technologies) contiene un transposón Tn7 para mover el ADN que codifica la proteína de interés en un genoma de baculovirus mantenido en *E. coli* como un plásmido grande llamado "bácmido". Véase Hill-Perkins y Possee, J. Gen. Virol. 71:971-976, 1990; Bonning y col., J. Gen. Virol. 75:1551-1556, 1994; y Chazenbalk y Rapoport, J. Biol. Chem. 270:1543-1549, 1995. Además, los vectores de transferencia pueden incluir una fusión en fase con ADN que codifica una extensión polipeptídica o marcada de afinidad como se ha desvelado anteriormente. Usando técnicas conocidas en la técnica, se introduce por transformación un vector de transferencia que contiene una secuencia de ADN que codifica proteína en células huésped *E. coli*, y las células se exploran para bácmidos que contenga un gen lacZ interrumpido indicativo de baculovirus recombinante. El ADN del bácmido que contiene el genoma de baculovirus recombinante se aísla, usando técnicas habituales, y se usa para transfectar células de *Spodoptera frugiperda*, tales como células Sf9. El virus recombinante que expresa la proteína de interés se produce posteriormente. Las reservas de virus recombinante se preparan por procedimientos habitualmente usados en la técnica.

Para la producción de proteínas, se usa el virus recombinante para infectar células huésped, normalmente una línea celular obtenida del cogollero del maíz, *Spodoptera frugiperda* (por ejemplo, células Sf9 o Sf21) o *Trichoplusia ni* (por ejemplo, células HIGH FIVE; Invitrogen, Carlsbad, CA). Véase en líneas generales Glick y Pasternak, Molecular Biotechnology, Principles & Applications of Recombinant DNA (ASM Press, Washington, D.C., 1994). Véase también la patente de Estados Unidos N° 5.300.435. Se usa medio sin suero para cultivar y mantener las células. Las formulaciones adecuadas de medio son conocidas en la técnica y pueden obtenerse de proveedores comerciales. Las células se cultivan desde una densidad de inoculación de aproximadamente  $2.5 \times 10^5$  células hasta una densidad de  $1.2 \times 10^6$  células, momento en el cual se añade una reserva de virus recombinante a una multiplicidad de infección (MOI) de 0,1 a 10, más normalmente casi 3. Los procedimientos usados se describen en líneas generales en manuales de laboratorio disponibles (véase, por ejemplo, King y Possee, *supra*; O'Reilly y col., *supra*; Richardson, *supra*).

También pueden usarse células fúngicas, incluyendo células de levadura, dentro de la presente invención. Las especies de levadura de particular interés a este respecto incluyen *Saccharomyces cerevisiae*, *Pichia pastoris*, y *Pichia metanolica*. Los procedimientos para transformar células de *S. cerevisiae* con ADN exógeno y producir polipéptidos recombinantes a partir de las mismas se desvelan por, por ejemplo, Kawasaki, patente de Estados Unidos N° 4.599.311; Kawasaki y col., patente de Estados Unidos N° 4.931.373; Brake, patente de Estados Unidos N° 4.870.008; Welch y col., patente de Estados Unidos N° 5.037.743; y Murray y col., patente de Estados Unidos N° 4.845.075. Las células transformadas se seleccionan por fenotipo determinado por el marcador de selección, habitualmente resistencia a fármacos o la capacidad de crecer en ausencia de un nutriente particular (por ejemplo, leucina). Un sistema de vector a modo de ejemplo para su uso en *Saccharomyces cerevisiae* es el sistema de vector *POT1* desvelado por Kawasaki y col. (patente de Estados Unidos N° 4.931.373), que permite que células transformadas se seleccionen por crecimiento en medio que contiene glucosa. Los promotores y terminadores adecuados para su uso en levaduras incluyen aquellos de genes de enzimas glucolíticas (véase, por ejemplo, Kawasaki, patente de Estados Unidos N° 4.599.311; Kingsman y col., patente de Estados Unidos N° 4.615.974; y Bitter, patente de Estados Unidos N° 4.977.092) y genes de alcohol deshidrogenasa. Véanse también las patentes de Estados Unidos N° 4.990.446; 5.063.154; 5.139.936; y 4.661.454. Los sistemas de transformación para otras levaduras, incluyendo *Hansenula polymorpha*, *Schizosaccharomyces pombe*, *Kluyveromyces lactis*, *Kluyveromyces fragilis*, *Ustilago maydis*, *Pichia pastoris*, *Pichia metanolica*, *Pichia guilliermondii*, y *Candida maltosa* son conocidos en la técnica. Véase, por ejemplo, Gleeson y col., J. Gen. Microbiol. 132:3459-3465, 1986; Cregg, patente de Estados Unidos N° 4.882.279; y Raymond y col., Yeast 14:11-23, 1998. Pueden usarse células de *Aspergillus* de acuerdo con los procedimientos de McKnight y col., patente de Estados Unidos N° 4.935.349. Se desvelan procedimientos para transformar *Acremonium chrysogenum* por Sumino y col., patente de Estados Unidos N° 5.162.228. Se desvelan procedimientos para transformar *Neurospora* por Lambowitz, patente de Estados Unidos N° 4.486.533. La producción de proteínas recombinantes en *Pichia metanolica* se desvela en las patentes de Estados Unidos N° 5.716.808; 5.736.383; 5.854.039; y 5.888.768.

Células huésped procariotas, incluyendo cepas de las bacterias *Escherichia coli*, *Bacillus*, y otros géneros también son células huésped útiles dentro de la presente invención. Las técnicas para transformar estos huéspedes y expresar secuencias de ADN foráneo clonadas en los mismos son bien conocidas en la técnica (véase, por ejemplo, Sambrook y col., *supra*). Cuando se expresa una proteína recombinante en bacterias tales como *E. coli*, la proteína puede retenerse en el citoplasma, normalmente en forma de gránulos insolubles, o puede dirigirse al espacio periplásmico mediante una secuencia de secreción bacteriana. En el primer caso, las células se lisan, y los gránulos se recuperan y desnaturalizan usando, por ejemplo, isotiocianato de guanidina o urea. La proteína desnaturalizada después puede replegarse y dimerizarse diluyendo el agente desnaturalizante, tal como diálisis frente a una solución de urea y una combinación de glutatión reducido y oxidado, seguido de diálisis frente a una solución salina tamponada. Como alternativa, la proteína puede recuperarse del citoplasma en forma soluble y aislarse sin el uso de agentes desnaturalizantes. La proteína se recupera de la célula como un extracto acuoso en, por ejemplo, solución salina tamponada con fosfato. Para captura la proteína de interés, el extracto se aplica directamente a un medio cromatográfico, tal como un anticuerpo inmovilizado o columna de heparina-Sepharose. Las proteínas secretadas pueden recuperarse del espacio periplásmico en una forma soluble y funcional alterando las células (por, por ejemplo, sonicación o choque osmótico) para liberar los contenidos del espacio periplásmico y recuperando la proteína, obviando de este modo la necesidad de desnaturalización y replegamiento. Los anticuerpos, incluyendo anticuerpos de cadena sencilla, pueden producirse en células huésped bacterianas de acuerdo con procedimientos conocidos. Véase, por ejemplo, Bird y col., Science 242:423-426, 1988; Huston y col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:5879-5883, 1988; y Pantoliano y col., Biochem. 30:10117-10125, 1991.

Las células huésped transformadas o transfectadas se cultivan de acuerdo con procedimientos convencionales en un medio de cultivo que contiene nutrientes y otros componentes necesarios para el crecimiento de las células huésped elegidas. Se conoce en la técnica diversos medios adecuados, incluyendo medios definidos y medios complejos, y generalmente incluyen una fuente de carbono, una fuente de nitrógeno, aminoácidos esenciales, vitaminas y minerales. Los medios también pueden contener componentes tales como factores de crecimiento o suero, según sea necesario. El medio de cultivo generalmente seleccionará células que contienen el ADN añadido de forma exógena por, por ejemplo, selección con fármacos o deficiencia en un nutriente esencial que se complementa por el marcador de selección portado en el vector de expresión o co-transfectado en la célula huésped.

Las proteínas antagonistas de VEGF-A y PDGFR $\beta$  se purifican por procedimientos convencionales de purificación de proteínas, normalmente por una combinación de técnicas cromatográficas. Véase en líneas generales Affinity Chromatography: Principles & Methods (Pharmacia LKB Biotechnology, Uppsala, Suecia, 1988); Scopes, Protein Purification: Principles and Practice (Springer-Verlag, Nueva York 1994). Las proteínas que comprenden un polipéptido de cadena pesada de inmunoglobulina pueden purificarse por cromatografía de afinidad sobre proteína A inmovilizada. Pueden usarse etapas de purificación adicionales, tales como filtración en gel, para obtener el nivel deseado de pureza o para proporcionar desalación, intercambio de tampón, y similares.

Los anticuerpos pueden purificarse del medio de cultivo celular por procedimientos conocidos, tales como cromatografía de afinidad usando columnas convencionales y otros equipos. En un procedimiento típico, se recoge medio condicionado y puede almacenarse a 4 °C durante hasta cinco días. Para evitar la contaminación, generalmente se añade un agente bacteriostático (por ejemplo, azida sódica). El pH del medio se disminuye (normalmente hasta pH ~5,5), tal como mediante la adición de ácido acético glacial gota a gota. El inferior pH proporciona una captura óptima de IgG mediante una resina de proteína G. El tamaño de la columna de proteína G se determina basándose en el volumen del medio condicionado. La columna compactada se neutraliza con un tampón adecuado, tal como NaPO<sub>4</sub> 35 mM, NaCl 120 mM, pH 7,2. El medio después se pasa sobre la resina de proteína G neutralizada a un caudal determinado tanto por el volumen del medio como por el tamaño de la columna. El flujo continuo se retiene para posibles pasos adicionales sobre la columna. La resina con el anticuerpo capturado entonces se lava en el tampón de neutralización. La columna se eluye en fracciones usando un tampón ácido de elución, tal como glicina 0,1 M, pH 2,7 o equivalente. Cada fracción se neutraliza, tal como con tris 2 M, pH 8,0 a una proporción 1:20 de tris:glicina. Las fracciones que contienen proteína (por ejemplo, basándose en la A<sub>280</sub>) se combinan. A las fracciones combinadas se les intercambio el tampón por un tampón adecuado, tal como NaPO<sub>4</sub> 35 mM, NaCl 120 mM, pH 7,2 usando una columna de desalación. La concentración se determina por A<sub>280</sub> usando un coeficiente de extinción de 1,44. Los niveles de endotoxina pueden determinarse por ensayo LAL. La proteína purificada puede almacenarse congelada, normalmente a -80 °C.

#### IV. Usos para tratamiento

##### A. General

En otro aspecto, la presente memoria descriptiva describe la inhibición de la angiogénesis, particularmente para el tratamiento de enfermedades o trastornos asociados con la angiogénesis. Generalmente, dichos procedimientos incluyen administrar a un sujeto un antagonista de PDGFR $\beta$  y/o VEGF-A en una cantidad eficaz para inhibir la angiogénesis. Más particularmente, para uso terapéutico, el antagonista de PDGFR $\beta$  y/o VEGF-A se administra a un sujeto que padece, o en elevado riesgo de desarrollar, una enfermedad o trastorno caracterizado por angiogénesis aumentada (un "trastorno neovascular"). Los trastornos neovasculares susceptibles a tratamiento de acuerdo con la presente invención incluyen, por ejemplo, cánceres caracterizados por crecimiento de tumores sólidos (por ejemplo,

cáncer pancreático, carcinoma de células renales (RCC), cáncer colorrectal, cáncer pulmonar no microcítico (NSCLC), y tumor estromático gastrointestinal (GIST)) así como diversos trastornos oculares neovasculares (por ejemplo, degeneración macular relacionada con la edad, retinopatía diabética, neovascularización del iris, y glaucoma neovascular), como se indica en las reivindicaciones. Otros trastornos neovasculares susceptibles a tratamiento incluyen, por ejemplo, artritis reumatoide, psoriasis, aterosclerosis, inflamación crónica, inflamación pulmonar, preeclampsia, efusión pericárdica (tal como la asociada con pericarditis), y efusión pleural.

En ciertas realizaciones que comprenden el uso de un antagonista de PDGFR $\beta$ , el antagonista de PDGFR $\beta$  es un anticuerpo anti-PDGFR $\beta$  descrito en el presente documento. En algunas de estas variaciones, el anticuerpo anti-PDGFR $\beta$  se usa en combinación con un antagonista de VEGF-A tal como, por ejemplo, un anticuerpo neutralizante que se une específicamente a VEGF-A o a un receptor de VEGF-A.

En otras realizaciones que comprenden el uso de un antagonista de VEGF-A, el antagonista de VEGF-A es un anticuerpo anti-VEGF-A descrito en el presente documento. En algunas de estas variaciones, el anticuerpo anti-VEGF-A se usa en combinación con un antagonista de PDGFR $\beta$  tal como, por ejemplo, un anticuerpo neutralizante que se une específicamente a PDGFR $\beta$  o a un ligando PDGF (por ejemplo, PDGF-B o PDGF-D).

En variaciones preferidas, se usa un antagonista tanto de PDGFR $\beta$  como de VEGF-A. Es particularmente preferido el uso de un anticuerpo neutralizante anti-PDGFR $\beta$  descrito en el presente documento en combinación con un anticuerpo neutralizante anti-VEGF-A descrito en el presente documento.

En cada una de las realizaciones que comprenden el uso de un antagonista de PDGFR $\beta$  en combinación con un antagonista de VEGF-A, el antagonista de PDGFR $\beta$  y el antagonista de VEGF-A pueden administrarse de forma simultánea o separada (por ejemplo, en diferentes momentos y/o en sitios diferentes de administración). Por consiguiente, en ciertas variaciones que comprenden la administración simultánea de un antagonista de PDGFR $\beta$  y un antagonista de VEGF-A, el procedimiento incluye la administración de una composición de unión biespecífica que comprende (a) un anticuerpo que se une específicamente al dominio extracelular de PDGFR $\beta$  y neutraliza la actividad PDGFR $\beta$  y (b) un anticuerpo que se une específicamente a VEGF-A y neutraliza la actividad VEGF-A. En realizaciones particularmente preferidas, la administración del antagonista de PDGFR $\beta$  y el antagonista de VEGF-A comprende administrar un anticuerpo biespecífico que se une a y neutraliza tanto PDGFR $\beta$  como VEGF-A. En ciertas realizaciones que comprenden la administración separada de un antagonista de PDGFR $\beta$  y un antagonista de VEGF-A, el antagonista de PDGFR $\beta$  y el antagonista de VEGF-A se administran secuencialmente. En dichas realizaciones, la administración de cada agente puede ser mediante el mismo procedimiento o diferente.

En cada una de las realizaciones de los procedimientos de tratamiento descritos en el presente documento, el antagonista de PDGFR $\beta$  y/o VEGF-A se suministra de un modo coherente con las metodologías convencionales asociadas con el tratamiento de la enfermedad o trastorno para el cual se busca tratamiento. De acuerdo con la divulgación en el presente documento, se administra una cantidad eficaz de los antagonistas a un sujeto en necesidad de dicho tratamiento durante un tiempo y en condiciones suficientes para prevenir o tratar la enfermedad o trastorno.

Los sujetos para la administración de antagonistas descritos en el presente documento incluyen pacientes en elevado riesgo de desarrollar una enfermedad o trastorno particular asociado con angiogénesis así como pacientes que presentan un trastorno neovascular existente. En ciertas realizaciones, se ha diagnosticado que el sujeto tiene la enfermedad o trastorno para el cual se busca tratamiento. Además, los sujetos pueden controlarse durante el transcurso del tratamiento para cualquier cambio en la enfermedad o trastorno (por ejemplo, para un aumento o disminución en los síntomas clínicos de la enfermedad o trastorno). Además, en algunas variaciones, el sujeto no padece otra enfermedad o trastorno que requiera tratamiento que implique inhibir cualquiera de las vías PDGFR $\beta$  y VEGF-A o ambas.

En aplicaciones profilácticas, se administran composiciones farmacéuticas o medicamentos a un paciente susceptible a, o de otro modo en riesgo de, una enfermedad particular en una cantidad suficiente para eliminar o reducir el riesgo o retardar la aparición de la enfermedad. En aplicaciones terapéuticas, se administran composiciones o medicamentos a un paciente que se sospecha que padece, o que ya padece dicha enfermedad en una cantidad suficiente para curar, o al menos detener parcialmente, los síntomas de la enfermedad y sus complicaciones. Una cantidad adecuada para conseguir esto se menciona como una dosis o cantidad terapéutica o farmacéuticamente eficaz. En regímenes tanto profilácticos como terapéuticos, los agentes habitualmente se administran en varias dosis hasta que se ha conseguido una respuesta suficiente (por ejemplo, inhibición de actividad inapropiada de angiogénesis). Normalmente, la respuesta se controla y se dan dosis repetidas si la respuesta deseada comienza a desaparecer.

Para identificar paciente objeto para el tratamiento, pueden emplearse procedimientos de selección aceptados para determinar los factores de riesgo asociados con trastornos neovasculares específicos o para determinar el estado de un trastorno existente identificado en un sujeto. Dichos procedimientos pueden incluir, por ejemplo, determinar si un individuo tiene parientes a los que se ha diagnosticado una enfermedad particular. Los procedimientos de selección también pueden incluir, por ejemplo, intervenciones convencionales para determinar el estado familiar para una

enfermedad particular que se sabe que tiene un componente hereditario. Por ejemplo, también se sabe que diversos cánceres tienen ciertos componentes hereditarios. Los componentes hereditarios de los cánceres incluyen, por ejemplo, mutaciones en múltiples genes que son transformantes (por ejemplo, Ras, Raf, EGFR, cMet, y otros), la presencia o ausencia de ciertas moléculas HLA y receptores inhibidores de eliminación (KIR), o mecanismos mediante los cuales las células cancerosas son capaces de modular la supresión inmune de células como células NK y linfocitos T, directa o indirectamente (véase, por ejemplo, Ljunggren y Malmberg, *Nature Rev. Immunol.* 7:329-339, 2007; Boyton y Altmann, *Clin Exp. Immunol.* 149:1-8, 2007). Hacia este fin, pueden emplearse de forma rutinaria sondas nucleotídicas para identificar individuos que portan marcadores genéticos asociados con una enfermedad particular de interés. Además, se conoce una amplia diversidad de procedimientos inmunológicos en la técnica que son útiles para identificar marcadores para enfermedades específicas. Por ejemplo, están disponibles diversos procedimientos de inmunoensayo ELISA y son bien conocidos en la técnica, que emplean sondas de anticuerpo monoclonal para detectar antígenos asociados con tumores específicos. La selección puede implementarse según indique la sintomatología conocida del paciente, factores de edad, factores de riesgo relacionados, etc. Estos procedimientos permiten al médico seleccionar de forma rutinaria pacientes en necesidad de los procedimientos descritos en el presente documento para su tratamiento. De acuerdo con estos procedimientos, puede implementarse la inhibición de la angiogénesis según un programa de tratamiento independiente o como un régimen de seguimiento, auxiliar, o de tratamiento coordinado a otros tratamientos.

Para su administración, el antagonista de PDGFR $\beta$  y/o VEGF-A se formula como una composición farmacéutica. Una composición farmacéutica que comprende un antagonista de PDGFR $\beta$  y/o VEGF-A puede formularse de acuerdo con procedimientos conocidos para preparar composiciones farmacéuticamente útiles, mediante los cuales la molécula terapéutica se combina en una mezcla con un vehículo farmacéuticamente aceptable. Se dice que una composición es un "vehículo farmacéuticamente aceptable" si su administración puede tolerarse por un paciente destinatario. Solución salina tamponada con fosfato estéril es un ejemplo de un vehículo farmacéuticamente aceptable. Otros vehículos adecuados son bien conocidos para los especialistas en la técnica. (Véase, por ejemplo, Gennaro (ed.), *Remington's Pharmaceutical Sciences* (Mack Publishing Company, 19<sup>a</sup> ed. 1995).) Las formulaciones pueden incluir adicionalmente uno o más excipientes, conservantes, solubilizantes, agentes tamponantes, albúmina para evitar la pérdida de proteína sobre las superficies de los viales, etc. Los antagonistas monoespecíficos pueden formularse individualmente o proporcionarse en una formulación combinada.

Una composición farmacéutica que comprende un antagonista de PDGFR $\beta$  y/o VEGF-A se administra a un sujeto en una cantidad eficaz. Como se describe en el presente documento, un antagonista puede administrarse a sujetos mediante diversos modos de administración incluyendo, por ejemplo, por vía de administración intramuscular, subcutánea, intravenosa, intra-auricular, intra-articular, parenteral, intranasal, intrapulmonar, transdérmica, intrapleurar, intratecal, y oral. Para uso farmacéutico para el tratamiento de trastornos oculares neovasculares, los antagonistas de PDGFR $\beta$  y/o VEGF-A normalmente se formulan para inyección intravítrea de acuerdo con procedimientos convencionales. Con fines de prevención y tratamiento, un antagonista puede administrarse a un sujeto en un suministro de un único bolo, mediante suministro continuo (por ejemplo, suministro transdérmico continuo) durante un periodo prolongado de tiempo, o en un protocolo repetido de administración (por ejemplo, en una base horaria, diaria, o semanal).

Una "cantidad terapéuticamente eficaz" de una composición es esa cantidad que produce un efecto estadísticamente significativo, tal como una reducción estadísticamente significativa en la progresión de la enfermedad o una mejora estadísticamente significativa en la función del órgano. La dosis exacta la determinará el médico de acuerdo con normas aceptadas, teniendo en cuenta la naturaleza y gravedad de la afección a tratar, los rasgos del paciente, etc. La determinación de la dosis pertenece al nivel de habilidad habitual en la técnica.

La determinación de las dosis eficaces en este contexto se basa normalmente en estudios en modelos animales seguidos por ensayos clínicos en seres humanos y está guiada por la determinación de las dosis eficaces y protocolos de administración que reducen significativamente la aparición o gravedad de la enfermedad o trastorno objeto en sujetos modelo. Las dosis eficaces de las composiciones de la presente invención varían dependiendo de muchos factores diferentes, incluyendo el medio de administración, el sitio diana, el estado fisiológico del paciente, si el paciente es un ser humano o un animal, otras medicaciones administradas, si el tratamiento es profiláctico o terapéutico, así como la actividad específica de la propia composición y su capacidad para provocar la respuesta deseada en el individuo. Habitualmente, el paciente es un ser humano, pero en algunas enfermedades, el paciente puede ser un mamífero no humano. Normalmente, los regímenes de dosificación se ajustan para proporcionar una respuesta terapéutica óptima, es decir, para optimizar la seguridad y la eficacia. Por consiguiente, una cantidad terapéutica o profilácticamente eficaz también es una en que cualquier efecto colateral indeseado se supera por los efectos beneficiosos de inhibir la angiogénesis. Para la administración de un antagonista de PDGFR $\beta$  y/o VEGF-A, una dosificación normalmente varía de aproximadamente 0,1  $\mu$ g a 100 mg/kg o 1  $\mu$ g/kg a aproximadamente 50 mg/kg, y más habitualmente de 10  $\mu$ g a 5 mg/kg del peso corporal del sujeto. En realizaciones más específicas, una cantidad eficaz del agente es entre aproximadamente 1  $\mu$ g/kg y aproximadamente 20 mg/kg, entre aproximadamente 10  $\mu$ g/kg y aproximadamente 10 mg/kg, o entre aproximadamente 0,1 mg/kg y aproximadamente 5 mg/kg. Las dosis dentro de este intervalo pueden conseguirse por administraciones únicas o múltiples incluyendo, por ejemplo, múltiples administraciones por día o administraciones diarias, semanas, bi-semanales, o mensuales. Por ejemplo, en ciertas variaciones, un régimen consta de una administración inicial seguida de múltiples administraciones

posteriores a intervalos semanales o bi-semanales. Otro régimen consta de una administración inicial seguida de múltiples administraciones posteriores a intervalos mensuales o bi-mensuales. Como alternativa, las administraciones pueden ser en una base irregular indicada por el control de la actividad de células NK y/o los síntomas clínicos de la enfermedad o trastorno.

5 Las dosis de la composición farmacéutica puede variarse por el médico asistente para mantener una concentración deseada en un sitio diana. Por ejemplo, si se selecciona un modo intravenoso de suministro, la concentración local del agente en el torrente sanguíneo en el tejido diana puede ser entre aproximadamente 1-50 nanomoles de la composición por litro, a veces entre aproximadamente 1,0 nanomoles por litro y 10, 15, ó 25 nanomoles por litro dependiendo del estado del sujeto y la respuesta medida proyectada. Pueden seleccionarse concentraciones superiores o inferiores basándose en el modo de suministro, por ejemplo, suministro trans-epidérmico frente a suministro a una superficie mucosa. La dosis también debe ajustarse basándose en la tasa de liberación de la formulación administrada, por ejemplo, pulverización nasal frente a partículas en polvo, orales o inyectadas de liberación sostenida, formulaciones transdérmicas, *etc.* Para conseguir el mismo nivel de concentración en suero, por ejemplo, se administrarían partículas de liberación lenta con una tasa de liberación de 5 nanomolar (en condiciones convencionales) a aproximadamente dos veces la dosis de partículas con una tasa de liberación de 10 nanomolar.

Una composición farmacéutica que comprende un antagonista de PDGFR $\beta$  y/o VEGF-A puede facilitarse en forma líquida, en un aerosol, o en forma sólida. Las formas líquidas, se ilustran por soluciones inyectables, aerosoles, gotas, soluciones topológicas y suspensiones orales. Formas sólidas a modo de ejemplo incluyen cápsulas, comprimidos, y formas de liberación controlada. La última forma se ilustra por bombas miniosmóticas e implantes. (Véase, por ejemplo, Bremer y col., Pharm. Biotechnol. 10:239, 1997; Ranade, "Implants in Drug Delivery," en Drug Delivery Systems 95-123 (Ranade y Hollinger, eds., CRC Press 1995); Bremer y col., "Protein Delivery with Infusion Pumps," en Protein Delivery: Physical Systems 239-254 (Sanders y Hendren, eds., Plenum Press 1997); Yewey y col., "Delivery of Proteins from a Controlled Release Injectable Implant," en Protein Delivery: Physical Systems 93-117 (Sanders y Hendren, eds., Plenum Press 1997).) Otras formas sólidas incluyen cremas, pastas, otras aplicaciones topológicas, y similares.

Los liposomas proporcionan un medio para suministrar polipéptidos terapéuticos a un sujeto, por ejemplo, de forma intravenosa, intraperitoneal, intratecal, intramuscular, subcutánea, o mediante administración oral, inhalación, o administración intranasal. Los liposomas son vesículas microscópicas que constan de una o más bicapas lipídicas que rodean compartimientos acuosos. (Véase, en líneas generales, Bakker-Woudenberg y col., Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis. 12 (Supl. 1):S61, 1993; Kim, Drugs 46:618, 1993; Ranade, "Site-Specific Drug Delivery Using Liposomes as Carriers," en Drug Delivery Systems 3-24 (Ranade y Hollinger, eds., CRC Press 1995)) Los liposomas son de composición similar a las membranas celulares y como resultado, los liposomas pueden administrarse de forma segura y son biodegradables. Dependiendo del procedimiento de preparación, los liposomas pueden ser unilamelares o multilamelares, y los liposomas pueden variar en tamaño con diámetros que varían de 0,02  $\mu\text{m}$  a más de 10  $\mu\text{m}$ . Puede encapsularse diversos agentes en liposomas: la división de agentes hidrófobos en las bicapas y la división de agentes hidrófilos dentro el espacio o espacios acuosos internos. (Véase, por ejemplo, Machy y col., Liposomes In Cell Biology And Pharmacology (John Libbey 1987); Ostro y col., American J. Hosp. Pharm. 46:1576, 1989.) Además, es posible controlar la disponibilidad terapéutica del agente encapsulado variando el tamaño del liposoma, la cantidad de bicapas, la composición lipídica, así como la carga y las características superficiales de los liposomas.

Los liposomas pueden adsorberse a casi cualquier tipo de célula y después liberar lentamente el agente encapsulado. Como alternativa, un liposoma absorbido puede endocitarse por células que son fagocíticas. La endocitosis viene seguida por la degradación intralisosómica de los lípidos liposomales y la liberación de los agentes encapsulados (véase Scherphof y col., Ann. N. Y. Acad. Sci. 446:368, 1985). Después de la administración intravenosa, los liposomas pequeños (0,1 a 1,0  $\mu\text{m}$ ) normalmente se captan por células del sistema reticuloendotelial, localizado principalmente en el hígado y el bazo, mientras que los liposomas mayores de 3,0  $\mu\text{m}$  se depositan en el pulmón. Esta captación preferencial de liposomas más pequeños por las células del sistema reticuloendotelial se ha usado para suministrar agentes quimioterapéuticos a macrófagos y a tumores del hígado.

El sistema reticuloendotelial puede esquivarse mediante varios procedimientos incluyendo saturación con grandes dosis de partículas liposómicas, o inactivación selectiva de macrófagos por medios farmacológicos (véase Claassen y col., Biochim. Biophys. Acta 802:428, 1984). Además, la incorporación de fosfolípidos derivatizados con glucolípidos o polietilenglicol en membranas liposómicas ha demostrado provocar una captación significativamente reducida por el sistema reticuloendotelial (véase Allen y col., Biochim. Biophys. Acta 1068:133, 1991; Allen y col., Biochim. Biophys. Acta 1150:9, 1993).

Los liposomas también pueden prepararse para abordar células u órganos particulares variando la composición fosfolipídica o insertando receptores o contra-receptores en los liposomas. Por ejemplo, se han usado liposomas, preparados con un elevado contenido de un tensioactivo aniónico, para abordar el hígado. (Véase, por ejemplo, la patente japonesa 04-244.018 de Hayakawa y col.; Kato y col., Biol. Pharm. Bull. 16:960, 1993.) Estas formulaciones se prepararon mezclando fosfatidilcolina de soja,  $\alpha$ -tocoferol, y aceite de ricino hidrogenado etoxilado (HCO-60) en metanol, concentrado la mezcla al vacío, y después reconstituyendo la mezcla con agua. Una formulación



liposómica de dipalmitoilfosfatidilcolina (DPPC) con una mezcla de esterilglucósido derivado de soja (SG) y colesterol (Ch) también ha demostrado abordar el hígado. (Véase Shimizu y col. *Biol. Pharm. Bull.* 20:881, 1997.)

Como alternativa, diversos contra-receptores de direccionamiento pueden unirse a la superficie del liposoma, tales como anticuerpos, fragmentos de anticuerpo, carbohidratos, vitaminas, y proteínas de transporte. Por ejemplo, para direccionamiento al hígado, los liposomas pueden modificarse con derivados de galactosil-lípido de tipo ramificado para abordar receptores de asialoglucoproteína (galactosa), que se expresan exclusivamente sobre la superficie de células hepáticas. (Véase Kato y Sugiyama, *Crit. Rev. Ther. Drug Carrier Syst.* 14:287, 1997; Murahashi y col., *Biol. Pharm. Bull.* 20:259, 1997.) En un enfoque más general al direccionamiento tisular, las células diana se premarcan con anticuerpos biotinilados específicos para un contra-receptor expresado por la célula diana. (Véase Harasym y col., *Adv. Drug Deliv. Rev.* 32:99, 1998.) Después de la eliminación del plasma del anticuerpo libre, se administran liposomas conjugados con estreptavidina. En otro enfoque, se unen directamente anticuerpos de direccionamiento a los liposomas. (Véase Harasym y col., *supra*.)

Los polipéptidos y anticuerpos pueden encapsularse dentro de liposomas usando técnicas convencionales de microencapsulación de proteínas. (Véase, por ejemplo, Anderson y col., *Infect. Immun.* 31:1099, 1981; Anderson y col., *Cancer Res.* 50:1853, 1990; Cohen y col., *Biochim. Biophys. Acta* 1063:95, 1991; Alving y col. "Preparation and Use of Liposomes in Immunological Studies," en *Liposome Technology* (Vol. III) 317 (Gregoriadis, ed., CRC Press, 2ª ed. 1993); Wassef y col., *Meth. Enzymol.* 149:124, 1987.) Como se ha indicado anteriormente, los liposomas terapéuticamente útiles pueden contener diversos componentes. Por ejemplo, los liposomas pueden comprender derivados lipídicos de poli(etilenglicol). (Véase Allen y col., *Biochim. Biophys. Acta* 1150:9, 1993.)

Se han diseñado microesferas poliméricas degradables para mantener niveles sistémicos elevados de proteínas terapéuticas. Las microesferas se preparan a partir de polímeros degradables tales como poli(lactida-co-glicolida) (PLG), polianhídridos, poli (orto ésteres), polímeros no biodegradables de etilvinil acetato, en que las proteínas se atrapan en el polímero. (Véase, por ejemplo, Gombotz y Pettit, *Bioconjugate Chem.* 6:332, 1995; Ranade, "Role of Polymers in Drug Delivery," en *Drug Delivery Systems* 51-93 (Ranade y Hollinger, eds., CRC Press 1995); Roskos y Maskiewicz, "Degradable Controlled Release Systems Useful for Protein Delivery," en *Protein Delivery: Physical Systems* 45-92 (Sanders y Hendren, eds., Plenum Press 1997); Bartus y col., *Science* 281:1161, 1998; Putney y Burke, *Nature Biotechnology* 16:153, 1998; Putney, *Curr. Opin. Chem. Biol.* 2:548, 1998.) Nanoesferas recubiertas con polietilenglicol (PEG) también pueden proporcionar vehículos para administración intravenosa de proteínas terapéuticas. (Véase, por ejemplo, Gref y col., *Pharm. Biotechnol.* 10:167, 1997.)

Los especialistas en la técnica pueden idear otras formas de dosificación, como se muestra por, por ejemplo, Ansel y Popovich, *Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery Systems* (Lea y Febiger, 5ª ed. 1990); Gennaro (ed.), *Remington's Pharmaceutical Sciences* (Mack Publishing Company, 19ª ed. 1995), y Ranade y Hollinger, *Drug Delivery Systems* (CRC Press 1996).

Las composiciones farmacéuticas descritas en el presente documento también pueden usarse en el contexto de terapia de combinación. La expresión "terapia de combinación" se usa en el presente documento para indicar que a un sujeto se le administra al menos una dosis terapéuticamente eficaz de un antagonista de PDGFR $\beta$  y/o VEGF-A y otro agente terapéutico. El antagonista de PDGFR $\beta$  y/o VEGF-A puede ser, por ejemplo, una composición de unión biespecífica que se une a y neutraliza tanto PDGFR $\beta$  como VEGF-A. En la presente invención, la composición de unión biespecífica es un anticuerpo biespecífico definido en las reivindicaciones.

Por ejemplo, en el contexto de inmunoterapia contra el cáncer, pueden usarse composiciones que tienen actividad antagonista de PDGFR $\beta$  y/o VEGF-A como agente de inhibición de la angiogénesis en combinación con quimioterapia o radiación. Los antagonistas de PDGFR $\beta$  y/o VEGF-A pueden trabajar en sinergia con tipos convencionales de quimioterapia o radiación. Los antagonistas de PDGFR $\beta$  y/o VEGF-A pueden reducir adicionalmente la carga tumoral y permitir una eliminación más eficaz por el agente quimioterapéutico.

Las composiciones descritas en el presente documento que muestran actividad inhibidora de la angiogénesis también pueden usarse en combinación con compuestos inmunomoduladores incluyendo diversas citoquinas y moléculas co-estimuladoras/inhibidoras. Estos podrían incluir, aunque sin limitación, el uso de citoquinas que estimulan respuestas inmunes anti-cáncer. Por ejemplo, el uso combinado de IL-2 e IL-12 muestra efectos beneficiosos en linfoma de linfocitos T, carcinoma de células escamosas, y cáncer pulmonar. (Véase Zaki y col., *J. Invest. Dermatol.* 118:366-71, 2002; Li y col., *Arch. Otolaryngol. Head Neck Surg.* 127:1319-24, 2001; Hiraki y col., *Lung Cancer* 35:329-33, 2002.) Además, los antagonistas de PDGFR $\beta$  y/o VEGF-A podrían combinarse con reactivos que co-estimulan diversas moléculas de superficie celular halladas en células efectoras de base inmune, tal como la activación de CD137. (Véase Wilcox y col., *J. Clin. Invest.* 109:651-9, 2002) o la inhibición de CTLA4 (Chambers y col., *Ann. Rev. Immunol.* 19:565-94, 2001). Como alternativa, los antagonistas de PDGFR $\beta$  y/o VEGF-A podrían usarse con reactivos que inducen la apoptosis de células tumorales interaccionando con receptores relacionados con TRAIL. (Véase, por ejemplo, Takeda y col., *J. Exp. Med.* 195:161-9, 2002; Srivastava, *Neoplasia* 3:535-46, 2001.) Dichos reactivos incluyen el ligando TRAIL, fusiones de ligando TRAIL-Ig, anticuerpos anti-TRAIL, y similares.

En otras variaciones, se usan un antagonista de PDGFR $\beta$  y/o VEGF-A en combinación con una terapia de anticuerpo monoclonal que no aborda específicamente la angiogénesis. Dicha terapia de combinación es particularmente útil para el tratamiento del cáncer, en que el uso de anticuerpos monoclonales, particularmente anticuerpos dirigidos contra antígenos expresados en tumor, se está convirtiendo en práctica convencional para muchos tumores, incluyendo carcinoma de células de mama (trastuzumab o HERCEPTIN®) y carcinoma de colon (cetuximab o ERBITUX®).

Las composiciones farmacéuticas pueden proveerse como un kit que comprende un recipiente que comprende una composición terapéutica descrita en el presente documento. Puede proporcionarse una composición terapéutica, por ejemplo, en forma de una solución inyectable para dosis únicas o múltiples, o en forma de un polvo estéril que se reconstituirá antes de inyectarse. Como alternativa, dicho kit puede incluir un dispersador de polvo seco, generador de aerosol líquido, o nebulizador para la administración de una composición terapéutica. Dicho kit puede comprender adicionalmente información escrita sobre indicaciones y uso de la composición farmacéutica.

## B. Tratamiento del cáncer

### 1. Tipos de cáncer

Los cánceres susceptibles a tratamiento de acuerdo con la presente invención incluyen cánceres caracterizados por la presencia de tumores sólidos. Como se ha analizado anteriormente, la cantidad de vasos sanguíneos en un tejido tumoral es un potente indicador pronóstico negativo para cánceres que implican la formación de tumores sólidos (véase, por ejemplo, Weidner y col., (1992), *supra*; Weidner y col., (1993), *supra*; Li y col., *supra*; Foss y col., *supra*), y parece que tanto la familia de VEGF como la de PDGF de moléculas de señalización desempeñan tareas clave en el desarrollo de nuevos vasos sanguíneos asociados con tumores sólidos. La siguiente Tabla 7 enumera algunos cánceres caracterizados por la formación de tumores sólidos, organizados predominantemente por tejidos diana.

**Tabla 7: Ejemplos de cánceres que implican formación de tumores sólidos**

1.	Cáncer de cabeza y cuello	
	a. Cerebro	
	b. Cavidad oral	
	c. Orofaringe	
	d. Nasofaringe	
	e. Hipofaringe	
	f. Cavidades nasales y senos paranasales	
	g. Laringe	
	h. Labios	
2.	Cánceres pulmonares	
	a. Carcinoma no microcítico	
	b. Carcinoma microcítico	
3.	Cánceres del tracto gastrointestinal	
	a. Cáncer Colorrectal	
	b. Cáncer gástrico	
	c. Cáncer esofágico	
	d. Cáncer anal	
	e. Cáncer del conducto biliar extra-hepático	
	f. Cáncer de la Ampolla de Vater	
	g. Tumor estromático gastrointestinal (GIST)	
4.	Cáncer hepático	
	a. Adenoma de células hepáticas	
	b. Carcinoma hepatocelular	
5.	Cáncer de mama	
6.	Cáncer ginecológico	
	a. Cáncer cervical	
	b. Cáncer de ovario	
	c. Cáncer vaginal	
	d. Cáncer de vulva	
	e. Neoplasia trofoblástica gestacional	
	f. Cáncer uterino	

(continuación)

7.	Cáncer del tracto urinario	
	a. Carcinoma cáncer renal	
	b. Cáncer de próstata	
	c. Cáncer de vejiga urinaria	
	d. Cáncer de pene	
	e. Cáncer de uretra	
8.	Cáncer de vejiga urinaria	
9.	Tumores neurológicos	
	a. Astrocitoma y glioblastoma	
	b. Linfoma primario del SNC	
	c. Meduloblastoma	
	d. Tumores de células germinales	
	e. Retinoblastoma	
10.	Neoplasmas endocrinos	
	a. Cáncer de tiroides	
	b. Cáncer pancreático	
	1)	Tumores de las células de los islotes
		a) Insulinomas
		b) Glucagonomas
	c. Feocromocitoma	
	d. Carcinoma adrenal	
	e. Tumores carcinoides	
	f. Carcinoma de paratiroides	
	g. Neoplasmas de la glándula pineal	
11. 12. 13. 14. 15.	Cánceres cutáneos	
	a. Melanoma maligno	
	b. Carcinoma de células escamosas	
	c. Carcinoma de células basales	
	d. Sarcoma de Kaposi	
	Cánceres óseos	
	a. Osteoblastoma	
	b. Osteocondroma	
	c. Osteosarcoma	
	Neoplasmas de tejido conectivo	
	a. Condrioblastoma	
	b. Condroma	
	Cánceres infantiles	
	a. Cánceres cerebrales	
	b. Neuroblastoma	
	c. Tumor de Wilm (nefroblastoma)	
	d. Rabdomiosarcoma	
	e. Retinoblastoma	
	Cánceres sensibles a inmunoterapia	
	a. Melanoma	
	b. Cáncer renal	
	c. Cáncer de mama	
	d. Cáncer de próstata	
	e. Cáncer colorrectal	
	f. Cáncer cervical	
	g. Cáncer de ovarios	
	h. Cáncer pulmonar	

Por consiguiente, en ciertas realizaciones, un antagonista de PDGFR $\beta$  y/o VEGF-A descrito en el presente documento se usa para tratar un cáncer caracterizado por la presencia de un tumor sólido tal como, por ejemplo, cualquiera de los cánceres enumerados en la Tabla 7. Por ejemplo, en algunas realizaciones, el cáncer a tratar de acuerdo con la presente invención se selecciona entre los siguientes: un cáncer de la cabeza y el cuello (por ejemplo, un cáncer de la cavidad oral, orofaringe, nasofaringe, hipofaringe, cavidad nasal o senos paranasales, laringe, labios, o glándula salival); un cáncer pulmonar (por ejemplo, cáncer pulmonar no microcítico, carcinoma microcítico, o mesotelioma); un cáncer del tracto gastrointestinal (por ejemplo, cáncer colorrectal, cáncer gástrico, cáncer esofágico, o cáncer anal); tumor estromático gastrointestinal (GIST); adenocarcinoma pancreático; carcinoma pancreático de células acinares; un cáncer del intestino delgado; un cáncer del hígado o el árbol biliar (por ejemplo, adenoma de células hepáticas, carcinoma hepatocelular, hemangiosarcoma, colangiosarcoma extrahepático o intrahepático, cáncer de la ampolla de vater, o cáncer de vesícula biliar); un cáncer de mama (por ejemplo, cáncer metastásico de mama o cáncer inflamatorio de mama); un cáncer ginecológico (por ejemplo, cáncer cervical, cáncer de ovario, cáncer de trompas de Falopio, carcinoma peritoneal, cáncer vaginal, cáncer de la vulva, neoplasia trofoblástica gestacional, o cáncer uterino, incluyendo cáncer de endometrio o sarcoma uterino); un cáncer del tracto urinario (por ejemplo, cáncer de próstata; cáncer de vejiga; cáncer de uretra; cáncer de pene; o cáncer de riñón tal como, por ejemplo, carcinoma de células renales o carcinoma de células de transición, incluyendo pelvis renal y uréter); cáncer testicular; un cáncer del sistema nervioso central (SNC) tal como un tumor intracraneal (por ejemplo, astrocitoma, astrocitoma anaplásico, glioblastoma, oligodendroglioma, oligodendroglioma anaplásico, ependimoma, linfoma primario del SNC, meduloblastoma, tumor de células germinales, neoplasma de la glándula pineal, meningioma, tumor de la pituitaria, tumor de la vaina de los nervios (por ejemplo, schwannoma), cordoma, craneofaringioma, un tumor del plexo coroideo (por ejemplo, carcinoma del plexo coroideo); o otros tumores intracraneales de origen neuronal o glial) o un tumor de la médula espinal (por ejemplo, schwannoma, meningioma); una neoplasia endocrina (por ejemplo, cáncer de tiroides tal como, por ejemplo, carcinoma de tiroides, cáncer medular, o linfoma de tiroides; un tumor endocrino pancreático tal como, por ejemplo, un insulinooma o glucagonoma; un carcinoma adrenal tal como, por ejemplo, feocromocitoma; un tumor carcinoide; o un carcinoma de paratiroides); un cáncer cutáneo (por ejemplo, carcinoma de células escamosas; carcinoma de células basales; sarcoma de Kaposi; o un melanoma maligno tal como, por ejemplo, un melanoma intraocular); un cáncer óseo (por ejemplo, un sarcoma óseo tal como, por ejemplo, osteosarcoma, osteocondroma, o sarcoma de Ewing); mieloma múltiple; un cloroma; un sarcoma de tejido blando (por ejemplo, un tumor fibroso o tumor fibrohistiocítico); un tumor del músculo liso o músculo esquelético; un tumor perivascular de vasos sanguíneos o linfáticos (por ejemplo, sarcoma de Kaposi); un tumor sinovial; un tumor mesotelial; un tumor neural; un tumor paraganglionar; un tumor cartilaginoso u óseo extrasquelético; y un tumor mesenquimático pluripotencial.

En algunas variaciones, el cáncer a tratar es un cáncer infantil tal como, por ejemplo, cáncer cerebral, neuroblastoma, tumor de Wilm (nefroblastoma), rabdomiosarcoma, retinoblastoma, o hepatoblastoma.

En otras variaciones, el cáncer es un cáncer sensible a inmunoterapia tal como, por ejemplo, melanoma, cáncer renal, cáncer de mama, cáncer de próstata, cáncer colorrectal, cáncer cervical, cáncer de ovario, o cáncer pulmonar.

Algunos de los cánceres enumerados anteriormente, incluyendo algunos de los modelos animales relevantes para evaluar los efectos del antagonista de PDGFR $\beta$  y/o VEGF-A sobre respuestas tumorales, se analizan en detalle adicional a continuación.

#### a. *Melanoma*

El melanoma de propagación superficial es el tipo más común de melanoma. Aproximadamente 7 de cada 10 (70 %) son de este tipo. Aparecen principalmente en personas de mediana edad. El sitio más común en mujeres es en las piernas, mientras que en hombres es más común en el torso, particularmente la espalda. Tienden a empezar propagándose a través de la superficie de la piel: esto se conoce como fase de crecimiento radial. Si el melanoma se retira en esta fase existen muy altas probabilidades de cura. Si el melanoma no se elimina, comienza a crecer más profundo en las capas de la piel. Entonces existe riesgo de que se propague en el torrente sanguíneo o sistema linfático a otras partes del organismo. El melanoma nodular aparece más frecuentemente en el pecho o la espalda. Se halla más habitualmente en personas de mediana edad. Tiende a crecer más profundo en la piel de forma bastante rápida si no se elimina. Este tipo de melanoma a menudo se eleva por encima del resto de la superficie de la piel y se siente como un bulto. Puede ser marrón muy oscuro-negro o negro. El melanoma lentiginoso maligno se encuentra más habitualmente en la cara, particularmente en personas ancianas. Crece lentamente y puede tardar varios años en desarrollarse. El melanoma acral se encuentra habitualmente en las palmas de las manos, las plantas de los pies o alrededor de las uñas de los pies. Otros tipos muy raros de melanoma de la piel incluyen melanoma amelanótico (en que el melanoma pierde su pigmento y aparece como un área blanca) y melanoma desmoplásico (que contiene tejido cicatrizal fibroso). El melanoma maligno puede comenzar en partes del cuerpo diferentes a la piel pero esto es muy raro. Las partes del cuerpo que pueden verse afectadas son el ojo, la boca, bajo las uñas de los dedos de las manos (conocido como melanoma subungueal), la vulva o tejidos vaginales, o de forma interna.

La mayoría de los melanomas comienzan con un cambio en el aspecto de la piel normal. Esto puede parecerse a un nuevo lunar anormal. Menos de un tercio se desarrollan en lunares existentes. Puede ser difícil explicar la diferencia entre un lunar y un melanoma, pero puede usarse la siguiente lista de comprobación para ayudar. Se conoce como

la lista ABCD. Asimetría - los lunares normales son habitualmente de forma simétrica. Los melanomas probablemente son irregulares o asimétricos. Borde - los lunares habitualmente tienen un borde regular bien definido. Los melanomas tienen mayor probabilidad de tener un borde irregular con límites dentados. Color - los lunares son habitualmente de un marrón uniforme. Los melanomas tienden a tener más de un color. Pueden ser de tonos variados de marrón mezclado con negro, rojo, rosa, blanco o un matiz azulado. Diámetro - los lunares son normalmente no mayores que el extremo romo de un lápiz (aproximadamente 6 mm transversalmente). Los melanomas son habitualmente de más de 7mm de diámetro. Los lunares normales pueden elevarse desde la piel y/o pueden ser velludos. También puede haber picor, formación de costras o sangrado en melanomas - estos son signos menos comunes pero no deben ignorarse (sitio web de Internet cancerbacup). Los efectos de un antagonista de PDGFRβ y/o VEGF-A sobre la respuesta tumoral pueden evaluarse en un modelo de melanoma murino similar al descrito en Hermans y col., Cancer Res. 63:8408-13, 2003; Ramont y col., Exp. Cell Res. 29:1-10, 2003; Safwat y col., J. Exp. Ther. Oncol. 3:161-8, 2003; y Fidler, Nat New Biol. 242:148-9, 1973.

#### b. *Carcinoma de células renales*

El carcinoma de células renales, una forma de cáncer de riñón que implica cambios cancerosos en las células del túbulo renal, es el tipo más común de cáncer de riñón en adultos. Se desconoce porqué las células se vuelven cancerosas. Un historial de tabaquismo aumenta enormemente el riesgo de desarrollar carcinoma de células renales. Algunas personas también pueden tener un riesgo hereditario y aumentado a desarrollar carcinoma de células renales, y una historia familiar de cáncer de riñón aumenta el riesgo. Personas con enfermedad de von Hippel-Lindau, una enfermedad hereditaria que afecta a los capilares del cerebro, habitualmente también desarrollan carcinoma de células renales. Trastornos renales que requieren diálisis para su tratamiento también aumentan el riesgo de desarrollar carcinoma de células renales. El primer síntoma es habitualmente sangre en la orina. A veces están implicados los dos riñones. El cáncer metastatiza o se propaga fácilmente, muy a menudo hasta los pulmones y otros órganos, y aproximadamente un tercio de los pacientes tiene metástasis en el momento del diagnóstico (sitio web de Internet Medline Plus Medical Encyclopedia). Los efectos de un antagonista de PDGFRβ y/o VEGF-A sobre la respuesta tumoral pueden evaluarse en un modelo murino de carcinoma de células renales similar al descrito en Sayers y col., Cancer Res. 50:5414-20, 1990; Salup y col., Immunol. 138:641-7, 1987; y Luan y col., Transplantation 73:1565-72, 2002.

#### c. *Cáncer cervical*

El cerviz es el cuello del útero que se abre en la vagina. El cáncer cervical, también llamado carcinoma cervical, se desarrolla a partir de células anormal sobre la superficie del cerviz. El cáncer cervical es uno de los cánceres más comunes que afectan a las mujeres. El cáncer cervical está habitualmente precedido por displasia, cambios precancerosos en las células sobre la superficie del cerviz. Estas células anormales pueden progresar hasta cáncer invasivo. Una vez que aparece el cáncer, puede progresar a través de cuatro fases. Las fases se definen por el grado de propagación del cáncer. Cuando más se ha propagado el cáncer, más extensivo tendrá que ser el tratamiento probablemente. Existen 2 tipos principales de cáncer cervical: (1) tipo escamoso (cáncer epidermoide): éste es el tipo más común, representando aproximadamente el 80 % al 85 % de los cánceres cervicales. Este cáncer puede causarse por enfermedades de transmisión sexual. Una de estas enfermedades sexuales es el papilomavirus humano, que causa verrugas venéreas. El tumor canceroso crece sobre y en el interior del cerviz. Este cáncer generalmente empieza sobre la superficie del cerviz y puede diagnosticarse en una etapa temprana mediante citología cervical. (2) Adenocarcinoma: este tipo de cáncer cervical se desarrolla a partir del tejido en las glándulas cervicales en el canal del cerviz. El cáncer cervical temprano habitualmente no causa síntomas. El cáncer habitualmente se detecta por citología cervical y examen pélvico. Por esto hay que empezar a hacerse citologías pélvicas y exámenes pélvicos en cuanto se llegue a ser sexualmente activa. Las mujeres jóvenes y sanas que nunca han sido sexualmente activas deben hacer su primer examen pélvico anual a la edad de 18. Las fases tardías de cáncer cervical causan sangrado vaginal anormal o una descarga teñida de sangre en momentos inesperados, tal como entre periodos menstruales, después de tener relaciones, o después de la menopausia. La descarga vaginal anormal puede ser turbia o sangrienta o puede contener moco con un mal olor. Las fases avanzadas del cáncer pueden causar dolor (sitio web de Internet University of Michigan Health System). Los efectos de un antagonista de PDGFRβ y/o VEGF-A sobre la respuesta tumoral pueden evaluarse en un modelo de cáncer cervical murino similar al descrito en Ahn y col., Hum. Gene Ther. 14:1389-99, 2003; Hussain y col., Oncology 49:237-40, 1992; y Sengupta y col., Oncology 48:258-61, 1991.

#### d. *Tumores de cabeza y cuello*

La mayoría de los cánceres de cabeza y cuello son de un tipo llamado carcinoma (es particular carcinoma de células escamosas). Los carcinomas de cabeza y cuello comienzan en células que forman el revestimiento de la boca, la nariz, la garganta o la oreja, o la capa superficial que cubre la lengua. Sin embargo, los cánceres de cabeza y cuello pueden desarrollarse a partir de otros tipos de células. El linfoma se desarrolla a partir de células del sistema linfático. El sarcoma se desarrolla a partir de las células de apoyo que componen los músculos, el cartílago o los vasos sanguíneos. El melanoma comienza a partir de células llamadas melanocitos, que dan color a los ojos y la piel. Los síntomas de un cáncer de cabeza y cuello dependerán de donde esté - por ejemplo, cáncer en la lengua puede cuasar alguna dificultad al hablar. Los síntomas más comunes son una úlcera o área irritada en la cabeza o el cuello que no cura en unas pocas semanas; dificultad al tragar, o dolor cuando se mastica o traga; problemas al

respirar o hablar, tal como respiración ruidosa persistente, dificultada al hablar o voz ronca; entumecimiento en la boca; nariz tapada persistente, o hemorragias nasales; dolor de oídos persistente, zumbido en los oídos, o dificultad para oír; un hinchamiento o bulto en la boca o el cuello; dolor en la cara o la mandíbula superior; en personas que fuman o mastican tabaco, pueden aparecer cambios pre-cancerosos en el revestimiento de la boca, o en la lengua.

Estos pueden aparecer como parches blancos persistentes (leucoplaquia) o parches rojos (eritroplaquia). Habitualmente son indoloros pero a veces pueden ser dolorosos y pueden sangrar (sitio web de Internet Cancerbacup). Los efectos de un antagonista de PDGFR $\beta$  y/o VEGF-A sobre la respuesta tumoral pueden evaluarse en un modelo murino de tumor de cabeza y cuello similar al descrito en Kuriakose y col., Head Neck 22:57-63, 2000; Cao y col., Clin. Cancer Res. 5:1925-34, 1999; Hier y col. Laryngoscope 105:1077-80, 1995; Braakhuis y col., Cancer Res. 51:211-4, 1991; Baker Laryngoscope 95:43-56, 1985; y Dong y col., Cancer Gene Ther. 10:96-104, 2003.

#### e. *Cáncer cerebral*

Los tumores que empiezan en el tejido cerebral se conocen como tumores primarios del cerebro. Los tumores cerebrales primarios se nombran de acuerdo con el tipo de células o la parte del cerebro en que se originan. Los tumores cerebrales primarios más comunes son los gliomas. Comienzan en células de la glía. Existen muchos tipos de gliomas. (1) Astrocitoma - El tumor surge a partir de células gliales con forma de estrella llamadas astrocitos. En adultos, los astrocitomas muy a menudo surgen en el cerebro. En niños, aparecen en el tronco encefálico, el cerebro, y el cerebelo. Un astrocitoma de grado III a veces se denomina astrocitoma anaplásico. Un astrocitoma de grado IV habitualmente se denomina glioblastoma multiforme. (2) Glioma del tronco encefálico - El tumor aparece en la parte más inferior del cerebro. Los gliomas del tronco encefálico muy a menudo se diagnostican en niños pequeños y adultos de mediana edad. (3) Ependimoma - El tumor surge de células que revisten los ventrículos o el canal central de la médula espinal. Se encuentran muy comúnmente en niños y adultos jóvenes. (4) Oligodendroglioma - Este raro tumor surge de células que fabrican la sustancia grasa que cubre y protege los nervios. Estos tumores habitualmente aparecen en el cerebro. Crecen lentamente y habitualmente no se propagan en el tejido cerebral adyacente. Son más comunes en adultos de edad media. Los síntomas de tumores cerebrales dependen del tamaño, tipo y localización del tumor. Los síntomas pueden causarse cuando un tumor presiona sobre un nervio o daña una cierta área del cerebro. También pueden causarse cuando el cerebro se hincha o el fluido se acumula dentro del cráneo. Estos son los síntomas más comunes de tumores cerebrales: cefaleas (habitualmente peores en la mañana); náuseas o vómitos; cambios en el habla, la visión, o el oído; problemas de equilibrio y para andar; cambios en el humor, la personalidad, o la capacidad de concentrarse; problemas con la memoria; espasmos o sacudidas musculares (ataques o convulsiones); y entumecimiento o cosquilleo en los brazos o las piernas (sitio web de Internet National Cancer Institute). Los efectos de un antagonista de PDGFR $\beta$  y/o VEGF-A sobre la respuesta tumoral pueden evaluarse en un modelo animal de glioma similar al descrito en Schueneman y col., Cancer Res. 63:4009-16, 2003; Martinet y col., Eur. J. Surg. Oncol. 29:351-7, 2003; Bello y col., Clin. Cancer Res. 8:3539-48, 2002; Ishikawa y col., Cancer Sci. 95:98-103, 2004; Degen y col., J. Neurosurg. 99:893-8, 2003; Engelhard y col., Neurosurgery 48:616-24, 2001; Watanabe y col., Neurol., Res. 24:485-90, 2002; y Lumniczky y col., Cancer Gene Ther. 9:44-52, 2002.

#### f. *Cáncer de tiroides*

Los cánceres papilares y foliculares de tiroides representan el 80 al 90 por ciento de todos los cánceres de tiroides. Ambos tipos empiezan en las células foliculares de la tiroides. La mayoría de los cánceres papilares y foliculares de tiroides tienden a crecer lentamente. Si se detectan pronto, la mayoría puede tratarse de forma satisfactoria. El cáncer medular de tiroides representa el 5 al 10 por ciento de los casos de cáncer de tiroides. Surge en células C, no células foliculares. El cáncer medular de tiroides es más fácil de controlar si se encuentra y se trata antes de que se propague a otras partes del cuerpo. El cáncer anaplásico de tiroides es el tipo menos común de cáncer de tiroides (solamente el 1 al 2 por ciento de los casos). Surge en las células foliculares. Las células cancerosas son muy anormales y difíciles de reconocer. Este tipo de cáncer es habitualmente muy difícil de controlar porque las células cancerosas tienden a crecer y propagarse muy rápidamente. El cáncer temprano de tiroides a menudo no causa síntomas. Pero según crece el cáncer, los síntomas pueden incluir: un bulto, o nódulo, en la parte frontal del cuello cerca de la nuez; ronquera o dificultada para hablar en una voz normal; ganglios linfáticos hinchados, especialmente en el cuello; dificultada para tragar o respirar; o dolor en la gargantas o el cuello (sitio web de Internet National Cancer Institute). Los efectos de un antagonista de PDGFR $\beta$  y/o VEGF-A sobre la respuesta tumoral pueden evaluarse en un modelo murino o de rata de tumor de tiroides similar al descrito en Quidville y col., Endocrinology 145:2561-71, 2004 (modelo de ratón); Cranston y col., Cancer Res. 63:4777-80, 2003 (modelo de ratón); Zhang y col., Clin Endocrinol (Oxf). 52:687-94, 2000 (modelo de rata); y Zhang y col., Endocrinology 140:2152-8, 1999 (modelo de rata).

#### g. *Cáncer hepático*

Existen dos tipos diferentes de cáncer primario de hígado. El tipo más común se llama hepatoma o carcinoma hepatocelular (HCC), y surge de las células principales del hígado (los hepatocitos). Este tipo está habitualmente confinado al hígado, aunque ocasionalmente se propaga a otros órganos. Aparece principalmente en personas con una enfermedad hepática llamada cirrosis. También existe un sub-tipo más raro de hepatoma llamado hepatoma fibrolamelar, que puede aparecer en personas jóvenes y no está relacionado con enfermedad hepática anterior. El

otro tipo de cáncer primario de hígado se llama colangiocarcinoma o cáncer de los conductos biliares, porque empieza en las células que revisten los conductos biliares. La mayoría de las personas que desarrollan hepatoma habitualmente también tienen una afección llamada cirrosis del hígado. Es una fina cicatrización por todo el hígado que se debe a diversas causas incluyendo infección y alcoholismo grave durante un largo periodo de tiempo. Sin embargo, solamente una pequeña parte de las personas que tienen cirrosis del hígado desarrollan cáncer primario de hígado. Una infección con el virus de la hepatitis B o la hepatitis C puede conducir a cáncer de hígado, y también puede ser la causa de cirrosis, que aumenta el riesgo de desarrollar hepatoma. Las personas que tienen una rara afección llamada hemocromatosis, que causa exceso de depósitos de hierro en el organismo, tienen mayores probabilidades de desarrollar hepatoma. Por tanto, los antagonistas de PDGFR $\beta$  y/o VEGF-A descritos en el presente documento pueden usarse para tratar, prevenir, inhibir la progresión de, retardar la aparición de, y/o reducir la gravedad o inhibir al menos una de las afecciones o síntomas asociados con carcinoma hepatocelular. El carcinoma hepatocelular puede estar asociado o no con una infección de hepatitis (por ejemplo, hepatitis A, hepatitis B, hepatitis C y hepatitis D).

Los efectos de un antagonista de PDGFR $\beta$  y/o VEGF-A sobre la respuesta tumoral pueden evaluarse en un modelo de ratón transgénico de carcinoma hepatocelular, que incluye la sobre-expresión del factor- $\alpha$  de crecimiento transformante (TFG- $\alpha$ ) en solitario (Jhappan y col., Cell, 61:1137-1146, 1990; Sandgren y col., Mol. Cell Biol., 13:320-330, 1993; Sandgren y col., Oncogene 4:715-724, 1989; y Lee y col., Cancer Res. 52:5162-5170, 1992) o en combinación con c-myc (Murakami y col., Cancer Res., 53:1719-1723, 1993), H-ras mutado (Saitoh y col., Oncogene 5:1195-2000, 1990), genes del virus de la hepatitis B que codifican HbsAg y HBx (Toshkov y col., Hepatology 20:1162-1172, 1994; Koike y col., Hepatology 19:810-819, 1994), el antígeno T grande de SV40 (Sepulveda y col., Cancer Res. 49:6108-6117, 1989; Schirmacher y col., Am. J. Pathol., 139:231-241, 1991) y FGF19 (Nicholes y col., American Journal of Pathology, 160:2295-2307, 2002).

#### h. *Cáncer pulmonar*

Los efectos de un antagonista de PDGFR $\beta$  y/o VEGF-A sobre la respuesta tumoral pueden evaluarse en un modelo de xenoinjerto de carcinoma pulmonar humano microcítico/no microcítico. En resumen, se injertan tumores humanos en ratones inmunodeficientes y estos ratones se tratan con un antagonista de PDGFR $\beta$  y/o VEGF-A en solitario o en combinación con otros agentes que pueden usarse para demostrar la eficacia del tratamiento evaluando el crecimiento del tumor (Nemati y col., Clin Cancer Res. 6:2075-86, 2000; y Hu y col., Clin. Cancer Res. 10:7662-70, 2004).

#### 2. Criterios de valoración y actividad anti-tumoral para tumores sólidos

Aunque cada protocolo puede definir las evaluaciones de respuesta tumoral de forma diferente, actualmente se considera de los criterios RECIST (criterios de evaluación de respuesta en tumores sólidos) son las directrices recomendadas para la evaluación de la respuesta tumoral por el National Cancer Institute (véase Therasse y col., J. Natl. Cancer Inst. 92:205-216, 2000). De acuerdo con los criterios RECIST, respuesta tumoral significa una reducción o eliminación de todas las lesiones medibles o metástasis. La enfermedad generalmente se considera medible si comprende lesiones que pueden medirse de forma precisa en al menos una dimensión como  $\geq 20$  mm con técnicas convencionales o  $\geq 10$  mm con exploración TC espiral con márgenes claramente definidos por fotografía médica o rayos X, tomografía axial computerizada (TC), imágenes de resonancia magnética (RM), o exploración clínica (si las lesiones son superficiales). Enfermedad no medible significa que la enfermedad comprende lesiones  $< 20$  mm con técnicas convencionales o  $< 10$  mm con exploración TC espiral, y lesiones ciertamente no medibles (demasiado pequeñas para medirlas de forma precisa). La enfermedad no medible incluye efusiones de la pleura, ascitis, y enfermedad documentada por evidencias indirectas.

Los criterios para un estado objetivo son necesarios en los protocolos para evaluar la respuesta de un tumor sólido. Los criterios representativos incluyen los siguientes: (1) respuesta completa (CR), definida como desaparición completa de toda enfermedad medible; sin nuevas lesiones; sin síntomas relacionados con la enfermedad; sin evidencias de enfermedad no medible; (2) respuesta parcial (PR) definida como una disminución del 30 % en la suma del diámetro más largo de las lesiones diana; (3) enfermedad progresiva (PD), definida como un aumento del 20 % en la suma del diámetro más largo de las lesiones diana o aparición de cualquier lesión nueva; (4) respuesta estable o ausente, definida como no clasificable para CR, PR, o enfermedad progresiva. (Véase, Therasse y col., *supra*.)

Los criterios de valoración adicionales que se aceptan dentro de la técnica oncológica incluyen supervivencia global (OS), supervivencia sin enfermedad (DFS), tasa de respuesta objetiva (ORR), tiempo hasta la progresión (TTP), y supervivencia sin progresión (PFS) (véase Guidance for Industry: Clinical Trial Endpoints for the Approval of Cancer Drugs and Biologics, abril 2005, Center for Drug Evaluation and Research, FDA, Rockville, MD.)

#### 3. Terapia de combinación contra el cáncer

Como se ha analizado anteriormente, un antagonista de PDGFR $\beta$  y/o VEGF-A puede usarse en combinación con un segundo agente para el tratamiento de un trastorno neovascular. Cuando se usan para tratar el cáncer, los antagonistas descritos en el presente documento pueden usarse en combinación con terapias convencionales contra

el cáncer tales como, por ejemplo, cirugía, radioterapia, quimioterapia, o combinaciones de los mismos. En ciertos aspectos, otros agentes terapéuticos útiles para terapia de combinación contra el cáncer con un antagonista de PDGFR $\beta$  y/o VEGF-A incluyen otros agentes anti-angiogénicos. En algunos otros aspectos, otros agentes terapéuticos útiles para terapia de combinación con un antagonista de PDGFR $\beta$  y/o VEGF-A incluyen un antagonista de otros factores que están implicados en el crecimiento tumoral tales como, por ejemplo, EGFR, ErbB2 (Her2), ErbB3, ErbB4, o TNF. En algunos aspectos, un antagonista de PDGFR $\beta$  y/o VEGF-A se co-administra con una citoquina (por ejemplo, una citoquina que estimula una respuesta inmune contra un tumor). A continuación se describen en detalle adicionales terapias de combinación a modo de ejemplo particularmente susceptibles para tratamiento del cáncer.

**a. Anticuerpos dirigidos a antígenos asociados a tumor en combinación con un antagonista de PDGFR $\beta$  y/o VEGF-A**

La terapia de anticuerpos ha sido particularmente satisfactoria en tratamiento del cáncer porque ciertos tumores presentan antígenos únicos, antígenos específicos de linaje, o antígenos presentes en cantidades excesivas relativas a células normales. Uno de los mecanismos asociados con la actividad anti-tumoral de la terapia de anticuerpos monoclonales es la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC). En ADCC, los anticuerpos monoclonales se unen a una célula diana (por ejemplo, célula cancerosa) y células efectoras específicas que expresan receptores para el anticuerpo monoclonal (por ejemplo, células NK, monocitos, granulocitos) se unen al complejo de anticuerpo monoclonal/célula diana provocando muerte celular dirigida. Un antagonista de PDGFR $\beta$  y/o VEGF-A puede co-administrarse con un anticuerpo monoclonal contra un antígeno asociado a tumor. La dosis y programa del MAb se basa en las propiedades farmacocinéticas y toxicocinéticas atribuidas al anticuerpo específico co-administrado, y deben optimizar estos efectos, minimizando al mismo tiempo cualquier toxicidad que pudiera asociarse a la administración de un antagonista de PDGFR $\beta$  y/o VEGF-A.

La terapia de combinación con un antagonista de PDGFR $\beta$  y/o VEGF-A y un anticuerpo monoclonal contra un antígeno asociado a tumor puede estar indicada cuando ha fallado un tratamiento de primera línea y puede considerarse como un tratamiento de segunda línea. La memoria descriptiva describe el uso de la combinación como un tratamiento de primera línea en poblaciones de pacientes recién diagnosticados y que no se han tratado anteriormente con agentes antineoplásicos ("paciente *de novo*") y pacientes que no han recibido anteriormente ninguna terapia de anticuerpo monoclonal ("pacientes vírgenes").

Un antagonista de PDGFR $\beta$  y/o VEGF-A también es útil en terapia de combinación con anticuerpos monoclonales contra antígenos asociados a tumor en ausencia de cualquier ADCC directa mediada por anticuerpos de las células tumorales. Por ejemplo, anticuerpos que bloquean una señal inhibidora en el sistema inmune pueden conducir a respuestas inmunes aumentadas. Ejemplos incluyen (1) anticuerpos contra moléculas de la familia B7R que tienen función inhibidora tal como, antígeno 4 asociado a linfocitos T citotóxicos (CTLA-4), muerte programada-1 (PD-1), atenuados de linfocitos B y T (BTLA); (2) anticuerpos contra citoquinas inhibidoras como IL-10, TGF $\beta$ ; y (3) anticuerpos que eliminan o inhiben funciones de células supresoras como anti-CD25 o CTLA-4. Por ejemplo, se cree que MAb anti-CTLA4 tanto en ratones como en seres humanos suprimen la función de linfocitos T inmunosupresores (Tregs) o inhiben la señal inhibidora transmitida a través de la unión de CTLA-4 sobre linfocitos T a moléculas B7-1 o B7-2 en APC o células tumorales.

La Tabla 8 es una lista no exclusiva de anticuerpos monoclonales aprobados o que se están ensayando para los cuales es posible terapia de combinación con un antagonista de PDGFR $\beta$  y/o VEGF-A.

**Tabla 8: Terapias con anticuerpos monoclonales para su uso en combinación con antagonistas de PDGFR $\beta$  y/o VEGF-A**

<u>Diana</u>	<u>Nombre del fármaco</u>	<u>Indicación clínica</u>	<u>Compañía</u>
TRAIL-R1	HGS-ETRI	cánceres	HGS
TRAIL-R2	HGS-ETR2	tumores sólidos	HGS
CD40	SGN40	MM	Seattle Genetics
HER2	Herceptin	cáncer de mama	Genentech
EGF-R	ABX-EGF	CRC, NSCLC, RCC	Abgenix
EGF-R	EMD72000	tumores sólidos	Merck
EGF-R	MDX-214	tumores EGF-R positivos	Medarex
EGF-R	Erbix	CRC	Imclone



(continuación)

<u>Diana</u>	<u>Nombre del fármaco</u>	<u>Indicación clínica</u>	<u>Compañía</u>
Integrina $\alpha 5\beta 3$	Vitaxin	psoriasis, cáncer de próstata	AME/Lilly
CD152	CTLA-4	cánceres	Medarex
CD49e	Integrina $\alpha 5$	cánceres	Protein Design Labs
MUC18 (tipo TIM)	ABX-MA1	melanoma	
Mucina TAG-72	Anatumomab	cánceres	
CD3	Ecromeximab	melanoma	Kyowa Hakko
CD64 (Fc GR1)	AntiCD64	cánceres	Medarex
CEA	CEA-Cide	cánceres	Immunomedics
EpCAM	Panorex	cáncer colorrectal	Centocor
Lewis-Y-Ag	SGN15	cánceres	Seattle Genetics

b. *Inhibidores de tirosina quinasa en combinación con antagonista de PDGFR $\beta$  y/o VEGF-A*

En algunas realizaciones, un antagonista de PDGFR $\beta$  y/o VEGF-A descrito en el presente documento se usa en combinación con un inhibidor de tirosina quinasa. Las tirosina quinasas son enzimas que catalizan la transferencia del grupo fosfato  $\gamma$  desde la adenosina trifosfato hasta proteínas diana. Las tirosina quinasas pueden clasificarse como proteínas tirosina quinasa receptoras y no receptoras. Desempeñan una tarea esencial en diversos procesos celulares normales, incluyendo la activación a través de receptores del crecimiento y efectos sobre la proliferación, supervivencia y crecimiento de diversos tipos celulares. Además, se cree que promueven la proliferación de células tumorales, inducen efectos anti-apoptóticos y promueven la angiogénesis y metástasis. Además de la activación a través de factores de crecimiento, la activación de la proteína quinasa a través de mutación somática es un mecanismo común de la tumorigénesis. Algunas de las mutaciones identificadas están en B-Raf quinasa, FLT3 quinasa, BCR-ABL quinasa, c-KIT quinasa, las vías del factor de crecimiento epidérmico (EGFR) y PDGFR. Las Her2, VEGFR y c-Met son otras vías significativas de receptor tirosina quinasa (RTK) implicadas en la progresión del cáncer y la tumorigénesis. Como una gran cantidad de procesos celulares se inicia por tirosina quinasas, se han identificado como dianas clave para inhibidores.

Los inhibidores de tirosina quinasa (TKI) son moléculas pequeñas que actúan dentro de la célula, compitiendo con adenosina trifosfato (ATP) por la unión al dominio catalítico de tirosina quinasa de tirosina quinasas receptoras y no receptoras. Esta unión competitiva bloquea el inicio de la señalización corriente abajo que conduce a funciones efectoras asociadas con estos eventos de señalización como crecimiento, supervivencia, y angiogénesis. Usando un enfoque estructural y computacional, se identificaron varios compuestos a partir de numerosas bibliotecas combinatorias de química medicinal que inhibían tirosina quinasas.

Se cree que la mayoría de los TKI inhiben el crecimiento de tumores a través de la inhibición directa de la célula tumoral o a través de la inhibición de la angiogénesis. Además, ciertos TKI afectan a la señalización a través de los receptores de la familia de VEGF, incluyendo sorafenib y sunitinib. En algunos casos los TKI han demostrado activar funciones de células dendríticas y otras células inmunes innatas, como células NK. Esto se ha presentado recientemente en modelos animales para imatinib. Imatinib es un TKI que ha demostrado potenciar la actividad citolítica en células dendríticas y células NK (para una revisión, véase Smyth y col., NEJM 354:2282, 2006).

BAY 43-9006 (sorafenib, Nexavar®) y SU 11248 (sunitinib, Sutent®) son dos de estos TKI que se han aprobado recientemente para su uso en carcinoma metastásico de células renales (RCC). Varios otros TKI están en desarrollo en fase tardía o temprana para el tratamiento de diversos tipos de cáncer. Otros TKI incluyen, aunque sin limitación: Imatinib mesilato (Gleevec®, Novartis); Gefitinib (Iressa®, AstraZeneca); Erlotinib clorhidrato (Tarceva®, Genentech); Vandetanib (Zactima®, AstraZeneca); Tipifamib (Zamestra®, Janssen-Cilag); Dasatinib (Sprycel®, Bristol Myers Squibb); Lonafamib (Sarasar®, Schering Plough); Vatalanib succinato (Novartis, Schering AG); Lapatinib (Tykerb®, GlaxoSmithKline); Nilotinib (Novartis); Lestaurtinib (Cephalon); Pazopanib clorhidrato (GlaxoSmithKline); Axitinib (Pfizer); Canertinib diclorhidrato (Pfizer); Pelitinib (National Cancer Institute, Wyeth); Tandutinib (Millennium); Bosutinib (Wyeth); Semaxanib (Sugen, Taiho); AZD-2171 (AstraZeneca); VX-680 (Merck, Vertex); EXEL-0999 (Exelixis); ARRY-142886 (Array BioPharma, AstraZeneca); PD-0325901 (Pfizer); AMG-706 (Amgen); BIBF-1120 (Boehringer Ingelheim); SU-6668 (Taiho); CP-547632 (OSI); (AEE-788 (Novartis); BMS-582664 (Bristol-Myers Squibb); JNK-401 (Celgene); R-788 (Rigel); AZD-1152 HQPA (AstraZeneca); NM-3 (Genzyme Oncology); CP-868596 (Pfizer); BMS-599626 (Bristol-Myers Squibb); PTC-299 (PTC Therapeutics); ABT-869

(Abbott); EXEL-2880 (Exelixis); AG-024322 (Pfizer); XL-820 (Exelixis); OSI-930 (OSI); XL-184 (Exelixis); KRN-951 (Kirin Brewery); CP-724714 (OSI); E-7080 (Eisai); HKI-272 (Wyeth); CHIR-258 (Chiron); ZK-304709 (Schering AG); EXEL-7647 (Exelixis); BAY-57-9352 (Bayer); BIBW-2992 (Boehringer Ingelheim); AV-412 (AVEO); YN-968D1 (Advenchen Laboratories); Midostaurin (Novartis); Perifosine (AEterna Zentaris, Keryx, National Cancer Institute); AG-024322 (Pfizer); AZD-1152 (AstraZeneca); ON-01910Na (Onconova); y AZD-0530 (AstraZeneca).

#### c. Combinaciones con quimioterapia

En ciertas realizaciones, un antagonista de PDGFR $\beta$  y/o VEGF-A se administra en combinación con uno o más agentes quimioterapéuticos. Los agentes quimioterapéuticos tienen diferentes modos de acción, por ejemplo, influyendo en el ADN o ARN e impidiendo la replicación del ciclo celular. Ejemplos de agentes quimioterapéuticos que actúan a nivel de ADN o a nivel de ARN son anti-metabolitos (tales como Azatioprina, Citarabina, Fludarabina fosfato, Fludarabina, Gemcitabina, citarabina, Cladribina, capecitabina 6-mercaptopurina, 6-tioguanina, metotrexato, 5-fluorouracilo e hidroxiurea); agentes alquilantes (tales como Melfalán, Busulfán, Cisplatin, Carboplatino, Ciclofosfamida, Ifosfamida, Dacarabazina, Procarbazina, Clorambucilo, Tiotepa, Lomustina, Temozolamida); agentes anti-mitóticos (tales como Vinorelbina, Vincristina, Vinblastina, Docetaxel, Paclitaxel); inhibidores de topoisomerasa (tales como Doxorubicina, Amsacrina, Irinotecán, Daunorubicina, Epirubicina, Mitomicina, Mitoxantrona, Idarubicina, Tenipósido, Etopósido, Topotecán); antibióticos (tales como actinomicina y bleomicina); asparaginasa; antraciclinas o taxanos.

#### d. Combinaciones con radioterapia

En algunas variaciones, un antagonista de PDGFR $\beta$  y/o VEGF-A se administra en combinación con radioterapia. Ciertos tumores pueden tratarse con radiación o agentes radiofarmacéuticos. La radioterapia se usa habitualmente para tratar tumores no resecables o inoperables y/o metástasis tumorales. La radioterapia normalmente se suministra de tres modos. La irradiación de haz externo se administra a distancia del cuerpo e incluye rayos gamma ( $^{60}\text{Co}$ ) y rayos X. La braquiterapia usa fuente, por ejemplo  $^{60}\text{Co}$ ,  $^{137}\text{Cs}$ ,  $^{192}\text{Ir}$ , o  $^{125}\text{I}$ , con o en contacto con un tejido diana.

#### e. Combinaciones con agentes hormonales

En algunas realizaciones, un antagonista de PDGFR $\beta$  y/o VEGF-A se administra en combinación con una hormona o anti-hormona. Ciertos cánceres están asociados con dependencia hormonal e incluyen, por ejemplo, cáncer de ovario, cáncer de mama, y cáncer de próstata. El tratamiento de cáncer dependiente de hormonas puede comprender el uso de compuestos anti-andrógenos o anti-estrógenos. Las hormonas y anti-hormonas usadas en terapia contra el cáncer incluyen Estramustina fosfato, Poliestradiol fosfato, Estradiol, Anastrozol, Exemestano, Letrozol, Tamoxifeno, Megestrol acetato, Medroxiprogesterona acetato, Octreotida, Ciproterona acetato, Bicalutida, Flutamida, Triterelina, Leuporelina, Buserelina y Goserelina.

### C. Trastornos oculares neovasculares

Varios trastornos oculares implican alteraciones en la angiogénesis y son susceptibles a tratamiento de acuerdo con la presente invención. Dichos trastornos oculares neovasculares incluyen, por ejemplo, degeneración macular relacionada con la edad (por ejemplo, degeneración macular relacionada con la edad "húmeda"), retinopatía diabética, neovascularización del iris, glaucoma neovascular y vitrorretinopatía proliferativa enumerados en las reivindicaciones. En el presente documento también se describe la neovascularización del disco óptico, neovascularización de la córnea, neovascularización vítrea, paño, pterigión, edema macular, edema macular diabético, retinopatía vascular, degeneración de la retina, uveítis, y enfermedades inflamatorias de la retina.

Por ejemplo, la retinopatía diabética, la tercera causa principal de ceguera en los adultos (representando casi el 7 % de los casos de ceguera en los EEUU), está asociada con eventos angiogénicos extensivos. La retinopatía no proliferativa está acompañada por pérdida selectiva de pericitos dentro de la retina, y su pérdida provoca la dilatación de los capilares asociados y un aumento resultante en el flujo de sangre. En los capilares dilatados, las células endoteliales proliferan y forman externalizaciones, que se convierten en microaneurismas, y los capilares adyacentes llegan a bloquearse de modo que el área de retina que rodea estos microaneurismas no está perfundida. Finalmente, aparecen vasos de derivación entre áreas adyacentes de los microaneurismas, y se observa el cuadro clínico de retinopatía diabética temprana con microaneurismas y áreas de retina no perfundida. Los microaneurismas filtran y los vasos capilares pueden sangrar, causando exudados y hemorragias. Una vez se han establecido las fases iniciales de la retinopatía diabética de fondo, la afección progresa durante un periodo de años, desarrollando retinopatía diabética proliferativa y ceguera en aproximadamente el 5 % de los casos. La retinopatía diabética proliferativa aparece cuando algunas áreas de la retina siguen perdiendo sus vasos capilares y quedan no perfundidas, conduciendo a la aparición de nuevos vasos en el disco y otras partes de la retina. Estos nuevos vasos sanguíneos crecen en el vítreo y sangran fácilmente, conduciendo a hemorragias pre-retinianas. En retinopatía diabética proliferativa avanzada, una hemorragia masiva del vítreo puede llenar una parte importante de la cavidad vítrea. Además, los nuevos vasos vienen acompañados por proliferación de tejido fibroso lo que puede conducir a desprendimiento de la retina por tracción.

La retinopatía diabética está asociada principalmente con la duración de diabetes mellitus; por lo tanto, según envejece la población y los pacientes diabéticos viven más tiempo, aumentará la prevalencia de la retinopatía diabética. Actualmente se usa terapia con láser en retinopatía diabética tanto no proliferativa como proliferativa. El tratamiento focal con láser de los microaneurismas filtrantes que rodean el área macular reduce la pérdida visual en el 50 % de los pacientes con edema macular clínicamente significativo. En retinopatía diabética proliferativa, la fotocoagulación panretiniana provoca varios miles de pequeñas quemaduras dispersadas por toda la retina (evitando el área macular); este tratamiento reduce la tasa de ceguera en un 60 por ciento. El tratamiento temprano del edema macular y la retinopatía diabética proliferativa previene la ceguera durante 5 años en el 95 % de los pacientes, mientras que el tratamiento tardío previene la ceguera en solamente el 50 por ciento. Por lo tanto, son esenciales un diagnóstico y tratamiento tempranos.

Otro trastorno ocular que implica neovascularización es degeneración macular relacionada con la edad (AMD), una enfermedad que afecta aproximadamente a uno de cada diez americanos por encima de la edad de 65. La AMD se caracteriza por una serie de cambios patológicos en la mácula, la región central de la retina, que viene acompañada por una disminución en la agudeza visual, afectando particularmente a la visión central. La AMD implica a una única capa de células llamada epitelio de pigmento retiniano que descansa inmediatamente por debajo de la retina sensorial. Estas células nutren y soportan la parte de la retina en contacto con ellas, es decir, las células fotorreceptoras que contienen los pigmentos visuales. El epitelio de pigmento retiniano descansa sobre la membrana de Bruch, una membrana basal compleja que, en AMD, engrosa y se vuelve esclerótica. Nuevos vasos sanguíneos pueden romper a través de la membrana de Bruch desde la coroides subyacente, que contiene un rico lecho vascular. Estos vasos a su vez pueden filtrar fluido o sangrar por debajo del epitelio de pigmento retiniano y también entre el epitelio de pigmento retiniano y la retina sensorial. La posterior cicatrización fibrosa altera la nutrición de las células fotorreceptoras y conduce a su muerte, provocando una pérdida de agudeza visual central. Este tipo de maculopatía relacionada con la edad se llama el tipo "húmedo" a causa de los vasos filtrantes y el edema o sangre subretiniano. El tipo húmedo representa solamente el 10 % de los casos de maculopatía relacionada con la edad pero provoca el 90 % de los casos de ceguera legal a partir de degeneración macular en los ancianos. El tipo "seco" de maculopatía relacionada con la edad implica la desintegración del epitelio de pigmento retiniano junto con pérdida de las células fotorreceptoras superpuestas. El tipo seco reduce la visión pero habitualmente sólo a niveles de 20/50 a 20/100.

La AMD viene acompañada por una distorsión de la visión central con objetos que aparecen más grandes o más pequeños o líneas rectas que aparecen distorsionadas, dobladas, o sin un segmento central. En el tipo húmedo de AMD, puede apreciarse un pequeño desprendimiento de la retina sensorial en el área macular, pero el diagnóstico definitivo de una membrana neovascular subretiniana requiere angiografía con fluoresceína. En el tipo seco, las drusas pueden alterar el patrón de pigmentación en el área macular. Las drusas son excrecencias de la membrana basal del epitelio de pigmento retiniano que sobresalen en las células, causando que se abulten de forma anterior; su papel como factor de riesgo en maculopatía relacionada con la edad no está claro. Actualmente no existe tratamiento para el tipo seco de maculopatía relacionada con la edad. Los tratamientos convencionales para el tipo seco de maculopatía relacionada con la edad incluyen tratamiento con láser, que destruye inicialmente la membrana neovascular y evita una pérdida visual adicional en aproximadamente el 50 % de los pacientes a los 18 meses. En 60 meses, sin embargo, solamente el 20 % aún obtiene beneficio sustancial.

Para uso farmacéutico en el tratamiento de un trastorno ocular neovascular, un antagonista de PDGFR $\beta$  y/o VEGF-A normalmente se formula para inyección intravítrea de acuerdo con procedimientos convencionales. En general, las formulaciones farmacéuticas incluirán el antagonista o antagonistas en combinación con un vehículo farmacéuticamente aceptable, tal como solución salina, solución salina tamponada, dextrosa al 5 % en agua, o similares. En ciertas variaciones para usos oftálmicos, un antagonista de PDGFR $\beta$  y/o VEGF-A se formula en una solución salina tamponada con fosfato a pH 5-7.

La supresión de un trastorno ocular neovascular se evalúa mediante cualquier procedimiento aceptado para medir si la angiogénesis se ralentiza o disminuye. Esto incluye observación directa y evaluación indirecta tal como evaluando síntomas subjetivos o indicaciones fisiológicas objetivas.

La eficacia de tratamiento, por ejemplo, puede evaluarse basándose en la prevención o reversión de la neovascularización, microangiopatía, filtración vascular o edema vascular, o cualquier combinación de los mismos. La eficacia del tratamiento para evaluar la supresión de un trastorno ocular neovascular también puede definirse en términos de estabilización o mejora de la agudeza visual.

En la determinación de la eficacia de una terapia particular en el tratamiento o prevención de un trastorno ocular neovascular, los pacientes también pueden evaluarse clínicamente por un oftalmólogo varios días después de la inyección y al menos un mes después justo antes de la siguiente inyección. También se realizan pruebas de agudeza visual ETDRS, fotografía con kodachrome, y angiopatía con fluoresceína mensualmente durante los primeros 4 meses según necesite el oftalmólogo.

Por ejemplo, para evaluar la eficacia de la terapia con antagonista de PDGFR $\beta$  y/o antagonista de VEGF-A para tratar neovascularización ocular, pueden realizarse estudios que implican la administración de inyecciones intravítreas únicas o múltiples de un antagonista de PDGFR $\beta$  y/o VEGF-A en pacientes que padecen

neovascularización coroidea subfoveal secundaria a degeneración macular relacionada con la edad de acuerdo con procedimientos convencionales bien conocidos en las técnicas oftalmológicas. En un estudio a modo de ejemplo, pacientes con neovascularización coroidea subfoveal (CNV) secundaria a degeneración macular relacionada con la edad (AMD) reciben una única inyección intravítrea de un antagonista de PDGFR $\beta$  y/o VEGF-A. La eficacia del tratamiento se controla, por ejemplo, por evaluación oftálmica. Se acepta que los pacientes que muestran visión estable o mejorada tres meses después del tratamiento, por ejemplo, demostrando una mejora en la línea 3 o mayor en visión con la tabla ETDRS, han recibido una dosis eficaz del antagonista de antagonista de PDGFR $\beta$  y/o VEGF-A que suprime un trastorno ocular neovascular.

La invención se ilustra adicionalmente mediante los siguientes ejemplos no limitantes.

#### **Ejemplo 1: Selección de anticuerpos que se unen a VEGF-A**

Se identificaron anticuerpos que se unen a VEGF-A explorando la biblioteca de fagos Dyax Fab 310 (Dyax Corp., Cambridge, MA). El procedimiento elegido para la selección y exploración de las bibliotecas de fagos-anticuerpos usaba inmunotubos de poliestireno (NUNC, Dinamarca) recubiertos con antígeno (VEGF-A<sub>165</sub>, R&D Systems). Los anticuerpos se aislaron aumentando la rigurosidad después de unas pocas rondas de selección. La primera generación de anticuerpos fue en formato Fab. Los anticuerpos Fab solubles se generaron por digestión con enzima *Mlu*I (n° R0198S, New England Biolabs, Beverly, MA) para retirar la prolongación del gen III del fago M13. Se aplicó la misma estrategia de selección, exploración, y solubilización para anticuerpos en el formato scFv.

#### **Ejemplo 2: Identificación de clones Fab de unión a VEGF-A**

Los clones Fab que se unen a VEGF-A se identificaron mediante un ensayo de unión basado en placa. Se recubrieron placas Costar (n° 9018) de 96 pocillos con 50  $\mu$ l de VEGF-A (R&D Systems) u homodímero de PDGF-D (SEC ID N° 481) a 0,6  $\mu$ g/ml en NaHCO<sub>3</sub> 0,1 M, pH 9,6 durante una noche a 4 °C. El siguiente día, las placas se lavaron tres veces con Tween-20 al 0,1 %/PBS (PBST). Cada pocillo se llenó con 100  $\mu$ l de leche al 2 % (n° 170-6404, Bio-Rad)/PBST durante una hora a TA para el bloqueo. Las placas de ensayo después se lavaron tres veces con PBST. Cada pocillo se llenó con 25  $\mu$ l de leche al 2 %/PBST, seguido de la adición de 25  $\mu$ l de sobrenadante Fab. Los pocillos después se mezclaron e incubaron durante una hora a TA. Las placas se lavaron tres veces con PBST. Para la detección de Fab, se añadieron 50  $\mu$ l de pAb anti-Fab humano específico-HRP (1:4000) (n° 31482, Pierce) en leche al 2 %/PBST a cada pocillo durante una hora a TA. Las placas después se lavaron tres veces con PBST. Se añadieron 50  $\mu$ l de TMB (TMBW-1000-01, BioFX Laboratories) a cada pocillo para el revelado durante 15 min., seguido de la adición de 50  $\mu$ l de tampón de detención (STPR-1000-01, BioFX Laboratories) para inactivar la reacción. Las placas después se leyeron a 450 nm en un lector de placa.

#### **Ejemplo 3: Conversión de sFab de unión a VEGF-A en scFv**

Se amplificaron las regiones variables lambda, kappa, y de cadena pesada a partir de una combinación de ADN de fagos Fab Dyax seleccionados por VEGF-A de brazo A y brazo B en ronda 2 en un proceso de 3 etapas usando cebadores dirigidos contra las secuencias flanqueantes para cada subtipo. La primera ronda de PCR amplifica cada una de las regiones flanqueantes variables y añade proyecciones apropiadas para facilitar las reacciones de la ronda 2 de PCR. Las reacciones de la ronda 2 de PCR añaden secuencias enlazadoras gly/ser apropiadas a los extremos de los productos apropiados de la ronda 1 de PCR y las reacciones de la ronda 3 de PCR solapan los productos de cadena ligera variable lambda, cadena ligera variable kappa, y cadena pesada variable para crear productos scFv en orientaciones tanto LH como HL, que después se clonaron en el vector de presentación en fagos PIMD21 digerido con *Ap*LI/*Not*I.

#### **Ejemplo 4: Identificación de sFab y scFv que inhiben la unión de VEGF a sVEGFR2**

Se exploraron clones Fab y scFv contra VEGF-A mediante un ensayo de neutralización basado en placa. Se recubrieron placas Costar (n° 9018) de 96 pocillos con 100  $\mu$ l de anticuerpo específico anti-IgG humana Fc $\gamma$  (n° 109-005-098, Jackson Immunology) a 1  $\mu$ g/ml en NaHCO<sub>3</sub> 0,1 M, pH 9,6 durante una noche a 4 °C. El siguiente día, las placas se lavaron tres veces con 400  $\mu$ l de Tween-20 al 0,1 %/PBS (PBST). Cada pocillo se llenó con 100  $\mu$ l de BSA al 1 % (n° A3059-100G, SIGMA)/PBST durante una hora a temperatura ambiente (TA) para el bloqueo. Las placas se lavaron tres veces con PBST. Se añadieron 100  $\mu$ l de VEGFR2-Fc (SEC ID N° 482) a 0,2  $\mu$ g/ml en BSA al 1 %/PBST a cada pocillo durante una hora a temperatura ambiente. De forma concurrente, en una placa diferente de 96 pocillos (Costar 3357), se añadieron 65  $\mu$ l de sobrenadante Fab o scFv a 65  $\mu$ l de VEGF-A biotinilado en BSA al 1 %/PBST a 20 ng/ml durante 1 h a temperatura ambiente. Las placas de ensayo bloqueadas se lavaron tres veces con PBST. Cada pocillo se llenó con 100  $\mu$ l de complejo de sobrenadante/VEGF-A biotinilado durante 1 h a temperatura ambiente. Las placas se lavaron tres veces con PBST. Se añadieron 100  $\mu$ l de estreptavidina-HRP (1:4000) (n° 21124, Pierce) en BSA al 1 %/PBST a cada pocillo durante una hora a temperatura ambiente. Las placas después se lavaron tres veces con PBST. Se añadieron 100  $\mu$ l de TMB (TMBW-1000-01, BioFX Laboratories) a cada pocillo para el revelado durante 20 minutos, seguido de la adición de 100  $\mu$ l de tampón de detención (STPR-1000-01, BioFX Laboratories) para inactivar la reacción. Las placas después se leyeron a 450 nm en un lector de placa.

### Ejemplo 5: Medición de las afinidades de unión del receptor-2 de VEGF humano a VEGF-A humano mediante resonancia de plasmón superficial (Biacore)

#### Determinación de la afinidad

Se midieron las constantes de velocidad cinética y las constantes de disociación en equilibrio para la interacción del receptor-2 de VEGF (VEGFR-2) con VEGF-A mediante resonancia de plasmón superficial. La resonancia de plasmón superficial permite controlar las fases tanto de asociación como de disociación durante interacciones biomoleculares (Ohlson, J Mol Recognit, 1997). La constante de velocidad de asociación ( $k_a$  ( $M^{-1}s^{-1}$ )) es un valor que refleja la velocidad de la formación del complejo antígeno-antagonista. La constante de velocidad de disociación ( $k_d$  ( $s^{-1}$ )) es un valor que refleja la estabilidad de este complejo. Dividiendo la constante de velocidad de asociación por la constante de velocidad de disociación ( $k_a/k_d$ ) se obtiene la constante de asociación en equilibrio ( $K_A$  ( $M^{-1}$ )). Dividiendo la constante de velocidad de disociación por la constante de velocidad de asociación ( $k_d/k_a$ ) se obtiene la constante de disociación en equilibrio ( $K_D$  (M)). Este valor describe la afinidad de unión de la interacción. Interacciones con la misma  $K_D$  pueden tener constantes de velocidad de asociación y disociación ampliamente variables. Por consiguiente, medir tanto la  $k_a$  como la  $k_d$  ayuda a describir de forma más precisa la afinidad de la interacción.

#### Materiales y procedimientos

Se completó una serie de experimentos para medir la afinidad de unión de la interacción de VEGFR-2 con VEGF-A. Las mediciones de la cinética y afinidad de unión se obtuvieron usando ensayos de resonancia de plasmón superficial usando un sistema Biacore T100™ (GE Healthcare, Piscataway, NJ). Los procedimientos se programaron usando el Software de control Biacore T100™, v 1.1.1. El VEGF-A humano (R&D Systems) se inmovilizó de forma covalente en el chip sensor CM5 usando química de acoplamiento de amina (EDC:NHS) hasta una densidad de aproximadamente 200 RU. Después de la inmovilización, los sitios activos restantes en la celda de flujo se bloquearon con etanolamina. La proteína unida no específica se retiró lavando con NaOH 50 mM. Se activó una celda de flujo de referencia y después se bloqueó con etanolamina.

Se inyectaron diluciones en serie 1:2 de VEGFR-2 humano-Fc5 que variaban de 200 nM a 3,13 nM sobre la superficie y se dejó que se unieran específicamente al VEGF-A inmovilizado en el chip sensor. Las inyecciones de las concentraciones de VEGFR-2-Fc5 se realizaron con un tiempo de asociación de 10 minutos y un tiempo de disociación de 15 minutos. Los estudios de unión cinética se realizaron con un caudal de 30  $\mu$ l/min. Todos los experimentos de unión se realizaron a 25 °C en un tampón de HEPES 10 mM, NaCl 150 mM, EDTA 3 mM tensioactivo P20 al 0,05 %, pH 7,4. También se realizaron inyecciones de tampón para permitir la sustracción del ruido y la desviación del instrumento. Entre ciclos, la celda de flujo se lavó con glicina 10 mM, pH 1,5 para regenerar la superficie. La estabilidad basal se evaluó para asegurar que la etapa de regeneración proporcionaba una superficie de unión consistente en toda la secuencia de inyecciones.

Los datos se compilaron usando el software de evaluación Biacore T100™ (versión 1.1.1). Los datos se procesaron sustrayendo las inyecciones en la celda de flujo de referencia y de blanco y se evaluó la estabilidad basal para asegurar que la etapa de regeneración proporcionaba una superficie de unión consistente en toda la secuencia de inyecciones. Se comprobaron curvas de inyección por duplicado para la reproducibilidad. Como VEGFR-2-Fc5 y VEGF-A son ambas moléculas dimericas, se determinó que el modelo de analito bivalente era el más apropiado y las curvas de unión resultantes se ajustaron de forma global a este modelo.

#### Resultados

Se caracterizó VEGFR-2 por su afinidad de unión a VEGF-A (resultados resumidos en la Tabla 9). Se midieron las constantes de velocidad de asociación ( $k_a$  ( $M^{-1}s^{-1}$ )) y las constantes de velocidad de disociación ( $k_d$  ( $s^{-1}$ )). Los datos se ajustan bien al modelo de interacción bivalente. Este modelo mide dos valores tanto para  $k_a$  ( $k_{a1}$  y  $k_{a2}$ ) como para  $k_d$  ( $k_{d1}$  y  $k_{d2}$ ). La primera serie de valores ( $k_{a1}$  y  $k_{d1}$ ) describe la cinética monovalente de la interacción que se presentan en la Tabla 9. La afinidad presentada para estas muestras se obtuvo de estos valores, y se denomina  $K_{D1}$ . La  $K_D$  y  $K_A$  se calcularon a partir de los valores de  $k_a$  y  $k_d$ . En estas condiciones de ensayo, la constante de velocidad de disociación en equilibrio para la interacción VEGF-ANEGFR-2 fue de aproximadamente  $1.E^{-8}M$ .

**Tabla 9: Caracterización de afinidad de unión a VEGF-A por VEGFR-2**

Interacción	$k_a$ ( $M^{-1}s^{-1}$ )	$k_d$ ( $s^{-1}$ )	$K_D$ (M)	$K_A$
VEGF-A VEGFR-2	2.E+4	2.E-4	1.E-8	1.E+8

### Ejemplo 6: Medición de las constantes de disociación de la interacción de antagonistas de VEGF-A humano con VEGF-A humano mediante resonancia de plasmón superficial (Biacore)

Se evaluaron antagonistas de VEGF-A humano para su afinidad de unión a VEGF-A humano de acuerdo con sus constantes de velocidad de disociación usando resonancia de plasmón superficial. Se midieron las constantes de velocidad de disociación para la interacción de antagonistas de VEGF-A con VEGF-A mediante resonancia de plasmón superficial. La constante de velocidad de disociación ( $k_d(s^{-1})$ ) es un valor que refleja la estabilidad de este complejo. Es independiente de la concentración y por lo tanto adecuado para seleccionar y clasificar muestras con concentraciones desconocidas.

#### Materiales y procedimientos

Se completó una serie de experimentos para medir la afinidad de unión de antagonistas de VEGF-A a VEGF-A. Los estudios de cinética y afinidad de unión se realizaron en un sistema Biacore T-100™ (GE Healthcare, Piscataway, NJ). Los procedimientos se programaron usando el Software de control Biacore T100™, v 1.1.1. El VEGF-A humano se inmovilizó de forma covalente en un chip sensor CM5 usando química de acoplamiento de amina (EDC:NHS) hasta una densidad de aproximadamente 200 RU. El VEGF-A se inmovilizó solamente en la celda de flujo activa. Después del procedimiento de inmovilización, los sitios activos restantes en la celda de flujo se bloquearon con etanolamina. La proteína unida de forma no específica se retiró lavando con NaOH 50 mM. Se activó una celda de referencia y después se bloqueó con etanolamina.

Los sobrenadantes de antagonista de VEGF-A (seleccionados de una exploración de biblioteca de fagos Dyax) se diluyeron 1:3 en tampón de procesamiento, se inyectaron sobre la superficie y se dejó que se unieran específicamente a VEGF-A en un chip sensor con un tiempo de asociación de 5 minutos y un tiempo de disociación de 5 minutos. Se usaron inyecciones duplicadas de VEGFR-2-Fc5 100 nM y anticuerpo monoclonal anti-VEGF-A 100 nM (Avastin™, Genentech) como controles positivos. Los estudios de unión cinética se realizaron usando un caudal de 30 ul/min. Todos los experimentos de unión se realizaron a 25 °C en tampón de procesamiento de HEPES 10 mM, NaCl 150 mM, EDTA 3 mM tensioactivo P20 al 0,05 %, 1 mg/ml de albúmina sérica bovina, pH 7,4. También se realizaron inyecciones de tampón para permitir la sustracción del ruido y la desviación del instrumento. Entre ciclos, la celda de flujo se lavó con glicina 10 mM, pH 1,5 para retirar los antagonistas de VEGF-A unidos de la superficie.

Los datos se compilaron usando el software de evaluación Biacore T100™ (versión 1.1.1). Los datos se procesaron sustrayendo las inyecciones en la celda de flujo de referencia y de blanco. La estabilidad basal se evaluó para asegurar que la etapa de regeneración proporcionaba una superficie de unión consistente en toda la secuencia de inyecciones. Como las concentraciones de partida de los antagonistas de VEGF-A eran desconocidas, las curvas de unión resultantes se ajustaron de forma global a un modelo de unión de disociación 1:1 para calcular las constantes de velocidad de disociación ( $k_d(s^{-1})$ ).

#### Resultados

Se determinó el análisis de la velocidad de disociación de antagonistas de VEGF-A para VEGF-A humano. Las curvas de unión resultantes se ajustan bien a un modelo de disociación 1:1. Las concentraciones de partida de los antagonistas de VEGF-A eran desconocidas, por lo tanto solamente se presentaron las constantes de velocidad de disociación ( $k_d(s^{-1})$ ) ya que la  $k_d$  es independiente de la concentración. Las constantes de velocidad de disociación calculadas se clasificaron desde la más lenta hasta la más rápida. En estas condiciones de ensayo, los antagonistas de VEGF-A presentan un gran intervalo de constantes de velocidad de disociación ( $1.E^{-5} - 2.E^{-2}(s^{-1})$ ) para su interacción con VEGF-A (véase la Tabla 10). Para una comparación, la  $k_d$  de la interacción VEGFR-2-Fc5 - VEGF-A era de aproximadamente  $2.E^{-4} s^{-1}$  y la interacción anticuerpo monoclonal anti-VEGF-A Avastin™ Fab - VEGF-A era de aproximadamente  $8.E^{-5} s^{-1}$ .

**Tabla 10: Constantes de velocidad de disociación de interacción de antagonistas de VEGF-A con VEGF-A**

scFv y controles	Velocidad de disociación [ $k_d(s^{-1})$ ]
Avastin™	1.E-04
Lucentis™	2.E-05
Avastin™ Fab	8.E-05
c636.1_1	2.E-04
c721.1_1	2.E-04
c721.1_2	2.E-04
c752.1_1	5.E-04
c831.1_1	4.E-04
c1036.1_1	5.E-04

(continuación)

scFv y controles	Velocidad de disociación [ $k_d(s^{-1})$ ]
c1044.1_1	3.E-04
c1090.1_1	3.E-04
c1094.1_1	4.E-04
c1155.1_1	4.E-04
c1080.1_1	2.E-03
c1135.1_1	5.E-04
c1270.1_1	5.E-04
c1285.1_1	6.E-04
c1257.1_1	5.E-04
c1410.1_1	2.E-04
c1476.1_1	2.E-04
c641.1_1	7.E-04
c648.1_1	5.E-04
c868.1_1	6.E-04
c870.1_1	2.E-04
c1039.1_1	2.E-04
c1092.1_1	4.E-03

**Ejemplo 7: Purificación de proteínas derivadas de la fracción periplásmica de *E. coli***

Se expresaron proteínas scFv, scFv en tándem, y sFab en el espacio periplásmico de células *E. coli*. La escala de la fermentación varió de cultivos en matraz de agitación de 25 ml a sistemas de alimentación en lotes de 2 l. Las células *E. coli* se centrifugaron usando una centrifuga hasta sedimentar. El sedimento celular húmedo se resuspendió completamente en tampón periplásmico [Tris 0,2 M, sacarosa al 20 % (p/v), cóctel inhibidor de proteasa sin EDTA completo (Roche) pH 7,5] a una proporción de 2 ml por gramo de peso celular húmedo. La lisozima, una enzima que facilita la degradación de la pared celular puede incluirse o no en el procedimiento. Para determinar si usar o no lisozima, se transfirieron 500  $\mu$ l de sedimento re-suspendido a un tubo eppendorf y se añadieron 30 U de lisozima Ready-Lyse (Epicentre) por  $\mu$ l de tampón periplásmico usado y se incubó la suspensión a temperatura ambiente durante 5 minutos. Después de la incubación, la solución se comprobó para viscosidad aumentada por inversión. Si la solución se sujeta a la pared del tubo, entonces puede que esté sucediendo una lisis celular prematura, y no se incluye la lisozima en la solución preparativa. Si la solución no se sujeta a la pared del tubo, entonces se incluye la lisozima en la solución preparativa. Sin se usa lisozima, se añaden 30 U de lisozima Ready-Lyse (Epicentre) por  $\mu$ l de tampón periplásmico usado y la suspensión se incuba a temperatura ambiente durante 4-6 minutos. Se añadió agua enfriada en hielo a una proporción de 3 ml por gramo de peso de sedimento celular húmedo original y la solución se incubó durante al menos 10 minutos pero no más de 30 minutos. Los esferoplastos restantes se sedimentaron mediante centrifugación a 15.000xg (o 10.000 - 20.000 RPM, lo que sea más rápido) durante al menos 15 minutos, pero no más de 45 minutos, a temperatura ambiente. El sobrenadante que contenía la fracción periplásmica se vertió en un nuevo recipiente y se ajustó a Imidazol 25 mM, NaCl 500 mM usando sólido pesado. Esta solución se filtró a través de a un filtro de 0,22  $\mu$ m antes de la purificación usando un filtro de cuello de botella (Nalgene).

Captura en cromatografía de afinidad por metal inmovilizado (IMAC)

Tradicionalmente, se usó una columna HisTrap HP de 5 ml (GE Healthcare) para la etapa IMAC, sin embargo, el tamaño de la columna puede aumentarse o disminuirse en escala dependiendo de la cantidad de diana scFv en la fracción periplásmica determinada por ensayo analítico IMAC-SEC. La capacidad de unión de esta resina IMAC ha demostrado ser de al menos 20 mg/ml del lecho compactado. Si se usan columnas mayores de 10 ml de tamaño, se prefirían columnas de vidrio Waters (Millipore) con un diámetro interno de 2 y 5 cm. Usando una estación apropiada de cromatografía (Akta Explorer que usa el software UNICORN 4.1 y superior [GE Healthcare] o BioCAD Sprint, 700E, o Vision que usa el software Perfusion Chromatography versión 3.00 o superior [Applied Biosystems]), se equilibró la columna IMAC en  $\text{NaPO}_4$  50 mM, NaCl 500 mM, Imidazol 25 mM pH 7,5 y la fracción periplásmica se cargó sobre la misma a no más de 190 cm/h hasta agotarse. La columna se lavó con tampón de equilibrado hasta que los controles a UV A 254 nm y UV A 280 nm son estables en la línea basal para al menos 2 VC a un caudal que

no exceda 190 cm/h. La proteína unida se eluyó de forma competitiva usando  $\text{NaPO}_4$  50 mM, NaCl 500 mM, Imidazol 400 mM, pH 7,5 a no más de 190 cm/h. Las fracciones de elución se evaluaron para el contenido de proteína mediante UV a A 280 nm, cromatografía analítica por exclusión de tamaño, y SDS-PAGE.

#### Otras técnicas cromatográficas

- 5 La pureza de la combinación IMAC se evaluó por gel SDS-PAGE y cromatografía analítica por exclusión de tamaño (SEC). Si la combinación no era susceptible a limpieza final mediante SEC, se emplearon otras técnicas cromatográficas para purificar adicionalmente la proteína scFv diana de los contaminantes residuales de la célula huésped y los agregados. Estas técnicas convencionales incluían intercambio aniónico, intercambio catiónico, e interacción hidrofóbica. También se usaron otros enfoques basados en afinidad incluyendo, aunque sin limitación: uso de la marca myc c-terminal mediante resina anti-myc o enfoques de afinidad basados en ligandos usando el ligando apropiado acoplado de forma covalente a una perla rígida. La utilidad de estas otras técnicas se determinó sobre una base proteína a proteína.

#### *Cromatografía por exclusión de tamaño (SEC)*

- 15 La cantidad de proteína evaluada por UV a A 280 nm y el procedimiento SEC analítico determinaron el tamaño de la columna de filtración en gel usada: <1 mg = columna 10/300 Superdex 200 GL, 1-10 mg = 16/60 Superdex 200, > 10 mg = 26/60 Superdex 200 (todas GE Healthcare). La combinación de elución IMAC se concentró usando el concentrador de centrifuga Ultracel de 10 kD de MWCO (Millipore) siendo el volumen concentrado final no mayor del 3 % del volumen de la columna de filtración en gel usada. El concentrado se inyectó en la columna y la proteína se eluyó de forma isocrática a un caudal que no excedía de 76 cm/h y no más lento de 34 cm/h. Las fracciones de elución se analizaron por SDS-PAGE, y se preparó la combinación apropiada.

#### Eliminación de endotoxina

- 25 Las especificaciones del producto final respecto a los niveles de endotoxina se determinaron mediante el estado de un grupo particular. La combinación SEC se concentró a >0,25 mg/ml determinada por UV a A 280 nm usando un concentrador de centrifuga Ultracel de 10 kD de MWCO (Millipore). Se pre-humedeció un filtro Mustang E 0,22  $\mu\text{m}$  (PALL) con el tampón de fase móvil SEC y se filtró el concentrado SEC a través del mismo mediante un sistema de suministro con jeringa manual a un caudal de ~1 ml/min. El producto filtrado final se ensayó para endotoxinas usando el sistema PTS EndoSafe (Charles River), concentración mediante UV a A 280 nm, y se separó en alícuotas para su almacenamiento.

#### **Ejemplo 8: Establecimiento de la línea celular indicadora 293/KDR/KZ136**

- 30 Para ensayar la capacidad de las moléculas de neutralizar la actividad VEG-A<sub>165</sub>, se creó una línea celular indicadora de luciferasa. Se sembraron células 293/KDR (Sibtech, Inc. Newington, CT), que expresan de forma estable VEGF-R2 (KDR/Flk-1), a una densidad de 250.000 células/pocillo en placas de 6 pocillos en medio completo (DMEM, suero bovino fetal (FBS) al 10 %, piruvato sódico 1X, GlutaMax 1X (Invitrogen)) y se dejó que se adhirieran durante una noche a 37 °C en una incubadora humidificada en CO<sub>2</sub> al 5 %. El siguiente día, las células se transfectoron usando Lipofectamina 2000 (Invitrogen) y pKZ136 (ZymoGenetics, Inc), un plásmido que contiene un casete STAT-SRE-Luciferasa y marcador de selección en neomicina usando el protocolo del fabricante. La señalización a través de VEGF-R2 inducirá la activación del elemento de respuesta de suero (SRE) y mediará la expresión de luciferasa. En resumen, se añadieron 4  $\mu\text{g}$  de pKZ136 a 250  $\mu\text{l}$  de DMEM sin suero en un tubo y se añadieron 10  $\mu\text{l}$  de reactivo Lipofectamina 2000 a 250  $\mu\text{l}$  de DMEM sin suero en otro tubo. Ambos tubos se mezclaron suavemente, se incubaron 5 min a temperatura ambiente (TA), y se combinaron para un volumen total de 500  $\mu\text{l}$ . Después de 20 minutos a TA, se aspiró el medio completo de las células y los 500  $\mu\text{l}$  de mezcla de Lipofectamina/ADN se añadieron al pocillo. Después de 5 horas a 37 °C, CO<sub>2</sub> al 5 %, se añadieron 2 ml de medio completo y las células se devolvieron a la incubadora y se incubaron durante una noche. El siguiente día, se reemplazó el medio con medio completo que contenía 500  $\mu\text{g}/\text{ml}$  de Geneticina (G418 Sulfato, Invitrogen) y la selección para transfectantes estables sucedió en 10-14 días.

- Después de establecer las células 2931KDR/KZ136 resistentes a Geneticina, se aislaron clones individuales por el procedimiento de dilución limitante. En resumen, se sembraron varias placas de cultivo de 96 pocillos a una densidad de siembra de 0,25 células/pocillo en 200  $\mu\text{l}$  de medio completo. Después de 15-20 días, se aislaron los pocillos que mostraban una única colonia establecida y se exploraron para la actividad luciferasa en respuesta VEGFA-165. Los clones aislados se sembraron por triplicado a una densidad de siembra de 10.000 células/pocillo en placas recubiertas de cultivo celular blancas opacas de 96 pocillos (Costar n° 3917) en medio completo y se dejó que se adhirieran durante una noche. El siguiente día, se retiró el medio completo por aspiración de vacío y se reemplazó con 100  $\mu\text{l}$  de medio sin suero (DMEM, piruvato sódico 1X, GlutaMax 1X, (Invitrogen)) y las células se privaron de suero durante una noche. El siguiente día, se añadió VEGF-A<sub>165</sub> a concentraciones de 0,0263, 0,263, y 2,63 nM en medio sin suero y se incubaron a 37 °C durante 4 horas. La actividad luciferasa se midió usando el sistema de ensayo de Luciferasa (Promega, E1501) y un luminómetro de microplaca (Berthold Technologies) de acuerdo con el protocolo del fabricante. El clon con la mayor actividad luciferasa se denominó 293/KDR/KZ136/c22 y se usó para ensayos de exploración.



**Ejemplo 9: Identificación de scFv neutralizantes anti-VEGF usando el ensayo Luminex de fosforilación de VEGF-R2 inducida por VEGFA de 293/KDR/KZ136/c22**

Para seleccionar moléculas candidatas (scFv, Fab) por su capacidad de neutralizar la actividad de VEGFA, se realizó un ensayo luminex basado en células que mide la fosforilación de VEGF-R2 (KDR/Flk-1). Se sembraron células 293/KDR/KZ136/c22 a una densidad de 20.000 células por pocillo en 100 µl de medio completo (DMEM, suero bovino fetal (FBS) al 10 %, piruvato sódico 1X, GlutaMax 1X (Invitrogen)) en placas transparentes de cultivo tisular de 96 pocillos y se dejó que se adhirieran durante una noche. El siguiente día, se retiró el medio completo por aspiración de vacío y se reemplazó con 100 µl de medio sin suero (DMEM, piruvato sódico 1X, GlutaMax 1X). Las células se incubaron durante una noche.

El siguiente día, las moléculas neutralizantes de VEGF-A candidatas (scFv, Fab), los controles positivos (bevacizumab (anticuerpo monoclonal anti-VEGFA, Genentech), ranibizumab (Fab de afinidad madurada anti-VEGFA, Genentech), y bevacizumab Fab (generado en el propio laboratorio) se diluyeron en serie de 200 nM hasta 12 pM a diluciones 1:5 junto con un agente no neutralizante (medio solamente) en medio sin suero. A éstas, se añadió un volumen igual de VEGF-A<sub>165</sub> a 0,54 nM para una concentración final de VEGF-A 0,26 nM y 100 nM a 6 pM de molécula neutralizante o control positivo. Éstas se incubaron durante 60 minutos a 37 °C.

Después de la incubación, se retiró el medio de las células privadas de suero por aspiración de vacío y se reemplazó con 100 µl de los complejos anteriores. Las células se incubaron durante 10 minutos a 37 °C. Después de la incubación, se retiró el medio por aspiración de vacío y las células se lavaron suavemente con 100 µl de solución salina tamponada con fosfato enfriada en hielo (PBS, Invitrogen). El PBS se retiró por aspiración de vacío y las células se lisaron en 25 µl de tampón de lisis NP-40 (Invitrogen nº Cat. FNN0021) que contenía PMSF 1 mM (Sigma, P-2714 en DMSO) y 1 Mini comprimido completo por 10 ml (Roche, 11836153001). Los lisados se incubaron durante 20 minutos a 4 °C sobre un agitador de plataforma y se centrifugaron a 3000 rpm durante 10 min a 4 °C para aclarar los lisados. Los lisados se transfirieron a una placa nueva de microtitulación de 96 pocillos y se colocaron a -20 °C hasta el ensayo.

Para el ensayo luminex de fosforilación de VEGF-R2, se usó el kit de reactivo de tampón de proteína intracelular (Invitrogen LHB0002) y el kit de perlas de anticuerpo contra VEGFR2 [pY1059] (Invitrogen LHO0601) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Los lisados se descongelaron y mezclaron 1:5 con 80 µl de *diluyente de ensayo*. Se pre-humedecieron los pocillos de una placa de filtración al vacío luminex con 200 µl de *solución de lavado de trabajo*. Las perlas diluidas se añadieron a 25 µl por pocillo y se lavaron 2X con 200 µl de *solución de lavado de trabajo*. Después del lavado, se añadieron 50 µl de lisado diluido, y 50 µl de anticuerpo detector diluido a cada pocillo y las placas se cubrieron en papel de plata y se incubaron durante 3 horas a temperatura ambiente (TA) en un agitador de plataforma a 500 rpm. Después de la incubación, las perlas se lavaron 2X con 200 µl de solución de lavado de trabajo y después se añadieron 100 µl de *Anti-IgG de conejo-RPE* diluido a cada pocillo y las placas se cubrieron en papel de plata y se incubaron durante 30 minutos a TA en un agitador de plataforma a 500 rpm. Después de la incubación, las perlas se lavaron 3X con 200 µl de *solución de lavado de trabajo*, y se resuspendieron en 125 µl de *solución de lavado de trabajo*. Las perlas se resuspendieron durante 30 segundos en un agitador de plataforma a 500 rpm y se leyeron en un instrumento Luminex-100 (BioRad). Los datos se analizaron usando un software analítico (Spotfire) y se calcularon los valores de CI<sub>50</sub> para cada candidato y control.

La acción de unión de VEGF-A<sub>165</sub> a su receptor, VEGF-R2 (KDR/Flk-1), induce la fosforilación del receptor. Este ensayo basado en luminex une el VEGF-R2 total a una perla marcada de forma fluorescente conjugada con un anticuerpo anti-VEGF-R2. Se usa un anticuerpo secundario que detecta la fosforilación en [pY1059] para detectar cuánto VEGF-R2 se ha fosforilado. Una disminución en la fosforilación del receptor indica que esta activación mediada por VEGF-A se está neutralizando.

**Ejemplo 10: Ensayo de reactividad cruzada de scFv de unión a VEGF contra VEGF-A murino**

Para seleccionar moléculas candidatas (scFv, Fab) por su capacidad de neutralizar la actividad de VEGFA *murino*, se realizó un ensayo luminex basado en células que mide la fosforilación de VEGF-R2 (KDR/Flk-1). Como mVEGF-164 reaccionará de forma cruzada con VEGF-R2 humano, puede usarse un sistema indicador basado en VEGF-R2 humano. Se sembraron células 293/KDR/KZ136/c22 a una densidad de 20.000 células por pocillo en 100 µl de medio completo (DMEM, suero bovino fetal (FBS) al 10 %, piruvato sódico 1X, GlutaMax 1X (Invitrogen)) en placas transparentes de cultivo tisular de 96 pocillos y se dejó que se adhirieran durante una noche. El siguiente día, se retiró el medio completo por aspiración de vacío y se reemplazó con 100 µl de medio sin suero (DMEM, piruvato sódico 1X, GlutaMax 1X). Las células se incubaron durante una noche.

El siguiente día, las moléculas neutralizantes de VEGF-A candidatas (scFv, Fab) se diluyeron en serie de 200 nM hasta 12 pM en diluciones 1:5 junto con un agente no neutralizante (medio solamente) en medio sin suero. Se usó VEGF-R2-Fc como control positivo para la neutralización. A esto se añadió un volumen igual de mVEGF-A<sub>164</sub> (493-MV-005, R&D Systems) a 0,54 nM para una concentración final de 0,26 nM de VEGA y 100 nM a 6 pM de molécula neutralizante o control positivo. Éstas se incubaron durante 60 minutos a 37 °C.

Después de la incubación, se retiró el medio de las células privadas de suero por aspiración de vacío y se reemplazó con 100 µl de los complejos anteriores. Las células se incubaron durante 10 minutos a 37 °C. Después de la incubación, se retiró el medio por aspiración de vacío y las células se lavaron suavemente con 100 µl de solución salina tamponada con fosfato enhiada en hielo (PBS, Invitrogen). El PBS se retiró por aspiración de vacío y las células se lisaron en 25 µl de tampón de lisis NP-40 (Invitrogen nº Cat. FNN0021) que contenía PMSF 1 mM (Sigma, P-2714 en DMSO) y 1 mini comprimido completo por 10 ml (Roche, 11836153001). Los lisados se incubaron durante 20 minutos a 4 °C en un agitador de plataforma y se centrifugaron a 3000 rpm durante 10 min a 4 °C para aclarar los lisados. Los lisados se transfirieron a una placa nueva de microtitulación de 96 pocillos y se colocaron a -20 °C hasta el ensayo.

Para el ensayo luminex de fosforilación de VEGF-R2, se usó el kit de reactivo de tampón de proteína intracelular (Invitrogen LHB0002) y el kit de perlas de anticuerpo contra VEGFR2 [pY1059] (Invitrogen LHO0601) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Los lisados se descongelaron y mezclaron 1:5 con 80 µl de *diluyente de ensayo*. Se pre-humedecieron los pocillos de una placa de filtración al vacío luminex con 200 µl de *solución de lavado de trabajo*. Las perlas diluidas se añadieron a 25 µl por pocillo y se lavaron 2X con 200 µl de *solución de lavado de trabajo*. Después del lavado, se añadieron 50 µl de lisado diluido, y 50 µl de anticuerpo detector diluido a cada pocillo y las placas se cubrieron en papel de plata y se incubaron durante 3 horas a temperatura ambiente (TA) en un agitador de plataforma a 500 rpm. Después de la incubación, las perlas se lavaron 2X con 200 µl de solución de lavado de trabajo y después se añadieron 100 µl de *Anti-IgC de conejo-RPE* diluido a cada pocillo y las placas se cubrieron en papel de plata y se incubaron durante 30 minutos a TA en un agitador de plataforma a 500 rpm. Después de la incubación, las perlas se lavaron 3X con 200 µl de *solución de lavado de trabajo*, y se resuspendieron en 125 µl de *solución de lavado de trabajo*. Las perlas se resuspendieron durante 30 segundos en un agitador de plataforma a 500 rpm y se leyeron en un instrumento Luminex-100 (BioRad). Los datos se analizaron usando un software analítico (Spotfire) y se calcularon los valores de CI<sub>50</sub> para cada candidato y control.

La acción de unión de mVEGF-A<sub>164</sub> al receptor humano, VEGF-R2 (KDR/Flk-1), induce la fosforilación del receptor. Este ensayo basado en luminex une el VEGF-R2 total a una perla marcada de forma fluorescente conjugada con un anticuerpo anti-VEGF-R2. Se usa un anticuerpo secundario que detecta la fosforilación en [pY1059] para detectar cuánto VEGF-R2 se ha fosforilado. Una disminución en la fosforilación del receptor indica que esta activación mediada por mVEGF-A<sub>164</sub> se está neutralizando.

#### **Ejemplo 11: Identificación de scFv neutralizantes anti-VEGF usando el ensayo de luciferasa basado en células inducido por VEGF-A de 293/KDR/KZ136/c22**

Para seleccionar moléculas candidatas (scFv, Fab) por su capacidad de neutralizar la actividad de VEGFA, se realizó un ensayo de luciferasa basado en células. Se sembraron células 293/KDR/KZ136/c22 a una densidad de siembra de 10.000 células por pocillo en placas tratadas con cultivo tisular blancas opacas de 96 pocillos (Costar nº 3917) en 100 µl de medio completo (DMEM, suero bovino fetal (FBS) al 10 %, piruvato sódico 1X, GlutaMax 1X (Invitrogen)) y se incubaron 48 horas en a 37 °C en una incubadora humidificada de CO<sub>2</sub> al 5 %. Después de 48 horas, se retiró medio completo por aspiración de vacío y se reemplazó con 100 µl de medio sin suero (DMEM, piruvato sódico 1X, GlutaMax 1X (Invitrogen)) y se incubaron durante una noche.

El siguiente día, las moléculas neutralizantes de VEGFA candidatas (scFv, Fab), los controles positivos (bevacizumab (anticuerpo monoclonal anti-VEGFA, Genentech), ranibizumab (Fab de afinidad madurada anti-VEGFA, Genentech), y bevacizumab Fab generado en el propio laboratorio) se diluyeron en serie de 200 nM hasta 12 pM en diluciones 1:5 junto con un agente no neutralizante (medio solamente) en medio sin suero. A esto se añadió un volumen igual de VEGFA-165 a 0,54 nM para una concentración final de 0,26 nM de VEGFA y 100 nM a 6 pM de molécula neutralizante o control positivo. Éstas se incubaron durante 60 minutos a 37 °C. Después de la incubación, se retiró por aspiración el medio de las células privadas de suero y se añadieron 100 µl de los complejos anteriores y se incubaron a 37 °C durante 4 horas.

Después de 4 horas de incubación, se realizó un ensayo de luciferasa usando el sistema de ensayo de Luciferasa (Promega, E1501) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. En resumen, se aspiró el medio y se añadieron 25 µl de tampón is 1X (Promega, E153A) a cada pocillo. Las placas se incubaron durante 20-30 minutos a TA para equilibrarlas. La actividad luciferasa se midió usando a luminómetro de microplaca (Berthold Technologies), 40 µl de inyección de sustrato, 1 segundo de tiempo de integración. Los datos se analizaron usando un software analítico (Spotfire) y se calcularon los valores CI<sub>50</sub> para cada candidato y control.

La acción de unión de VEGF-A<sub>165</sub> a su receptor, VEGF-R2 (KDR/Flk-1), induce una cascada de señalización que activa STAT (transductor de señales y activador de la transcripción) y/o SRE (elemento de respuesta de suero) que dirige la transcripción del gen indicador de luciferasa. Una disminución en la actividad luciferasa indica que esta señalización mediada por VEGFA se está neutralizando.

Resultados

Los scFv y BiAb enumerados en las siguientes Tablas 11 y 12 se seleccionaron en el ensayo de luciferasa por la neutralización de la actividad inducida por VEGF. Se demostró inhibición significativa con varios scFv y BiAb seleccionados (presentados como valores de CI50 en las Tablas 11 y 12). Los valores de CI50 se indican como concentración nM del scFv necesaria para neutralizar la actividad VEGF en un 50 %. Bevacizumab (Avastin™), Lucentis™, y Avastin™ Fab (generado en el propio laboratorio) se usaron como controles para la actividad.

5

**Tabla 11: Actividad de neutralización de scFv anti-VEGF-A en ensayo de Luciferasa basado en células**

scFv y controles	CI50 (nM) de Luciferasa
Avastin™	0,1-0,4
Lucentis™	0,1-0,5
Avastin™ Fab	2,9-6,45
c636.1_1	0,10
c721.1_1	1,47
c721.1_2	0,23
c752.1_1	1,09
c831.1_1	0,25
c1036.1_1	0,31
c1044.1_1	0,09
c1090.1_1	0,43
c1094.1_1	0,95
c1155.1_1	0,2
c1080.1_1	0,01
c1135.1_1	0,4
c1270.1_1	0,3
c1285.1_1	0,13
c1257.1_1	0,34
c1410.1_1	0,08
c1476.1_1	0,2
c641.1_1	3,1
c648.1_1	0,2
c868.1_1	0,5
c870.1_1	0,3
c1039.1_1	0,07
c1092.1_1	15,23

**Tabla 12: Actividad de neutralización de BiAb anti-VEGF-A en ensayo de Luciferasa basado en células**

BiAb	CI50 (nM) de Luciferasa
A2096F (c1111) BiAb	0,13
A2100F (c868) BiAb	0,212
A2105F (c868) dímero	0,22
A2097F (c870) BiAb	0,335
A2099F (c1039) BiAb	0,04
A2101F (c1081) BiAb	10,08
A2098F (c1092) BiAb	2,33
162.6262/bevacizumab Biab	0,08

**Ejemplo 12: Ensayo de proliferación para determinar la actividad neutralizante de scFv contra VEGFA sobre células HUVEC estimuladas con VEGF-A**

- 5 Para seleccionar un scFv neutralizante de VEGF-A que tuviera afinidad moderada por VEGF-A, se ejecutó un ensayo de <sup>3</sup>H-timidina. Se usó VEGF-A<sub>165</sub> humano recombinante como control positivo a 2,6 nM. Se usó medio DMEM-F12 (1:1) con insulina-transferrina-selenio 1x (medio sin suero, SFM; Invitrogen, Carlsbad, CA) como control negativo. Se diluyó en serie el scFv contra VEGF-A humano en SFM a 500 nM, 50 nM, 5 nM, 0,5 nM, 0,05 nM, 0,005 nM, y 0,0005 nM. Se sembraron células endoteliales de la vena umbilical humana (HUVEC) en placas de fondo plano de 96 pocillos en un volumen de 100 µl a una densidad de 900-1000 células por pocillo. Las células HUVEC
- 10 se sembraron durante 2 días en medio EGM-2 MV completo (Lonza, Walkersville, MD) a 37 °C, CO<sub>2</sub> al 5 %. Las células se privaron de suero con SFM durante 24 h, se estimularon durante 24 h con 2,6 nM con o sin el scFv contra VEGF-A diluido en serie, y se pulsaron durante 24 h con 1 µCi por pocillo de <sup>3</sup>H-timidina, que se incorpora en células en proliferación (todo a 37 °C, CO<sub>2</sub> al 5 %). Las células se recogieron y contaron usando un instrumento Topcount (Hewlett Packard).
- 15 Resultados: Una gran cantidad de scFv y BiAb seleccionados en el ensayo mostraron potente neutralización de proliferación de HUVEC inducida por VEGF como se observa por los bajos valores nM de CI50 en las siguientes Tablas 13 y 14.

**Tabla 13: Actividad de neutralización de scFv anti-VEGF-A en ensayo de proliferación de HUVEC**

scFv y controles	CI50 (nM) de proliferación
Avastin <sup>TM</sup>	0,3-0,6
Lucentis <sup>TM</sup>	0,3-0,8
Avastin <sup>TM</sup> Fab	14-17
c636.1_1	0,99
c721.1_1	7,45
c721.1_2	1,67
c752.1_1	2,90
c831.1_1	0,25
c1036.1_1	0,72
c1044.1_1	0,43
c1090.1_1	0,61
c1094.1_1	1,0
c1155.1_1	0,13
c1080.1_1	0,58
c1135.1_1	0,99
c1270.1_1	0,9
c1285.1_1	0,86
c1257.1_1	2,2
c1410.1_1	0,65
c1476.1_1	0,17
c641.1_1	6,3

(continuación)

scFv y controles	CI50 (nM) de proliferación
c648.1_1	0,01
c868.1_1	3,1
c870.1_1	0,8
c1039.1_1	0,77
c1092.1_1	16,6

**Tabla 14: Actividad de neutralización de BiAb y dímero anti-VEGF-A en ensayo de proliferación de HUVEC**

BiAb y dímeros	CI50 (nM) de proliferación
A2096F (c1111) BiAb	2,27
A2100F (c868) BiAb	0,57
A2105F (c868) dímero	0,84
A2097F (c870) BiAb	0,8
A2099F (c1039) BiAb	0,19
A2101F (c1081) BiAb	4,15
A2098F (c1092) BiAb	1,08
162.6262/bevacizumab BiAb	2,27

**Ejemplo 13: Construcción y expresión del plásmido PDGFR $\beta$ -Fc5 pZMP45 en células 293F**

Se construyó un plásmido de expresión que codificaba PDGFR $\beta$ -Fc5 en el vector pZMP45 mediante recombinación homóloga en levaduras. El fragmento PDGFR $\beta$ -Fc5 se creó con PCR, usando un plásmido de expresión pre-existente que contenía la secuencia Fc5 de PDGFR $\beta$  (aminoácidos 1-530) como molde. El cebador directo zc58363 (CTCTCCACAGGTGTCCTCGAGAATTCATATAGGCCGGCCACCATGCGGCTTCCGGGTGCGATGCCAG; SEC ID N° 483) creó un solapamiento 5' en pZMP45, y el cebador inverso zc52514 (GGGGTGGGTACAACCCAGAGCTGTTTTAAGCGCGCCTCTAGATTATTTACCCGGAGACAGGGAGAGGCTCT T; SEC ID N° 484) creó un solapamiento 3' en pZMP45.

Las condiciones de PCR, usando Platinum® PCR SuperMix High Fidelity (Invitrogen, n° Cat. 12532-016), fueron las siguientes: 1 ciclo 94 °C durante 2 min; 30 ciclos 94 °C durante 30 s, 55 °C durante 30 s, 68 °C durante 2:30 min; después mantenimiento a 4 °C. La mezcla de reacción de PCR después se procesó en un gel de agarosa al 1 % con TAE 1x. La banda correcta se escindió y se purificó usando el kit de purificación de gel de Qiagen (Qiagen, n° catálogo 28704).

El plásmido pZMP45 es un vector de expresión de mamífero que contiene un casete de expresión que tiene el promotor/potenciador temprano inmediato de CMV, el intrón A de CMV, múltiples sitios de restricción para la inserción de secuencias codificantes, y una secuencia peptídica señal tPA optimizada, el terminador de SV40, un origen de replicación de *E. coli*, y las secuencias URA3 y CEN-ARS necesarias para la selección y replicación en *S. cerevisiae*.

Se combinaron cien  $\mu$ l de células de levadura electrocompetentes (*S. cerevisiae*) con 4  $\mu$ l de ADN purificado de lo anterior, se mezclaron con 100 ng de plásmido pZMP45 cortado con BglII, y se transfirieron a una cubeta de electroporación de 0,2 cm. La mezcla de levadura-ADN se electropulsó a 0,75 kV (5 kV/cm),  $\infty$  ohm, 25  $\mu$ F. A cada cubeta se añadió 1 ml de sorbitol 1,2 M, y las levaduras se sembraron en una placa URA-DS y se incubaron a 30 °C. Después de aproximadamente 72 horas, se resuspendieron aproximadamente 50  $\mu$ l de células de levadura compactadas recogidas de los transformantes de levadura Ura+ de una única placa en 100  $\mu$ l de tampón de lisis (Triton X-100 al 2 %, SDS al 1 %, NaCl 100 mM, Tris 10 mM, pH 8,0, EDTA 1 mM), 100  $\mu$ l de tampón Qiagen P1 de un kit Qiagen miniprep (Qiagen, Valencia, CA, n° catálogo 27104), y 20 U de Zimoliasa (Zymo Research, Orange, CA, n° catálogo 1001). Esta mezcla se incubó durante 30 minutos a 37 °C, y se realizó el resto del protocolo Qiagen miniprep, partiendo con la adición de reactivo P2. El ADN se eluyó con 40  $\mu$ l de reactivo EB.

Se transformaron quince  $\mu$ l de células *E. coli* electrocompetentes (DH12S, Invitrogen, Carlsbad, CA) con 2  $\mu$ l de ADN de levadura en una cubeta de electroporación de 0,2 cm. Las células se electropulsaron a 1,75 kV, 25  $\mu$ F, y 400 ohm. Después de la electroporación, se añadió 1 ml de SOC (Bacto Triptona al 2 % (Difco, Detroit, MI), extracto de levadura al 0,5 % (Difco), NaCl 10 mM, KCl 2,5 mM, MgCl<sub>2</sub> 10 mM, MgSO<sub>4</sub> 10 mM, glucosa 20 mM) a la cubeta. Esta solución se sembró en dos placas LB AMP (caldo LB (Lennox), Bacto Agar al 1,8 % (Difco), 100 mg/l de

ampicilina), una con 200 µl de transformantes, la segunda con 100 µl.

Se picaron los clones individuales de las placas de transformación, y se secuenciaron para identificar un clon que contuviera la construcción de expresión correcta para PDGFRβ-Fc5. Se aisló el ADN plasmídico a mayor escala usando el kit Invitrogen mega prep (Invitrogen, Carlsbad, CA, n° catálogo 457009) de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

#### Transfección en células 293F

Para ensayar la expresión de PDGFRβ-Fc5, se transfectaron de forma transitoria 1 millón de células 293F usando 1 µg de ADN plasmídico y 1,3 µl de Lipofectamina2000 (Invitrogen, Carlsbad, CA, n° catálogo 11668-019) en 100 µl de OptiMEM (Invitrogen, Carlsbad, CA, n° catálogo 31985-070), siguiendo el procedimiento del producto Lipofectamina2000. Las células se cultivaron en un pocillo de una placa de 12 pocillos, agitando a 120 rpm, 37 °C, CO<sub>2</sub> al 6 %. Después de 96 horas, se recogió el medio y se preparó para ensayo de transferencia de Western.

Se usaron materiales y protocolos Invitrogen para la transferencia de Western con HRP-anticuerpo de cabra anti-IgG humana (H+L) (Jackson ImmunoResearch n° catálogo 109-035-003) como anticuerpo de detección. Se observó expresión significativa, de modo que se inició una transfección a gran escala.

#### **Ejemplo 14: Selección de anticuerpos que se unen a PDGFRβ**

Se identificaron anticuerpos que se unen al dominio extracelular de PDGFRβ explorando bibliotecas de fagos Dyax Fab 310 y 410 (Dyax Corp., Cambridge, MA). La selección y exploración de las bibliotecas de fagos-anticuerpos usaron antígeno biotinilado inmovilizado (PDGFRβ-Fc5; SEC ID N° 486) capturado sobre perlas magnéticas, Dynabeads M-280 Estreptavidina (n° 112-06D, Invitrogen Dynal AS, Oslo, Noruega). Los anticuerpos se aislaron aumentando la rigurosidad después de unas pocas rondas de selección. La primera generación de anticuerpos estaba en el formato Fab. Los anticuerpos Fab solubles se generaron por digestión con enzima *MluI* (n° R0198S, New England Biolabs, Beverly, MA) para retirar el gen 3 del fago M 13. Se aplicó la misma estrategia de selección, exploración y solubilización para anticuerpos en el formato scFv.

#### **Ejemplo 15: Ensayo de unión basado en placa para PDGFRβ**

Los clones positivos del formato Fab para PDGFRβ se seleccionaron mediante un ensayo de unión basado en placa. Se recubrieron placas Costar (n° 9018) de 96 pocillos con 50 µl de anticuerpo anti-IgG humana Fcg-específico (n° 109-005-098, Jackson Immunology) a 1 µg/ml en NaHCO<sub>3</sub> 0,1 M, pH 9,6 durante una noche a 4 °C. El siguiente día, las placas se lavaron tres veces con Tween-20 al 0,1 %/PBS (PBST). Cada pocillo se llenó con 100 µl de leche al 5 % (n° 170-6404, Bio-Rad)/PBST durante una hora a temperatura ambiente (TA) para el bloqueo. Se añadieron 50 µl de PDGFRβ-Fc5 (SEC ID N° 486) o 1L-27RA-Fc5 (SEC ID N° 487) a 0,25 µg/ml en BSA al 2 % (n° 160069 MB Biomedicals)/PBST a cada pocillo durante una hora a TA. Las placas se lavaron tres veces con PBST. Cada pocillo se llenó con 100 µl de leche al 5 %/PBST durante una hora a TA para el bloqueo. Las placas de ensayo después se lavaron tres veces con PBST. Cada pocillo se llenó con 50 µl de Fab. Los pocillos después se mezclaron y después se incubaron durante una hora a TA. Las placas se lavaron tres veces con PBST. Para la detección de Fab, se añadieron 50 µl de pAb anti-Fab humano específico-HRP (1:4000) (n° 31482, Pierce) en BSA al 2 %/PBST a cada pocillo durante una hora a TA. Las placas después se lavaron tres veces con PBST. Se añadieron 50 µl de TMB (TMBW-1000-01, BioFX Laboratories) a cada pocillo para revelar durante 10-20 min, seguido de la adición de 50 µl de tampón de detención (STPR-1000-01, BioFX Laboratories) para inactivar la reacción. Las placas después se leyeron a 450 nm en un lector de placa.

#### **Ejemplo 16: Conversión de Fab-scFv contra PDGFRβ**

Se amplificaron las regiones variables lambda, kappa, y de cadena pesada a partir de una combinación de 10 brazos de ADN de fagos Fab Dyax seleccionados para PDGFRβ de ronda 2 en un proceso de 3 etapas usando cebadores dirigidos contra las secuencias flanqueantes para cada subtipo. La primera ronda de PCR amplifica cada una de las regiones flanqueantes variables y añade proyecciones apropiadas para facilitar las reacciones de la ronda 2 de PCR. Las reacciones de la ronda 2 de PCR añaden secuencias enlazadoras gly/ser apropiadas a los extremos de los productos apropiados de la ronda 1 de PCR y las reacciones de la ronda 3 de PCR solapan los productos de cadena ligera variable lambda, cadena ligera variable kappa y cadena pesada variable para crear productos scFv en ambas orientaciones LH y HL, que después se clonaron en el vector de presentación en fagos PIMD21 digerido con *ApaI/NotI*.

#### **Ejemplo 17: Identificación de sFab y scFv neutralizantes usando un ensayo de neutralización basado en placa para PDGFRβ**

Se seleccionaron Fab y scFv contra PDGFRβ mediante un ensayo de neutralización basado en placa. Se recubrieron placas Costar (n° 9018) de 96 pocillos con 50 µl de anticuerpo anti-IgG humana Fcg-específico (n° 109-005-098, Jackson Immunology) a 1 µg/ml en NaHCO<sub>3</sub> 0,1 M, pH 9,6 durante una noche a 4 °C. El siguiente día, las

placas se lavaron tres veces con Tween-20 al 0,1 %/PBS (PBST). Cada pocillo se llenó con 100 µl de leche al 5 % (nº 170-6404, Bio-Rad)/PBST durante una hora a temperatura ambiente (TA) para el bloqueo. Se añadieron 50 µl de PDGFRβ (preparado en el propio laboratorio) a 0,25 µg/ml en BSA al 2 % (nº 160069 MB Biomedicals)/PBST a cada pocillo durante una hora a TA. Las placas se lavaron tres veces con PBST. Cada pocillo se llenó con 100 µl de leche al 5 %/PBST durante una hora a TA para el bloqueo. Las placas de ensayo después se lavaron tres veces con PBST. Cada pocillo se llenó con 50 µl de una mezcla (1:1) de sobrenadante Fab o scFv y homodímero PDGF-B biotinilado (SEC ID Nº 488) (PDGF-BB) a 0,01 12 µg/ml en BSA al 2 %/PBST durante una hora a TA. Las placas se lavaron tres veces con PBST. Se añadieron 50 µl de (1:3000) estreptavidina-HRP (nº 21124, Pierce) en BSA al 2 %/PBST a cada pocillo durante una hora a TA. Las placas después se lavaron tres veces con PBST. Se añadieron 50 µl de TMB (TMBW-1000-01, BioFX Laboratories) a cada pocillo para revelar durante 20 - 30 min, seguido de la adición de 50 µl de tampón de detención (STPR-1000-01, BioFX Laboratories) para inactivar la reacción. Las placas después se leyeron a 450 nm en un lector de placa.

#### **Ejemplo 18: Medición de las afinidades de unión de PDGF-BB humano al receptor-β de PDGF humano mediante resonancia de plasmón superficial (Biacore)**

Se midieron las constantes de velocidad cinética y las constantes de disociación en equilibrio para la interacción de PDGFR-β-Fc5 con el PDGF-BB mediante resonancia de plasmón superficial. La resonancia de plasmón superficial permite controlar las fases tanto de asociación como de disociación durante interacciones biomoleculares (Ohlson, *J. Mol. Recogni.*, 1997). La constante de velocidad de asociación ( $k_a$  ( $M^{-1}s^{-1}$ )) es un valor que refleja la velocidad de la formación del complejo antígeno-antagonista. La constante de velocidad de disociación ( $k_d$  ( $s^{-1}$ )) es un valor que refleja la estabilidad de este complejo. Dividiendo la constante de velocidad de asociación por la constante de velocidad de disociación ( $k_a/k_d$ ) se obtiene la constante de asociación en equilibrio ( $K_A$  ( $M^{-1}$ )). Dividiendo la constante de velocidad de disociación por la constante de velocidad de asociación ( $k_d/k_a$ ) se obtiene la constante de disociación en equilibrio ( $K_D$  (M)). Este valor describe la afinidad de unión de la interacción. Interacciones con la misma  $K_D$  pueden tener constantes de velocidad de asociación y disociación ampliamente variables. Por consiguiente, medir tanto la  $k_a$  como la  $k_d$  ayuda a describir de forma más precisa la afinidad de la interacción.

#### Determinación de la afinidad

Se midieron las constantes de velocidad cinética y las constantes de disociación en equilibrio para la interacción de PDGF-BB con PDGFR-β-Fc5 mediante resonancia de plasmón superficial. La constante de velocidad de asociación ( $k_a$  ( $M^{-1}s^{-1}$ )) es un valor que refleja la velocidad de la formación del complejo antígeno-antagonista. La constante de velocidad de disociación ( $k_d$  ( $s^{-1}$ )) es un valor que refleja la estabilidad de este complejo. Dividiendo la constante de velocidad de asociación por la constante de velocidad de disociación ( $k_a/k_d$ ) se obtiene la constante de asociación en equilibrio ( $K_A$  ( $M^{-1}$ )). Dividiendo la constante de velocidad de disociación por la constante de velocidad de asociación ( $k_d/k_a$ ) se obtiene la constante de disociación en equilibrio ( $K_D$  (M)). Este valor describe la afinidad de unión de la interacción. Interacciones con la misma  $K_D$  pueden tener constantes de velocidad de asociación y disociación ampliamente variables. Por consiguiente, medir tanto la  $k_a$  como la  $k_d$  ayuda a describir de forma más precisa la afinidad de la interacción.

#### Materiales y procedimientos

Se completó una serie de experimentos para medir la afinidad de unión de la interacción de PDGF-BB con PDGFR-β. Los estudios de cinética y afinidad de unión se realizaron en un sistema Biacore T100™ (GE Healthcare, Piscataway, NJ). Los procedimientos se programaron usando el Software de control Biacore T100™, v 1.1.1. Para capturar la molécula de fusión PDGFR-β-Fc5, se inmovilizó de forma covalente anticuerpo de cabra anti-IgG humana Fc-gamma (Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA) en un chip sensor CM5 usando química de acoplamiento de amina (EDC:NHS) hasta una densidad de aproximadamente 10.000 RU. Después se inyectó PDGFR-β-Fc5 en esta superficie a un caudal de 10 µl/min durante 90 segundos para capturar aproximadamente 500 RU.

Se inyectaron diluciones 1:3 en serie de PDGF-BB humano que variaban de 1,37 nM a 0,02 nM sobre la superficie y se dejó que se unieran específicamente al PDGFR-β-Fc5 inmovilizado en un chip sensor. Las inyecciones de las concentraciones de PDGF-BB se realizaron con un tiempo de asociación de 5 minutos y un tiempo de disociación de 5 minutos. Los estudios de unión cinética se realizaron con un caudal de 50 µl/min. Todos los experimentos de unión se realizaron a 25 °C en un tampón de HEPES 10 mM, NaCl 500 mM, EDTA 3 mM tensioactivo P20 al 0,05 %, 1 mg/ml de albúmina sérica bovina, pH 7,4. También se realizaron inyecciones de tampón para permitir la sustracción del ruido y la desviación del instrumento. Entre ciclos, la celda de flujo se lavó con glicina 10 mM, pH 1,75 para regenerar la superficie.

Los datos se compilaron usando el software de evaluación Biacore T100™ (versión 1.1.1). Los datos se procesaron sustrayendo las inyecciones en la celda de flujo de referencia y de blanco. La estabilidad basal se evaluó para asegurar que la etapa de regeneración proporcionaba una superficie de unión consistente en toda la secuencia de inyecciones. Se comprobaron curvas de inyección por duplicado para la reproducibilidad. Se determinó que el modelo de unión 1:1 era el más apropiado y las curvas de unión resultantes se ajustaron de forma global a este modelo.

## Resultados

Se caracterizó PDGF-BB por su afinidad de unión a PDGFR- $\beta$ -Fc5 (resultados resumidos en la Tabla 15). Se midieron las constantes de velocidad de asociación ( $k_a$  ( $M^{-1}s^{-1}$ )) y las constantes de velocidad de disociación ( $k_d$  ( $s^{-1}$ )). Se calcularon la  $K_D$  y  $K_A$  a partir de los valores de  $k_a$  y  $k_d$ . Los datos se ajustan bien al modelo de interacción 1:1. En estas condiciones de ensayo, la constante de disociación en equilibrio para la interacción PDGF-BB - PDGFR- $\beta$ -Fc5 fue de aproximadamente  $2.E^{-11}M$ .

**Tabla 15: Caracterización de afinidad de unión de PDGF-BB por PDGFR $\beta$**

Interacción	$k_a$ ( $M^{-1}s^{-1}$ )	$k_d$ ( $s^{-1}$ )	$K_D$ (M)	$K_A$ ( $M^{-1}$ )
PDGF-BB/ PDGFR $\beta$ -Fc5	6.E+7	1.E-3	2.E-11	6.E+10

### Ejemplo 19: Medición de las constantes de velocidad de disociación para la interacción de antagonistas del receptor- $\beta$ de PDGF humano con el receptor- $\beta$ de PDGF humano mediante resonancia de plasmón superficial (Biacore)

Se evaluaron antagonistas de PDGFR- $\beta$  humano para su afinidad de unión a human PDGFR- $\beta$  reflejada en sus constantes de velocidad de disociación usando resonancia de plasmón superficial. Se midieron las constantes de velocidad de disociación para la interacción de antagonistas de PDGFR- $\beta$  con el PDGFR- $\beta$  mediante resonancia de plasmón superficial. La constante de velocidad de disociación ( $k_d$  ( $s^{-1}$ )) es un valor que refleja la estabilidad de este complejo. Es independiente de la concentración y por lo tanto adecuado para seleccionar y clasificar muestras con concentraciones desconocidas.

## Materiales y procedimientos

Se completó una serie de experimentos para medir la afinidad de unión de los antagonistas de PDGFR- $\beta$  a PDGFR- $\beta$ . Los estudios de cinética y afinidad de unión se realizaron en un sistema Biacore T-100™ (GE Healthcare, Piscataway, NJ). Los procedimientos se programaron usando el Software de control Biacore T100™, v 1.1.1. Para capturar una molécula PDGFR- $\beta$ -Fc5, se inmovilizó de forma covalente anticuerpo de cabra anti-IgG humana Fc-gamma (Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA) en un chip sensor CM5 usando química de acoplamiento de amina (EDC:NHS) hasta una densidad de aproximadamente 10.000 RU. Después del procedimiento de inmovilización, los sitios activos restantes en la celda de flujo se bloquearon con etanolamina. La proteína unida de forma no específica se retiró lavando con NaOH 50 mM. El PDGFR $\beta$  se diluyó hasta 100 nM y después se inyectó en esta superficie a un caudal de 10 ul/min durante 2 minutos para capturar aproximadamente 500RU.

Se diluyeron 1:3 los sobrenadantes de antagonista de PDGFR- $\beta$  humano (seleccionados a partir de la exploración de la biblioteca de fagos Dyax) en tampón de procesamiento y se inyectaron sobre la superficie y se dejó que se unieran específicamente al PDGFR- $\beta$  Fc5 capturado sobre el chip sensor con un tiempo de asociación de 5 minutos y un tiempo de disociación de 5 minutos. Se realizaron inyecciones duplicadas de PDGF-BB y un anticuerpo monoclonal anti-PDGFR- $\beta$  (ZymoGenetics) como controles positivos. También se preparó una celda de flujo de control inmovilizando anticuerpo de cabra anti-IgG humana Fc-gamma hasta una densidad de aproximadamente 10.000 RU. En lugar de Fab contra PDGFR- $\beta$ , se inyectó tampón sobre esta superficie seguido de inyecciones de antagonistas de PDGFR- $\beta$ . Los estudios de unión cinética se realizaron con un caudal de 30 ul/min. Todos los experimentos de unión se realizaron a 25 °C en un tampón de procesamiento de HEPES 10 mM, NaCl 500 mM, EDTA 3 mM tensioactivo P20 al 0,05 %, 1 mg/ml de albúmina sérica bovina, pH 7,4. También se realizaron inyecciones de tampón para permitir la sustracción del ruido y la desviación del instrumento. Entre ciclos, la celda de flujo se lavó con glicina 10 mM, pH 1,75 para retirar el PDGFR- $\beta$  Fc5 unido.

Los datos se compilaron usando el software de evaluación Biacore T100™ (versión 1.1.1). Los datos se procesaron sustrayendo las inyecciones en la celda de flujo de referencia y de blanco. La estabilidad basal se evaluó para asegurar que la etapa de regeneración proporcionaba una superficie de unión consistente en toda la secuencia de inyecciones. Como las concentraciones de partida de los antagonistas de PDGFR- $\beta$  eran desconocidas, las curvas de unión resultantes se ajustaron de forma global a un modelo de unión de disociación 1:1 para calcular las constantes de velocidad de disociación ( $k_d$ ( $s^{-1}$ )). Este modelo no depende de la concentración del antagonista.

## Resultados

Se determinó el análisis de la velocidad de disociación de antagonistas de PDGFR- $\beta$  para PDGFR- $\beta$  Fc5. Las curvas de unión resultantes se ajustan bien al modelo de disociación 1:1. Las concentraciones de partida de los antagonistas de PDGFR- $\beta$  eran desconocidas, por lo tanto se presentaron solamente las constantes de velocidad de disociación ( $k_d$  ( $s^{-1}$ )) ya que  $k_d$  es independiente de la concentración. Las constantes de velocidad de disociación calculadas se clasificaron desde la más lenta hasta la más rápida. En estas condiciones de ensayo, los antagonistas de PDGFR- $\beta$  presentan un gran intervalo de constantes de velocidad de disociación ( $1.E^{-6}$  -  $2.E^{-2}$  ( $s^{-1}$ )) para su



interacción con PDGFR- $\beta$  Fc5 (véase la Tabla 16). Por motivos de comparación, la  $k_d$  de la interacción PDGF-BB - PDGFR- $\beta$  fue de aproximadamente  $1.E^{-3} s^{-1}$  y la interacción anticuerpo monoclonal anti-PDGFR- $\beta$  - PDGFR- $\beta$  fue de aproximadamente  $2.E^{-4} s^{-1}$ .

**Tabla 16: Constantes de velocidad de disociación para la interacción de antagonistas de PDGFR- $\beta$  con PDGFR- $\beta$  Fc5**

scFv y controles	Velocidad de disociación [ $k_d$ ( $s^{-1}$ )]
162.6262 IgG	2.E-04
162.6262 Fab	9.E-04
c597.1_2	4.E-04
c613.1_1	3.E-04
c624.1_1	4.E-04
c973	5.E-04
c972	3.E-06
c1035	4.E-05
c1014	4.E-05
c949	2.E-04
c1226	3.E-05
c947	5.E-04
c951	7.E-04
c971	3.E-04
c1244	2.E-06
c993	1.E-04
c975	6.E-04
c946	5.E-04
c941	1.E-04
c1245	3.E-06
c939	6.E-04
c1318	1.E-06

#### **Ejemplo 20: Clonación y expresión de células BHK 570 con un elemento de respuesta en suero indicador de luciferasa**

Se transfectaron células BHK 570 (ATCC, Manassas, VA) en placas de cultivo tisular de 100 x 20 mm (Falcon, Colorado Springs, CO) con 10 ug de ADN plasmídico KZ67 que contenía un elemento de respuesta en suero, un indicador de luciferasa, y resistencia a G418 (ZymoGenetics, Inc) usando lipofectamina (Invitrogen, Carlsbad, CA) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Después de 48 horas, se retiraron las células con tripsina (Gibco Laboratories, Grand Island, NY) y se sembraron en placas de 100 x 20 mm en medio de cultivo (DMEM (Gibco), suero bovino fetal al 10 % (FBS), L-glutamina 2 mM y piruvato sódico 1 mM más 500 ug/ml de Geneticina (Gibco) para seleccionar los transfectantes estables, y se mantuvieron en este medio. Después de aproximadamente una semana, se retiraron las células estables con tripsina, se contaron en un hemacitómetro, y se añadieron a placas de fondo plano de 96 pocillos (Falcon) a una densidad de una célula por pocillo en un volumen de 100 ul de medio de cultivo más Geneticina. Después de una semana de cultivo, los pocillos se valoraron para colonias individuales bajo un microscopio. Después de cultivo adicional, las células se retiraron con tripsina y se transfirieron a una nueva placa de 96 pocillos y se dejaron llegar a confluencia. Las células se retiraron con 25 ul de tripsina y se re-suspendieron en 75 ul de medio de cultivo. Se hicieron tres placas replicadas, cada una con 30 ul de la mezcla celular. Dos placas eran blancas sólidas de 96 pocillos (Coming Costar, Coming, NY) para un ensayo de luciferasa y una era una placa transparente de 96 pocillos (Falcon) para la recuperación de clones positivos. El siguiente día se reemplazó el medio en las placas blancas con medio sin suero. Después de privar de suero a las células durante dos días se indujo una placa con medio reciente que contenía FBS al 20 % en un volumen de 100 ul y se añadió medio sin suero a la otra placa para determinar la respuesta basal. Después de incubar a 37 °C y CO<sub>2</sub> al 5 % durante cuatro horas, se realizó un ensayo de luciferasa con reactivos de luciferasa El500 de Promega (Madison, WI) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Las placas se leyeron en un luminómetro Berthold LB96V-2R (Oak Ridge, TN). Se calculó el factor de inducción dividiendo la señal de los pocillos con suero por aquellos sin suero. Los clones positivos se aumentaron en escala de la placa transparente y se volvieron a ensayar por ensayo de

luciferasa. Las células se sembraron en placas blancas de 96 pocillos a 10.000 células por pocillo en FBS al 1 % y se realizó un ensayo de luciferasa dos días después con una respuesta a dosis de FBS.

**Ejemplo 21: Clonación y expresión de células BHK 570 KZ67 E10.2 B3 con PDGFR $\beta$  humano y de macaco cynomolgus**

Se transfectaron células BHK 570 KZ67 E10.2 B3 (véase anteriormente) como se ha descrito anteriormente con PDGFR $\beta$  humano en plásmido pzp9 que contenía un gen de resistencia a DHFR (ZymoGenetics, Inc) o PDGFR de macaco cynomolgus en plásmido pzMP43 que contenía un gen de resistencia a zeocina (ZymoGenetics, Inc). La clonación y los ensayos de luciferasa se realizaron como anteriormente excepto en que se usó metotrexato 250 nM (Calbiochem, San Diego, CA) para seleccionar los transfectantes humanos y se usaron 200 ug/ml de zeocina (Invitrogen) para los transfectantes de macaco cynomolgus. PDGF BB (ZymoGenetics, Inc) a una concentración de 10 ng/ml en medio de ensayo (DMEM, albumina sérica bovina al 0,5 % (Gibco), L-glutamina 2 mM, piruvato sódico 1 mM, y HEPES 25 mM) se usó para la inducción inicial de clones a partir de placas de 96 pocillos. El posterior análisis sobre clones aumentados a escala se realizó con una respuesta a dosis de PDGF BB de 100 a 0,01 ng/ml en medio de ensayo.

**Ejemplo 22: Identificación de sFab y scFv neutralizantes contra PDGFR $\beta$  usando un ensayo basado en Luminex para determinar la fosforilación de PDGFR $\beta$  en pericitos**

Para seleccionar un scFv neutralizante contra PDGFR $\beta$  humano se realizó un ensayo basado en Luminex. El ensayo detecta la cantidad de PDGFR $\beta$  fosforilado que está presente en lisados celulares. Se sembraron pericitos vasculares de cerebro humano (ScienCell Research, San Diego, CA) en placas de fondo plano de 96 pocillos (Falcon, Colorado Springs, CO) a una densidad de 7.500 células por pocillo en un volumen de 100 ul en medio completo (medio de pericitos (PM) ScienCell más suplementos ScienCell de suero bovino fetal, suplemento de cultivo de pericitos, y penicilina-estreptomina) a 37 °C y CO<sub>2</sub> al 5 %. En el día dos se cambió el medio a ScienCell PM sin suplementos y se privó de suero durante 24 horas. En el día tres se retiró el medio de las células y se añadieron los scFv diluidos en serie y el anticuerpo monoclonal de control contra PDGFR $\beta$  (ZymoGenetics, Inc., anticuerpo de ratón anti-humano, E9899) en medio de ensayo (ScienCell PM. y albumina sérica bovina al 0,5 %) en un volumen de 50 ul y se incubaron durante 60 minutos a 37 °C y CO<sub>2</sub> al 5 %. Se añadió PDGF BB (ZymoGenetics, Inc.) en 50 ul a concentración 2X para dar una concentración final de 0,44 nM (CE<sub>80</sub> concentración eficaz al 80 por ciento) y se incubaron durante 10 minutos a 37 °C y CO<sub>2</sub> al 5 %.

Las células después se lavaron con tampón de lavado celular Bio-Plex, se lisaron con solución de lisis de acuerdo con las directrices del fabricante (BioRad, Hercules, CA), y los sobrenadantes celulares se congelaron a -20 °C. Para descongelar los sobrenadantes celulares, se añadieron perlas fosfo-PDGFR $\beta$  1x y se incubaron a temperatura ambiente en un agitador durante 18 h. Se añadieron anticuerpos de detección a las perlas lavadas y se incubaron a temperatura ambiente en un agitador durante 30 minutos, y después se incubó estreptavidina-PE con las perlas a temperatura ambiente durante 15 minutos. Las perlas se re-suspendieron en tampón de re-suspensión Bio-Plex y se analizaron en un lector de serie Bio-Plex (Bio-Rad Laboratories).

Resultados: los scFv, Fab y BiAb mostraron potente neutralización de la fosforilación de PDGFR inducida por PDGF-BB como se muestra por los bajos valores nM de CI50 en las siguientes Tablas 17 y 18.

**Tabla 17: Actividad de neutralización de scFv y Fab Anti-PDGFR $\beta$  en ensayo basado en Luminex-usando pericitos**

scFv, Fab y controles	CI50 (nM) de fosforilación
162.6262 IgG	0,05-0,2
162.6262 Fab	8,0-28,0
c597.1_2	3,66
c613.1_1	8,3
c624.1_1	6,8
c973	13,26
c972	0,60
c1035	0,45
c1014	0,01
c949	1,1
c1226	0,02
c947	3
c951	5,2

(continuación)

scFv, Fab y controles	CI50 (nM) de fosforilación
c971	16,37
c1244	0,62
c993	0,1
c975	5,02
c946	14,66
c941	0,11
c1245	3,06
c939	31,87
c1318	5,76

**Tabla 18: Actividad de neutralización de BiAb Anti-PDGFR $\beta$  en ensayo basado en Luminex usando pericitos**

IgG y BiAb	CI50 (nM) de fosforilación
c597.1_1	0,13
c613.1_2	0,45
c600.1_1	0,15
A2100F (c868)	0,04
A2097F (c870)	0,38
A2099F (c1039)	0,27
A2101F (c1081)	0,1
A2098F (c1092)	0,17
A2096F (c1111)	0,29
c597.1 1 (A2104)	0,22
162.6262/bevacizumab Biab	0,03

**Ejemplo 23: Identificación de sFab y scFv neutralizantes contra PDGFR $\beta$  usando un ensayo de proliferación de pericitos inducida por PDGF-BB**

- 5 Para seleccionar moléculas candidatas (scFv, Fab) para su capacidad de neutralizar la proliferación inducida por activación de PDGF-BB del PDGFR $\beta$  humano, se ejecutó un ensayo de  $^3\text{H}$ -timidina. El ensayo mide la cantidad de nucleótido radiomarcado incorporado en el ADN de células proliferantes. Se sembraron pericitos vasculares de cerebro humano (HBVP; ScienCell Research, San Diego, CA) en placas de fondo plano de 96 pocillos (Falcon, Colorado Springs, CO) a una densidad de 500 células/pocillo en 150  $\mu\text{l}$  de medio completo (medio de pericitos (PM) ScienCell más suplementos ScienCell de suero bovino fetal, suplemento de cultivo de pericitos, y penicilina-estreptomycin) a 37 °C en CO<sub>2</sub> al 5 %. Después de 24-48 horas, se reemplazó con medio completo DMEM-F12 (1:1) con insulina-transferrina-selenio 1x (medio sin suero, SFM; Invitrogen, Carlsbad, CA) y las células se incubaron como anteriormente durante 18-24 horas adicionales. Las moléculas neutralizantes de PDGFR $\beta$  (scFv, Fab), un anticuerpo monoclonal de control contra PDGFR $\beta$  (ZymoGenetics, Inc. E9899), o el fragmento Fab del anticuerpo monoclonal E9899 (ZymoGenetics, Inc.) se diluyeron en serie 1:4 de 2000 nM a 0,02 nM en SFM presencia de un nivel constante de PDGF-BB humano (0,4nM, CE<sub>80</sub>, concentración eficaz al 80 %, ZymoGenetics, Inc. A493F). Se incubaron células privadas de suero con 150ml de SFM, PDGF-BB 0,4 nM en SFM, o las moléculas aPDGFR $\beta$  tituladas con PDGF-BB 0,4 nM en SFM. Después 18-24 horas, se añadió 1  $\mu\text{Ci}$  de  $^3\text{H}$ -timidina (Amersham) a cada pocillo y las células se incubaron de forma normal durante 3-6 horas. Las células se recogieron en placas de filtro y se determinó la incorporación de  $^3\text{H}$ -timidina usando una máquina Packard Topcount.
- 15
- 20 Resultados: los scFv, Fab, y BiAb mostraron potente neutralización de la proliferación de pericitos inducida por PDGF-BB como se muestra por los bajos valores nM de CI50 en las siguientes Tablas 19 y 20.

**Tabla 19: Actividad de neutralización de scFv Anti-PDGFR $\beta$  en ensayo de proliferación de pericitos**

scFv y controles	CI50 (nM) de proliferación
162.6262 IgG	0,05-3
162.6262 Fab	20-80
c597.1_2	109,1
c613.1_1	6,63
c624.1_1	Inactivo
c973	38,5
c972	0,004
c1035	33,73
c1014	NC*
c949	30,46
c1226	NC
c947	82,74
c951	65,13
c971	Inactivo
c1244	NC
c993	NC
c975	4,02
c946	142
c941	12,69
c1245	NC
c939	36,74
c1318	NC
*NC = No calculable	

**Tabla 20: Actividad de neutralización de IgG y BiAb Anti-PDGFR $\beta$  en ensayo de proliferación de pericitos**

IgG y BiAb	CI50 (nM) de proliferación
c597.1_1	0,51
c613.1_2	ND
c600.1_1	0,73
A2100F (c868)	3,16
A2097F (c870)	1,25
A2099F (c1039)	1,69
A2101F (c1081)	2,18
A2098F (c1092)	1,1
A2096F (c1111)	0,9
c597.1_1 (A2104)	2,5
162.6262/bevacizumab Biab	3,3

**Ejemplo 24: Clonación de PDGFR $\beta$  de longitud completa a partir de macacos cynomolgus**

5 Se clonó PDGFR $\beta$  de macaco cynomolgus (CnPDGFR $\beta$ ) por PCR usando una polimerasa termoestable de alta fidelidad (PFU Ultra, Stratagene Corp. La Jolla Ca.). Basándose en la información de secuencia disponible del UCSC Genome Browser para PDGFR $\beta$  de chimpancé y humano, se designaron los oligonucleótidos 58399 (AGGACTTCCTGGAGGGGGTGA; SEC ID N° 489) y 58400 (GAGCTTCAGGCAGGGCAGGGT; SEC ID N° 490)

para amplificar la fase de lectura abierta del gen de cynomolgus a partir de una biblioteca de ADNc de bazo de cynomolgus del propio laboratorio. Los productos de PCR de múltiples reacciones de PCR se clonaron en PCR4 TO (Invitrogen corp. Carlsbad, CA) para comparaciones de secuencia. Se obtuvo una secuencia consenso de nucleótidos (SEC ID N° 491) de 16 clones.

#### 5 **Ejemplo 25: Ensayo de Luminex para determinar la reactividad cruzada de scFv contra PDGFR $\beta$ con el receptor PDGFR $\beta$ de cynomolgus**

Para explorar la reactividad cruzada de scFv contra PDGFR $\beta$  humano, se realizó un ensayo basado en Luminex. El ensayo detecta la cantidad de PDGFR $\beta$  fosforilado que está presente en lisados celulares. Se sembraron células cutáneas de macaco cynomolgus (células CYNOM-K1), (European Collection of Cell Cultures, Wiltshire, R.U.) en placas de fondo plano de 96 pocillos (Falcon, Colorado Springs, CO) a una densidad de 7.500 células por pocillo en un volumen de 100  $\mu$ l en medio completo (MEM de Earle, suero bovino fetal (FBS) al 10 %, L-glutamina 2 mM, aminoácidos no esenciales al 1 %) durante un día a 37 °C y CO<sub>2</sub> al 5 %. En el día dos las células se cambiaron a medio sin FBS y se privaron de suero durante 24 horas. En el día tres se retiró el medio de las células y se añadieron los scFv diluidos en serie y el anticuerpo monoclonal de control contra PDGFR $\beta$  (ZymoGenetics, Inc. E9899) en medio de ensayo (MEM más albumina sérica bovina al 0,5 % y HEPES 25 mM) en un volumen de 50  $\mu$ l y se incubaron durante 60 minutos a 37 °C y CO<sub>2</sub> al 5 %, se añadió PDGF BB (ZymoGenetics, Inc.) en 50  $\mu$ l a concentración 2X para dar una concentración final de 0,33 nM (CE<sub>80</sub>, concentración eficaz al 80 por ciento) y se incubaron durante 10 minutos a 37 °C y CO<sub>2</sub> al 5 %.

Las células después se lavaron con tampón de lavado celular Bio-Plex, se lisaron con solución de lisis de acuerdo con las directrices del fabricante (BioRad, Hercules, CA), y los sobrenadantes celulares se congelaron a -20 °C. Para descongelar los sobrenadantes celulares, se añadieron perlas fosfo- PDGFR $\beta$  1x y se incubaron a temperatura ambiente en un agitador durante 18 h. Se añadieron anticuerpos de detección a las perlas lavadas y se incubaron a una temperatura ambiente en un agitador durante 30 minutos, y después se incubó estreptavidina-PE con las perlas a temperatura ambiente durante 15 minutos. Las perlas se re-suspendieron en tampón de re-suspensión Bio-Plex y se analizaron en un lector de serie Bio-Plex (Bio-Rad Laboratories).

Resultados: los scFv, Fab, e IgG mostraron potente neutralización de la fosforilación de PDGFR inducida por PDGF-BB como se muestra por los bajos valores nM de CI50 en la siguiente Tabla 21.

**Tabla 21: Actividad de neutralización de IgG, scFv, o Fab Anti-PDGFR $\beta$  en ensayo basado en Luminex usando células CYNOM-K1**

Anticuerpo	IgG, scFv, o Fab	CI50 (nM) de fosforilación
c597.1_1	IgG	<0,1
c613.1_2	IgG	1,4
c600.1_1	IgG	0,1
162.6262	IgG	sin efecto
163.3111	IgG	<0,1
c613.1_1	Fab	10
c1035	scFv	0,2
c949	scFv	0,7
c941	scFv	<0,1

#### **Ejemplo 26: Ensayo Luminex para determinar la reactividad cruzada de scFv anti-PDGFR $\beta$ con PDGFR $\beta$ de ratón**

Para explorar la reactividad cruzada de scFv contra PDGFR $\beta$  humano, se realizó un ensayo basado en Luminex. El ensayo detecta la cantidad de PDGFR $\beta$  fosforilado que está presente en lisados celulares. Se sembraron fibroblastos embrionarios murinos (3T3-Swiss albino, Swiss; American Type Culture Collection, Manassas, VA) en placas de fondo plano de 96 pocillos (Falcon, Colorado Springs, CO) a una densidad de 1.000 células por pocillo en un volumen de 100  $\mu$ l en medio completo (medio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM), suero bovino fetal (FBS) al 5 %) y se incubaron a 37 °C en CO<sub>2</sub> al 5 %. Después de 24-48 horas, se reemplazó el medio completo con medio DMEM-F12 (1:1) con insulina-transferrina-selenio 1x (medio sin suero, SFM; Invitrogen, Carlsbad, CA) y las células se incubaron como anteriormente durante 18-24 horas adicionales. Las moléculas neutralizantes de PDGFR $\beta$  (scFv, Fab), un anticuerpo monoclonal de control contra PDGFR $\beta$  (ZymoGenetics, Inc. E9899), o el fragmento Fab del anticuerpo monoclonal E9899 (ZymoGenetics, Inc.) se diluyeron en serie 1:4 de 2000 nM a 0,02 nM en SFM. Se incubaron células privadas de suero con 150  $\mu$ l de SFM o las moléculas aPDGFR $\beta$  tituladas en SFM durante 1 hora a 37 °C en CO<sub>2</sub> al 5 %. Las células después se pulsaron con 50  $\mu$ l de PDGF-BB 1,6 nM

(ZymoGenetics, Inc.; concentración final 0,4 nM, CE<sub>80</sub>, concentración eficaz al 80 %) durante 10 minutos a 37 °C en CO<sub>2</sub> al 5 %. Se incluyeron pocillos de control sin estimulación con PDGF-BB. Las células después se lavaron con tampón de lavado celular Bio-Plex y se lisaron en tampón de lisis suministrado en el kit de ensayo de acuerdo con las directrices del fabricante (BioRad, Hercules, CA), y los sobrenadantes celulares se congelaron a -20 °C. Para descongelar los sobrenadantes celulares, se añadieron perlas fosfo-PDGFRβ 1x y se incubaron a temperatura ambiente en un agitador durante 18 horas. Se añadió anticuerpo de detección a las perlas lavadas y se incubaron a temperatura ambiente en un agitador durante 30 minutos, y después se incubó estreptavidina-PE con las perlas a temperatura ambiente durante 15 minutos. Las perlas se re-suspendieron en tampón de re-suspensión Bio-Plex y se analizaron en un lector de serie Bio-Plex (Bio-Rad Laboratories).

## 10 **Ejemplo 27: Ensayo de internalización basado en inmunofluorescencia para medir el efecto de antagonistas de PDGFRβ/VEGFA sobre la internalización del receptor**

### **Material y procedimientos**

Se sembraron pericitos vasculares de cerebro humano (HBVP) de bajo pase (ScienCell Research, San Diego, CA) a sub-confluencia en 4 portaobjetos de vidrio Lab-Tek II (Nº catálogo 154917 Nalge Nunc, Naperville, IL) a un volumen de 500 ul/portaobjeto en medio completo (medio de pericitos (PM) ScienCell más suplementos ScienCell de suero bovino fetal, suplemento de cultivo de pericitos, y penicilina-estreptomomicina). Los portaobjetos se incubaron a 37 °C y CO<sub>2</sub> al 5 % durante 1-2 días hasta que alcanzaron una confluencia de aproximadamente el 75 %. La unión de los antagonistas de PDGFRβ/VEGFA y el anticuerpo de control se hace a 4 °C, de modo que todos los portaobjetos se colocan en hielo y se lavan una vez con DMEM frío + BSA al 0,1 %. Los antagonistas de PDGFRβ/VEGFA y el anticuerpo de ensayo se diluyen después a 1 ug/ml en tampón de unión que consta de DMEM + BSA al 3 % y tampón HEPES. Cada portaobjetos se configura de modo que están designados dos antagonistas, un anticuerpo de control y un pocillo de control para el anticuerpo secundario solamente para cada portaobjetos de vidrio. Se añaden 500 ul/pocillo de antagonistas, control, o medio solamente a cada portaobjetos. Después de una hora de incubación, se fija el portaobjetos T0 lavando con PBS frío una vez y añadiendo 1 ml/pocillo de solución de paraformaldehído. Este portaobjetos T0 mide la expresión del receptor sobre la superficie celular y los portaobjetos incubados a 37 °C miden la internalización del receptor en el tiempo. Los portaobjetos restantes se ponen en la incubadora a 37 °C y se retiran y fijan de un modo similar a los treinta minutos, noventa minutos, cuatro horas y seis horas como puntos temporales. Todos los portaobjetos se mantienen en hielo después de la fijación. Una vez que se han fijado todos los portaobjetos, se lavan una vez con PBS y se permeabilizan durante dos minutos con MetOH a -20 °C. Los portaobjetos se lavan de nuevo con PBS frío. Desde ese momento en adelante la tinción se hace a temperatura ambiente. Los portaobjetos se incuban a temperatura ambiente durante cinco minutos en glicina 50 mM preparada en PBS. La glicina se retira y se elimina por lavado con PBS, y los portaobjetos se bloquean con suero de cabra normal al 10 % en PBS (NºS-1000, Vector Labs, Inc. Burlingame, CA), 500 ul/pocillo durante treinta minutos. Después de la etapa de bloqueo, se añaden 500 ul/pocillo de los anticuerpos secundarios a cada pocillo. Se diluyen anticuerpo de cabra anti-ratón Alexafluor 488 (Nº Cat. A 11029, Molecular Probes, Eugene, OR), o anticuerpo de cabra anti-humano Alexafluor 488 (Nº Cat. A 11013, Molecular Probes, Eugene, OR) 1:150 en tampón de lavado que consta de PBS + Tween 20 al 0,1 % y BSA al 0,1 %. Los portaobjetos se incuban en la oscuridad a temperatura ambiente durante cuarenta y cinco minutos. Cada portaobjetos se lava tres veces impregnando en PBS durante 5 minutos a temperatura ambiente. Se añade una gota de medio de montaje Vectashield con tinción DAPI a cada cámara (Nº Cat. H-1200, Vector Labs, Inc., Burlingame Calif.) y los portaobjetos se cubren y examinan bajo el microscopio fluorescente. Se usa el software Metavue para visualizar el perfil de tinción de dos colores.

## **Ejemplo 28: Ensayo de unión a FcRn para medir la unión de antagonistas de PDGFRβ/VEGF-A a FcRn con pH 6,0 y pH 7,4**

### **Materiales y procedimientos**

Se preparan dos placas con antagonistas de PDGFRβ/VEGFA y anticuerpos de control: una para lavado a pH 6,0 y otra para lavado a pH 7,4. Día 1: se recubren dos placas de elisa de 96 pocillos Nunc Maxisorp (nº cat. 44-2404) con 300 ng/pocillo de NeutrAvidina (Pierce Chemical Co. nº cat. 31000) preparada en NaHCO<sub>3</sub> 100 mM, pH 9,3. Las placas se incuban a 4 °C durante una noche. Día 2: las placas se lavan 5 veces con Tween-20 al 0,1 %/PBS (PBST). Las placas después se bloquean con 25 ul/pocillo de tampón de bloqueo que contiene NaCl al 0,8 %, KCl al 0,02 %, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> al 0,102 %, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> al 0,02 %, BSA al 1 %, polisorbato al 0,05 %, Proclin 300 al 0,05 % pH 7,2, durante una hora a temperatura ambiente. Las placas después se lavan 2 veces con PBST. Cada pocillo después se recubre con 150 ng de proteína FCRN biotinilada (producida en el propio laboratorio) diluida en PBST + BSA al 1 %. Las placas se incuban a temperatura ambiente durante una hora. Se diluyen los antagonistas de PDGFRβ/VEGFA y los anticuerpos de control (Herceptin, por ejemplo) en NaPO<sub>4</sub> 100 mM, Tween 20 al 0,05 % (v/v), + BSA al 0,1 % ajustado a pH 6,0 (tampón de pH 6,0) a concentraciones que varían de 150 nM a 0,07 nM. Las muestras se ensayan por duplicado a un volumen de 50 ul/pocillo de cada concentración. El tampón de pH 6,0 se ejecuta solamente como control para determinar los niveles de fondo en cada placa. Las placas se incuban a temperatura ambiente durante dos horas. Después de la etapa de unión, cada placa se lava en tampones diferentes: una placa se lava con 250 ul/pocillo de tampón de pH 6,0, y una placa se lava con 250 ul/pocillo de NaPO<sub>4</sub> 100 m, Tween 20 al 0,05 % (v/v), BSA al 0,1 % ajustado a pH 7,4 (tampón de pH 7,4). Las placas se incuban en tampones de lavado a temperatura

ambiente durante un total de una hora con una etapa de lavado realizada cada veinte minutos. Después de las etapas de lavado, el anticuerpo unido se detecta con 100 ul/pocillo de anticuerpo secundario de cabra específico anti-fragmento Fc gamma de IgG F(ab)<sub>2</sub> humana conjugado con HRP (Jackson Immunoresearch N° cat. 109-036-098). El anticuerpo secundario se diluye 1:5.000 en el tampón de pH 6,0, y la incubación se hace durante una hora a temperatura ambiente. Las placas después se lavan 5 veces con PBST. Finalmente, se añaden 100 ul de TMB (TMBW-1000-01, BioFX Laboratories) a cada pocillo, y las placas se revelan a temperatura ambiente durante aproximadamente tres minutos. En este punto, se añaden 100 ul/pocillo de tampón de parada (STPR-100-01, BioFX Laboratories) para detener la reacción. Las placas se leen en un espectrofotómetro a una longitud de onda de 450/570 nm. Se examinan los valores de DO para comparar los patrones de unión a pH 6,0 y los patrones de liberación a pH 7,4.

## Ejemplo 29: Construcción del panel de moléculas biespecíficas anti- PDGFR $\beta$ /VEGF-A

### A. Resumen

Los formatos de construcción de expresión a modo de ejemplo para una molécula biespecífica anti-PDGFR $\beta$ /VEGF-A incluyen FvFc de cadena sencilla en tándem (tascFvFc), biFvFc de cadena sencilla (biscFvFc), y biAb. Las definiciones de estos formatos moleculares son las siguientes: un tascFvFc tiene dos scFv uno junto a otro conectados por un lazo y fusionados directamente a un Fc. Un biscFvFc tiene tanto un scFv amino-terminal como uno carboxilo-terminal fusionados a un Fc con el extremo carboxilo-terminal conectado mediante un enlazador. Tanto los tascFvFc como los biscFvFc, para los propósitos de este ejemplo, tienen un Fc sin función efectora (Fc5) (SEC ID N° 492). Un biAb es una inmunoglobulina completa con un scFv carboxilo-terminal conectado mediante un enlazador. En el caso de biAb descritos en este ejemplo, la cadena pesada usada era gamma1 humana sin función efectora (IgG1.1) y las regiones constantes de cadena ligera eran kappa. Estas moléculas se muestran en la Figura 2.

Para los propósitos de describir moléculas Fv de cadena sencilla en tándem, un lazo se define como un polipéptido que conecta dos Fv de cadena sencilla y el enlazador se refiere al polipéptido que conecta los dos dominios variables que comprenden un Fv de cadena sencilla y a cualquier polipéptido que una un scFv con un Fc o cadena pesada de inmunoglobulina. La secuencia enlazadora usada en las moléculas scFv descritas en este ejemplo es (G<sub>4</sub>S)<sub>5</sub> (SEC ID N° 494). La secuencia lazo usada para tascFvFc es normalmente (G<sub>4</sub>S)<sub>2</sub> (SEC ID N° 496). El enlazador carboxilo-terminal usado para conectar los scFv a Fc en el formato bisc y biAb es el mismo que la secuencia lazo para los tascFvFc. Las secuencias scFv se fusionaron a Fc5, una forma modificada de Fc gamma1 humana que es un efector menos para los biscFvFc. Las secuencias scFv se fusionaron a IgG1.1, una inmunoglobulina gamma humana completa sin función efectora para los biAb.

### Construcción de FvFc de cadena sencilla en tándem

Los fragmentos de PCR Fv de cadena sencilla se construyen cada uno solapando dos fragmentos de PCR, uno para cada una de las regiones pesada variable y ligera variable con la región de solapamiento interna en el enlazador de 25 monómeros (G<sub>4</sub>S)<sub>5</sub>.

Los dos fragmentos de PCR se generan, uno para cada scFv y se ensamblan en scFv en tándem por el siguiente procedimiento: El scFv en el extremo 5' tiene una oligosecuencia que solapa la secuencia señal 26-10 VH de ratón y con la región lazo entre los dos scFv. El scFv 3' tiene una oligosecuencia que solapa el lazo y el compañero de fusión Fc5. Cada fragmento scFv se ensambla por PCR. Los fragmentos scFv se ensamblan en un scFv en tándem y se insertan en el sitio *NotI* de pZMP31-ms 26-10VH-Fc5 por recombinación de levaduras como se describe a continuación.

Las condiciones de reacción de amplificación por PCR son las siguientes: 1 ciclo, 95 °C, 2 minutos; 30 ciclos, 95 °C, 15 segundos, seguido por 55 °C, 30 segundos, seguido por 68 °C, 1 minuto por kb. La mezcla de reacción de PCR se procesa en un gel de agarosa al 1 % y el fragmento de ADN correspondiente al tamaño esperado se extrae del gel usando el kit de purificación de ADN de PCR GE Healthcare Illustra GFX™ y Gel Band (Reino Unido).

Los ADNc se clonan en el vector pZMP31-ms 26-10VH-Fc5 (SEC ID N° 648) para FvFc de cadena sencilla en tándem (tascFv-Fc) por recombinación de levaduras. El vector pZMP31-ms 26-10VH-Fc5 se obtiene de pZMP31 (SEC ID N° 647) mediante la adición de la secuencia señal 26-10 VH de ratón y Fc5 con un sitio de restricción *NotI* entre medias para la inserción de ADNc. pZMP31 es un vector de expresión de mamífero que contiene un casete de expresión que tiene el potenciador CMV/promotor MPSV quimérico, un sitio *EcoRI* para la linealización para la inserción de ADNc, un sitio de entrada interno del ribosoma de poliovirus (IRES), un ADNc DHFR, el terminador SV40, un origen de replicación de *E. coli*, y los genes URA3 y CEN-ARS de *S. cerevisiae*. Este vector se obtiene de pZMP21 (patente de Estados Unidos 7.262.025).

Antes de la recombinación en levaduras con los fragmentos de PCR extraídos del gel, el plásmido pZMP31-ms 26-10VH-Fc5 se dirige con *NotI*. Se combinan 100  $\mu$ l de levadura electrocompetente (*S. cerevisiae* SF838-9D, URA-) con aproximadamente 12  $\mu$ l de cada fragmento de PCR extraído del gel y aproximadamente 100 ng de vector pZMP31-ms 26-10VH-Fc5 digerido con *NotI*. La mezcla se transfiere a una cubeta de electroporación de 0,2 cm. La

mezcla de levadura/ADN se electropulsa usando una fuente de alimentación (BioRad Laboratories, Hercules, CA) con la configuración de 0,75 kV (5 kV/cm),  $\infty$  ohm, y 25  $\mu$ F. Se añaden seiscientos  $\mu$ l de sorbitol 1,2 M a la cubeta, y la levadura se siembra en alícuotas de 300  $\mu$ l en dos placas URA-D y se incuban a 30 °C. después de aproximadamente 72 horas, los transformantes de levadura Ura<sup>+</sup> de una única placa se re-suspenden en 1 ml de H<sub>2</sub>O y se centrifugan brevemente para sedimentar las células de levadura. El sedimento celular se re-suspende en 0,5 ml de tampón de lisis (Triton X-100 al 2 %, SDS al 1 %, NaCl 100 mM, Tris 10 mM, pH 8,0, EDTA 1 mM). Los 500  $\mu$ l de la mezcla de lisis se añaden a un tubo Eppendorf que contiene 250  $\mu$ l de perlas de vidrio lavadas con ácido y 300  $\mu$ l de fenol-cloroformo, se agita con vórtice durante 3 minutos, y se centrifuga durante 5 minutos en una centrífuga Eppendorf a velocidad máxima. Se transfieren trescientos  $\mu$ l de la fase acuosa a un tubo nuevo, y se precipita el ADN con 600  $\mu$ l de etanol, seguido por centrifugación durante 30 minutos a velocidad máxima. El tubo se decanta y se lava el sedimento con 1 ml de etanol al 70 %. El tubo se decanta y se re-suspende el sedimento de ADN en 10  $\mu$ l de agua.

La transformación de las células huésped *E. coli* electrocompetentes (DH10B, Invitrogen, Carlsbad, CA) se hace usando 1  $\mu$ l de la preparación de ADN de levadura y 20  $\mu$ l de células *E. coli*. Las células se electropulsan a 2,0 kV, 25  $\mu$ F, y 400 ohm. Después de la electroporación, se añade 1 ml de SOC (Tryptona Bacto™ al 2 % (Difco, Detroit, MI), extracto de levadura al 0,5 % (Difco), NaCl 10 mM, KCl 2,5 mM, MgCl<sub>2</sub> 10 mM, MgSO<sub>4</sub> 10 mM, glucosa 20 mM) y las células se siembran en alícuotas de 50  $\mu$ l y 200  $\mu$ l en dos placas LB AMP (caldo LB (Lennox), agar Bacto™ al 1,8 % (Difco), 100 mg/l de ampicilina).

El plásmido se extrae de seis clones de *E. coli* para cada construcción, se somete a análisis de secuencia y se selecciona un clon que contenga la secuencia correcta para uso adicional. El ADN plasmídico a gran escala se aísla usando un kit disponible en el mercado (Kit QIAGEN Plasmid Mega, Qiagen, Valencia, CA) de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

#### A. Construcción de BiAb

##### 1. Panel de BiAb inicial

Se construyeron fragmentos de PCR Fv de cadena sencilla cada uno solapando dos fragmentos de PCR, uno para cada una de las regiones pesada variable y ligera variable con la región de solapamiento interna en el enlazador de 25 monómeros (G<sub>4</sub>S)<sub>5</sub>.

##### a. Conversión de Fab en IgG

Se amplificó la secuencia c597 Fab por PCR a partir de la construcción de presentación pMID usando los cebadores zc60375 (SEC ID N° 645) y zc60376 (SEC ID N° 646) en las siguientes condiciones: 1 ciclo, 95 °C, 2 minutos; 25 ciclos, 95 °C, 30 segundos, seguido por 50 °C, 30 segundos, seguido por 68 °C, 90 segundos; 1 ciclo, 68 °C, 5 minutos. La reacción de PCR se purificó usando un kit de purificación de PCR QIAquick (QIAGEN) seguido por digestión con *Apa*LI y *Nhe*I (New England Biolabs), incubado a 37 °C durante una noche. La reacción de digestión se procesó en un gel de agarosa al 1,2 % (Invitrogen) y el fragmento de ADN de 1,1 kb se extrajo del gel usando el kit de extracción de gel QIAquick (QIAGEN).

El fragmento se ligó en pRH laz (Dyax) fosfatado (Promega) cortado con *Apa*LI y *Ahe*I usando ADN ligasa T4 (NEB), incubando una noche a 16 °C, seguido por inactivación por calor durante 10 minutos a 65 °C. La reacción de ligamiento se precipitó con NaOAc/etanol y se re-suspendió en 20  $\mu$ l H<sub>2</sub>O.

Se transformaron 50  $\mu$ l de células DH5 $\alpha$  competentes (Invitrogen) con 4  $\mu$ l del ligamiento mediante choque térmico según el protocolo del fabricante, después se sembraron en placas de agar (2xYT, glucosa al 2 %, 100  $\mu$ g/ml de Ampicilina) y se cultivaron durante una noche a 37 °C.

El plásmido se preparó a partir de una única colonia usando el kit QIAprep Spin Miniprep de QIAGEN, después se digirió secuencialmente con *Asc*I y *Mfe*I; cada digestión seguida por purificación con el kit de purificación de PCR QIAquick. El fragmento de ADN de 6,9 kb se fosfató (Promega), se procesó en un gel de agarosa al 1,2 % (Invitrogen) y se extrajo del gel usando el kit de extracción de gel QIAquick.

Se realizó una reacción de ligamiento que contenía este vector intermedio y un fragmento de 692 pb que se había digerido anteriormente de pShuttle (Dyax) usando *Asc*I y *Mfe*I (NEB) purificado después con el kit de purificación de PCR QIAquick como se ha descrito anteriormente.

La reacción de ligamiento se precipitó con NaOAc/etanol y se re-suspendió en 20  $\mu$ l H<sub>2</sub>O.

Se transformaron 75  $\mu$ l de células DH5 $\alpha$  competentes (Invitrogen) con 2  $\mu$ l del ligamiento mediante choque térmico según el protocolo del fabricante, después se sembraron en placas de agar (2xYT, glucosa al 2 %, 100  $\mu$ g/ml de Ampicilina) y se cultivaron durante una noche a 37 °C.

El plásmido se aisló de 4 colonias usando el kit QIAprep Spin Miniprep y se sometieron a análisis de secuencia. Se seleccionó un único clon que contenía la secuencia correcta para preparación a gran escala de ADN plasmídico (kit



EndoFree Plasmid Maxi, QIAGEN).

*b. Inserción de scFv C-terminal*

El plásmido de inmunoglobulina gamma c597.1/pRHlaz (fase de lectura abierta mostrada en las SEC ID N° 536 y SEC ID N° 509) ya contenía el anticuerpo anti-PDGFR $\beta$  y se linealizó en el extremo 3' de la cadena pesada para insertar los Fv de cadena sencilla anti-VEGF-A: c1111.1 contenido en la SEC ID N° 495, c870.1 contenido en la SEC ID N° 497, c1092.1 contenido en la SEC ID N° 499, 1039.1 contenido en la SEC ID N° 501, c868.1 contenido en la SEC ID N° 503, y c1081.1 contenido en la SEC ID N° 505. Se generaron dos fragmentos de PCR para añadir los scFv carboxilo-terminales y se unieron juntos mediante PCR de solapamiento. La primera PCR usó un oligonucleótido 5' que solapaba con el sitio BsrGI en la región Fc de inmunoglobulina gamma I y el oligo 3' solapaba con el enlazador (G<sub>4</sub>S)<sub>2</sub>. El segundo fragmento de PCR usó un oligonucleótido 5' que solapaba en la región del enlazador (G<sub>4</sub>S)<sub>2</sub> y contenía el fragmento scFv. El oligonucleótido 3' solapaba con el sitio BclI en la estructura del vector.

Las condiciones de reacción de amplificación por PCR fueron las siguientes: 1 ciclo, 95°C, 2 minutos; 30 ciclos, 95°C, 15 segundos, seguido por 55°C, 30 segundos, seguido por 68°C, 1 minuto por kb. La mezcla de reacción de PCR se procesó en un gel de agarosa al 1 % y el fragmento de ADN correspondiente al tamaño esperado se extrajo del gel usando el kit de purificación de ADN de PCR y de bandas de gel GE Healthcare Illustra GFX™ (Reino Unido).

Los fragmentos de PCR generados por la PCR de solapamiento se digirieron con BsrGI y BclI. Los fragmentos se ligaron en inmunoglobulina gamma1 c597.1/pRHlaz (una estructura de vector Dyax comercial) que se había digerido anteriormente con las mismas enzimas, usando ADN ligasa T4 (Invitrogen, Carlsbad, CA). Los ligamientos se incubaron durante una noche a 16 °C y se trataron con calor durante 10 minutos a 65 °C.

La transformación de células huésped *E. coli* químicamente competentes (DH10B-T1, Invitrogen, Carlsbad, CA) se realizó usando 1  $\mu$ l de la preparación de ADN ligado y 20  $\mu$ l de células *E. coli*. Las células se transformaron de acuerdo con el manual del producto y después se colocaron en alícuotas de 50  $\mu$ l y 200 $\mu$ l en dos placas LB AMP (caldo LB (Lennox), Agar Bacto™ al 1.8 % (Difco), 100 mg/l de ampicilina).

El plásmido se preparó a partir de cuatro colonias por construcción y se sometió a análisis de secuencia. Se seleccionó al menos un clon que contenía la secuencia correcta para su uso adicional. Se aisló ADN plasmídico a gran escala usando un kit disponible en el mercado (Kit QIAGEN Plasmid Mega, Qiagen, Valencia, CA) de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

Los cebadores oligonucleotídicos y moldes para la construcción de cada biAb se resumen en la Tabla 22.

**Tabla 22: Construcción de BiAb - cadena pesada con scFv\* C-Terminal**

MVC N°/ SEC ID N°: Nucleótidos/ SEC ID N°: Polipéptido**	N° zc de cebadores oligonucleotídicos	IgG1 molde (MVC376)	N° zc de cebadores oligonucleotídicos	ID del grupo molde
MVC N° 334/ SEC ID N°:511/SEC ID N°:512	5'=56959 (SEC ID N°:523) 3'=60566 (SEC ID N°:525)	IgG1 SEC ID N°:509	5'=60525 (SEC ID N°:524) 3'=61084 (SEC ID N°:526)	c1111.1 SEC ID N°:497
MVC N° 335/ SEC ID N°:513/SEC ID N°:54	5'=56959 (SEC ID N°:523) 3'=60566 (SEC ID N°:525)	IgG1 SEC ID N°:509	5'=60525 (SEC ID N°:524) 3'=61085 (SEC ID N°:527)	c870.1 SEC ID N°:499
MVC N° 336/ SEC ID N°:515/SEC ID N°:516	5'=56959 (SEC ID N°:523) 3'=60566 (SEC ID N°:525)	IgG 1 SEC ID N°:509	5'=60525 (SEC ID N°:524) 3'=61086 (SEC ID N°:528)	c1092.1 SEC ID N°:501

(continuación)

MVC N°/ SEC ID N°: Nucleótidos/ SEC ID N°: Polipéptido**	N° zc de cebadores oligonucleotídicos	IgG1 molde (MVC376)	N° zc de cebadores oligonucleotídicos	ID del grupo molde
MVC N° 337/ SEC ID N°:517/SEC ID N°:518	5'=56959 (SEC ID N°:523) 3'=60566 (SEC ID N°:525)	IgG1 SEC ID N°:509	5'=60525 (SEC ID N°:524) 3'=61086 (SEC ID N°:528)	c1039.1 SEC ID N°:503
MVC N° 338/ SEC ID N°:519/SEC ID N°:520	5'=56959 (SEC ID N°:523) 3'=60566 (SEC ID N°:525)	IgG 1 SEC ID N°:509	5'=61089 (SEC ID N°:530) 3'=61087 (SEC ID N°:529)	c868.1 SEC ID N°:505
MVC N° 339/ SEC ID N°:521/SEC ID N°:522	5'=56959 (SEC ID N°:523) 3'=60566 (SEC ID N°:525)	IgG 1 SEC ID N°:509	5'=60525 (SEC ID N°:524) 3'=61086 (SEC ID N°:528)	c1081.1 SEC ID N°:507
<p>* Todos los biAb tienen la misma secuencia de cadena ligera c597.1 (secuencias nucleotídicas y polipeptídicas mostradas en las SEC ID N°:536 y 537, respectivamente). La secuencia señal del componente de cadena ligera c597.1 de los biAb corresponde a los aminoácidos 1-19 de la SEC ID N°:537 (codificada por los nucleótidos 1-57 de la SEC ID N°:536).</p> <p>** Las construcciones MVC N° 334-339 son IgG 1 humana de tipo silvestre (que comprende la región variable de cadena pesada de c597) con un scFv carboxilo-terminal conectado mediante un enlazador. La secuencia señal del componente IgG1-scFv corresponde a los aminoácidos 1-19 de la SEC ID N° indicada del polipéptido (correspondiente a los nucleótidos 1-57 de la SEC ID N° indicada de nucleótidos).</p>				

## 2. Segundo panel de BiAb

Se construyeron de fragmentos de PCR de Fv de cadena sencilla cada uno solapando dos fragmentos de PCR, uno para cada una de las regiones pesada variable y ligera variable con la región de solapamiento interna en el enlazador de 25 monómeros (G<sub>4</sub>S)<sub>5</sub>.

### 5 a. Conversión de Fab en IgG

Para cada uno de los Fab c597 y c600, se amplificó la secuencia Fab por PCR a partir de la construcción de presentación pMID usando los cebadores zc60375 (SEC ID N° 645) y zc60376 (SEC ID N° 646) en las siguientes condiciones: 1 ciclo, 95 °C, 2 minutos; 25 ciclos, 95 °C, 30 segundos, seguido por 50 °C, 30 segundos, seguido por 68 °C, 90 segundos; 1 ciclo, 68 °C, 5 minutos. La reacción de PCR se purificó usando un kit de purificación de PCR QIAquick (QIAGEN) seguido por digestión con *Apa*LI y *Nhe*l (New England Biolabs), incubada a 37 °C durante toda la noche. La reacción de digestión se procesó en un gel de agarosa al 1,2 % (Invitrogen) y el fragmento de ADN de 1,1 kb se extrajo del gel usando el kit de extracción de gel QIAquick (QIAGEN).

El fragmento se ligó en pRhlaz (Dyax) fosfatado (Promega) cortado con *Apa*LI y *Nhe*l usando ADN ligasa T4 (NEB), incubando durante una noche a 16 °C, seguido por inactivación por calor durante 10 minutos a 65 °C. La reacción de ligamiento se precipitó en NaOAc/etanol y se re-suspendió en 20 µl H<sub>2</sub>O.

Se transformaron 50 µl de células competentes DH5α (Invitrogen) con 4 µl del ligamiento mediante choque térmico según el protocolo del fabricante, después se sembraron en placas de agar (2xYT, glucosa al 2 %, 100 µg/ml de Ampicilina) y se cultivaron durante una noche a 37 °C.

El plásmido se preparó a partir de una única colonia usando el kit QIAGEN QIAprep Spin Miniprep, después se digirió secuencialmente con *As*cl y *M*feI; cada digestión seguida por purificación con el kit de purificación de PCR QIAquick. El fragmento de ADN de 6,9 kb se fosfató (Promega), se ejecutó en un gel de agarosa al 1,2 % (Invitrogen) y se extrajo del gel usando el kit de extracción de gel QIAquick.

Se realizó una reacción de ligamiento que contenía este vector intermedio y un fragmento de 692 pb que se había digerido anteriormente de pShuttle (Dyax) usando *Ascl* y *MfeI* (NEB) purificado después con el kit de purificación de PCR QIAquick como se ha descrito anteriormente.

La reacción de ligamiento se precipitó en NaOAc/etanol y se re-suspendió en 20 µl de H<sub>2</sub>O.

- 5 Se transformaron 75 µl de células competentes DH5α (Invitrogen) con 2 µl del ligamiento mediante choque térmico según el protocolo del fabricante, después se sembraron en placas de agar (2xYT, glucosa al 2 %, 100 µg/ml de Ampicilina) y se cultivaron durante una noche a 37 °C.

El plásmido se aisló de 4 colonias usando el kit QIAprep Spin Miniprep y se sometió a análisis de secuencia. Se seleccionó un único clon que contenía la secuencia correcta para preparación de ADN plasmídico a gran escala (kit EndoFree Plasmid Maxi, QIAGEN).

#### b. Inserción de scFv C-terminal

Los plásmidos de inmunoglobulina gamma 1 c597.1/pRH1az (fase de lectura abierta mostrada en las SEC ID N° 536 y SEC ID N° 509) o de inmunoglobulina gamma 1 c600.11/pRH1az (fase de lectura abierta mostrada en las SEC ID N° 613 y SEC ID N° 615) ya contenían el anticuerpo anti-PDGFRβ y se linealizaron en el extremo 5' de la cadena pesada en el sitio *NheI* para insertar los Fv de cadena sencilla anti-VEGFA: c868.1 contenido en la SEC ID N° 607, c870.1 contenido en la SEC ID N° 609, 1039.1 contenido en la SEC ID N° 611. Se generaron dos fragmentos de PCR para añadir el scFv carboxilo-terminal y se unieron juntos mediante PCR de solapamiento. La primera PCR usó oligonucleótido 5' que solapaba con el sitio *NheI* en la inmunoglobulina gamma 1 para hacer que la región Fc de la inmunoglobulina gamma 1.1 (SEC ID N° 641) y el oligo 3' solaparan en el enlazador (G<sub>4</sub>S)<sub>2</sub>. El segundo fragmento de PCR usó un oligonucleótido 5' que solapaba con la región enlazadora (G<sub>4</sub>S)<sub>2</sub> y contenía el fragmento scFv. El oligonucleótido 3' solapaba con el sitio *BclI* en la estructura del vector. Las condiciones de reacción de amplificación por PCR fueron las siguientes: 1 ciclo, 95°C, 2 minutos; 30 ciclos, 95°C, 15 segundos, seguido por 55°C, 30 segundos, seguido por 68°C, 1 minuto por kb. La mezcla de reacción de PCR se procesó en un gel de agarosa al 1 % y el fragmento de ADN correspondiente al tamaño esperado se extrajo del gel usando el kit de purificación de ADN de PCR y de banda de gel GE Healthcare Illustra GFX™ (Reino Unido).

Los fragmentos de PCR generados por PCR de solapamiento se digirieron con *NheI* y *BclI*. Los fragmentos se ligaron en inmunoglobulina gamma 1 c597.1/pRH1az o inmunoglobulina gamma 1 c600.1/pRH1az (una estructura de vector Dyax comercial) que se había digerido anteriormente con las mismas enzimas, usando ADN ligasa T4 (Invitrogen, Carlsbad, CA). Los ligamientos se incubaron durante una hora a temperatura ambiente y se trataron con calor durante 10 minutos a 65 °C.

La transformación de células huésped *E. coli* químicamente competentes (DH10B-T1, Invitrogen, Carlsbad, CA) se realizó usando 1 µl de la preparación de ADN ligado y 20 µl de células *E. coli*. Las células se transformaron de acuerdo con el manual del producto y después se colocaron en alícuotas de 50 µl y 200 µl en dos placas LB AMP (caldo LB (Lennox), agar Bacto™ al 1,8 % (Difco), 100 mg/l de ampicilina).

35 El plásmido se preparó a partir de cuatro colonias por construcción y se sometió a análisis de secuencia. Se seleccionó al menos un clon que contenía la secuencia correcta para su uso adicional. Se aisló el ADN plasmídico a gran escala usando un kit disponible en el mercado (kit QIAGEN Plasmid Mega, Qiagen, Valencia, CA) de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

Los cebadores oligonucleotídicos y moldes para la construcción de cada biAb se resumen en la Tabla 23.

**Tabla 23: Construcción de BiAb – cadena pesada con scFv C-Terminal\***

MVC N°/ SEC ID N°: nucleótidos (cadena pesada de IgG) / SEC ID N°: polipéptido**	N° zc de cebadores oligonucleotídicos	IgG1.1 molde	N° zc de cebadores oligonucleotídicos	ID del grupo molde
MVC N° 486/ (c597.1) SEC ID N°:629/ SEC ID N°:630	5'=62580 (SEC ID N°:601) 3'=60566 (SEC ID N°:525)	IgG1.1 (SEC ID N°:641)	5'=61089 (SEC ID N°:530) 3'=61087 (SEC ID N°:529)	c868.1 SEC ID N°:607

40

(continuación)

<b>MVC Nº/ SEC ID Nº: nucleótidos (cadena pesada de IgG) / SEC ID Nº: polipéptido**</b>	<b>Nº zc de cebadores oligonucleotídicos</b>	<b>IgG1.1 molde</b>	<b>Nº zc de cebadores oligonucleotídicos</b>	<b>ID del grupo molde</b>
MVC Nº 487/ (c597.1) SEC ID Nº:631/ SEC ID Nº:632	5'=62580 (SEC ID Nº:601) 3'=60566 (SEC ID Nº:525)	IgG1.1 (SEC ID Nº:641)	5'=60525 (SEC ID Nº:524) 3'=62593 (SEC ID Nº:602)	c870.1 SEC ID Nº:609
MVC Nº 488/ (c597.1) SEC ID Nº:633/ SEC ID Nº:634	5'=62580 (SEC ID Nº:601) 3'=60566 (SEC ID Nº:525)	IgG1.1 (SEC ID Nº:641)	5'=60525 (SEC ID Nº:524) 3'=61086 (SEC ID Nº:528)	c1039.1 SEC ID Nº:611
MVC Nº 489/ (c600.1) SEC ID Nº:635/ SEC ID Nº:636	5'=62580 (SEC ID Nº:601) 3'=60566 (SEC ID Nº:525)	IgG1.1 (SEC ID Nº:641)	5'=61089 (SEC ID Nº:530) 3'=61087 (SEC ID Nº:529)	c868.1 SEC ID Nº:607
MVC Nº 490/ (c600.1) SEC ID Nº:637/ SEC ID Nº:638	5'=62580 (SEC ID Nº:601) 3'=60566 (SEC ID Nº:525)	IgG1.1 (SEC ID Nº:641)	5'=60525 (SEC ID Nº:524) 3'=62593 (SEC ID Nº:602)	c870.1 SEC ID Nº:609
MVC Nº 491/ (c600.1) SEC ID Nº:639/ SEC ID Nº:640	5'=62580 (SEC ID Nº:601) 3'=60566 (SEC ID Nº:525)	IgG1.1 (SEC ID Nº:641)	5'=60525 (SEC ID Nº:524) 3'=61086 (SEC ID Nº:528)	c1039.1 SEC ID Nº:611
<p>* Todos los biAb tienen la misma secuencia de cadena ligera (secuencias nucleotídicas y polipeptídicas mostradas en las SEC ID Nº:536 y 537, respectivamente, o en las SEC ID Nº: 613 y 614, respectivamente). La secuencia señal del componente de cadena ligera c597.1 o c600.1 de los biAb corresponde a los aminoácidos 1-19 de la SEC ID Nº:537 o SEQ ID NO:613 (codificada por los nucleótidos 1-57 de la SEC ID Nº:536 o SEC ID Nº:614).</p> <p>** Las construcciones MVC Nº 486-491 son IgG 1 humanas negativas en función efectora ("IgG 1.1") (que comprende la región variable de cadena pesada de c597 o c600, como se indica) con un scFv carboxilo-terminal conectado mediante un enlazador. La secuencia señal del componente IgG1.1-scFv corresponde a los aminoácidos 1-19 de la SEC ID Nº indicada de polipéptido (correspondiente a los nucleótidos 1-57 de la SEC ID Nº indicada de nucleótidos)</p>				

### C. Construcción de Bi-FvFc de cadena sencilla (BiscFvFv)

#### 1. General

5 Los fragmentos de PCR Fv de cadena sencilla se construyeron cada uno solapando dos fragmentos de PCR, uno para cada una de las regiones pesada variable y ligera variable con la región de solapamiento interna en el enlazador de 25 monómeros (G<sub>4</sub>S)<sub>5</sub>.

10 Se generaron tres fragmentos de PCR para el ensamblaje de una molécula bi-FvFc de cadena sencilla (biscFvFv). El scFv en el extremo 5' tenía la secuencia señal de ratón 26-10 VH añadida mediante diseño de oligos y solapaba con la región 5' no traducida del vector y con la región Fc. El segundo fragmento de PCR constaba del fragmento Fc5, que solapaba con la secuencia enlazadora que conecta el scFv carboxilo-terminal con la región Fc. El scFv 3' solapaba con la secuencia enlazadora en el extremo carboxilo del Fc y el IRES de poliovirus (sitio interno de entrada del ribosoma).

Las condiciones de reacción de amplificación por PCR fueron las siguientes: : 1 ciclo, 95°C, 2 minutos; 30 ciclos, 95°C, 15 segundos, seguido por 55°C, 30 segundos, seguido por 68°C, 1 minuto por kb. La mezcla de reacción de PCR se procesó en un gel de agarosa al 1 % y el fragmento de ADN correspondiente al tamaño esperado se extrajo del gel usando el kit de purificación de ADN de PCR y de bandas de gel GE Healthcare illustra GFX™ (Reino Unido).

- 5 Los ADNc se clonaron en el vector pZMP31 por recombinación de levaduras. pZMP31 es un vector de expresión de mamífero que contiene un casete de expresión que tiene el potenciador CMV/promotor MPSV quimérico, un sitio EcoRI para la linealización para la inserción del ADNc, un sitio interno de entrada del ribosoma (IRES) de poliovirus, un ADNc de DHFR, el terminador SV40, un origen de replicación de *E. coli*, y los genes URA3 y CEN-ARS de *S. cerevisiae*. Este vector se obtuvo de pZMP21 (patente de Estados Unidos 7.262.025).
- 10 Antes de la recombinación en levaduras con los fragmentos de PCR extraídos del gel, el plásmido pZMP31 se digirió con EcoRI. Se combinaron 100 µl de levaduras electrocompetentes (*S. cerevisiae* SF838-9D, URA-) con aproximadamente 12 µl de cada fragmento de PCR extraído del gel y aproximadamente 100 ng de pZMP31 digerido con EcoRI. La mezcla se transfirió a una cubeta de electroporación de 0,2 cm. La mezcla de levadura/ADN se electropulsó usando una fuente de alimentación (BioRad Laboratories, Hercules, CA) con la configuración de 0,75 kV (5 kV/cm), ∞ ohm, y 25 µF. Se añadieron seiscientos µl de sorbitol 1,2 M a la cubeta, y las levaduras se sembraron en alícuotas de 300 µl en dos placas URA-D y se incubaron a 30 °C. Después de aproximadamente 72 horas, los transformantes de levadura Ura+ de una única placa se re-suspendieron en 1 ml de H<sub>2</sub>O y se centrifugaron brevemente para sedimentar las células de levadura. El sedimento celular se re-suspendió en 0,5 ml de tampón de lisis (Triton X-100 al 2 %, SDS al 1 %, NaCl 100 mM, Tris 10 mM, pH 8,0, EDTA 1 mM). Los 500 µl de la mezcla de lisis se añadieron a un tubo Eppendorf que contenía 250 µl de perlas de vidrio lavadas en ácido y 300 µl de fenol-cloroformo, se agitó con vórtice durante 3 minutos, y se centrifugó durante 5 minutos en una centrifuga Eppendorf a velocidad máxima. Se transfirieron 300 µl de la fase acuosa a un tubo nuevo, y el ADN se precipitó con 600 µl de etanol, seguido por centrifugación durante 30 minutos a velocidad máxima. El tubo se decantó y se lavó el sedimento con 1 ml de etanol al 70 %. El tubo se decantó y el sedimento de ADN se re-suspendió en 10 µl de agua.
- 15
- 20
- 25 La transformación de las células huésped *E. coli* electrocompetentes (DH10B, Invitrogen, Carlsbad, CA) se hizo usando 1 µl de la preparación de ADN de levadura y 20 µl de células *E. coli*. Las células se electropulsaron a 2,0 kV, 25 µF, y 400 ohm. Después de la electroporación, se añadió 1 ml de SOC (Tryptona Bacto™ al 2 % (Difco, Detroit, MI), extracto de levadura al 0,5 % (Difco), NaCl 10 mM, KCl 2,5 mM, MgCl<sub>2</sub> 10 mM, MgSO<sub>4</sub> 10 mM, glucosa 20 mM) y las células se sembraron en alícuotas de 50 µl y 200 µl en dos placas LB AMP (caldo LB (Lennox), agar Bacto™ al 1,8 % (Difco), 100 mg/l de ampicilina).
- 30

El plásmido se extrajo de seis colonias de *E. coli* para cada construcción, se sometió a análisis de secuencia y se seleccionó un clon que contenía la secuencia correcta para su uso adicional. El ADN plasmídico a gran escala se aisló usando un kit disponible en el mercado (kit QIAGEN Plasmid Mega, Qiagen, Valencia, CA) de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

## 35 2. Construcción de BiscFvFc c941/c868, c941/c870, 941/c1039, c1035/c868, c1035/c870, y c1035/c1039

- Se generaron tres fragmentos de PCR para el ensamblaje de una molécula bi-FvFc de cadena sencilla (biscFvFc). El scFv en el extremo 5' era c941.1 contenido en la SEC ID N° 603 o c1035.1 contenido en la SEC ID N° 605 y tenía la secuencia señal de ratón 26-10 VH añadida mediante diseño de oligos y solapaba con la región 5' no traducida del vector y con la región Fc. El segundo fragmento de PCR constaba del fragmento Fc5, que solapaba con la
- 40 la secuencia enlazadora que conecta el scFv carboxilo-terminal a la región Fc. El scFv 3' era c868.1 contenido en la SEC ID N° 607, c870.1 contenido en la SEC ID N° 609, ó 1039.1 contenido en la SEC ID N° 611 y solapaba con la secuencia enlazadora en el extremo carboxilo del Fc y el IRES (sitio interno de entrada del ribosoma) de poliovirus. Los cebadores oligonucleotídicos y moldes para la construcción de cada biscFvFc se resumen en la Tabla 24.

Tabla 24: Construcción de Bi-FvFc de cadena sencilla (BiscFvFc)

MVC N°/ SEC ID N°: nucleótidos/ SEC ID N°: polipéptido*	scFv1				scFv2			
	N° zc oligos	Molde	N° zc oligos	Molde	Fc5 (SEC ID N°:643) y N° zc	N° zc oligos	Molde	N° zc oligos
415/SEC ID N°:617/ SEC ID N°:618	5'=56626 (SEC N°:585) 5'=60427 (SEC ID N°:588) 3'=61436 (SEC ID N°:591)	C941.1 SEC ID N°:603	5'=61437 (SEC ID N°:592)	C941.1 SEC ID N°:603	Fc5  5'=24945(SEC ID N°:584)  3'=60566(SEC ID N°:525)	5'=61438 (SEC ID N°:593)	C868.1 SEC ID N°:607	5'=60139 (SEC ID N°:587)
416/SEC ID N°:619/ SEC ID N°:620	5'=56626 (SEC ID N°:585) 5'=60427 (SEC ID N°:588) 3'=61436 (SEC ID N°:591)	C941.1 SEC ID N°:603	5'=61437 (SEC ID N°:592) 3'=60496 (SEC ID N°:589)	C941.1 SEC ID N°:603	Fc5  5'=24945(SEC ID N°:594)  3'=60566(SEC ID N°:525)	5'=60525 (SEC ID N°:524) 3'=59956 (SEC ID N°:586)	C870.1 SEC ID N°:609	5'=61440 (SEC ID N°:595) 3'=61447 (SEC ID N°:599)

(continuación)

<b>MVC N°/ SEC ID N°:</b> <b>nucleótidos/ SEC ID N°:</b> <b>polipéptido*</b>	<b>N° zc oligos</b>	<b>Molde</b>	<b>N° zc oligos</b>	<b>Molde</b>	<b>Fc5 (SEC ID N°:643) y N° zc</b>	<b>N° zc oligos</b>	<b>Molde</b>	<b>N° zc oligos</b>	<b>Molde</b>
417/SEC ID N°:621/ SEC ID N°:622	5'=56626 (SEC ID N°:585) 5'=60427 (SEC ID N°:588) 3'=61436 (SEC ID N°:591)	C941.1 SEC ID N°:603	5'=61437 (SEC ID N°:592)	C941.1 SEC ID N°:603	Fc5  5'=24945(SEC ID N°:584)  3'=60566(SEC ID N°:525)	5'=60525 (SEC ID N°:524)  3'=59956 (SEC ID N°:586)	C1039.1 SEC ID. N°:611	5'=60500 (SEC ID N°:590)  3'=61448 (SEC ID N°:600)	C1039.1 SEC ID N°:611
418/SEC ID N°:623/ SEC ID N°:624	5'=56626 (SEC ID N°:585) 5'=60427 (SEC ID N°:588) 3'=59956 (SEC ID N°:586)	C1035.1 SEC ID N°:605	5'=61443 (SEC ID N°:596)  3'=61444 (SEC ID N°:597)	C1035.1 SEC ID N°:605	Fc5  5'=24945(SEC ID N°:584)  3'=60566(SEC ID N°:525)	5'=61438 (SEC ID N°:593)  3'=61439 (SEC ID N°:594)	C868.1 SEC ID N°:607	5'=60139 (SEC ID N°:587) 3'=61445 (SEC ID N°:598)	C868.1 SEC ID N°:607

(continuación)

<b>MVC N°/ SEC ID N°:</b> <b>nucleótidos/</b> <b>SEC ID N°:</b> <b>polipéptido*</b>	<b>N° zc oligos</b>	<b>Molde</b>	<b>N° zc oligos</b>	<b>Molde</b>	<b>Fc5 (SEC ID</b> <b>N°:643) y N° zc</b>	<b>N° zc oligos</b>	<b>Molde</b>	<b>N° zc oligos</b>	<b>Molde</b>
419/SEC ID N°:625/ SEC ID N°:626	5'=56626 (SEC ID N°:585) 5'=60427 (SEC ID N°:588)	C1035.1 SEC ID N°:605	5'=61443 (SEC ID N°:596) 3'=61444 (SEC ID N°:597)	C1035.1 SEC ID N°:605	Fc5  5'=24945(SEC ID N°:584) 3'=60566(SEC ID N°:525)	5'=60525 (SEC ID N°:524) 3'=59956 (SEC ID N°:586)	C870.1 SEC ID N°:609	5'=61440 (SEC ID N°:595) 3'=61447 (SEC ID N°:599)	C870.1 SEC ID N°:609
420/SEC ID N°:627/ SEC ID N°:628	5'=56626 (SEC ID N°:385) 5'=60427 SEC ID N°:588) 3'=59956 (SEC ID N°:586)	C1035.1 SEC ID N°:605	5'=61443 (SEC ID N°:596) 3'=61444 (SEC ID N°:597)	C1035.1 SEC ID N°:605	Fc5  5'=24945(SEC ID N°:584) 3'=60566(SEC ID N°:525)	5'=60525 (SEC ID N°:524) 3'=59956 (SEC ID N°:586)	C1039.1 SEC ID N°:611	5'=60500 (SEC ID N°:590) 3'=61448 (SEC ID N°:600)	C1039.1 SEC ID N°:611
* La secuencia señal de los bisosFcVFc corresponde a los aminoácidos 1-19 de la SEC ID N° indicada de polipéptido (correspondiente a los nucleótidos 1-57 de la SEC ID N° indicada de nucleótidos)									



**Ejemplo 30: Expresión de moléculas tascFv y biscFv**

Se digieren cuatro réplicas de una alícuota de 100 µg de una construcción tasc o bisc con 100 unidades de Pvu I a 37 °C durante tres horas, se precipitan con IPA, y se centrifugan en un tubo de microfuga de 1,5 ml. El sobrenadante se retira por decantación de cada sedimento, se añade 1 ml de etanol al 70 % y después se deja incubar durante 5 minutos a temperatura ambiente. Los tubos se centrifugan en una microfuga durante 5 minutos a 14.000 rpm y el sobrenadante se retira por decantación de los sedimentos. Cada sedimento se re-suspende en 500 µl de medio ZF1 en un entorno estéril y se deja incubar a temperatura ambiente durante 30 minutos. Se centrifugan 5E6 a 1E7 células 5xSA por réplica en cada uno de los cuatro tubos y se re-suspenden usando la solución de ADN-medio. Cada mezcla de ADN/célula se coloca en una cubeta con hueco de 0,4 cm y se somete a electroporación usando los siguientes parámetros: 950 µF, alta capacitancia, y 300 V. Los contenidos de las cubetas se retiran, combinan, diluyen en un matraz de agitación de 125 ml que contienen 25 ml de medio ZF1. El matraz se coloca en una incubadora sobre un agitador a 37 °C, CO<sub>2</sub> al 6 %, y se agita a 120 rpm. La línea celular después se somete a selección con metotrexato (MTX) y se expande a volúmenes mayores.

La producción de cada molécula se consigue sembrando una línea celular seleccionada en un matraz de agitación de 3 l a 4E5 células/ml en 1500 ml de medio ZF1. La centrifugadora se centrifuga a 85 rpm durante 120 horas a 37 °C, y CO<sub>2</sub> al 6 %, se recoge, se filtra a través de un filtro de 1,2 µm y uno de 0,2 µm, y se suministra para purificación.

**Ejemplo 31: Expresión de moléculas biAb**

Se digieren cuatro réplicas de una alícuota de 100 µg de ADN biab, compuesto por 50 µg de plásmido de cadena pesada y 50 µg de plásmido de cadena ligera de un par de construcciones de biAb, con 100 unidades de PvuI a 37 °C durante tres horas, se precipitan con IPA, y se centrifugan en un tubo de microfuga de 1,5 ml. El sobrenadante se retira por decantación de cada sedimento, se añade 1 ml de etanol al 70 % y después se deja incubar durante 5 minutos a temperatura ambiente. Los tubos se centrifugan en una microfuga durante 5 minutos a 14.000 rpm y el sobrenadante se retira por decantación de los sedimentos. Cada sedimento se re-suspende en 500 µl de medio ZF1 en un entorno estéril y se deja incubar a temperatura ambiente durante 30 minutos. Se centrifugan  $5 \times 10^6$  a  $1 \times 10^7$  células 5xSA por réplica en cada uno de los cuatro tubos y se re-suspenden usando la solución de ADN-medio. Cada mezcla de ADN/célula se coloca en una cubeta con hueco de 0,4 cm y se somete a electroporación usando los siguientes parámetros: 950 µF, alta capacitancia, y 300 V. Los contenidos de las cubetas se retiran, combinan, diluyen en un matraz de agitación de 125 ml que contiene 25 ml de medio ZF1. El matraz se coloca en una incubadora sobre un agitador a 37 °C, CO<sub>2</sub> al 6 %, y se agita a 120 rpm. La línea celular después se somete a selección con metotrexato (MTX) y se expande a volúmenes mayores.

La producción de un biab se consigue sembrando una línea celular seleccionada en un matraz de agitación de 3 l a  $4 \times 10^5$  células/ml en 1500 ml de medio ZF1. La centrifugadora se centrifuga a 85 rpm durante 120 horas a 37 °C, y CO<sub>2</sub> al 6 %, se recoge, se filtra a través de un filtro de 1,2 µm y uno de 0,2 µm, y se suministra para purificación.

**Ejemplo 32: Purificación de proteínas de fusión biespecíficas anti-PDGFRβ/VEGF de Fv de cadena sencilla-Fc5 en tándem a partir de células 293**

Se producen proteínas de fusión biespecíficas recombinantes de Fv de cadena sencilla-Fc5 en tándem a partir de células 293 transfectadas que expresan la diana a > 2 mg/l. Las transfecciones en 293 se realizan usando procedimientos conocidos en la técnica. El medio condicionado se recoge, se filtra a esterilidad usando filtro de 0,2 µm y se ajusta a pH 7,4. La proteína se purifica del medio filtrado usando una combinación de cromatografía de afinidad de proteína POROS® A50 (Applied Biosciences, Foster City, CA) y cromatografía por exclusión de tamaño Superdex 200 (GE Healthcare, Piscataway, NJ.). Se pre-eluye una columna POROS® A50 de 4 ml (10 mm x 50 mm) con tres volúmenes de columna (VC) de citrato-fosfato 25 mM (citrato sódico 1,61 mM - fosfato sódico 23,4 mM), tampón de sulfato de amonio 250 mM pH 3 y se equilibra con 20 VC de citrato-fosfato 25 mM, sulfato de amonio 250 mM pH 7,4. La carga directa de la columna a 1500 cm/h a 4 °C captura las proteínas de fusión en el medio condicionado. Después de completarse la carga, la columna se lava con 10 VC de citrato-fosfato 25 mM, tampón de sulfato de amonio 250 mM pH 7,4 después de lo cual la proteína unida se eluye a 1500 cm/h con un gradiente de 5 VC de pH 7,4 a pH 3 formado usando los tampones citrato-fosfato-sulfato de amonio. Se recogen fracciones de 2,0 ml cada una en tubos que contienen 200 µl de Tris 2,0 M, pH 8,0 y se mezclan inmediatamente para neutralizar las proteínas eluidas. Las fracciones se combinan basándose en A280 y SDS-PAGE no reductor.

La combinación que contiene la diana se concentra por ultrafiltración usando dispositivos de centrifugación Amicon Ultra-15 30K NWML (Millipore), hasta < 3 % del volumen de una columna Superdex 200 de tamaño apropiado. El concentrado se inyecta en la columna de exclusión de tamaño equilibrada en histidina 25 mM, NaCl 125 mM pH 6,8 y se eluye de forma isocrática a 30 cm/h. Las fracciones que contienen la diana purificada se combinan basándose en A280 y SDS-PAGE, se filtran a través de un filtro de 0,2 µm y se congelan como alícuotas a -80 °C. La concentración de la proteína purificada final se determina por absorción UV a 280 nm.

Análisis de proteínas de fusión purificadas de scFv-Fc5 en tándem

Las proteínas recombinantes se analizan por SDS-PAGE (BisTris al 4-12 %, Invitrogen, Carlsbad, CA) con tinción de Coomassie R250 al 0,1 % para la proteína e inmunotransferencia con anti-IgG-HRP. La proteína purificada se somete a electroforesis y se transfiere a nitrocelulosa (0,2 µm; Invitrogen, Carlsbad, CA) usando el sistema de transferencia en seco iBlot™ (Invitrogen, Carlsbad, CA). Los filtros después se bloquean con leche en polvo desnatada al 10 % en Tris 50 mM, NaCl 150 mM, EDTA 5 mM, Igepal al 0,05 % (TBS) durante 15 minutos a temperatura ambiente. La nitrocelulosa se aclara rápidamente, y se añade el anticuerpo contra IgG-HRP (1:10.000). Las transferencias se incuban durante una noche a 4 °C, con agitación suave. Después de la incubación, las transferencias se lavan cada una tres veces durante 10 minutos en TBS, y después se aclaran rápidamente en H<sub>2</sub>O. Las transferencias se revelan usando reactivos de sustrato quimioluminiscente disponibles en el mercado (Pierce SuperSignal), y la señal se captura usando el instrumento y software ImageQuant (GE Healthcare, Piscataway, NJ).

**Ejemplo 33: Ensayos *in vitro* para ensayar la actividad anti-angiogénica de antagonistas de PDGFRβ/VEGF-A**Ensayo de migración de células endoteliales para medir la inhibición de la migración del antagonista de PDGFRβ/VEGFA

Se siembran placas de inserción de 24 pocillos BD Biosciences N° 354143 Angiogenesis System con HUVEC sub-confluentes, de bajo pase (células endoteliales de la vena umbilical humana) adquiridas de Lonza, Rockland Inc., ME. La densidad de siembra es de 100.000 células/inserto en un volumen de 250 µl en DMEM + tampón hepes y medio BSA al 0,1 %. Todas las muestras de ensayo y control se procesan por triplicado. Después de la adición de las células al inserto superior, los pocillos de la placa se llenan con un volumen de 750 µl de soluciones de ensayo y controles. Los controles positivos son suero bovino fetal al 10 % y VEGFA (R&D Systems) a 0,1-50 ng/ml. El control negativo es DMEM + tampón hepes y BSA al 0,1 %. Las muestras de ensayo constan de concentraciones similares de VEGFA + antagonista de PDGFRβ/VEGFA a concentraciones variables. Las muestras de VEGFA (+/- antagonistas de PDGFRβ/VEGFA) pueden prepararse en bajas concentraciones de FBS. La placa de inserción se incubaba a 37 °C, CO<sub>2</sub> al 5 %, durante 21-23 horas. Las HUVEC que han migrado se miden por marcaje con calceína, colorante fluorescente AM (N° C3100MP, Molecular Probes). Se diluye calceína AM en solución salina básica de Hanks caliente, a 37 °C a una concentración de 4 µg/ml. El colorante diluido se añade a cada pocillo de una nueva placa de 24 pocillos, 500 µl/pocillo. La inserción interna que contiene las células se retira de la placa original, y los contenidos se vuelcan en el fregadero, teniendo cuidado de no alterar las células que han migrado adheridas a la parte inferior de la inserción. Los insertos después se colocan en los pocillos que contienen el colorante calceína, y la placa completa se devuelve a la incubadora de 37 °C, CO<sub>2</sub> al 5 % durante 90 minutos. Las mediciones fluorescentes se leen desde la parte inferior usando el Cytofluor 4000 (Applied Bio-Systems) a longitudes de onda de excitación/emisión de 485/530 nm. Los datos se expresan como unidades fluorescentes relativas (UFR), o como factor de migración sobre los controles.

Inhibición de crecimiento endotelial y de pericitos por antagonista de PDGFRβ/VEGF-A en un ensayo de brote en co-cultivo *in vitro***A. Sumario**

Para ensayar la eficacia del antagonista biespecífico de PDGFRβ/VEGF-A, se estableció un sistema de co-cultivo *in vitro* de células endoteliales y pericitos como se ha descrito (Darland y col, Dev Biol 264 (2003), 275). En este co-cultivo, se co-cultivan HUVEC recubiertas sobre perlas Cytodex con células madre mesenquimáticas humanas (Lonza) en presencia de medio completo EGM-2 y medio condicionado de fibroblastos D551 en gel de fibrina. Al inicio del experimento o en el Día 7 del experimento, se añaden 0,1-50 nM de antagonista de control, antagonista de PDGFRβ, antagonista de VEGF-A o antagonista de PDGFRβ/VEGF-A a los cultivos. Las células se fijan en el Día 8 después de la adición de los antagonistas usando PFA. Las células después se tiñen por IHC usando anticuerpos anti-actina de células de músculo liso (αSMA) o anti-PECAM para identificar pericitos y células endoteliales respectivamente. En los pocillos con tratamiento con antagonista de control, estas células forman brotes de células endoteliales protegidos por una cobertura de pericitos. En células tratadas con antagonistas de VEGF-A, PDGFRβ, o PDGFRβ/VEGF-A, se reduce la cantidad de brotes y la longitud de los brotes lo que sugiere que el antagonista muestra eficacia en este modelo de co-cultivo *in vitro*. La eficacia de los antagonistas de PDGFRβ, o PDGFRβ/VEGF-A puede demostrarse adicionalmente por disociación de los pericitos de las células endoteliales.

**B. Diseño del estudio**

En el Día 1, se recubren perlas Cytodex-3 con HUVEC y se incuban durante una noche a 37 °C, CO<sub>2</sub> al 5 %. En el Día 2, se incluyen las perlas HUVEC (200 perlas/pocillo) en gel de fibrina junto con células madre mesenquimáticas humanas (hMSC) (40.000 células/pocillo) en pocillos de una placa de 24 pocillos. Se añade una mezcla 1:1 de medio completo EGM-2 y medio de fibroblastos D551 a estas células junto con 2 ng/ml de HGF. El medio se reemplaza cada dos días hasta el final del experimento. Los antagonistas se añaden al cultivo en el Día 2 (desde el inicio del co-cultivo) o en el Día 7 (después de la formación del co-cultivo). Las células se fijan en PFA al 4 % durante una noche seis días después de la adición de antagonistas. Las células se tiñen con anticuerpos anti-PECAM o anti-SMA seguido por anticuerpo secundario (conjugado fluorescente). Las células después se visionan

por microscopio y se cuentan manualmente las cantidades y longitudes de brotes para una serie representativa de 10 perlas/pocillo. Los promedios para el pocillo se calculan posteriormente.

- En los pocillos con tratamiento con antagonista de control, estas células forman brotes de células endoteliales protegidos por una cobertura de pericitos. En células tratadas con antagonistas de VEGF-A, PDGFR $\beta$ , o PDGFR $\beta$ /VEGF-A, se reduce la cantidad de brotes y la longitud de los brotes lo que sugiere que el antagonista muestra eficacia en este modelo de co-cultivo *in vitro*. La eficacia de los antagonistas de PDGFR $\beta$ , o PDGFR $\beta$ /VEGF-A puede demostrarse adicionalmente por disociación de los pericitos de las células endoteliales.

#### **Ejemplo 34: Ensayo de membrana corioalantoidea (CAM) para la evaluación de antagonistas de PDGFR $\beta$ /VEGF-A *in vitro***

- Se rompieron huevos Leghorn blancos fertilizados de tres días de edad, y se colocaron cuidadosamente embriones de pollo con yemas intactas en 20 placas Petri de plástico de 100 mm. Después de seis días de incubación en CO<sub>2</sub> al 3 % a 37 °C, se implanta un disco de metilcelulosa que contiene al menos dos moléculas PDGF/EGF (tales como VEGF-A y PDGF-BB) y un anticuerpo monoclonal de control o una sustancia de anticuerpo biespecífico, y/o complejos VEGFR solubles, secado sobre una malla de nailon (3x3 mm) en la CAM de embriones individuales para determinar la influencia del anticuerpo biespecífico sobre el desarrollo vascular y los usos potenciales del mismo para inhibir la formación vascular. Los discos de malla de nailon se preparan por desecación de 10 microlitros de metilcelulosa al 0,45 % (en H<sub>2</sub>O). Después de 4-5 días de incubación, se examinan los embriones y las CAM para la formación de nuevos vasos sanguíneos y vasos linfáticos en el campo del disco implantado por un estereoscopio. Se usan discos de metilcelulosa que contienen PBS como controles negativos. Los anticuerpos que reconocen moléculas de superficie celular de vasos tanto sanguíneos como linfáticos se usan para caracterizar adicionalmente los vasos. La inhibición de crecimiento de nuevos vasos sanguíneos en presencia de una composición de anticuerpo biespecífico con relación a un anticuerpo monoclonal de control indica eficacia de la composición de anticuerpo biespecífico para el tratamiento de trastornos asociados con angiogénesis.

#### **Ejemplo 35: Ensayo de córnea para la evaluación de antagonistas de PDGFR $\beta$ /VEGF-A *in vivo***

- Se crearon microbolsillos de córnea con una cuchilla de cataratas de von Graefe modificada en ambos ojos de ratones macho C57BL6/J de 5 a 6 semanas de edad o conejos blancos hembra New Zealand. Se recubrió un microgránulo (0,35 x 0,35 mm) de sulfato de sacarosa y aluminio (Bukh Meditec, Copenhagen, Dinamarca) con polímero hydropol tipo NCC (IFN Science, New Brunswick, NJ) que contenía diversas concentraciones de dos o más PDGF-BB/VEGF-A en solitario o en combinación con: i) factores que se sabe que modulan el crecimiento de los vasos (por ejemplo, 80 ng de FGF-2); ii) anticuerpo monoclonal específico para uno de los factores de crecimiento; o iii) una composición de anticuerpo biespecífico. El granulo se coloca a 0,6-0,8 mm del limbo. Después del implante, se aplica eritromicina/pomada oftálmica a los ojos. Los ojos se examinan mediante un biomicroscopio de lámpara de hendidura durante el transcurso de 3-12 días. Se mide la longitud de los vasos y la trayectoria en dirección horaria de la neovascularización circunferencial y la linfangiogénesis. Además, los ojos se cortan en secciones y se inmunotienen para marcadores de vasos sanguíneos y/o linfáticos LYVE-1 (Prevo y col., J. Biol. Chem. 276: 19420-19430, 2001), podoplanina (Breiteneder-Geleff y col., Am. J. Pathol. 154: 385-94, 1999) para caracterizar adicionalmente los vasos afectados. La inhibición del crecimiento de vasos en presencia de una composición de anticuerpo biespecífico con relación al anticuerpo de control indica eficacia de la composición de anticuerpo biespecífico para el tratamiento de trastornos asociados con la angiogénesis.

- Ejemplo 36: Modelo de rhabdomyosarcoma A673 para la evaluación de la eficacia de antagonistas de PDGFR $\beta$ /VEGF-A contra el crecimiento tumoral**

##### Sumario

- Para ensayar si el antagonista biespecífico de PDGFR $\beta$ /VEGF-A tiene actividad sobre el crecimiento tumoral en ratones, se inyecta s.c. a grupos de ratones el tumor de rhabdomyosarcoma A673 en el Día 0. Una vez que los tumores crecieron hasta 150-200 mm<sup>3</sup>, a los grupos de ratones (n=10/gp) se les inyecta después de 1 mg/kg a 30 mg/kg de reactivo de control, antagonista de VEGF-A, antagonista de PDGFR $\beta$  o antagonista de PDGFR $\beta$ /VEGF-A 1X-3X/semana durante 3 semanas. El volumen del tumor se controla 3X/semana durante 5 semanas. Tumores significativamente más pequeños en ratones a los que se ha inyectado antagonista de VEGF-A, antagonista de PDGFR $\beta$ , o antagonista de PDGFR $\beta$ /VEGF-A, en comparación con los ratones a los que se ha inyectado reactivo de control, indica eficacia del antagonista para la inhibición del crecimiento tumoral. También puede evaluarse la eficacia de un antagonista de PDGFR $\beta$ /VEGF-A sobre tratamientos individuales con antagonista de VEGF-A o antagonista de PDGFR $\beta$  en solitario.

##### Diseño del estudio

- Se inyecta s.c. a ratones C.B-17 SCID hembra de ocho a diez semanas de edad (Charles River Laboratories) en el flanco derecho con 2 x 10<sup>6</sup> células A673 en el Día 0. Empezando con un tamaño de tumor de 150-200 mm<sup>3</sup>, se inyecta a los grupos de ratones (n=10/grupo) i.p. con 1 mg/kg a 30 mg/kg de reactivo de control, antagonista de VEGF-A, antagonista de PDGFR $\beta$  o antagonista de PDGFR $\beta$ /VEGF-A 1X-3X/semana durante 3 semanas. El

crecimiento del tumor se controla 3X/semana durante 5 semanas usando mediciones con calibre. El volumen del tumor se calcula usando la fórmula  $\frac{1}{2} \times (B)^2 \times L$  (mm<sup>3</sup>).

**Ejemplo 37: Modelo de carcinoma pancreático BxPC3 para la evaluación de la eficacia de antagonistas de PDGFR $\beta$ /VEGF-A contra el crecimiento de tumores**

5 Sumario

Para ensayar si el antagonista biespecífico de PDGFR $\beta$ /VEGF-A tiene actividad sobre el crecimiento de tumores en ratones, se inyectó s.c. a grupos de ratones el tumor pancreático BxPC3 en el Día 0. Una vez que los tumores crecen hasta 150-200 mm<sup>3</sup>, se inyecta entonces a los grupos de ratones (n=10/gp) de 1 mg/kg a 30 mg/kg de reactivo de control, antagonista de VEGF-A, antagonista de PDGFR $\beta$  o antagonista de PDGFR $\beta$ /VEGF-A 1X-3X/semana durante 3 semanas. El volumen del tumor se controla 3X/semana durante 5 semanas. Tumores significativamente más pequeños en ratones inyectados con un antagonista de VEGF-A, antagonista de PDGFR $\beta$ , o antagonista de PDGFR $\beta$ /VEGF-A, en comparación con los ratones a los que se ha inyectado reactivo de control, indica eficacia del antagonista para la inhibición del crecimiento del tumor. También puede evaluarse la eficacia de un antagonista de PDGFR $\beta$ /VEGF-A sobre tratamientos individuales con antagonista de VEGF-A o antagonista de PDGFR $\beta$  en solitario.

Diseño del estudio

Se inyecta s.c. a ratones C.B-17 SCID hembra de ocho a diez semanas de edad (Charles River Laboratories) en el flanco derecho con  $2 \times 10^6$  células BxPC-3 en el Día 0. Empezando con un tamaño de tumor de 150-200 mm<sup>3</sup>, se inyectó i.p. a los grupos de ratones (n=10/grupo) con 1 mg/kg a 30 mg/kg de reactivo de control, antagonista de VEGF-A, antagonista de PDGFR $\beta$  o antagonista de PDGFR $\beta$ /VEGF-A 1X-3X/semana durante 3 semanas. El crecimiento del tumor se controla 3X/semana durante 5 semanas usando mediciones con calibre. El volumen del tumor se calcula usando la fórmula  $\frac{1}{2} \times (B)^2 \times L$  (mm<sup>3</sup>).

**Ejemplo 38: Modelo de neovascularización de la córnea (NT de la córnea) de enfermedad ocular para evaluar la eficacia de antagonistas de PDGFR $\beta$ /VEGF-A**

La neovascularización de la córnea es un modelo animal ampliamente usado que permite una clara visualización del crecimiento vascular anormal en el ojo. Los vasos que crecen en la córnea normalmente avascular, pueden llegar a quedar bien establecidos, haciendo de este un modelo atractivo para estudiar la regresión de los vasos. En este ejemplo, se demuestra la eficacia de un antagonista de PDGFR $\beta$ /VEGF-A usando el modelo de neovascularización de la córnea. Para inducir NV experimental de la córnea, se anestesian ratones C57BL/6 macho (18-20 g; Charles River, Wilmington, Mass.) con clorhidrato de ketamina (25 mg/kg) y xilacina (10 mg/kg) intramuscular. Se aplica de forma tópica NaOH (2  $\mu$ l de 0,2 mM). Se retiran la córnea y el epitelio limbal aplicando un movimiento rotatorio paralelo al limbo usando una cuchilla n° 21 (Feather, Osaka, Japón). Después de 7 días o 10 días (modelo de regresión), se tratan los ratones con inyecciones intraperitoneales de 1-25 mg/kg de reactivo de control, antagonista de VEGF-A, antagonista de PDGFR $\beta$ , o antagonista biespecífico de PDGFR $\beta$ /VEGF-A. En el día 14 o el día 20 (modelo de regresión) después de la inducción de NV de la córnea, los ratones reciben 20  $\mu$ g/g de lectina concanavalina A acoplada a fluoresceína-isotiocianato (Vector Laboratories, Burlingame, Calif.) por vía intravenosa tras estar profundamente anestesiados con clorhidrato de xilacina y clorhidrato de ketamina. Treinta minutos después, se enuclean los ojos de los ratones, y se montan en plano las córneas. La NV de la córnea se visualiza usando microscopía de fluorescencia y se cuantifica usando el software Openlab. El porcentaje de córnea cubierta por vasos se calcula como un porcentaje del área de córnea total. Los resultados demuestran la eficacia de los antagonistas de PDGFR $\beta$ /VEGF-A en relación al reactivo de control, o sobre tratamientos individuales con los antagonistas de PDGFR $\beta$  o VEGF-A en solitario.

**Ejemplo 39: Modelo de neovascularización de la córnea (NT de la córnea) de enfermedad ocular para evaluar la eficacia de antagonistas de PDGFR $\beta$ /VEGF-A contra degeneración macular relacionada con la edad (AMD)**

A menudo se usa CNV experimental como modelo para degeneración macular relacionada con la edad (AMD). En este modelo, los vasos de la coroide crecen a través de roturas en la membrana de Bruch y al interior de la retina, similar a lo observado en pacientes de AMD. Para inducir CNV experimental, se anestesian ratones C57BL/6 macho (18-20 g; Charles River, Wilmington, Mass.) con clorhidrato de ketamina (25 mg/kg) y xilacina (10 mg/kg) intramuscular y se dilatan las pupilas con tropicamida al 1 %. Se generan cuatro quemaduras usando fotocoagulación con láser de diodo (tamaño de mancha de 75  $\mu$ m, duración de 0,1 segundo, 90 mW, Oculight SL laser, IRIDEX, Mountain View, Calif.) y se desliza manualmente una cubierta tal como una lente de contacto. Las quemaduras se localizan en las posiciones 3, 6, 9, y 12 de un reloj del polo posterior de la retina. La producción de una burbuja en el momento del láser, que indica la ruptura de la membrana de Bruch, es un factor importante para obtener neovascularización coroidal, de modo que solamente ratones en que se produjo una burbuja para las cuatro quemaduras se incluyen en el estudio. Después de 7 días o 14 días (modelo de regresión), los ratones se tratan diariamente con la una inyección intraperitoneal de 1-25 mg/kg de reactivo de control, antagonista de VEGF-A, antagonista de PDGFR $\beta$ , o antagonista biespecífico de PDGFR $\beta$ /VEGF-A dos veces al día. Después de 7 días o 14

días (modelo de regresión) de tratamiento, se mide el área de lesiones de NV coroidal en coroides montada en plano teñidas con PECAM. Los montajes en plano se examinan por microscopía de fluorescencia y se cuantifican usando el software Openlab. Una disminución en el área de CNV en los ojos tratados con antagonista de PDGFR $\beta$ /VEGF-A, relativa al reactivo de control, indica que el antagonista biespecífico es un potente inhibidor de la neovascularización.

La disminución en el área de CNV en los ojos tratados con antagonista de PDGFR $\beta$ /VEGF-A, relativa al antagonista de VEGF-A o el antagonista de PDGFR $\beta$  en solitario, indica eficacia del antagonista de PDGFR $\beta$ /VEGF-A sobre los tratamientos individuales.

#### **Ejemplo 40: Caracterización de antagonistas anti-receptor- $\beta$ de Hu-PDGF**

Se realizaron experimentos de agrupamiento de epítomos para determinar cuáles de los antagonistas de PDGFR $\beta$  (scFv, Fab, hulgG, mslgG) son capaces de unirse simultáneamente a PDGFR $\beta$  humano. Los antagonistas de PDGFR $\beta$  que compiten por el mismo sitio de unión (epítomo) o uno solapante en el antígeno no son capaces de unirse simultáneamente y se agrupan funcionalmente en una única familia o "agrupamientos de epítomos". Los antagonistas de PDGFR $\beta$  que no compiten por el mismo sitio de unión en el antígeno son capaces de unirse simultáneamente y se agrupan en familias separadas o agrupamientos de epítomos. Se realizaron experimentos usando un instrumento Biacore 3000<sup>TM</sup>. El Biacore es solamente uno de diversos formatos de ensayo que se usan rutinariamente para asignar paneles de fragmentos de anticuerpo y anticuerpos monoclonales a agrupamientos de epítomos. Muchas referencias (por ejemplo, The Epitope Mapping Protocols, Methods in Molecular Biology, Volumen 6,6 Glenn E. Morris ed.) describen procedimientos alternativos que pueden usarse para "agrupar" los fragmentos de anticuerpo y que se esperaría que proporcionaran datos comparables respecto a las características de unión de los antagonistas de PDGFR $\beta$  a PDGFR $\beta$  Fc5. Se realizaron experimentos de agrupamiento de epítomos con PDGFR $\beta$ -Fc5 (SEC ID N° 486).

#### Materiales y procedimientos

Se realizaron estudios de agrupamiento de epítomos en un sistema Biacore 3000® (GE Healthcare, Piscataway, NJ). Los procedimientos se programaron usando el software de control Biacore3000® v. 3.2. Se inmovilizó de forma covalente anticuerpo policlonal de cabra anti-IgG humana Fc-gamma (Jackson ImmunoResearch Laboratories, West Grove, PA) en un chip sensor Biacore® CM5 usando química de acoplamiento de amina (EDC:NHS) a una densidad de 8.000 RU. Después del procedimiento de inmovilización, se bloquearon los sitios activos de la celda de flujo con etanolamina. La proteína unida de forma no específica se retiró por lavado con NaOH 50 mM. El antígeno PDGFR $\beta$ -Fc5 y los antagonistas de PDGFR $\beta$  se diluyeron a 5  $\mu$ g/ml.

El PDGFR $\beta$ -Fc5 se capturó en la superficie anti-Fc humana a aproximadamente 250 RU. Esto estuvo seguido por bloqueo de los sitios de unión Fc no ocupados en el chip usando hu-IgG completa (Jackson ImmunoResearch Laboratories, West Grove, PA). Se inyectó antagonista de PDGFR $\beta$  primario durante 120 segundos a 20  $\mu$ l/min y se dejó que se uniera específicamente al PDGFR $\beta$ -Fc5 capturado al nivel de saturación. El instrumento Biacore<sup>TM</sup> mide la masa de proteína unida al chip sensor y pueden verificarse para cada ciclo la unión tanto de PDGFR $\beta$ -Fc5 como del candidato de agrupamiento primario. Después de la unión del antagonista de PDGFR $\beta$  primario, se inyecta un antagonista de PDGFR $\beta$  secundario y se deja que se una a PDGFR $\beta$ -Fc5 que se captura sobre la superficie anti-Fc humana.

Todos los experimentos de unión se realizaron a 25 °C en un tampón de HEPES 10 mM, NaCl 500 mM, EDTA 3 mM, tensioactivo P20 al 0,05 %, 0,01 mg/ml de albumina sérica bovina, pH 7,4. También se realizaron inyecciones de tampón para permitir la sustracción del ruido y la desviación del instrumento. Entre ciclos, se lavó la celda de flujo con glicina 10 mM, pH 1,75 para retirar el PDGFR $\beta$ -Fc5 unido. Los datos se compilan usando el software de evaluación Biacore 3000<sup>TM</sup>.

Los resultados experimentales se interpretaron del siguiente modo. Si el antagonista de PDGFR- $\beta$  secundario no era capaz de unirse al antígeno PDGFR- $\beta$ -Fc5 simultáneamente con el antagonista primario, se agrupaba funcionalmente en una única familia o agrupación de epítomos. Sin embargo, si el antagonista de PDGFR- $\beta$  secundario era capaz de unirse al antígeno simultáneamente con el antagonista primario mostrando un aumento en la masa sobre la superficie del chip se agrupaba en una familia diferente o agrupamiento de epítomos. Cada antagonista de PDGFR- $\beta$  se ensayó frente a sí mismo como control negativo para establecer el nivel de señal de fondo (sin unión).

#### Resultados

Se caracterizaron y asignaron los antagonistas de PDGFR- $\beta$  purificados en agrupamientos de epítomos (véase la Tabla 25). La señal (RU, unidades de respuesta) presentada por el Biacore está directamente correlacionada con la masa sobre la superficie del chip sensor. Una vez que el nivel de señal de fondo (RU) asociada con los controles negativos queda establecida (los mismos antagonistas de PDGFR- $\beta$  usados como antagonista primario y secundario), se presentaron los resultados de agrupamiento como unión positiva o negativa. Unión positiva indica que dos antagonistas de PDGFR- $\beta$  diferentes son capaces de unirse al antígeno simultáneamente. Unión negativa indica que dos antagonistas de PDGFR- $\beta$  diferentes no son capaces de unirse al antígeno simultáneamente.

La diferencia entre valores de respuesta positivos y negativos en este experimento fue significativa y permitió una asignación inequívoca de los 8 antagonistas de PDGFR- $\beta$  purificados en dos familias distintas o agrupamientos de epítomos. El primer agrupamiento de epítomos está representado por antagonistas de PDGFR- $\beta$  producidos por los clones c941.1, c1035, c951.1, c975.1 (todos scFv), c597.1 (Fab), c600.1 (hIgG), y el anticuerpo monoclonal murino anti-PDGFR- $\beta$  humano 163.3.1.1.1. El segundo agrupamiento de epítomos está representado por el anticuerpo monoclonal murino anti-PDGFR- $\beta$  humano 162.6.2.6.2. Además, el antagonista de PDGFR- $\beta$  c1035.1, se descubrió que solapaba entre el agrupamiento n°1 y el agrupamiento n°2.

**Tabla 25: Asignaciones de agrupamiento de epítomo para antagonistas neutralizantes de PDGFR- $\beta$**

Nº de agrupamiento de epítomo	Antagonistas de PDGFR- $\beta$
Agrupamiento N° 1:	c941.1, c597.1, c951.1, c975.1, c600, mAb 163.3111
Agrupamiento N° 2:	mAb 162.6262
Agrupamiento N° 1/2:	c1035.1

#### **Ejemplo 41: Agrupamiento de epítomos de antagonistas de VEGF-A**

Se realizaron experimentos de agrupamiento de epítomos para determinar cuáles de los antagonistas de VEGF-A son capaces de unirse simultáneamente a VEGF-A humano. Los antagonistas de VEGF-A que compiten por el mismo sitio de unión (epítomo) o uno solapante sobre el antígeno no son capaces de unirse simultáneamente y se agrupan funcionalmente en una única familia o "agrupamientos de epítomos". Los antagonistas de VEGF-A que no compiten por el mismo sitio de unión sobre el antígeno son capaces de unirse simultáneamente y se agrupan en familias diferentes o agrupamientos de epítomos. Se realizaron experimentos usando un instrumento Biacore T100<sup>TM</sup>. El Biacore es solamente uno de diversos formatos de ensayo que se usan rutinariamente para asignar paneles de fragmentos de anticuerpo y anticuerpos monoclonales a agrupamientos de epítomos. Muchas referencias (por ejemplo, The Epitope Mapping Protocols, Methods in Molecular Biology, Volumen 6,6 Glenn E. Morris ed.) describen procedimientos alternativos que pueden usarse para "agrupar" los fragmentos de anticuerpo y que se esperaba que proporcionaran datos comparables respecto a las características de unión de los antagonistas de VEGF-A a VEGF-A humano. Se realizaron experimentos de agrupamiento de epítomos con VEGF-A humano nativo soluble como antígeno.

#### Materiales y procedimientos

Se realizaron dos experimentos de agrupamiento de epítomos diferentes en un sistema BIACORE T100<sup>TM</sup> (GE Healthcare, Piscataway, NJ). En ambos experimentos, los antagonistas de VEGF-A primarios se inmovilizaron de forma covalente en un chip sensor CM5 usando química de acoplamiento de amina (EDC:NHS) a una densidad de aproximadamente 800-1000 RU. Después del procedimiento de inmovilización, los sitios activos restantes en la celda de flujo se bloquearon con etanolamina. La proteína unida de forma no específica se retiró por lavado con NaOH 50 mM. La celda de referencia también se activó y después se bloqueó con etanolamina sin el antagonista de VEGF-A.

En la primera serie de experimentos, los antagonistas de VEGF-A secundarios y el antígeno VEGF-A se diluyeron a 100 nM. El antígeno VEGF-A se inyectó y se dejó que se uniera específicamente a un antagonista de VEGF-A inmovilizado sobre el chip sensor. VEGF-A es un dímero, por lo tanto hay dos sitios de unión potenciales para cada antagonista de VEGF-A. Para asegurar que todos los sitios de unión estuvieran ocupados, el antagonista de VEGF-A primario que se había inmovilizado anteriormente se inyectó sobre VEGF-A. Después de esta etapa, se inyectó antagonista de VEGF-A secundario para observar la unión simultánea a VEGF-A.

En una segunda serie de experimentos de agrupamiento, los antagonistas de VEGF-A primarios se inmovilizaron de nuevo de forma covalente a celdas de flujo diferentes de un chip sensor BIACORE CM5. En este experimento, sin embargo, se pre-mezcló antígeno VEGF-A 10 nM con 1 mM de los antagonistas de VEGF-A secundarios, después se inyectaron sobre el antagonista de VEGF-A primario inmovilizado en un formato de competición.

Todos los experimentos de unión se realizaron a 25 °C en un tampón de HEPES 10 mM, NaCl 150 mM, EDTA 3 mM, tensioactivo P20 al 0,05 %, 1 mg/ml de albumina sérica bovina, pH 7,4. También se realizaron inyecciones de tampón para permitir la sustracción del ruido y la desviación del instrumento. Entre ciclos, la superficie de captura se regeneró después de cada ciclo de inyección mediante una inyección de 30 segundos de glicina 10 mM, pH 1,5 a 50 ul/min. Esto retiró el VEGF-A unido de la superficie. Los datos se compilaron usando el software de evaluación Biacore T100<sup>TM</sup> (versión 1.1.1).

Ambas series de resultados experimentales se interpretaron del siguiente modo. Si el antagonista de VEGF-A secundario no era capaz de unirse al antígeno VEGF-A simultáneamente con el antagonista primario, se agrupaba funcionalmente en una única familia o agrupamiento de epítomos. Sin embargo, si el antagonista de VEGF-A secundario era capaz de unirse al antígeno simultáneamente con el antagonista primario mostrando un aumento en

la masa sobre la superficie del chip se agrupaba en una familia diferente o agrupamiento de epítomos. Cada antagonista de VEGF-A se ensayó frente a sí mismo como control negativo para establecer el nivel de señal de fondo (sin unión).

#### Resultados

- 5 Los antagonistas de VEGF-A purificados se asignaron a agrupamientos de epítomos usando los datos de unión de las dos series de experimentos descritos anteriormente. La señal (RU, unidades de respuesta) presentada por el Biacore™ está directamente correlacionada con la masa sobre la superficie del chip sensor. Una vez que se estableció el nivel de señal de fondo (RU) asociada con los controles negativos (el mismo antagonista de VEGF-A usado como antagonista primario y secundario), los resultados de agrupamiento se presentaron como unión positiva o negativa. Unión positiva indica que dos antagonistas de VEGF-A diferentes son capaces de unirse al antígeno simultáneamente. Unión negativa indica que dos antagonistas de VEGF-A diferentes no son capaces de unirse al antígeno simultáneamente.

- 15 La diferencia entre valores de respuesta positivos y negativos en estos experimentos se usó para asignar los antagonistas de VEGF-A a tres familias o agrupamientos de epítomos (véase la Tabla 26). El primer agrupamiento de epítomos está representado por el antagonista de VEGF-A producido por c636. Un segundo agrupamiento de epítomos está representado por los antagonistas de VEGF-A c868, c1039, y c1081. Es de indicar que, cuando c636 era el primero en interaccionar con VEGF-A, tanto c868 como c1039 mostraban unión simultánea. Cuando interaccionaba c868 o c1039 con VEGF-A en primer lugar, c636 no mostraba ninguna unión, por lo tanto, c868 y c1039 están solapando el epítipo de c636. Además, el antagonista de VEGF-A c870 solapaba con el agrupamiento n°1 y el agrupamiento n°2. Un tercer agrupamiento de epítomos está representado por el antagonista de VEGF-A c820 y el anticuerpo contra VEGF-A de control positivo (anticuerpo monoclonal de ratón anti-VEGF-A, R&D Systems). Estos dos antagonistas de VEGF-A mostraron unión simultánea en presencia de todos los demás antagonistas de VEGF-A. Todos los antagonistas ensayados en los experimentos de agrupamiento demostraron neutralizar la actividad mitogénica de VEGF-A en algún grado.

**Tabla 26: Asignaciones de agrupamiento de epítipo para antagonistas neutralizantes de VEGF-A**

Nº de agrupamiento de epítipo	Antagonistas de VEGF-A
Agrupamiento Nº 1:	c636
Agrupamiento Nº 2:	c868, c1039, c1081
Agrupamiento Nº 1/2:	c870
Agrupamiento Nº 3:	c820, mAb de ratón

- 25 **Ejemplo 42: Medición de las afinidades de unión de antagonistas de VEGF-A humano a VEGF-A mediante resonancia de Plasmón superficial (Biacore)**

Se evaluaron los antagonistas monovalentes de VEGF-A humano producidos por los clones c868, c870 y c1039 para sus afinidades de unión a VEGF-A humano usando resonancia de Plasmón superficial.

#### Determinación de afinidad

- 30 Se midieron las constantes de velocidad cinética y disociación en equilibrio para la interacción de antagonistas de VEGF-A con VEGF-A mediante resonancia de Plasmón superficial. La constante de velocidad de asociación ( $k_a$  ( $M^{-1}s^{-1}$ )) es un valor que refleja la velocidad de la formación de complejos antígeno-antagonista. La constante de velocidad de disociación ( $k_d$  ( $s^{-1}$ )) es un valor que refleja la estabilidad de este complejo. Dividiendo la constante de velocidad de asociación entre la constante de velocidad de disociación ( $k_a/k_d$ ) se obtiene la constante de asociación en equilibrio ( $K_A$  ( $M^{-1}$ )). Dividiendo la constante de velocidad de disociación entre la constante de velocidad de asociación ( $k_d/k_a$ ) se obtiene la constante de disociación en equilibrio ( $K_D$  (M)). Este valor describe la afinidad de unión de la interacción. Interacciones con la misma  $K_D$  pueden tener constantes de velocidad asociación y disociación ampliamente variables. Por consiguiente, medir tanto la  $k_a$  como la  $k_d$  ayuda a describir de forma singular la afinidad de la interacción.

- 40 Materiales y procedimientos

- Se completó una serie de experimentos para medir las afinidades de unión de antagonistas de VEGF-A purificados producidos por los clones c868, c870 y c1039. Se realizaron estudios de cinética y afinidad de unión en un sistema Biacore T100™ (GE Healthcare, Piscataway, NJ). Los procedimientos se programaron usando el software de control Biacore T100™, v 1.1.1. Los antagonistas de VEGF-A se produjeron con marcas epitópicas His<sub>6</sub>/Myc. Los análisis de afinidad se realizaron capturando antagonistas de VEGF-A usando anticuerpos anti-His<sub>6</sub>/Myc inmovilizados en un chip CM5. Se mezclaron anticuerpos anti-His<sub>6</sub> y anti-Myc en una proporción molar 1:1 y se inmovilizaron

covalentemente en un chip sensor CM5 usando química de acoplamiento de amina a una densidad de aproximadamente 7.500 RU. Se inyectaron 10 nM de antagonistas de VEGF-A en celdas de flujo diferentes a 10  $\mu$ l/min durante 1 minuto, seguido por un periodo de estabilización de 1 minuto. Se inyectaron diluciones 1:3 en serie de VEGF-A de 33,3 nM - 0,14 nM sobre esta superficie y se dejaron que unieran específicamente al antagonista de VEGF-A capturado sobre el chip sensor. Se realizaron inyecciones duplicadas de cada concentración de VEGF-A con un tiempo de asociación de 5 minutos y un tiempo de disociación de 10 minutos. Se realizaron estudios de unión cinética con un caudal de 30  $\mu$ l/min. Todos los experimentos de unión se realizaron a 25 °C en un tampón de HEPES 10 mM, NaCl 500 mM, EDTA 3 mM, tensioactivo P20 al 0,05 %, 0,1 mg/ml de albumina sérica bovina, pH 7,4. Entre ciclos, se lavó la celda de flujo con H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> 50 mM para regenerar la superficie. Esta etapa de lavado retiró el antagonista de VEGF-A capturado de la superficie de anticuerpo inmovilizado, y permitió la posterior unión de la siguiente muestra.

Los datos se compilaron usando el software de evaluación Biacore T100™ (versión 1.1.1). Los datos se procesaron sustrayendo las inyecciones de la celda de flujo de referencia y blanca. La estabilidad basal se evaluó para asegurar que la etapa de regeneración proporcionaba una superficie de unión consistente a lo largo de toda la secuencia de inyecciones. Se comprobaron curvas de inyección por duplicado para la reproducibilidad. Como el antígeno VEGF-A forma dímeros, las curvas de unión resultantes se ajustaron de forma global al modelo de interacción de analito bivalente.

### Resultados

Se caracterizaron tres antagonistas de VEGF-A por su afinidad de unión por VEGF-A (resultados resumidos en la Tabla 27). Se midieron las constantes de velocidad de asociación ( $k_a$  ( $M^{-1}s^{-1}$ )) y las constantes de velocidad de disociación ( $k_d$  ( $s^{-1}$ )) para estos antagonistas de VEGF-A. Se calcularon las  $K_D$  y  $K_A$  a partir de los valores  $k_a$  y  $k_d$ . Los datos se ajustan bien al modelo de analito bivalente. Este modelo mide dos valores tanto para  $k_a$  ( $k_{a1}$  y  $k_{a2}$ ) como para  $k_d$  ( $k_{d1}$  y  $k_{d2}$ ). La primera serie de valores ( $k_{a1}$  y  $k_{d1}$ ) describe la cinética monovalente de la interacción que se presenta en la Tabla 24. La afinidad representada para estas muestras se obtuvo de estos valores, y se denomina  $K_{D1}$ . Se calcularon  $K_D$  y  $K_A$  a partir de los valores  $k_a$  y  $k_d$ . Los tres antagonistas de VEGF-A mostraron afinidad similar por el antígeno VEGF-A ( $K_D=0,7 - 1.0E-9M$ ) y estos resultados fueron coherentes en dos ejecuciones independientes.

**Tabla 27: Caracterización de afinidad de unión del antagonista de VEGF-A por VEGF-A**

ID Nº	$k_n$ ( $M^{-1}s^{-1}$ )	$k_d$ ( $s^{-1}$ )	$K_D$ (M)	$K_A$ ( $M^{-1}$ )
c868	5.E+5	6.E-4	1.E-9	8.E+8
c870	2.E+5	2.E-4	1.E-9	1.E+9
c1039	3.E+5	2 E-4	6.E-10	2 E+9

### Ejemplo 43: Medición de las afinidades de unión de antagonistas de VEGFA/PDGFR $\beta$ humano por VEGFA mediante resonancia de Plasmón superficial (Biacore)

Se evaluaron dos antagonistas de VEGF-A/PDGFR $\beta$  humano para las afinidades de unión a VEGF-A humano usando resonancia de Plasmón superficial. Estos dos antagonistas de VEGF-A/PDGFR $\beta$  constan de cinco dominios: dos dominios de unión a VEGF-A (dos c868 o dos c1039) y dos dominios de unión a PDGFR $\beta$  (dos c597) que están enlazados por una marca Fc humana.

#### Determinación de la afinidad

Se midieron las constantes de velocidad cinética, asociación y disociación en equilibrio para la interacción de los antagonistas de VEGF-A/PDGFR $\beta$  A2099F (que consta de dos dominios c1039 y dos dominios c597) y A2100F (que consta de dos dominios c868 y dos dominios c597) con el antígeno VEGF-A mediante resonancia de Plasmón superficial.

#### Materiales y procedimientos

Se completó una serie de experimentos para medir la afinidad de unión de antagonista de VEGF-A/PDGFR $\beta$  purificados generados contra los antígenos VEGF-A (R & D Systems) y PDGFR $\beta$  (ZymoGenetics). Se realizaron estudios de cinética y afinidad de unión en un sistema Biacore T100™ (GE Healthcare, Piscataway, NJ). Los procedimientos se programaron usando el software de control Biacore T100™, v 1.1.1. El antígeno VEGF-A humano se inmovilizó de forma covalente en la celda de flujo del chip sensor CM5 usando química de acoplamiento de amina (EDC:NHS) a una densidad de aproximadamente 160 RU. Se inyectaron diluciones 1:3 en serie de los antagonistas de VEGF-A/PDGFR $\beta$  de 11,1 nM - 0,14 nM sobre la superficie y se dejó que se unieran específicamente al VEGF-A inmovilizado sobre el chip sensor. Se realizaron inyecciones duplicadas de antagonistas de VEGF-A/PDGFR $\beta$  con un tiempo de asociación de 10 minutos y un tiempo de disociación de 15 minutos. Se realizaron estudios de unión



cinética con un caudal de 30 µl/min. Todos los experimentos de unión se realizaron a 25 °C en un tampón de HEPES 10 mM, NaCl 150 mM, EDTA 3 mM, tensioactivo P20 al 0,05 %, 0,1 mg/ml de albumina sérica bovina, pH 7,4. Para regenerar la superficie, las celdas de flujo se lavaron con glicina 10 mM, pH 1,5 entre cada ciclo.

Los datos se compilaron usando el software de evaluación Biacore T100™ (versión 1.1.1). Los datos se procesaron sustrayendo las inyecciones de la celda de flujo de referencia y blanca y se evaluó la estabilidad basal para asegurar que la etapa de regeneración proporcionaba una superficie de unión consistente durante toda la secuencia de inyecciones. Se comprobaron curvas de inyección duplicadas para la reproducibilidad. Como tanto el antígeno VEGF-A como los antagonistas de VEGF-A/PDGRFβ son moléculas bivalentes, las curvas de unión resultantes para la unión de los antagonistas de VEGF-A/PDGRFβ al antígeno VEGF-A se ajustaron de forma global al modelo de analito bivalente.

### Resultados

Se caracterizaron los antagonistas de VEGF-A/PDGRFβ purificados para su afinidad de unión por el antígeno VEGF-A (resultados resumidos en la Tabla 28). Se midieron las constantes de velocidad de asociación ( $k_a$  ( $M^{-1}s^{-1}$ )) y las constantes de velocidad de disociación ( $k_d$  ( $s^{-1}$ )) para la unidad de unión.  $K_D$  y  $K_A$  para cada interacción se calcularon a partir de los valores  $k_a$  y  $k_d$ . La afinidad de unión de los antagonistas de VEGF-A/PDGRFβ al antígeno VEGF-A se determinaron inmovilizando el antígeno VEGF-A e inyectando los antagonistas VEGF-A/PDGRFβ sobre esta superficie. Las series de datos resultantes se ajustaban bien al modelo de analito de interacción bivalente. Este modelo mide dos valores tanto para  $k_a$  ( $k_{a1}$  y  $k_{a2}$ ) como para  $k_d$  ( $k_{d1}$  y  $k_{d2}$ ). En la primera serie de valores ( $k_{a1}$  y  $k_{d1}$ ) se describe la cinética monovalente de la interacción que se presenta en la Tabla 28. La afinidad representada para estas muestras se obtuvo de estos valores, y se denomina  $K_{D1}$ . Se calcularon  $K_D$  y  $K_A$  a partir de los valores  $k_a$  y  $k_d$ . En estas condiciones de ensayo, la afinidad de unión del antagonista de VEGF-A/PDGRFβ A2100F a VEGF-A fue 5 E-9M.

**Tabla 28: Caracterización de afinidad de unión del antagonista de VEGF-A/PDGRF-β por VEGF-A**

ID N°	$k_n$ ( $M^{-1}s^{-1}$ )	$k_d$ ( $s^{-1}$ )	$k_D$ (M)	$k_A$ ( $M^{-1}$ )
c597/c1039	7.E+5	4.E-4	5.E-10	2.E+9
c597/c868	7.E+4	4.E-4	5.E-9	2.E+8

### Ejemplo 44: Inhibición del crecimiento de células de carcinoma hepatocelular humano *in vivo* usando anticuerpo biespecífico anti-PDGRF-β/anti-VEGF-A

Para evaluar la actividad antitumoral de un anticuerpo biespecífico anti-PDGRF-β/anti-VEGF-A contra células de carcinoma hepatocelular humano *in vivo*, se inyectó a grupos de ratones BALB/c desnudos células de carcinoma hepatocelular HuH7 o C3A en el día 0. Los grupos (n=10/grupo) de ratones que albergan tumor reciben Sug-75 µg de anticuerpo biespecífico anti-PDGRF-β/anti-VEGF-A por inyección i.p. o peritumoral en días alternos (EOD) desde los días 5-33. El volumen del tumor se controla 3X/semana durante 6 semanas. La inhibición del crecimiento del tumor por anticuerpo biespecífico anti-PDGRF-β/anti-VEGF-A indica que la proteína respectiva tiene efectos inhibidores sobre carcinoma hepatocelular humano *in vivo*.

Diseño del estudio. Se inyecta s.c. a ratones hembra desnudos BALB/c de ocho semanas de edad (Charles River Laboratories) en el flanco derecho con  $6 \times 10^6$  células HuH7 o C3A en el Día 0. Se inyecta i.p. a los grupos de ratones (n=10/grupo) o por vía peritumoral con 5 µg-75 µg de un anticuerpo biespecífico anti-PDGRFβ/anti-VEGF. A desde los días 5-33. Se proporcionan inyecciones en un volumen total de 200 µl. El crecimiento del tumor se controla 3X/semana durante 6 semanas usando mediciones con calibre. El volumen del tumor se calcula usando la fórmula  $\frac{1}{2} \pi (B)^2 \times L$  (mm<sup>3</sup>).

### Ejemplo 45: Inhibición del crecimiento de células de carcinoma de próstata humano *in vivo* usando anticuerpo biespecífico anti-PDGRF-β/anti-VEGF-A

Para evaluar la actividad antitumoral de un anticuerpo biespecífico anti-PDGRF-β/anti-VEGF-A contra células de carcinoma de próstata humano *in vivo*, se inyecta a grupos de ratones BALB/c desnudos células de carcinoma de próstata PC-3 o DU-145 en el día 0. Los grupos (n=10/grupo) de ratones que albergan tumor reciben 5 µg-75 µg de anticuerpo biespecífico anti-PDGRF-β/anti-VEGF-A por inyección i.p. o peritumoral en días alternos (EOD) desde los días 5-33. El volumen del tumor se controla 3X/semana durante 6 semanas. La inhibición del crecimiento del tumor (volumen o peso) por un anticuerpo biespecífico anti-PDGRF-β/anti-VEGF-A indica que la proteína respectiva tiene efectos inhibidores sobre carcinoma de próstata humano *in vivo*.

Diseño del estudio. Se inyecta s.c. a ratones hembra desnudos BALB/c de ocho semanas de edad (Charles River Laboratories) en el flanco derecho o por vía ortotópica en el lóbulo prostático con  $10 \times 10^6$  células PC-3 o  $6 \times 10^6$  células DU-145 en el Día 0. Se inyecta i.p. a los grupos de ratones (n=10/grupo) o por vía peritumoral (modelo s.c.

solamente) con 5 µg-75 µg de un anticuerpo biespecífico anti-PDGFRβ/anti-VEGF. A desde los días 5-33. Se proporcionan inyecciones en un volumen total de 200 µl. Para tumores s.c., el crecimiento del tumor se controla 3X/semana durante 6 semanas usando mediciones con calibre. El volumen del tumor se calcula usando la fórmula  $\frac{1}{2} \pi (B)^2 \times L$  (mm<sup>3</sup>). Para tumores ortotópicos, se sacrifica a los ratones al final del estudio y se pesa el tumor para

#### **Ejemplo 46: Modelo de cáncer de próstata murino para evaluar la eficacia del anticuerpo biespecífico anti-PDGFR-β/anti-VEGF-A**

Se evalúan los efectos de un anticuerpo biespecífico anti-PDGFR-β/anti-VEGF-A sobre la respuesta del tumor en modelo de cáncer de próstata murino, usando un modelo similar al descrito en Kwon y col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 96:15074-15079, 1999. En este modelo, existe un sobrecrecimiento metastásico de la línea celular de cáncer de próstata TRAMP-C2 derivada de adenocarcinoma transgénico de próstata de ratón (TRAMP), que se implanta en ratones C57BL/6. La recidiva metastásica es fiable, sucediendo principalmente en los ganglios linfáticos de drenaje en cercana proximidad al tumor primario.

En resumen, la línea celular C2 usada es en una línea de paso temprano derivada del ratón TRAMP que desarrolla espontáneamente tumores autóctonos atribuibles a la expresión del antígeno SV40 restringido a próstata. Las células se cultivan e inyectan por vía subcutánea en los ratones C57BL/6 a  $2,5 \times 10^6$  células/0,1 ml de medio. Los ratones se tratan con anticuerpo biespecífico anti-PDGFR-β/anti-VEGF-A comenzando 3-14 días después del implante del tumor, o cuando se establece el injerto del tumor y la velocidad de crecimiento. Se administrarán niveles de tratamiento de 0,5 - 5 mg/kg en una base diaria durante 5-14 días, y puede continuarse después de ello si no se observan evidencias de formación de anticuerpos neutralizantes. Los tumores se escinden después de sacrificar a los animales y se analizan para el volumen y usando histoquímica e inmunohistoquímica.

#### **Ejemplo 47: Inhibición de células de carcinoma de colon humano *in vivo* usando anticuerpo biespecífico anti-PDGFR-β/anti-VEGF-A**

Para evaluar la actividad antitumoral de un anticuerpo biespecífico anti-PDGFR-β/anti-VEGF-A contra células de carcinoma de colon humano *in vivo*, se inyecta a grupos de ratones BALB/c desnudos con células de carcinoma de colon DLD-1 o HCT-116 en el día 0. Los grupos (n=10/grupo) de ratones que albergan tumor reciben 5 µg-75 µg de un anticuerpo biespecífico anti-PDGFRβ/anti-VEGF humano por inyección i.p. o peritumoral en días alternos (EOD) desde los días 5-33. El volumen del tumor se controla 3X/semana durante 6 semanas. La inhibición del crecimiento del tumor (volumen o peso) por anticuerpo biespecífico anti-PDGFRβ/anti-VEGF sugiere que la proteína respectiva tiene efectos inhibidores sobre carcinoma de colon humano *in vivo*.

Diseño del estudio. Se inyecta s.c. a ratones hembra desnudos BALB/c de ocho semanas de edad (Charles River Laboratories) en el flanco derecho o por vía ortotópica en la pared colónica con  $6 \times 10^6$  células DLD-1 o HCT-116 en el Día 0. Se inyecta i.p. a los grupos de ratones (n=10/grupo) o por vía peritumoral (para el modelo s.c. solamente) 5 µg-75 µg de un anticuerpo biespecífico anti-PDGFRβ/anti-VEGF-A humano desde los días 5-33. Se proporcionan inyecciones en un volumen total de 200 µl. Para tumores s.c., el crecimiento del tumor se controla 3X/semana durante 6 semanas usando mediciones con calibre. El volumen del tumor se calcula usando la fórmula  $\frac{1}{2} \pi (B)^2 \times L$  (mm<sup>3</sup>). Para tumores ortotópicos, se sacrifica a los ratones al final del estudio y se pesan los tumores para posibilitar la evaluación de carga tumoral.

#### **Ejemplo 48: Modelo de tumor colorrectal de ratón para evaluar la eficacia de anticuerpo biespecífico anti-PDGFR-β/anti-VEGF-A**

Los efectos de un anticuerpo biespecífico anti-PDGFR-β/anti-VEGF-A en un modelo de ratón colorrectal se evalúan como se describe Yao y col., Cancer Res. 63:586-592, 2003. En este modelo, se implantan células de tumor de colon de ratón MC-26 en la sub-cápsula esplénica de ratones BALB/c. Después de 14 días, a los ratones tratados se les administra anticuerpo biespecífico anti-PDGFRβ/anti-VEGF-A. Los ratones se tratan con anticuerpo biespecífico anti-PDGFRβ/anti-VEGF-A comenzando 3-14 días después del implante del tumor, o cuando se establece el injerto del tumor y la velocidad de crecimiento. Se administran niveles de tratamiento de 0,5 - 5 mg/kg en una base diaria durante 5-14 días, y puede continuarse después de ello si no se observan evidencias de formación de anticuerpos neutralizantes.

La eficacia de un anticuerpo biespecífico anti-PDGFRβ/anti-VEGF-A en la prolongación de la supervivencia o la promoción de una respuesta tumoral se evalúa usando técnicas convencionales tales como las descritas en el presente documento.

#### **Ejemplo 49: Inhibición de células de carcinoma pancreático humano *in vivo* usando anticuerpo biespecífico anti-PDGFR-β/anti-VEGF-A**

Para evaluar la actividad antitumoral de un anticuerpo biespecífico anti-PDGFR-β/anti-VEGF-A contra células de carcinoma pancreático humano *in vivo*, se inyecta a grupos de ratones BALB/c desnudos células de carcinoma pancreático BxPC-3 o HPAF-II en el día 0. Los grupos (n=10/grupo) de ratones que albergan tumor reciben 5 µg-75

µg de un anticuerpo biespecífico anti-PDGFRβ/anti-VEGF por inyección peritumoral en días alternos (EOD) desde los días 5-33. El volumen del tumor se controla 3X/semana durante 6 semanas. La inhibición del crecimiento del tumor (volumen o peso) por anticuerpo biespecífico anti-PDGFRβ/anti-VEGF sugiere que la proteína respectiva tiene efectos inhibidores sobre carcinoma pancreático humano *in vivo*.

- 5 Diseño del estudio. Se inyecta s.c. a ratones hembra desnudos BALB/c de ocho semanas de edad (Charles River Laboratories) en el flanco derecho o por vía ortotópica en el lóbulo pancreático con  $6 \times 10^6$  células BxPC-3 o HCT-116 en el Día 0. A los grupos de ratones (n=10/grupo) se les inyecta i.p. o por vía peritumoral (para el modelo s.c. solamente) 5 µg-75 µg de un anticuerpo biespecífico anti-PDGFRβ/anti-VEGF-A desde los días 5-33. Se proporcionan inyecciones en un volumen total de 200 µl. Para tumores s.c., el crecimiento del tumor se controla 3X/semana durante 6 semanas usando mediciones con calibre. El volumen del tumor se calcula usando la fórmula  $\frac{1}{2}(B)^2 \times L$  (mm<sup>3</sup>). Para tumores ortotópicos, se sacrifica a los ratones al final del estudio y se pesan los tumores para posibilitar la evaluación de carga tumoral.

**Ejemplo 50: Modelo de cáncer pancreático de ratón para evaluar la eficacia de anticuerpo biespecífico anti-PDGFR-β/anti-VEGF-A**

- 15 La eficacia de un anticuerpo biespecífico anti-PDGFRβ/anti-VEGF-A en un modelo de cáncer pancreático de ratón se evalúa usando el protocolo desarrollado por Mukherjee y col., J. Immunol. 165:3451-3460, 2000. En resumen, se cruzan ratones transgénicos MUC1 (MUC1.Tg) con ratones que expresan oncogenes que desarrollan espontáneamente tumores del páncreas (ratones ET) denominados ratones MET. MUC1. Tg. Los ratones ET expresan los primeros 127aa del Ag T grande de SV40 bajo el control del promotor de la elastasa de rata. El cincuenta por ciento de los animales desarrollan tumores pancreáticos potencialmente mortales en aproximadamente 21 semanas de edad. Las células se ensayan de forma rutinaria por citometría de flujo para la presencia de MUC1. Todos los ratones tienen un fondo C57BL/6. Los animales se sacrifican y caracterizan a intervalos de 3 semanas desde 3 a 24 semanas. Los ratones se observan cuidadosamente para signos de enfermedad-salud, incluyendo letargia, distensión abdominal, falta de apetito o de sed, marcada pérdida de peso, heces pálidas, y postura encorvada.

- 20 Se disecciona el páncreas completo de la grasa y los ganglios linfáticos, se pesa, y se extiende sobre papel bibulous para fotografía. Se cuentan los nódulos, y el páncreas se fija en metacam, se procesa para microscopía por procedimientos convencionales, se secciona por etapas a 5 µm (aproximadamente 10 secciones por páncreas de ratón), se tiñe con hematoxilina y eosina, y se examina por microscopía óptica. Los tumores se obtienen de ratones MET en diversos momentos puntuales durante la progresión del tumor, se fijan en metacam (metanol al 60 %, cloroformo al 30 %, ácido acético glacial al 10 %), se incluyen en parafina, y se seccionan para análisis inmunohistoquímico. Los anticuerpos MUC1 usados son CT1, un Ab policlonal de conejo que reconoce la región de cola citoplásmica de ratón y humana de MUC1, HMFG-2, BC2, y SM-3, que tienen epítomos en el dominio TR de MUC1.

- 35 Los ratones se tratan con anticuerpo biespecífico anti-PDGFRβ/anti-VEGF-A comenzando 3-14 días después del implante del tumor, o cuando se establece el injerto del tumor y la tasa de crecimiento. Se administran niveles de tratamiento de 0,5 - 5 mg/kg en una base diaria durante 5-14 días, y puede continuarse después de ello si no se observan evidencias de formación de anticuerpos neutralizantes.

**Ejemplo 51: Modelo de melanoma B16-F10 para evaluar los efectos antitumorales *in vivo* de anticuerpo biespecífico anti-PDGFR-β/anti-VEGF-A**

- 40 Se dividen ratones (hembra, C57B16, 9 semanas de edad; Charles River Labs, Kingston, NY) en tres grupos. En el día 0, se recogen células de melanoma B16-F10 (ATCC N°. CRL-6475) de cultivo y se inyectan por vía intravenosa, mediante la vena de la cola, a todos los ratones (aproximadamente 100.000 células por ratón). Los ratones después se tratan con el artículo de ensayo o el vehículo asociado por inyección intraperitoneal de 0,1 ml de la solución indicada. Los ratones en el primer grupo (n=24) se tratan con vehículo (PBS, pH 6,0), que se inyecta en el día 0, 2, 4, 6, y 8. Los ratones en el segundo grupo (n=24) se tratan con un anticuerpo biespecífico anti-PDGFRβ/anti-VEGF-A, que se inyecta a una dosis de 75 µg en el día 0, 2, 4, 6, y 8. Los ratones en el tercer grupo (n=12) se tratan con el anticuerpo biespecífico anti-PDGFRβ/anti-VEGF-A, que se inyecta a una dosis de 75 µg al día desde el día 0 hasta el día 9. Todos los ratones se sacrifican en el día 18, y se recogen los pulmones para la cuantificación del tumor. Se cuentan focos de crecimiento tumoral mayores de 0,5 mm de diámetro sobre todas las superficies de cada lóbulo pulmonar. En ambos grupos de ratones tratados con anticuerpo biespecífico anti-PDGFRβ/anti-VEGF-A, la cantidad promedio de focos tumorales presentes en los pulmones está significativamente reducida, en comparación con ratones tratados con vehículo. Los ratones tratados más frecuentemente (es decir, diariamente) tienen menos focos tumorales que los ratones tratados en días alternos. Estos resultados indican que el tratamiento con anticuerpo biespecífico anti-PDGFRβ/anti-VEGF-A ralentizó el crecimiento de los tumores de melanoma B16.

**Ejemplo 52: Modelo de timoma EG.7 para evaluar los efectos antitumorales *in vivo* de anticuerpo biespecífico anti-PDGFR $\beta$ /anti-VEGF-A**

Se dividen ratones (hembra, C57B16, 9 semanas de edad; Charles River Labs, Kingston, NY) en tres grupos. En el día 0, se recogen células EG.7 (ATCC N<sup>o</sup>. CRL-2113) de cultivo y se inyectan 1.000.000 de células por vía intraperitoneal en todos los ratones. Después los ratones se tratan con el artículo de ensayo o el vehículo asociado por inyección intraperitoneal de 0,1 ml de la solución indicada. Los ratones en el primer grupo (n=6) se tratan con vehículo (PBS, pH 6,0), que se inyecta en el día 0, 2, 4, y 6. Los ratones en el segundo grupo (n=6) se tratan con un anticuerpo biespecífico anti-PDGFR $\beta$ /anti-VEGF-A, que se inyecta a una dosis de 10  $\mu$ g en el día 0, 2, 4, y 6. Los ratones en el tercer grupo (n=6) se tratan con el anticuerpo biespecífico anti-PDGFR $\beta$ /anti-VEGF-A, que se inyecta a una dosis de 75  $\mu$ g en el día 0, 2, 4, y 6. En ambos grupos de ratones tratados con anticuerpo biespecífico anti-PDGFR $\beta$ /anti-VEGF-A, el tiempo de supervivencia está significativamente aumentado, en comparación con ratones tratados con vehículo. Estos resultados indican que el tratamiento con anticuerpo biespecífico anti-PDGFR $\beta$ /anti-VEGF-A ralentiza el crecimiento de los tumores EG.7.

**Ejemplo 53: Modelo de carcinoma de ovario singénico de ratón para evaluar la eficacia de anticuerpo biespecífico anti-PDGFR $\beta$ /anti-VEGF-A**

El efecto de anticuerpo biespecífico anti-PDGFR $\beta$ /anti-VEGF-A se ensaya para la eficacia en carcinoma de ovario usando un modelo singénico de ratón como se describe en Zhang y col., Am. J. of Pathol. 161:2295-2309, 2002. En resumen, usando transfección retroviral y clasificación celular activada por fluorescencia se genera una línea celular de carcinoma de ovario ID8 murino C57BL6 que sobreexpresa de forma estable la isoforma VEGF<sub>164</sub> murina y la proteína fluorescente verde (GFP) potenciada. La construcción retroviral que contiene los ADNc de VEGF<sub>164</sub> y GFP se introduce por transfección en células BOSC23. Las células se analizan por clasificación celular FACS y se identifican las células GFP altamente positivas.

Las células ID8 transfectadas con VEGF<sub>164</sub>/GFP se cultivan hasta sub-confluencia y se preparan en una suspensión de celular individual en solución salina tamponada con fosfato (PBS) y MATRIGEL frío (BD Biosciences, Bedford, MA). Se inyecta por vía subcutánea a ratones C57BL6 hembra de seis a ocho semanas de edad en el flanco a  $5 \times 10^6$  células o células de control no transfectadas. Como alternativa, a los ratones se les puede inyectar por vía intraperitoneal  $7 \times 10^6$  células o células de control. Se hace un seguimiento de los animales para la supervivencia o se les sacrifica ocho semanas después de la inoculación y se evalúa el crecimiento del tumor. Los ratones se tratan con un anticuerpo biespecífico anti-PDGFR $\beta$ /anti-VEGF-A comenzando 3-14 días después del implante del tumor, o cuando se ha establecido el injerto del tumor y la tasa de crecimiento. Se administran niveles de tratamiento de 0,5 - 5 mg/kg en una base diaria durante 5-14 días, y puede continuarse después de ello si no se observan evidencias de formación de anticuerpos neutralizantes.

**Ejemplo 54: Modelo RenCA de ratón para evaluar la eficacia de anticuerpo biespecífico anti-PDGFR $\beta$ /anti-VEGF-A**

La eficacia de un anticuerpo biespecífico anti-PDGFR $\beta$ /anti-VEGF-A en un modelo de carcinoma de células renales se evalúa usando ratones BALB/c a los que se ha inyectado células RENCA, un adenocarcinoma renal de ratón de origen espontáneo, esencialmente como se describe en Wigginton y col., J. Nat. Cancer Insit. 88:38-43, 1996.

En resumen, se inyecta a ratones BALB/c entre ocho y diez semanas de edad células RenCA R  $1 \times 10^5$  células en la cápsula renal de los ratones. Veinte días después del implante de las células tumorales, los ratones se nefrectomizan para retirar los tumores primarios. Se deja que los ratones se recuperen de la cirugía, antes de la administración de anticuerpo biespecífico anti-PDGFR $\beta$ /anti-VEGF-A. Los ratones se tratan con anticuerpo biespecífico anti-PDGFR $\beta$ /anti-VEGF-A comenzando 3-14 días después del implante del tumor, o cuando se ha establecido el injerto del tumor y la tasa de crecimiento. Se administran niveles de tratamiento de 0,5 - 5 mg/kg en una base diaria durante 5-14 días, y puede continuarse después de ello si no se observan evidencias de formación de anticuerpos neutralizantes. Como alternativa, pueden introducirse células RenCA por inyección subcutánea ( $5 \times 10^5$  células) o intravenosa ( $1 \times 10^5$  células).

Los ratones se evalúan para la respuesta tumoral en comparación con ratones no tratados. La supervivencia se compara usando un procedimiento de Kaplan-Meier, así como el volumen del tumor que se está evaluando.

**Ejemplo 55: Modelo de cáncer de mama murino para evaluar la eficacia de anticuerpo biespecífico anti-PDGFR $\beta$ /anti-VEGF-A**

La eficacia de un anticuerpo biespecífico anti-PDGFR $\beta$ /anti-VEGF-A en un modelo murino para cáncer de mama se hace usando un modelo singénico como se describe en Colombo y col., Cancer Research 62:941-946, 2002. En resumen, las células TS/A son un carcinoma mamario espontaneo para ratones BALB/c. las células se cultivan durante aproximadamente una semana para seleccionar los clones. Las células TS/A seleccionadas se cultivan y usan para estimular ratones CD-1 *nulnu* BR (Charles River Laboratories) mediante  $2 \times 10^2$  células TS/A inyectadas por vía subcutánea en el flanco del ratón.

Los ratones se tratan con anticuerpo biespecífico anti-PDGFR $\beta$ /anti-VEGF-A comenzando 3-14 días después del implante del tumor, o cuando se ha establecido el injerto del tumor y la tasa de crecimiento. Se administran niveles de tratamiento de 0,5 - 5 mg/kg en una base diaria durante 5-14 días, y puede continuarse después de ello si no se observan evidencias de formación de anticuerpos neutralizantes. Los tumores se escinden después de sacrificar a los animales y se analizan para el volumen y usando histoquímica e inmunohistoquímica.

#### **Ejemplo 56: Transfección y producción de combinaciones CHO para la producción de proteínas**

Se digirió el ADN plasmídico con una enzima de restricción, *PvuI*. Para preparar una combinación CHO estable que exprese un BiscFv, se introdujeron por transfección 15  $\mu$ g de ADN plasmídico digerido en células huésped CHO DXB-11 siguiendo un protocolo convencional de electroporación. Se dejó que las células se recuperaran en medio completo durante dos días en un matraz de agitación a 37 °C. Después de la recuperación, las células se transfirieron a medio selectivo suplementado con metotrexato. Las células se propagaron cada tres a cuatro días hasta que fueron al menos un 90 % viables. Para preparar una combinación CHO estable que exprese un BiAb, se introdujeron por co-transfección 15  $\mu$ g de cada ADN plasmídico digerido en células huésped CHO DXB-11 siguiendo un protocolo convencional de electroporación. Se dejó que las células se recuperaran en medio completo durante dos días en un matraz de agitación a 37 °C. Después de la recuperación, las células se transfirieron a medio completo suplementado con puomicina. Las células se propagaron cada tres a cuatro días hasta que fueron al menos un 80 % viables. Las células después se transfirieron a medio selectivo suplementado con puomicina y metotrexato. Las células se propagaron cada tres a cuatro días hasta que fueron al menos un 90 % viables.

Cuando las células CHO DXB-11 transfectadas alcanzaron una viabilidad de al menos el 90 %, se ensayó la combinación para la producción de proteína recombinante. La combinación se sembró en medio de producción en un matraz de agitación y se incubó a 37 °C. Después de seis días, el cultivo se recogió y se ensayó el sobrenadante para la producción de proteína recombinante por HPLC de proteína A.

#### **Ejemplo 57: Medición de la afinidad de unión de moléculas biespecíficas para PDGFR- $\beta$ /VEGF-A por PDGFR- $\beta$ monomérico humano por resonancia de Plasmón superficial**

Se evaluaron moléculas biespecíficas para la afinidad de unión a PDGFR- $\beta$  monomérico humano. Se midieron las constantes de asociación y disociación para la interacción de las moléculas biespecíficas con PDGFR- $\beta$ . La afinidad de unión se midió usando estas constantes medidas.

##### Materiales y procedimientos

Las mediciones de cinética y afinidad de unión se realizaron en un sistema Biacore T-100™ (GE Healthcare, Piscataway, NJ). Los procedimientos se programaron usando el software de control Biacore T-100™ v1.1.1. Todos los estudios se hicieron a 25 °C y las muestras se almacenaron a 8 °C en el toma-muestras automático. Se inmovilizó anticuerpo de cabra específico anti-IgG humana Fc-gamma en un chip sensor CM4 usando una mezcla de EDC 0,4 M [N-etil-N'-(3-dietilamino-propil) carbodiimida] y NHS 0,1 M (N-hidroxisuccinimida). El anticuerpo se diluyó en acetato sódico 10 mM pH 5,0 hasta una concentración de 50  $\mu$ g/ml. La densidad de inmovilización fue de aproximadamente 3400-3700 RU. Después de la inmovilización, las celdas restantes se bloquearon con etanolamina y la proteína unida de forma no específica se retiró lavando con NaOH 50 mM.

Las moléculas biespecíficas para PDGFR- $\beta$ /VEGF-A se diluyeron en tampón HBS-EP (HEPES 10 mM, NaCl 150 mM, EDTA 3 mM, tensioactivo P20 al 0,005 %, 1 mg/ml de BSA, pH 7,4) a 2  $\mu$ g/ml. Se capturaron en celdas de flujo individuales del chip CM4 con anticuerpo de cabra anti-IgG humana Fc-gamma a 10  $\mu$ l/min. La densidad de inmovilización fue entre 83-108 RU.

Se inyectó PDGFR- $\beta$  monomérico sobre las celdas de flujo. Se hicieron diluciones 1:3 en serie del analito en tampón HBS-EP de 100 nM a 0,015 nM. Se realizaron inyecciones individuales de las series de concentración desde las concentraciones bajas hasta las altas, seguidas por inyección replicada de las series de muestras. El analito se inyectó a 30  $\mu$ l/min durante 9 minutos (tiempo de asociación). El tiempo de disociación para cada inyección de analito fue de 15 minutos. También se hicieron inyecciones de tampón para sustraer el ruido y la desviación del instrumento.

El análisis de los datos se realizó con el software de evaluación Biacore T100. Basándose en la unión del analito monomérico a la molécula bivalente, se determinó que el modelo de unión 1:1 era apropiado, y las curvas de unión resultantes se ajustaron a este modelo. El modelo de unión 1:1 mide un único valor para la constante de asociación ( $k_a$ ) y la constante de disociación ( $k_d$ ). La afinidad de unión global ( $K_D$ ) se obtuvo dividiendo la  $k_d$  entre la  $k_a$ .

##### Resultados

Las constantes cinéticas obtenidas para las diversas moléculas biespecíficas se resumen en la Tabla 29. Moléculas biespecíficas con grupos comunes de la familia anti-PDGFR- $\beta$  mostraron afinidades de unión similares y los datos se ajustan bien al modelo de unión 1:1. La mayoría de las moléculas se unían al analito (PDGFR- $\beta$  monomérico) con baja afinidad nM.

**Tabla 29: Afinidad de unión de moléculas biespecíficas por PDGFR $\beta$  monomérico**

Molécula	$k_a$ (1/Ms)	$k_d$ (1/s)	$K_D$ (nM)
c941.1 - c868.1	5.5E+04	1.3E-04	2
c941.1 - c1039.1	4.2E+04	4.3E-05	1
c1035.1 - c868.1	4.6E+04	5.2E-05	1
c1035.1 - c870.1	4.0E+04	4.5E-05	1
c1035.1 - c1039.1	4.7E+04	3.7E-05	0,8
c597.1 - c868.1	5.3E+04	3.4E-04	6
c597.1 - c870.1	5.3E+04	3.7E-04	7
c597.1 - c1039.1	5.6E+04	3.7E-04	7
c600.1 - c868.1	3.5E+04	1.8E-04	5
c600.1 - c870.1	3.5E+04	1.9E-04	5
c600.1 - c1039.1	2.9E+04	1.8E-04	6

**Ejemplo 58: Medición de la afinidad de unión de moléculas biespecíficas para PDGFR- $\beta$ /VEGF-A por VEGF-A humano recombinante por resonancia de Plasmón superficial**

Se evaluaron moléculas biespecíficas para la afinidad de unión a VEGF-A humano recombinante. Se midieron las constantes de asociación y disociación para la interacción de las moléculas biespecíficas con VEGF-A. La afinidad de unión se midió usando estas constantes medidas.

Materiales y procedimientos

Las mediciones de cinética y afinidad de unión se realizaron en un sistema Biacore T-100™ (GE Healthcare, Piscataway, NJ). Los procedimientos se programaron usando el software de control Biacore T-100™ v1.1.1. Todos los estudios se hicieron a 25 °C y las muestras se almacenaron a 8 °C en el toma-muestras automático. Se inmovilizó VEGF-A humano recombinante en un chip sensor CM4 usando una mezcla de EDC 0,4 M [N-etil-N'-(3-dietilamino-propil) carbodiimida] y NHS 0,1 M (N-hidroxisuccinimida). La proteína se diluyó en acetato sódico 10 mM pH 5,0 hasta una concentración de 2 µg/ml. La densidad de inmovilización fue de aproximadamente 13 RU. Después de la inmovilización, las celdas restantes se bloquearon con etanolamina 1 M y la proteína unida de forma no específica se retiró lavando con glicina 10 mM, pH 1,5.

Las moléculas biespecíficas para PDGFR- $\beta$ /VEGF-A se diluyeron en tampón HBS-EP (HEPES 10 mM, NaCl 150 mM, EDTA 3 mM, tensioactivo P20 al 0,005 %, 1 mg/ml de BSA, pH 7,4). Se hicieron diluciones 1:3 en serie del analito en tampón HBS-EP de 100 nM a 0,015 nM. La molécula biespecífica se inyectó sobre las celdas de flujo. Se realizaron inyecciones individuales de las series de concentración de concentraciones bajas a altas, seguidas por inyección replicada de las series de muestras. El analito se inyectó a 30 µl/min durante 9 minutos (tiempo de asociación). El tiempo de disociación para cada inyección de analito fue de 15 minutos. También se hicieron inyecciones de tampón para sustraer el ruido y la desviación del instrumento.

El análisis de los datos se realizó con el software de evaluación Biacore T100. Basándose en la unión de la molécula biespecífica dimérica a VEGF-A humano dimérico, se determinó que el modelo de unión bivalente era apropiado, y las curvas de unión resultantes se ajustaron a este modelo. El modelo de unión bivalente mide dos valores para la constante de asociación ( $k_{a1}$  y  $k_{a2}$ ) y la constante de disociación ( $k_{d1}$  y  $k_{d2}$ ). La afinidad de unión global ( $K_{D1}$ ) se obtuvo dividiendo la  $k_{d1}$  entre la  $k_{a1}$ .

Resultados

Las constantes cinéticas obtenidas para las diversas moléculas biespecíficas se resumen en la Tabla 30. Moléculas biespecíficas con grupos comunes de la familia anti-VEGF-A mostraron afinidades de unión razonablemente similares y los datos se ajustan bien al modelo de unión bivalente. La mayoría de las moléculas se unieron al VEGF-A con baja afinidad nM.

**Tabla 30: Afinidad de unión de moléculas biespecíficas por VEGF-A humano recombinante**

Molécula	$k_{a1}$ (1/Ms)	$k_{d1}$ (1/s)	$K_{D1}$ (nM)
c941.1 - c868.1	3.6E+05	4.0E-04	1
c941.1 - c1039.1	2.1E+05	2.5E-04	1
c1035.1 - c868.1	7.1E+04	1.2E-04	2
c1035.1 - c1039.1	21E+05	2.1E-04	1
c597.1 - c868.1	3.4E+04	1.1E-04	3
c597.1 - c1039.1	5.4E+04	1.1E-04	2
c600.1 - c868.1	3.2E+04	1.6E-04	5
c600.1 - c1039.1	6.1E+04	1.5E-04	2

**Ejemplo 59: Confirmación de co-unión de moléculas biespecíficas de PDGFR- $\beta$ /VEGF-A tanto a PDGFR- $\beta$  humano recombinante como a VEGF-A humano recombinante por resonancia de plasmón superficial**

Se evalúan moléculas biespecíficas para su capacidad de co-unirse simultáneamente a PDGFR- $\beta$  humano recombinante (monomérico o dimérico) y VEGF-A humano recombinante. Se calculó la estequiometría molar de la co-unión.

Materiales y procedimientos

Las mediciones de cinética y afinidad de unión se realizaron en un sistema Biacore T-100™ (GE Healthcare, Piscataway, NJ). Los procedimientos se programaron usando el software de control Biacore T-100™ v1.1.1. Todos los estudios se hicieron a 25 °C y las muestras se almacenaron a 8 °C en el toma-muestras automático. Se inmovilizó VEGF-A humano recombinante en un chip sensor CM4 usando una mezcla de EDC 0,4 M [N-etil-N'-(3-dietilamino-propil) carbodiimida] y NHS 0,1 M (N-hidroxisuccinimida). La proteína se diluyó en acetato sódico 10 mM pH 5,0 hasta una concentración de 2 µg/ml. La densidad de inmovilización fue de aproximadamente 13 RU. Después de la inmovilización, las celdas restantes se bloquearon con etanolamina 1 M y la proteína unida de forma no específica se retiró lavando con glicina 10 mM, pH 1,5.

Las moléculas biespecíficas para PDGFR- $\beta$ /VEGF-A se diluyeron en tampón HBS-EP (HEPES 10 mM, NaCl 150 mM, EDTA 3 mM, tensioactivo P20 al 0,005 %, 1 mg/ml de BSA, pH 7,4) a una concentración de 100 nM y se inyectó sobre las celdas de flujo a 10 µl/min durante 5 minutos. También se hicieron inyecciones de tampón para sustraer el ruido y la desviación del instrumento.

Se preparó una concentración de saturación (500 nM) de PDGFR- $\beta$  monomérico o PDGFR $\beta$ -Fc dimérico en tampón HBS-EP y se inyectó sobre las celdas de flujo. El analito se inyectó a 30 µl/min durante 10 minutos (tiempo de asociación). También se hicieron inyecciones de tampón para sustraer el ruido y la desviación del instrumento.

El análisis de los datos se realizó con el software de evaluación Biacore T100.

Resultados

Primero se dejó que cada molécula biespecífica se uniera a VEGF-A humano inmovilizado y se formaran las curvas de unión. Posteriormente, se permitió que el monómero de PDGFR- $\beta$  o el dímero de PDGFR $\beta$ -Fc se uniera a la molécula biespecífica capturada y unida a VEGF-A. Todas las moléculas biespecíficas fueron simultáneamente capaces de unirse tanto a VEGF-A como a PDGFR- $\beta$ . La estequiometría molar de la unión para las diversas moléculas biespecíficas se resume en la Tabla 31.

**Tabla 31: Estequiometría molar de la unión de moléculas biespecíficas unidas a VEGF-A a PDGFR $\beta$  monomérico y dimérico**

Molécula	PDGFR $\beta$ monomérico	PDGFR $\beta$ -Fc dimérico
c941.1 - c1039.1	0,8 a 1	0,5 a 1
c1035.1 - c.868.1	1,8 a 1	0,8 a 1

(continuación)

Molécula	PDGFR $\beta$ monomérico	PDGFR $\beta$ -Fc dimérico
c1035.1 - c1039.1	1,6 a 1	0,9 a 1
c597.1 - c1039.1	1,4 a 1	0,8 a 1
c600.1 - c1039.1	1,1 a 1	0,7 a 1

**Ejemplo 60: Análisis farmacocinético de moléculas biespecíficas después de inyección intravenosa de una única dosis en ratones SCID hembra**

Las moléculas biespecíficas descritas en los ejemplos anteriores (véase, por ejemplo, el Ejemplo 30) tienen el Fc de IgG 1 humana, de tipo silvestre o con mutaciones que inhiben la unión a Fc $\gamma$ R (Fc de función efectora negativa). Normalmente, la unión de estas moléculas a FcRn (receptor Fc neonatal) no se comprometería y, por lo tanto, se espera que estas moléculas tengan semivida en suero ( $t_{1/2}$ ) similar a los anticuerpos IgG clásicos. Se determinaron las propiedades farmacocinéticas de moléculas biespecíficas que comprenden el efector Fc de función efectora negativa después de inyección i.v. de una única dosis en ratones SCID hembra.

**Materiales y procedimientos**

Se usaron ratones SCID hembra de entre 8-10 semanas de edad (Charles River Laboratories) para todos los experimentos. Se inyectó a grupos de 24 ratones mediante la vena de la cola con 100  $\mu$ g de molécula biespecífica en un volumen de 100  $\mu$ l en histidina 25 mM, tampón NaCl 125 mM. Se recogió sangre completa en diversos momentos puntuales (0,5, 2, 6, 24, 72, 168, 336, y 504 h) de grupos de 3 ratones por punción cardiaca (en ratones anestesiados), se recogió el suero y se almacenó a -80 °C. La cantidad de molécula biespecífica en suero se determinó en las diversas muestras usando un ELISA limitado.

Se inmovilizó VEGF-A humano recombinante en plástico (placas de fondo plano de 96 pocillos). Se generaron diluciones en serie del suero aislado de los ratones y se añadieron a los pocillos recubiertos con VEGF-A humano (capturada de moléculas biespecíficas). Se usó un anticuerpo biotilado anti-IgG humana para unir la parte Fc de la molécula biespecífica capturada (en suero) seguido por detección usando estreptavidina-peroxidasa de rábano rusticano junto con el sustrato tetrametilbenzidina. Se usó una curva convencional usando molécula biespecífica reciente para calcular después la cantidad en suero.

Los perfiles resultantes de concentración frente al tiempo se sometieron a análisis PK no compartimental usando Win-Nonlin 5.0.1 (Pharsight Inc, Mountain view, CA). Se calcularon los valores para el área bajo las curvas de concentración frente al tiempo extrapoladas a la afinidad (AUC<sub>INF</sub>) usando el procedimiento trapezoidal lineal con ponderación uniforme.

**Resultados**

Las concentraciones en suero de molécula biespecífica fueron cuantificables en todas las muestras ensayadas hasta el último momento puntual medido (504 h después de la dosis). Los análisis de estos datos se muestran en la Tabla 32. Estos resultados demuestran que los bscFv c1035.1-c1039.1 y los biAb c597.1-c1039.1 y c600.1-c1039.1 tienen semividas en suero en el intervalo esperado de anticuerpos clásicos que contienen Fc.

**Tabla 32: Análisis farmacocinético de moléculas biespecíficas después de inyección i.v. de una única dosis**

Parámetro	Unidades	clo35.1-clo39.1	c597.1-c1039.1	c600.1-c1039.1
C <sub>0</sub>	$\mu$ g/ml	113	95,8	99,9
AUC <sub>0-t</sub>	h $\mu$ g/ml	13200	12700	16900
AUC <sub>INF</sub>	h* $\mu$ g/ml	24300	19200	28800
AUC % extrapolado	%	45,7	33,8	41,3
AUC <sub>inf/D</sub>	h* $\mu$ g/ml/ $\mu$ g	243	256	288
$t_{1/2,\lambda z}$	h	460	327	413
V <sub>SS</sub>	ml	2,65	1,78	1,98



(continuación)

Parámetro	Unidades	clo35.1-clo39.1	c597.1-c1039.1	c600.1-c1039.1
CI	ml/h	0,0041	0,0039	0,0035

**Ejemplo 61: Suero de ratones después de inyección de una única dosis de molécula biespecífica en ratones SCID neutraliza la actividad VEGF-A y PDGFR $\beta$  *in vitro***

Se analizó el suero del Ejemplo 60 usando una captura de VEGF-A humano seguido por detección usando un ELISA de anticuerpo anti-IgG humana Fc. Para demostrar adicionalmente que las moléculas detectadas en suero son activas, se ensayó el suero aislado para la actividad neutralizante en ensayos que ensayan la función de activación de VEGF-A y PDGFR $\beta$ .

Materiales y procedimientos

Se diluyó el suero aislado de los gráficos PK (0,5 y 504 h) en suero al 10 % y se ensayó para la actividad neutralizante. Para la actividad neutralizante contra VEGF-A, se usó el ensayo descrito en el Ejemplo 11 (actividad luciferasa inducida por VEGF-A humano en células 293/VEGFR2). Para la actividad neutralizante contra PDGFR $\beta$ , se usó el ensayo de fosforilación de PDGFR $\beta$  inducida por PDGF-BB descrito en el Ejemplo 22. Como controles, se usaron moléculas biespecíficas con adiciones recientes en suero SCID al 10 % para neutralizar la actividad.

Resultados

Como se muestra en la Tabla 33, el suero de ratones inyectados con moléculas biespecíficas neutralizaba de forma eficaz la actividad de VEGF-A y PDGFR $\beta$  humano. La actividad fue similar a la observada con molécula biespecífica con adiciones recientes en suero. Estos datos demuestran que las moléculas biespecíficas son activas en suero durante hasta al menos 504 h después de una única inyección.

**Tabla 33: Neutralización de la actividad VEGF-A y PDGFR $\beta$  *in vitro* con suero de ratones SCID a los que se ha inyectado anticuerpos biespecíficos para PDGFR $\beta$ /VEGF-A**

Molécula	Ejemplo	CI <sub>50</sub> (nM) de VEGF-A		CI <sub>50</sub> (nM) de PDGFR $\beta$	
		0,5 h	504 h	0,5 h	504 h
c1035.1-c1039.1	Adiciones recientes	0,52	0,52	0,7	0,7
	Ratón N° 1	0,50	0,83	2,1	3,0
	Ratón N° 2	0,54	0,51	1,9	1,9
	Ratón N° 3	0,53	0,52	1,5	1,8
c597.1-c1039.1	Adiciones recientes	0,41	0,44	1,4	1,4
	Ratón N° 1	0,67	1,03	1,6	3,6
	Ratón N° 2	0,71	0,96	1,5	2,9
	Ratón N° 3	ND	0,67	ND	1,4
ND = no determinado debido a cuestiones técnicas con la muestra					

**Ejemplo 62: Mapeado de epítomos de anticuerpos anti-VEGF-A**

Se evaluaron los anticuerpos monoclonales contra VEGF-A humano producidos por los clones c636, c868, c870 y c1039 para su unión peptídica a VEGF-A humano usando los portaobjetos JPT VEGF-A RepliTope™.

Material y procedimientos

Cada portaobjetos JPT constaba de 3 réplicas de la siguiente serie. Cada serie constaba de fragmentos de 13aa solapantes y sucesivos de VEGF-A (manchas 1-78), seguidos por fragmentos de 20aa solapantes y sucesivos de VEGF-A (manchas 85-115). Además, manchas de control de cada anticuerpo de ensayo e IgG de ratón y humana flanqueaban la parte superior, inferior, y los laterales de cada serie.

Se completó una serie de experimentos para determinar la capacidad de unión de los scFv c636, c870, c1039, y c868 frente a péptidos lineales sintéticos de la proteína VEGF-A humana. Los scFv anti-VEGF-A humano se marcaron con marcas epitópicas His/Myc. Se aplicó una solución de 10-100 µg/ml de los anticuerpos a los portaobjetos de péptido. Después se aplicaron anticuerpos anti-His y/o anti-Myc a los portaobjetos. Las señales se amplificaron con Tiramida Biotinilada de acuerdo con el procedimiento especificado por el kit (Renaissance® TSA™ Biotin System, PerkinElmer, nº NEL700A). Los anticuerpos unidos se visualizaron usando estreptavidina fosfatasa alcalina y un colorante rojo permanente DAKO.

Los datos se compilaron usando un escáner artesano de portaobjetos de microscopio que constaba de un microscopio invertido Nikon Eclipse TE2000U, una plataforma motorizada ASI MS-2000, una cámara Photometrics Cascade II 512 y un sistema de iluminación fluorescente X-cite 120. La intensidad de la señal se analizó usando el software de imágenes MetaMorph v7.1.

#### Resultados

Las posiciones y secuencias de los péptidos de unión se muestran en la siguiente Tabla 34. Los números indican el porcentaje de intensidad de señal del péptido respecto a las intensidades de señal globales.

**Tabla 34: Unión de anticuerpos Anti-VEGF-A a péptidos derivados de VEGF-A**

ID del péptido	Secuencia del péptido	Unidad funcional	c1039	c636	c868	c870
7	HEVVKFMDVYQRS (SEC ID Nº:544)	$\alpha 1$	3 %	7 %	6 %	4 %
8	VVKFMDVYQRSYS (SEC ID Nº:545)	$\alpha 1$	6 %	14 %	9 %	14 %
9	KFMDVYQRSYSHP (SEC ID Nº:546)	$\alpha 1$	7 %	15 %	10 %	17 %
10	MDVYQRSYSHP (SEC ID Nº:547)	$\alpha 1$	5 %			
11	VYQRSYSHP (SEC ID Nº:548)	$\alpha 1$	7 %		12 %	6 %
18	DIFQEYPDEIEYI (SEC ID Nº:549)	$\alpha 2$	3 %			
19	FQEYPDEIEYIFK (SEC ID Nº:550)	$\alpha 2$	5 %	4 %		
20	EYPDEIEYIFKPS (SEC ID Nº:551)	$\beta 2$	3 %			
23	EYIFKPSSVPLMR (SEC ID Nº:552)	$\alpha 2$ - $\beta 2$	9 %	18 %	14 %	32 %
24	IFKPSSVPLMRSG (SEC ID Nº:553)	$\alpha 2$ - $\beta 2$	7 %	15 %	9 %	25 %
34	LESVPTEESNITM (SEC ID Nº:554)	$\beta 4$ - $\beta 5$				
36	PTEESNITMQIMR (SEC ID Nº:555)	$\beta 4$ - $\beta 5$		5 %	6 %	
37	EESNITMQIMRIK (SEC ID Nº:556)	$\beta 5$	4 %	3 %	4 %	
38	SNITMQIMRIKPH (SEC ID Nº:557)			3 %		
39	ITMQIMRIKPHQG (SEC ID Nº:558)	$\beta 5$	3 %	6 %	6 %	1 %
41	IMRIKPHQGQHIG (SEC ID Nº:559)	$\beta 5$ - $\beta 6$		8 %	7 %	
59	PSGPSSERRKHLF (SEC ID Nº:560)	post $\beta 7^*$	13 %	3 %	20 %	
60	GPSSERRKHLFVQ (SEC ID Nº:561)	post $\beta 7^*$	5 %			
75	ARQLELNERTSRS (SEC ID Nº:562)	post $\beta 7^*$	7 %			
76	QLELNERTSRSDK (SEC ID Nº:563)	post $\beta 7^*$	4 %			
77	ELNERTSRSDKPR (SEC ID Nº:564)	post $\beta 7^*$	4 %			
78	LNERTSRSDKPRR (SEC ID Nº:565)	post $\beta 7^*$	4 %			

\* La región "post  $\beta 7$ " es el dominio de unión a heparina de la molécula VEGF.

Los 4 anticuerpos ensayados mostraron un sitio de unión específico alrededor de la región  $\alpha 2$ - $\beta 2$ . Los datos indicaron que los anticuerpos de ensayo podían clasificarse en dos categorías: el anticuerpo c636 y c870 preferían el lado C-terminal de VEGF-A, mientras que el anticuerpo c1039 y c868 tenía unión más fuerte hacia el lado N-terminal de la proteína. El anticuerpo c870 tenía la menor cantidad de péptidos de unión mientras que el anticuerpo c1039 tenía el patrón de unión más disperso. Los dos principales sitios de unión de cada anticuerpo se enumeran en la siguiente Tabla 35.

**Tabla 35: Sitios de unión anti-VEGF-A principales**

Rangos de unión	c1039	c636	c868	c870
1	post $\beta 7$	$\alpha 2$ - $\beta 2$	post $\beta 7$	$\alpha 2$ - $\beta 2$
2	$\alpha 2$ - $\beta 2$	$\alpha 1$	$\alpha 2$ - $\beta 2$	$\alpha 1$

### Ejemplo 63: Mapeado de epítomos de anticuerpos anti-PDGFR $\beta$

#### Sumario

El propósito de este estudio fue determinar los sitios de unión de moléculas anti-PDGFR $\beta$  usando un inmunoensayo de microserie de péptidos. En este estudio, se usó la tecnología de microserie de péptidos JPT para evaluar cinco moléculas anti-PDGFR $\beta$ : Fab c597 anti-PDGFR $\beta$ , scFv c1035 anti-PDGFR $\beta$ , scFv c941 anti-PDGFR $\beta$ , IgG1 c600 anti-PDGFR $\beta$ , scFv c1232 anti-PDGFR $\beta$ , y un anticuerpo monoclonal de ratón anti-PDGFR $\beta$  (E9899).

#### Materiales y procedimientos

Se preparó la microserie de péptidos RepliTope™ como una serie de fragmentos peptídicos solapantes de PDGFR $\beta$  humano (solapamientos de 20aa y desplazamientos de 5aa). Se imprimieron tanto las manchas de control como los péptidos en tres series replicadas idénticas por portaobjetos para la reproducibilidad dentro de la placa. Todos los péptidos y los anticuerpos de control incluyendo las moléculas de unión se unen covalentemente por química de inmovilización selectiva usando la función amino de las cadenas laterales de lisina. Las manchas de control constaban de: IgG humana, IgG de cabra, IgG de ratón, scFv c1035, Fab c597 y scFv c941.

El mapeado de epítopo se determinó detectando la unión de la molécula anti-PDGFR $\beta$  a PDGFR $\beta$  humano en portaobjetos RepliTope™. Como control adicional, se ensayaron un anticuerpo monoclonal de ratón anti-PDGFR $\beta$  humano (E9899; control +) y scFv anti-VEGF-A (control -). Antes de procesar los portaobjetos, se ensayó cada molécula anti-PDGFR $\beta$  en un dot blot para determinar las concentraciones de trabajo aproximadas de los anticuerpos primario y secundario. Cada experimento se procesó por duplicado.

Se incubaron los portaobjetos RepliTope™ durante una hora con moléculas anti-PDGFR $\beta$  diluidas con PB. Las moléculas anti-PDGFR $\beta$  marcadas con His6 (c1035, c941, c597 y c1232) se tiñeron con un anticuerpo secundario anti-his6 como se describe en el procedimiento resumido posteriormente. C600, una IgG 1 anti-PDGFR $\beta$  se tiñó con un anticuerpo de cabra secundario específico anti-fragmento F(ab')<sub>2</sub> humano Fc $\gamma$ . E9899, un anticuerpo monoclonal de ratón, se tiñó con un anticuerpo de cabra específico anti-fragmento F(ab')<sub>2</sub> de ratón Fc $\gamma$ . Después de las incubaciones con tiramida biotinilada y estreptavidina y las posteriores etapas de lavado con TNT, los portaobjetos se revelaron con rojo permanente DAKO incubando a TA hasta que las manchas llegaron a ser visibles pero antes de que se revelara la tinción de fondo (1-30 minutos). El revelado del color se detuvo aclarando con dH<sub>2</sub>O. los portaobjetos se secaron con nitrógeno y las manchas de péptidos se visualizaron tanto con un microscopio de campo brillante como uno fluorescente. Las imágenes de la placa se exploraron a aumento 4x usando formación de imágenes de fluorescencia y el software MetaMorph versión 7.1. Las imágenes se visualizaron para facilitar el análisis de los péptidos de unión anti-PDGFR $\beta$  usando Adobe Photoshop. Las manchas de los péptidos de unión se determinaron manualmente y se confirmaron por análisis visual. Los resultados del análisis de la microserie de péptidos se resumen en la siguiente Tabla 36.

**Tabla 36: Secuencias peptídicas de unión de PDGFR $\beta$  humano determinadas por microserie de péptidos JPT**

Anticuerpo	Secuencia de aminoácidos del péptido	Nº de manchas de péptido.	Dominio tipo Ig
scFv anti-PDGFR $\beta$ , (c1035)	<sup>186</sup> RSYISKTTIGDREYDSDAY <sup>205</sup> (SEC ID Nº:566)	38	D2
	<sup>191</sup> KTTIGDREVDSDAYVYRLQ <sup>210</sup> (SEC ID Nº:567)	39	D2
	<sup>196</sup> DREVDSDAYVYRLQVSSIN <sup>215</sup> (SEC ID Nº:568)	40	D2, bucle D2/D3
	<sup>251</sup> RKESGRLVEPVTDFLDMPY <sup>270</sup> (SEC ID Nº:569)	51	D3
Fab anti-PDGFR $\beta$ , (c597)	<sup>251</sup> RKESGRLVEPVTDFLDMPY <sup>270</sup> (SEC ID Nº:569)	51	D3
IgG1 anti-PDGFR $\beta$ , (c600)	<sup>251</sup> RKESGRLVEPVTDFLDMPY <sup>270</sup> (SEC ID Nº:569)	51	D3
scFv anti-PDGFR $\beta$ , (c941)	<sup>136</sup> LVVTLHEKKGDVALVPYDH <sup>175</sup> (SEC ID Nº:649)	32	D2
	<sup>191</sup> KTTIGDREVDSDAYVYRLQ <sup>210</sup> (SEC ID Nº:567)	39	D2
	<sup>231</sup> ITLMCIVIGNEVVNFEWTP <sup>250</sup> (SEC ID Nº:650)	47	D3
	<sup>251</sup> RKESGRLVEPVTDFLDMPY <sup>270</sup> (SEC ID Nº:569)	51	D3

**Ejemplo 64: Identificación de anticuerpos biespecíficos neutralizantes anti-VEGF usando el ensayo de luciferasa basado en células 293/KDR/KZ136/c22 inducido por VEGF-A**

5 Para seleccionar moléculas biespecíficas para su capacidad de neutralizar la actividad de VEGF-A se realizó un ensayo de luciferasa basado en células. Se sembraron células 293/KDR/KZ136/c22 a una densidad de siembra de 10.000 células por pocillo en placas blancas opacas de 96 pocillos tratadas con cultivo tisular (Costar nº 3917) en 100  $\mu$ l de medio completo (DMEM, suero bovino fetal (FBS) al 10 %, piruvato sódico 1X, GlutaMax (Invitrogen) 1X) y se incubaron 48 horas en una incubadora de CO<sub>2</sub> al 5 % humidificada a 37 °C. Después de 48 horas, se retiró el medio completo por aspiración de vacío y se reemplazó con 100  $\mu$ l de medio sin suero (DMEM, piruvato sódico 1X, GlutaMax (Invitrogen) 1X) y se incubaron durante una noche. Al día siguiente, se diluyeron en serie las moléculas neutralizantes de VEGF-A candidatas de 200 nM hasta 12 pM a diluciones 1:5 junto con un agente no neutralizante (medio solamente) en medio sin suero. A éstas, se añadió un volumen igual de VEGF-A<sub>165</sub> a 0,54 nM para una concentración final de VEGF-A 0,26 nM y 100 nM a 6 pM de molécula neutralizante o control positivo.

15 Estas se incubaron durante 60 minutos a 37 °C. Después de la incubación, se retiró por aspiración el medio de las células privadas de suero y se añadieron 100  $\mu$ l de los complejos anteriores y se incubaron a 37 °C durante 4 horas.

Después de 4 horas de incubación, se realizó un ensayo de luciferasa usando el sistema de ensayo de luciferasa (Promega, E1501) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. En resumen, se aspiró el medio y se añadieron 25  $\mu$ l de tampón is 1X (Promega, E153A) a cada pocillo. Las placas se incubaron durante 20-30 minutos a TA para equilibrarlas. La actividad luciferasa se midió usando un luminómetro de microplaca (Berthold Technologies), 40  $\mu$ l de inyección de sustrato, 1 segundo de tiempo de integración. Los datos se analizaron usando un software analítico (Spotfire) y se calcularon los valores de CI<sub>50</sub> para cada candidato y control.

La acción de unión de VEGF-A<sub>165</sub> a su receptor, VEGFR2 (KDR/Flk-1), induce una cascada de señalización que activa ATAT (transductor de señales y activador de la transcripción) y/o SRE (elemento de respuesta de suero), que dirige la transcripción del gen indicador de luciferasa. Una disminución en la actividad luciferasa indica que esta

señalización mediada por VEGF-A se está neutralizando.

#### Resultados

Se demostró inhibición significativa con varias moléculas biespecíficas exploradas (presentadas como valores de  $Cl_{50}$  en la Tabla 37). Los valores de  $Cl_{50}$  se indican como concentración nM de molécula biespecífica necesaria para neutralizar la actividad de VEGF en un 50 %.

**Tabla 37: Moléculas biespecíficas neutralizan la actividad luciferasa inducida por VEGF-A humano en células 293/KDR/ KZ136/c22**

Moléculas	$Cl_{50}$ (nM)
Avastin™	0,3
c597-c868	0,17
c597-c870	0,13
c597-c1039	0,09
c600-c868	0,18
c600-c870	0,07
c600-c1039	0,03
c1035-c868	0,2
c1035-c870	0,05
c1035-c1039	0,17
c941-c868	0,28
c941-c1039	0,21

#### Ejemplo 65: Ensayo de proliferación para determinar la actividad neutralizante de biAb y biscFv anti-VEGF-A sobre células HUVEC estimuladas con VEGF-A

Para seleccionar moléculas biespecíficas neutralizantes anti-VEGF-A (BiAb y BiscFv) que tuvieran una afinidad moderada por VEGF-A, se ejecutó un ensayo de  $^3H$ -timidina. Se usó VEGF-A<sub>165</sub> humano recombinante como control positivo a 2,6 nM. Se usó medio DMEM-F12 (1:1) con insulina-transferrina-selenio 1x (medio sin suero, SFM; Invitrogen, Carlsbad, CA) como control negativo. Las moléculas biespecíficas se diluyeron en serie en SFM a 500 nM, 50 nM, 5 nM, 0,5 nM, 0,05 nM, 0,005 nM, y 0,0005 nM. Se sembraron células endoteliales de la vena umbilical humana (HUVEC) en placas de fondo plano de 96 pocillos en un volumen de 100  $\mu$ l a una densidad de 900-1000 células por pocillo. Las células HUVEC se sembraron durante 2 días en medio EGM-2 MV completo (Lonza, Walkersville, MD) a 37°C, CO<sub>2</sub> al 5 %. Las células se privaron de suero con SFM durante 24 horas, se estimularon durante 24 horas con 2,6 nM con o sin el scFv contra-VEGF-A diluido en serie, y se pulsaron durante 24 horas con 1  $\mu$ Ci por pocillo de  $^3H$ -timidina, que se incorpora en células en proliferación (todo a 37°C, CO<sub>2</sub> al 5 %). Las células se recogieron y se contaron usando el instrumento Topcount (Hewlett Packard).

#### Resultados

Una gran cantidad de moléculas biespecíficas exploradas en el ensayo mostraron potente neutralización de proliferación de HUVEC inducida por VEGF, como se observa por bajos valores nM de  $Cl_{50}$  mostrados en las siguientes Tablas 38 y 39.

**Tabla 38: Actividad de neutralización de BiAb y dímero anti-VEGF-A en ensayo de proliferación de HUVEC**

BiAb y dímeros	$Cl_{50}$ (nM) de proliferación
c597-c1111	0,13
c597-c868	0,21 - 0,60
dímero c868	0,22
c600-c868	0,75
c597-c870	0,34-0,77

(continuación)

BiAb y dímeros	CI <sub>50</sub> (nM) de proliferación
c600-c870	0,73
c597-c1039	0,04 - 0,54
c600-c1039	0,46 - 0,52
c597-c1081	10,08
c597-c1092	2,33

**Tabla 39: Actividad de neutralización de Bisc anti-VEGF-A en ensayo de proliferación de HUVEC**

BiscFv	CI <sub>50</sub> (nM) de proliferación
c941-c868	0,99
c1035-c868	0,49 - 0,72
c1035-c870	1,1
c941-c1039	0,57 - 0,84
c1035-c1039	0,44 - 0,59

**Ejemplo 66: Ensayo de reactividad cruzada de scFv de unión a VEGF-A y anticuerpos biespecíficos contra VEGF-A murino usando el ensayo de fosforilación de VEGFR2**

- 5 Para seleccionar moléculas candidatas (scFv, Fab, y anticuerpos biespecíficos) por su capacidad de neutralizar la actividad de VEGF-A murino, se realizó un ensayo Luminex basado en células que mide la fosforilación de VEGFR2 (KDR/Flk-1). Como mVEGF-A<sub>164</sub> reaccionará de forma cruzada con VEGFR2 humano, puede usarse un sistema indicador basado en VEGFR2 humano. Se sembraron células 293/KDR/KZ136/c22 a una densidad de 20.000 células por pocillo en 100 µl de medio completo (DMEM, suero bovino fetal (FBS) al 10 %, piruvato sódico 1X, GlutaMax (Invitrogen) 1X) en placas de cultivo tisular transparentes de 96 pocillos y se dejaron adherir durante una noche. El siguiente día, se retiró el medio completo por aspiración de vacío y se reemplazó con 100 µl de medio sin suero (DMEM, piruvato sódico 1X, GlutaMax (Invitrogen) 1X). Las células se incubaron durante una noche.

- 15 El siguiente día, se diluyeron en serie las moléculas neutralizantes de VEGF-A candidatas (scFv, Fab) de 200 nM a 12 pM en diluciones 1:5 junto con un agente no neutralizante (medio solamente) en medio sin suero. Se usó VEGFR2-Fc como control positivo para la neutralización. A esto, se añadió un volumen igual de mVEGF-A<sub>165</sub> a (493-MV-005, R&D Systems) a 0,54 nM para una concentración final de VEGF-A 0,26 nM y de 100 nM a 6 pM de molécula neutralizante o control positivo. Esto se incubó durante 60 minutos a 37 °C.

- 20 Después de la incubación, se retiró el medio de las células privadas de suero por aspiración con vacío y se reemplazó con 100 µl de los complejos anteriores. Las células se incubaron durante 10 minutos a 37 °C. Después de la incubación, se retiró el medio por aspiración con vacío y las células se lavaron suavemente con 100 µl de solución salina tamponada con fosfato enfriada en hielo (PBS, Invitrogen). El PBS se retiró por aspiración con vacío y las células se lisaron en 25 µl de tampón de lisis NP-40 (Invitrogen N° Cat. FNN0021) que contenía PMSF 1 mM (Sigma, P-2714 en DMSO) y 1 minicomprimido completo por 10 ml (Roche, 11836153001).

- 25 Los lisados se incubaron durante 20 minutos a 4 °C en un agitador de plataforma y se centrifugaron a 3000 rpm durante 10 minutos a 4 °C para aclarar los lisados. Los lisados se transfirieron a una nueva placa de microtitulación de 96 pocillos y se colocaron a -20 °C hasta el ensayo.

- 30 Para el ensayo de Luminex de fosforilación de VEGFR2, se usó el kit de reactivo de tampón de proteína intracelular (Invitrogen LHB0002) y el kit de perlas de anticuerpo contra VEGFR2 [pY1059] (Invitrogen LH00601) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Los lisados se descongelaron y mezclaron 1:5 con 80 µl de diluyente de ensayo. Los pocillos de una placa de filtración por vacío Luminex se pre-humedecieron con 200 µl de solución de lavado de trabajo. Las perlas diluidas se añadieron a 25 µl por pocillo y se lavaron 2x con 200 µl de solución de lavado de trabajo. Después del lavado, se añadieron 50 µl de lisado diluido, y 50 µl del anticuerpo detector diluido a cada pocillo y las placas se cubrieron con papel de plata y se incubaron durante 3 horas a temperatura ambiente (TA) en un agitador de plataforma a 500 rpm. Después de la incubación, las perlas se lavaron 2x con 200 µl de solución de lavado de trabajo y después se añadieron 100 µl de anticuerpo diluido anti-IgG de conejo-RPE a cada pocillo y las placas se cubrieron con papel de plata y se incubaron durante 30 minutos a TA en un agitador de plataforma a 500 rpm. Después de la incubación, las perlas se lavaron 3x con 200 µl de solución de lavado de trabajo, y se re-suspendieron en 200 µl de solución de lavado de trabajo. Las perlas se re-suspendieron durante 30 segundos en un agitador de plataforma a 500 rpm y se leyeron en un instrumento Luminex-100 (BioRad). Los datos se analizaron

usando un software analítico (Spotfire) y se calcularon los valores de  $CI_{50}$  para cada candidato y control.

#### Resultados

5 La acción de la unión de mVEGF-A<sub>164</sub> al receptor humano, VEGF-R2 (KDR/Flk-1), induce la fosforilación del receptor. Este ensayo basado en Luminex une VEGF-R2 total a una perla marcada de forma fluorescente conjugada a un anticuerpo anti-VEGFR2. Se usa un anticuerpo secundario que detecta la fosforilación en [pY1059] para detectar cuanto VEGFR2 se ha fosforilado. Como se muestra en la siguiente Tabla 40, varios scFv que neutralizaban la actividad VEGF-A humana también inhibían la actividad VEGF de ratón en este ensayo: los anticuerpos biespecíficos que contenían estos mismos scFv también neutralizaban la actividad VEGF-A de ratón.

**Tabla 40: Neutralización de la actividad VEGF-A de ratón por scFv específicos de VEGF-A y anticuerpos biespecíficos**

scFv/Anticuerpos biespecíficos	$CI_{50}$ (nM)
c868	n/a
c870	0,16
c636	0,28
c1036	0,22
c1090	0,27
c1044	0,09
c1155	0,19
c1476	n/a
c1410	0,24
c1094	0,55
c1135	0,12
c1257	n/a
c1270	n/a
c1080	0,07
c1039	n/a
c1035/c1039 biscFv	n/a
c1035/c868 biscFv	n/a
c597/c870 biAb	0,16
n/a = actividad clara identificada	

#### 10 Ejemplo 67: Ensayo de proliferación para determinar la actividad de neutralización de scFv sobre células HUVEC estimuladas con VEGF-A de ratón (VEGF-A<sub>164</sub>)

Para seleccionar scFv de neutralización de VEGF-A de ratón, se ejecutó un ensayo de <sup>3</sup>H-timidina. Se usó VEGF-A<sub>165</sub> de ratón recombinante como control positivo a 2,6 nM. Se usó medio DMEM-F12 (1:1) con insulina-transferrina-selenio 1x (medio sin suero, SFM; Invitrogen, Carlsbad, CA) como control negativo. Las moléculas scFv se diluyeron en serie en SFM a 500 nM, 50 nM, 5 nM, 0,5 nM, 0,05 nM, 0,005 nM, y 0,0005 nM. Se sembraron células endoteliales de la vena umbilical humana (HUVEC) en placas de fondo plano de 96 pocillos en un volumen de 100 µl a una densidad de 900-1000 células por pocillo. Las células HUVEC se sembraron durante 2 días en medio EGM-2 MV completo (Lonza, Walkersville, MD) a 37 °C, CO<sub>2</sub> al 5 %. Las células se privaron de suero con SFM durante 24 horas, se estimularon durante 24 horas con 2,6 nM con o sin el scFv contra-VEGF-A diluido en serie, y se pulsaron durante 24 horas con 1 µCi por pocillo de <sup>3</sup>H-timidina, que se incorpora en células en proliferación (todo a 37 °C, CO<sub>2</sub> al 5 %). Las células se recogieron y se contaron usando el instrumento Topcount (Hewlett Packard).

#### Resultados

Una gran cantidad de scFv exploradas en el ensayo mostraron potente neutralización de proliferación de HUVEC inducida por VEGF de ratón, como se observa por bajos valores nM de  $CI_{50}$  mostrados en la siguiente Tabla 41.

**Tabla 41: Neutralización de proliferación de HUVEC inducida por VEGF-A de ratón por scFv específicos de VEGF-A**

scFv	CI <sub>50</sub> (nM)
c868	n/a
c870	0,36
c636	n/a
c1036	0,46
c1090	0,59
c1044	0,79
c1155	0,41
c1476	n/a
c1410	nd
c648	974
c1094	2,84
c1135	0,51
c1257	637
c1270	n/a
c1080	0,44

**Ejemplo 68: Ensayo Luminex para determinar la reactividad cruzada de sFab y scFv anti-PDGFR $\beta$  con PDGFR $\beta$  de ratón**

Para explorar la reactividad cruzada de scFv contra PDGFR $\beta$  humano, se realizó un ensayo basado en Luminex. El ensayo detecta la cantidad de PDGFR $\beta$  fosforilado que está presente en lisados celulares. Se sembraron fibroblastos embrionarios murinos (3T3-Swiss albino, Swiss; American Type Culture Collection, Manassas, VA) en placas de fondo plano de 96 pocillos (Falcon, Colorado Springs, CO) a una densidad de 1.000 células por pocillo en un volumen de 100  $\mu$ l en medio completo (medio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM), suero bovino fetal al 5 % (FBS)) y se incubaron a 37 °C en CO<sub>2</sub> al 5 %. Después de 24-48 horas, se reemplazó con medio DMEM-F12 (1:1) con insulina-transferrina-selenio 1x (Invitrogen, Carlsbad, CA; medio sin suero, SFM) y las células se incubaron como anteriormente durante 18-24 horas adicionales. Las moléculas neutralizantes de PDGFR $\beta$  (scFv, Fab) o la molécula de control quimérica de PDGFR $\beta$  murino-Fc humano (R&D Systems, n° 1042-PR-100) se diluyeron en serie 1:4 de 2000 nM a 0,02 nM en SFM. Las células privadas de suero se incubaron con 150  $\mu$ l de SFM o las moléculas anti-PDGFR $\beta$  tituladas en SFM durante 1 hora a 37 °C en CO<sub>2</sub> al 5 %. Las células después se pulsaron con 50  $\mu$ l de PDGF-BB 1,6 nM (concentración final 0,4 nM, CE<sub>80</sub>, concentración eficaz al 80 %) durante 10 minutos a 37 °C en CO<sub>2</sub> al 5 %. Se incluyeron pocillos de control sin estimulación con PDGF-BB. Las células después se lavaron con tampón de lavado celular Bio-Plex y se lisaron en tampón de lisis suministrado en el kit de ensayo de acuerdo con las directrices del fabricante (BioRad, Hercules, CA), y los sobrenadantes celulares se congelaron a -20 °C. A sobrenadantes celulares descongelados, se añadieron perlas fosfo-PDGFR $\beta$  1x y se incubaron a temperatura ambiente en un agitador durante 18 horas. Se añadió anticuerpo de detección a las perlas lavadas y se incubaron a temperatura ambiente en un agitador durante 30 minutos, y después se incubó estreptavidina-PE con las perlas a temperatura ambiente durante 15 minutos.

Las perlas se re-suspendieron en tampón de re-suspensión Bio-Plex y se analizaron en un lector de serie Bio-Plex (Bio-Rad Laboratories).

Resultados: Ninguno de los scFv o Fab analizados eran neutralizante contra PDGFR $\beta$  de ratón.

**Ejemplo 69: Identificación de BiscFv y BiAb neutralizantes contra PDGFR $\beta$  usando un ensayo de proliferación de fibroblastos inducida por PDGF**

Para seleccionar moléculas candidatas bisespecíficas (biscFv, biAb) por su capacidad de neutralizar la proliferación inducida por activación por PDGF-AB, -BB, -CC y -DD de los fibroblastos dérmicos humanos con PDGFR $\beta$  humano, se ejecutó un ensayo de <sup>3</sup>H-timidina. El ensayo mide la cantidad de nucleótido radiomarcado incorporado en ADN de células en proliferación. Se sembraron fibroblastos dérmicos humanos (HDF) en placas de fondo plano de 96 pocillos (Falcon, Colorado Springs, CO) a una densidad de 1.000-1.500 células por pocillo en 100  $\mu$ l de medio completo (MEM $\alpha$  (Invitrogen, Carlsbad, CA) + suero bovino fetal al 10 %) a 37 °C en CO<sub>2</sub> al 5 %. Después de 24



horas, se reemplazó el medio completo con medio DMEM-F12 (1:1) con insulina-transferrina-selenio 1x, fracción V de albumina sérica bovina al 0,1 %, piruvato Na 1 mM, L-glutamina 2 mM (Invitrogen, Carlsbad, CA; medio sin suero, SFM) y las células se incubaron como anteriormente durante 18-24 horas adicionales. Las moléculas biespecíficas (biscFv, biAb) o un anticuerpo de control monoclonal contra PDGFR $\beta$  (E9899) se diluyeron en serie 1:10 de 200 nM a 0,002 nM en SFM en presencia de un nivel constante de PDGF-BB humano (0,2 nM, CE<sub>80</sub>, concentración eficaz al 80 %), PDGF-AB humano (3 nM, CE<sub>80</sub>, R&D systems), PDGF-CC humano (1 nM, CE<sub>80</sub>) o PDGF-DD humano (0,2 nM, DE<sub>80</sub>). Las células privadas de suero se incubaron con 100  $\mu$ l de SFM, ligandos PDGF a CE<sub>80</sub> en SFM, o las moléculas anti-PDGFR $\beta$  tituladas con ligandos PDGF a CE<sub>80</sub> en SFM. Después de 6-8 horas, se añadió un 1  $\mu$ Ci de <sup>3</sup>H-timidina (Amersham, Piscataway, NJ) a cada pocillo y las células se incubaron de forma normal durante 18-24 horas. Las células se recogieron en placas de filtro y se determinó la incorporación de <sup>3</sup>H-timidina usando una maquina Packard Topcount.

#### Resultados

Los BiscFv y BiAb mostraron potente neutralización de la proliferación de fibroblastos primarios humanos inducida por los ligandos PDGF-AB, -BB, -CC y -DD como se muestra por los bajos valores nM de CI<sub>50</sub> en la siguiente Tabla 42. La neutralización de la proliferación inducida por PDGF-AB y PDGF-CC de los HDF indica que las moléculas biespecíficas no solamente neutralizan el homodímero de PDGFR $\beta$  sino también el heterodímero de PDGFR $\beta$ /PDGFR $\alpha$ .

**Tabla 42: Neutralización de proliferación de fibroblastos humanos inducida por PDGF por BiscFv y BiAb específicos de PDGFR $\beta$**

BiscFv	CI <sub>50</sub> (nM)		
	PDGF-AB	PDGF-BB	PDGF-CC
162.62.62	0,178	0,13-0,55	4,12
c1035.1 / c868.1	0,06	0,2-0,5	0,09
c1035.1/ c1039.1	0,13	0,09	ND
<b>Biab</b>			
c597.1/c1039.1	ND	0,22	ND
c600.1/c1039.1	ND	0,37	ND
ND: No determinado			

#### Ejemplo 70: Identificación de BiscFv y BiAb neutralizantes contra PDGFR $\beta$ usando ensayo de proliferación de pericitos inducida por PDGF-BB

Para seleccionar moléculas candidatas biespecíficas (biscFv, biAb) por su capacidad de neutralizar la proliferación inducida por la activación por PDGF-BB del PDGFR $\beta$  humano, se ejecutó un ensayo de <sup>3</sup>H-timidina. El ensayo mide la cantidad de nucleótido radiomarcado incorporado en ADN de células en proliferación. Se sembraron pericitos vasculares de cerebro humano (HBVP; ScienCell Research, San Diego, CA) en placas de fondo plano de 96 pocillos (Falcon, Colorado Springs, CO) a una densidad de 500-2000 células por pocillo en 150  $\mu$ l de medio completo (medio de pericitos ScienCell (PM) más suplementos ScienCell de suero bovino fetal, suplemento de cultivo de pericitos, y penicilina-estreptomycinina) a 37 °C en CO<sub>2</sub> al 5 %. Después de 24-48 horas, se reemplazó el medio completo con medio DMEM-F12 (1:1) con insulina-transferrina-selenio 1x (Invitrogen, Carlsbad, CA; medio sin suero, SFM) y las células se incubaron como anteriormente durante 18-24 horas adicionales. Las moléculas neutralizantes de PDGFR $\beta$  (biscFv o biAb), un anticuerpo de control monoclonal contra PDGFR $\beta$  (E9899), o el fragmento Fab del anticuerpo monoclonal E9899 se diluyeron en serie 1:4 de 2000 nM a 0,02 nM en SFM en presencia de un nivel constante de PDGF-BB humano (0,4 nM, CE<sub>80</sub>, concentración eficaz al 80 %). Las células privadas de suero se incubaron con 150  $\mu$ l de SFM, PDGF-BB 0,4 nM en SFM, o las moléculas anti-PDGFR $\beta$  tituladas con PDGF-BB 0,4 nM en SFM. Después de 18-24 horas, se añadió un 1  $\mu$ Ci de <sup>3</sup>H-timidina (Amersham, Piscataway, NJ) a cada pocillo y las células se incubaron de forma normal durante 3-6 horas. Las células se recogieron en placas de filtro y se determinó la incorporación de <sup>3</sup>H-timidina usando una maquina Packard Topcount.

#### Resultados

Los BiscFv y BiAb mostraron potente neutralización de la proliferación de pericitos inducida por PDGF-BB como se muestra por los bajos valores nM de CI<sub>50</sub> en las siguientes Tablas 43 y 44.

**Tabla 43: Actividad de neutralización de moléculas biespecíficas BiAb en proliferación de pericitos inducida por PDGF-BB**

BiAb	CI <sub>50</sub> (nM)
162.6262	0,05-0,48
c597.1-c868.1	0,05-1
c597.1-c870.1	0,66
c597-c1039	0,02-0,5
c600-c868	0,04-1,2
c600-c870	0,66
c600-c 1039	0,09-0,1

**Tabla 44: Actividad de neutralización de moléculas biespecíficas BiscFv en proliferación de pericitos inducida por PDGF-BB**

BiscFv	CI <sub>50</sub> (nM)
c1035-c868	0,02-1,02
c1035-c1039	0,2-1,7
c941-c1039	0,02-0,6

**Ejemplo 71: Identificación de anticuerpos biespecíficos neutralizantes contra PDGFR $\beta$  usando un ensayo de proliferación de pericitos inducida por PDGF-DD**

- 5 Para seleccionar moléculas candidatas biespecíficas por su capacidad de neutralizar la proliferación inducida por la activación por PDGF-DD del PDGFR $\beta$  humano, se ejecutó un ensayo de <sup>3</sup>H-timidina. El ensayo mide la cantidad de nucleótido radiomarcado incorporado en ADN de células en proliferación. Se sembraron pericitos vasculares de cerebro humano (HBVP; ScienCell Research, San Diego, CA) en placas de fondo plano de 96 pocillos (Falcon, Colorado Springs, CO) a una densidad de 500-2000 células por pocillo en 150  $\mu$ l de medio completo (medio de pericitos ScienCell (PM) más suplementos ScienCell de suero bovino fetal, suplemento de cultivo de pericitos, y penicilina-estreptomicina) a 37 °C en CO<sub>2</sub> al 5 %. Después de 24-48 horas, se reemplazó el medio completo con medio DMEM-F12 (1:1) con insulina-transferrina-selenio 1x (Invitrogen, Carlsbad, CA; medio sin suero, SFM) y las células se incubaron como anteriormente durante 18-24 horas adicionales. Las moléculas neutralizantes de PDGFR $\beta$  (biscFv), un anticuerpo de control monoclonal contra PDGFR $\beta$  (E9899), se diluyeron en serie 1:4 de 2000 nM a 0,02 nM en SFM en presencia de un nivel constante de PDGF-DD humano (0,2 nM, CE<sub>80</sub>, concentración eficaz al 80 %) o PDGF-BB humano (0,4 nM, CE<sub>80</sub>, concentración eficaz al 80 %). Las células privadas de suero se incubaron con 150  $\mu$ l de SFM, PDGF-BB 0,4 nM o PDGF-DD 0,2 nM en SFM, o las moléculas biespecíficas tituladas con PDGF-DD 0,2 nM o PDGF-BB 0,4 nM en SFM. Después de 18-24 horas, se añadió un 1  $\mu$ Ci de <sup>3</sup>H-timidina (Amersham, Piscataway, NJ) a cada pocillo y las células se incubaron de forma normal durante 3-6 horas. Las células se recogieron en placas de filtro y se determinó la incorporación de <sup>3</sup>H-timidina usando una maquina Packard Topcount.

Resultados

Los BiscFv c1035/c868 y c1035/c1039, y los BiAb, c600/c1039, mostraron potente neutralización de proliferación de pericitos inducida por PDGF-DD como se muestra por los bajos valores nM de CI<sub>50</sub> en la siguiente Tabla 45.

**Tabla 45: Neutralización de proliferación de pericitos inducida por PDGF por BiscFv específico para PDGFR $\beta$** 

Anticuerpo	CI <sub>50</sub> (nM)	
	PDGF-BB	PDGF-DD
162.62.62	0,36	0,04
c1035.1/c868.1	1,3	0,29
c1035/c1039	0,2	0,1
c600/c1039	0,1	0,2

**Ejemplo 72: Identificación sFab y scFv neutralizantes contra PDGFR $\beta$  usando un ensayo basado en Luminex para determinar la fosforilación de PDGFR $\beta$  en pericitos**

Para seleccionar un scFv neutralizante contra PDGFR $\beta$  humano se realizó un ensayo basado en Luminex. El ensayo detecta la cantidad PDGFR $\beta$  fosforilado que está presente en lisados celulares. Se sembraron pericitos vasculares de cerebro humano (ScienCell Research, San Diego, CA) en placas de fondo plano de 96 pocillos (Falcon, Colorado Springs, CO) a una densidad de 7.500 células por pocillo en un volumen de 100  $\mu$ l de medio completo de (ScienCell) de medio de pericitos (PM) más suplementos ScienCell de suero bovino fetal suplemento de cultivo de pericitos, y penicilina-estreptomycin a 37 °C en CO<sub>2</sub> al 5 %. En el día dos se cambió el medio a PM ScienCell sin suplementos y se privó de suero durante 24 horas. En el día tres se retiró el medio de las células y se añadieron los anticuerpos

5  
10

biespecíficos diluidos en serie y el anticuerpo monoclonal de control contra PDGFR $\beta$  humano (E9899) en medio de ensayo (PM ScienCell y albumina sérica bovina al 0,5 %) en un volumen de 50  $\mu$ l y se incubaron durante 60 minutos a 37 °C y CO<sub>2</sub> al 5 %, se añadió PDGF-BB en 50  $\mu$ l a concentración 2x para dar una concentración final de 0,44 nM (CE<sub>80</sub>, cantidad eficaz al 80 %) y se incubaron durante 10 minutos a 37 °C y CO<sub>2</sub> al 5 %.

Las células después se lavaron con tampón de lavado celular Bio-Plex, se lisaron con solución de lisis de acuerdo con las directrices del fabricante (BioRad, Hercules, CA), se congelaron los sobrenadantes celulares a -20 °C. A los sobrenadantes celulares descongelados, se añadieron perlas fosfo-PDGFR $\beta$  1x y se incubaron a temperatura ambiente en un agitador durante 18 horas. Se añadieron anticuerpos de detección a las perlas lavadas y se incubaron a temperatura ambiente en un agitador durante 30 minutos, y después se incubó estreptavidina-PE con las perlas a temperatura ambiente durante 15 minutos. Las perlas se re-suspendieron en tampón de re-suspensión Bio-Plex y se analizaron en un lector de serie Bio-Plex (Bio-Rad Laboratories).

15  
20

**Resultados**

Los anticuerpos biespecíficos mostraron potente neutralización de la fosforilación de PDGFR inducida por PDGF-BB como se muestra por los bajos valores nM de CI<sub>50</sub> en la siguiente Tabla 46.

**Tabla 46: Anticuerpos biespecíficos neutralizan la fosforilación de PDGFR $\beta$  inducida por PDGF-BB en pericitos humanos primarios**

Anticuerpo	CI <sub>50</sub> (nM)
E9899 (anti-PDGFR $\beta$ )	0,14 - 0,17
c597-c868 biAb	0,18 - 0,22
c597-c870 biAb	0,15 - 0,24
c597-c1039 biAb	0,14 - 0,18
c600-c868 biAb	0,3 - 0,48
c600-c870 biAb	0,2 - 0,3
c600-c1039 biAb	0,03 - 0,28
c1035-c868 biscFv	0,16 - 0,48
c1035-c870 biscFv	0,25 - 0,5
c1035-c1039 biscFv	0,16 - 0,61
c941-c868 biscFv	0,19 - 0,38
c941-c1039 biscFv	0,15

**Ejemplo 73: Identificación de anticuerpo biespecífico neutralizante que neutraliza la fosforilación de PDGFR $\beta$  inducida por PDGF-DD en pericitos**

Para seleccionar anticuerpos biespecíficos neutralizantes contra PDGFR $\beta$  humano, se realizó un ensayo basado en Luminex. El ensayo detecta la cantidad PDGFR $\beta$  fosforilado que está presente en lisados celulares. Se sembraron pericitos vasculares de cerebro humano (ScienCell Research, San Diego, CA) en placas de fondo plano de 96 pocillos (Falcon, Colorado Springs, CO) a una densidad de 7.500 células por pocillo en un volumen de 100  $\mu$ l de medio completo de (medio de pericitos (PM) ScienCell más suplementos ScienCell de suero bovino fetal, suplemento de cultivo de pericitos, y penicilina-estreptomycin a 37 °C en CO<sub>2</sub> al 5 %. En el día dos se cambió el medio a PM ScienCell sin suplementos y se privó de suero durante 24 horas. En el día tres se retiró el medio de las células y se añadieron los anticuerpos biespecíficos diluidos en serie y el anticuerpo monoclonal de control contra PDGFR $\beta$  humano (E9899) en medio de ensayo (PM ScienCell y albumina sérica bovina al 0,5 %) en un volumen de

25  
30  
35

50  $\mu$ l y se incubaron durante 60 minutos a 37 °C y CO<sub>2</sub> al 5 %. Se añadió PDGF-DD o PDGF-BB en 50  $\mu$ l a concentración 2x para dar una concentración final de PDGF-DD 0,2 nM y PDGF-BB 0,44 nM respectivamente (CE<sub>80</sub>, cantidad eficaz al 80 %) y se incubaron durante 10 minutos a 37 °C y CO<sub>2</sub> al 5 %.

Las células después se lavaron con tampón de lavado celular Bio-Plex, se lisaron con solución de lisis de acuerdo con las directrices del fabricante (BioRad, Hercules, CA), y se congelaron los sobrenadantes celulares a -20 °C. A los sobrenadantes celulares descongelados, se añadieron perlas fosfo-PDGFR $\beta$  1x y se incubaron a temperatura ambiente en un agitador durante 18 horas. Se añadieron anticuerpos de detección a las perlas lavadas y se incubaron a temperatura ambiente en un agitador durante 30 minutos, y después se incubó estreptavidina-PE con las perlas a temperatura ambiente durante 15 minutos. Las perlas se re-suspendieron en tampón de re-suspensión Bio-Plex y se analizaron en un lector de serie Bio-Plex (Bio-Rad Laboratories).

#### Resultados

El BiscFv c1035/c868 mostró potente neutralización de la fosforilación de PDGFR $\beta$  inducida por PDGF-BB o PDGF-DD como se muestra por los bajos valores nM de  $CI_{50}$  en la siguiente Tabla 47.

**Tabla 47: Neutralización de proliferación de pericitos inducida por PDGF por BiscFv específicos de PDGFR $\beta$**

Anticuerpo	$CI_{50}$ (nM)	
	PDGF-BB	PDGF-DD
E9899	0,01	0,02
c1035.1/c868.1	0,05	0,03

#### Ejemplo 74: Ensayo Luminex para determinar la reactividad cruzada de anticuerpos biespecíficos contra PDGFR $\beta$ con PDGFR $\beta$ de macaco cynomolgus

Para explorar la reactividad cruzada de anticuerpos biespecíficos con PDGFR $\beta$  de macaco cynomolgus, se realizó un ensayo basado en Luminex. El ensayo detecta la cantidad PDGFR $\beta$  fosforilado que está presente en lisados celulares. Se sembraron células cutáneas de macaco cynomolgus (células CYNOM-KI), (European Collection of Cell Cultures, Wiltshire, R.U.) en placas de fondo plano de 96 pocillos (Falcon, Colorado Springs, CO) a una densidad de 7.500 células por pocillo en un volumen de 100  $\mu$ l de medio completo (MEM de Earle, suero bovino fetal al 10 % (FBS), L-Glutamina 2 mM, aminoácidos no esenciales al 1 %) durante un día a 37 °C en CO<sub>2</sub> al 5 %. En el día dos las células se cambiaron el medio sin FBS y se privaron de suero durante 24 horas. En el día tres se retiró el medio de las células y se añadieron los anticuerpos biespecíficos diluidos en serie y el anticuerpo monoclonal de control contra PDGFR $\beta$  (E9899) en medio de ensayo (MEM más albumina sérica bovina al 0,5 % y HEPES 25 mM) en un volumen de 50  $\mu$ l y se incubaron durante 60 minutos a 37 °C y CO<sub>2</sub> al 5 %. Se añadió PDGF-BB en 50  $\mu$ l a concentración 2x para dar una concentración final de 0,33 nM ( $CE_{80}$ , cantidad eficaz al 80 %) y se incubaron durante 10 minutos a 37 °C y CO<sub>2</sub> al 5 %.

Las células después se lavaron con tampón de lavado celular Bio-Plex, se lisaron con solución de lisis de acuerdo con las directrices del fabricante (BioRad, Hercules, CA), y se congelaron los sobrenadantes celulares a -20 °C. A los sobrenadantes celulares descongelados, se añadieron perlas fosfo-PDGFR $\beta$  1x y se incubaron a temperatura ambiente en un agitador durante 18 horas. Se añadieron anticuerpos de detección a las perlas lavadas y se incubaron a temperatura ambiente en un agitador durante 30 minutos, y después se incubó estreptavidina-PE con las perlas a temperatura ambiente durante 15 minutos. Las perlas se re-suspendieron en tampón de re-suspensión Bio-Plex y se analizaron en un lector de serie Bio-Plex (Bio-Rad Laboratories).

#### Resultados

Los anticuerpos biespecíficos mostraron potente neutralización de la fosforilación de PDGFR $\beta$  inducida por PDGF-BB como se muestra por los bajos valores nM de  $CI_{50}$  en la siguiente Tabla 48.

**Tabla 48: Anticuerpos biespecíficos neutralizan la fosforilación de PDGF-BB inducida por PDGFR $\beta$  en células de macaco cynomolgus**

Anticuerpo	$CI_{50}$ (nM)
E9899 (anti-PDGFR $\beta$ )	NA
c597-c868 biAb	0,13
c597-c870 biAb	0,16
c597-c1039 biAb	0,09
c600-c868 biAb	0,29
c600-c870 biAb	0,32
c600-c1039 biAb	0,22
c1035-c868 biscFv	0,11

(continuación)

Anticuerpo	CI <sub>50</sub> (nM)
c1035-c870 biscFv	0,14
c1035-c1039 biscFv	0,1
c941-c868 biscFv	0,03
c941-c1039 biscFv	0,03
NA- sin actividad detectada	

**Ejemplo 75: Inhibición del crecimiento endotelial y de pericitos y morfogénesis por el antagonista de PDGFR $\beta$ /VEGF-A en un ensayo de brote de co-cultivo *in vitro***

Sumario

5 Para ensayar la eficacia del antagonista biespecífico de PDGFR $\beta$ /VEGF-A, se estableció un sistema de co-cultivo *in vitro* de células endoteliales y pericitos. En este co-cultivo, se insertan HUVEC recubiertas sobre perlas Cytodex en gel de fibrina junto con células madre mesenquimáticas humanas. Las células se cultivan en medio completo EGM-2 condicionado por fibroblastos humanos D551. En el inicio del experimento (contexto profiláctico) o en Día 8 del experimento (contexto terapéutico), se añade antagonista de control, antagonista de PDGFR $\beta$  (anticuerpo E9899 anti-PDGFR $\beta$ ), antagonista de VEGF-A (Bevacizumab, Genentech) o antagonista biespecífico de PDGFR $\beta$ /VEGF-A de concentración indicada al cultivo. Los cultivos se fijan 7 días después de la adición de los antagonistas con PFA. Las células endoteliales y los pericitos se tiñen con anticuerpos anti-PECAM y anti- $\alpha$ -actina de músculo liso (aSMA), respectivamente. En los pocillos de control, las células formaban brotes de células endoteliales protegidas por una cobertura de pericitos. La adición de antagonista de VEGF-A provocaba una cantidad y longitud reducidas de los brotes endoteliales, mientras que el antagonista de PDGFR $\beta$  no tenía efecto sobre la longitud y cantidad de brotes, pero conducía a la disociación de los pericitos de los brotes. El antagonista biespecífico de PDGFR $\beta$ /VEGF-A conducía a la disociación de los pericitos de los brotes endoteliales así como a una cantidad y longitud reducidas de los brotes endoteliales. La reducción en la cantidad y longitud de los brotes endoteliales con antagonistas biespecíficos de PDGFR $\beta$ /VEGF-A fue significativamente mayor que con el antagonista de VEGF-A en solitario.

20 Diseño del estudio

En el Día 1, se recubrieron perlas Cytodex-3 (GE healthcare) con HUVEC (Lonza) a una proporción de 400 células por perla y se incubaron durante una noche a 37 °C, CO<sub>2</sub> al 5 %. En el Día 2, las perlas HUVEC (100 perlas/pocillo) se insertaron en gel de fibrina junto con células madre mesenquimáticas humanas (hMSC, Lonza, 30.000 células/pocillo) en pocillos de una placa de cultivo tisular de 24 pocillos. Se añadió una mezcla 1:1 de medio completo EGM-2 reciente (Lonza) y medio EGM-2 condicionado con fibroblastos D551 a estas células junto con 2 ng/ml de HGF humano recombinante. El medio se reemplaza cada dos días hasta el final del experimento. Se añadieron antagonistas al cultivo en el Día 2 (desde el inicio del co-cultivo, contexto profiláctico) o en el Día 8 (después de formarse los brotes EC y la cobertura de pericitos, contexto terapéutico). A los 7 días después de la adición de los antagonistas, las células se fijaron en PFA al 4 % durante una noche a 4 °C. Las células se tiñeron con anticuerpos anti-PECAM o anti-SMA seguido por anticuerpo secundario (conjugado fluorescente). Las células después se visionaron mediante un microscopio invertido de fluorescencia y se capturaron imágenes 6x. Se eligió aleatoriamente una serie representativa de 10 perlas/pocillo para cada condición. La longitud total de todos los brotes alrededor de una perla se midió en MetaMorph (versión 7.1.6.0) usando la aplicación de formación de tubos de angiogénesis. Los parámetros fueron los siguientes: anchura mínima aproximada 1 píxel, anchura máxima aproximada 40 píxeles, intensidad por encima del fondo local: 40 tonos de grises (contexto profiláctico) o 100 tonos de grises (contexto terapéutico).

Resultados

El efecto de antagonistas biespecíficos para PDGFR $\beta$ /VEGF-A sobre brotes endoteliales se resume en las Figuras 3 y 4A-4D. En pocillos con tratamiento con antagonista de control, las células formaban brotes de células endoteliales protegidas por una cobertura de pericitos. En el contexto profiláctico, el antagonista de VEGF-A en solitario, las moléculas biespecíficas de PDGFR $\beta$ /VEGF-A (biscFv c1035/c868, biscFv c1035/c1039, biAb c597/c1039, y biAb c600/c1039), y la combinación de antagonistas de VEGF-A y PDGFR $\beta$  inhibió cada uno los brotes endoteliales en comparación con el control. (Véase la Figura 3). La inhibición de los brotes endoteliales con moléculas biespecíficas de PDGFR $\beta$ /VEGF-A o la combinación de antagonistas de VEGF-A y PDGFR $\beta$  fue significativamente mayor que con el antagonista de VEGF-A en solitario. (Véase, *id.*).

En el contexto terapéutico, el antagonista de VEGF-A en solitaria y cada una de las moléculas biespecíficas de PDGFR $\beta$ /VEGF-A - biscFv c1035/c868 (Figura 4A), biscFv c1035/c1039 (Figura 4B), biAb c597/c1039 (Figura 4C), y biAb c600/c1039 (Figura 4D) - inhibieron la formación de brotes endoteliales en comparación con el control. (La combinación de antagonista de VEGF-A y PDGFR $\beta$  no se ensayó en el contexto terapéutico). La inhibición de los

brotes endoteliales con moléculas biespecíficas de PDGFR $\beta$ /VEGF-A fue significativamente mayor que con el antagonista de VEGF-A en solitario (Véanse las Figuras 4A-4D).

#### **Ejemplo 76: Ensayo de internalización basado en inmunofluorescencia para medir el efecto de antagonistas de PDGFR $\beta$ /VEGF-A sobre la internalización del receptor**

##### 5 Sumario

Los anticuerpos y moléculas tipo anticuerpo, cuando se unen al receptor de superficie celular, podrían mediar la internalización del receptor. PDGF-BB induce la activación e internalización del PDGFR $\beta$ . Así mismo, los anticuerpos contra PDGFR $\beta$  han demostrado mediar la internalización y este proceso contribuye parcialmente a la actividad antagonista del anticuerpo. Se ensayó la actividad de dos moléculas biespecíficas de PDGFR $\beta$ /VEGF-A - biscFv c1035/c1039 y biscFv c1035/c868 - de internalizarse cuando están unidos a pericitos humanos primarios. También se ensayó si el VEGF-A humano pre-unido a un brazo del anticuerpo biespecífico inhibiría la internalización mediada por el antagonista.

##### Material y procedimientos

Se sembraron pericitos vasculares de cerebro humano (HBVP) de bajo pase (ScienCell Research, San Diego, CA) a sub-confluencia en 4 portaobjetos de vidrio Lab-Tek II (Nº catálogo 154917 Nalge Nunc, Naperville, IL) a un volumen de 500  $\mu$ l/portaobjeto en medio completo (medio de pericitos (PM) ScienCell más suplementos ScienCell de suero bovino fetal, suplemento de cultivo de pericitos, y penicilina-estreptomicina). Los portaobjetos se incubaron a 37 °C y CO<sub>2</sub> al 5 % durante 1-2 días hasta que alcanzaron una confluencia de aproximadamente el 75 %. La unión de los anticuerpos contra PDGFR $\beta$ /VEGFA y el anticuerpo de control se hizo a 4 °C, de modo que todos los portaobjetos se colocaron en hielo y se lavan una vez con DMEM frío + BSA al 0,1 %. Los anticuerpos contra PDGFR $\beta$ /VEGFA y el anticuerpo de ensayo se diluyeron entonces a 1  $\mu$ g/ml en tampón de unión que consta de DMEM + BSA al 3 % y tampón HEPES. Cada portaobjetos está configurado de modo que están designados dos anticuerpos, un anticuerpo de control y un pocillo de control para el anticuerpo secundario solamente para cada portaobjetos de vidrio. Se añaden 500  $\mu$ l/pocillo de antagonistas, control, o medio solamente a cada portaobjetos. Después de una hora de incubación, se fija el portaobjetos T0 lavando con PBS frío una vez y añadiendo 1 ml/pocillo de solución de paraformaldehído. Este portaobjetos T0 mide la expresión del receptor sobre la superficie celular y los portaobjetos se incubaron a 37 °C para medir la internalización del receptor en el tiempo. Los portaobjetos restantes se pusieron en la incubadora a 37 °C y se retiraron y fijaron de un modo similar a los treinta minutos, noventa minutos, cuatro horas y seis horas como puntos temporales. Todos los portaobjetos se mantuvieron en hielo después de la fijación. Una vez que se fijaron todos los portaobjetos, se lavaron una vez con PBS y se permeabilizaron durante dos minutos con MetOH a -20 °C. Los portaobjetos se lavaron de nuevo con PBS frío. Desde este punto en adelante, la tinción se hizo a temperatura ambiente. Los portaobjetos se incubaron a temperatura ambiente durante cinco minutos en glicina 50 mM preparada en PBS. La glicina se retiró y se eliminó por lavado con PBS, y los portaobjetos se bloquearon con suero de cabra normal al 10 % en PBS (NºS-1000, Vector Labs, Inc. Burlingame, CA), 500 ul/pocillo durante treinta minutos. Después de la etapa de bloqueo, se añadieron 500 ul/pocillo de los anticuerpos secundarios a cada pocillo. Se diluyeron 1:150 el anticuerpo de cabra anti-ratón Alexafluor 488 (Nº Cat. A 11029, Molecular Probes, Eugene, OR), o anticuerpo de cabra anti-humano Alexafluor 488 (Nº Cat. A 11013, Molecular Probes, Eugene, OR) en tampón de lavado que constaba de PBS + Tween 20 al 0,1 % y BSA al 0,1 %. Los portaobjetos se incubaron en la oscuridad a temperatura ambiente durante cuarenta y cinco minutos. Cada portaobjetos se lavó tres veces impregnando en PBS durante 5 minutos a temperatura ambiente. Se añadió una gota de medio de montaje Vectashield con tinción DAPI a cada cámara (Nº Cat. H-1200, Vector Labs, Inc., Burlingame Calif.) y los portaobjetos se cubrieron y examinaron bajo el microscopio fluorescente. Se usó el software Metavue para visualizar el perfil de tinción de dos colores.

En algunos experimentos, se pre-incubaron los anticuerpos biespecíficos de PDGFR $\beta$ -VEGF-A con VEGF-A humano 5 nM antes de la adición a las células. La internalización se siguió como se describe a continuación.

##### Resultados

Los anticuerpos biespecíficos c1035/c1039 y c1035/c868 se internalizaron de forma eficaz como se observa por la tinción punteada dentro de las células después de incubación a 37 °C. La pre-incubación con VEGF-A no afectó a la internalización de estas moléculas biespecíficas.

#### 50 **Ejemplo 77: Ensayo de unión a FcRn para medir la unión de antagonistas de PDGFR $\beta$ /VEGF-A a FcRn a pH 6,0 y pH 7,4**

##### Sumario

55 FcRn (receptor neonatal) es un receptor clave que se une a la región Fc de IgG. Esta unión induce la internalización en las células y estas IgG entonces se "reciclan" en la circulación. Esta es la razón clave por la que las IgG tienen una larga semivida en suero. Se ensayó la capacidad de anticuerpos biespecíficos de PDGFR $\beta$ /VEGF-A de unirse a FcRn *in vitro* a pH 6,0 y liberarse a pH 7,4, como se observa en un entorno fisiológico.

## Materiales y procedimientos

Se prepararon dos placas con anticuerpos contra PDGFR $\beta$ /VEGFA y anticuerpos de control: una para lavado a pH 6,0 y una para lavado a pH 7,4. Día 1: se recubrieron dos placas elisa Nunc Maxisorp (n<sup>o</sup> cat. 44-2404) de 96 pocillos con 300 ng/pocillo de NeutrAvidina (Pierce Chemical Co. n<sup>o</sup> cat. 31000) preparada en NaHCO<sub>3</sub> 100 mM, pH 9,3. Las placas se incubaron a 4 °C durante una noche. Día 2: las placas se lavaron 5 veces con Tween-20 al 0,1 %/PBS (PBST). Las placas después se bloquearon con 25  $\mu$ l/pocillo de tampón de bloqueo que contenía NaCl al 0,8 %, KCl al 0,02 %, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> al 0,102 %, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> al 0,02 %, BSA al 1 %, polisorbato al 0,05 %, Proclin 300 al 0,05 % pH 7,2, durante una hora a temperatura ambiente. Las placas después se lavaron 2 veces con PBST. Cada pocillo después se recubrió con 150 ng de proteína FCRN de cadena sencilla (scFVRN) biotinilada (restos aminoácidos 21-409 de la SEC ID N<sup>o</sup> 644) diluida en PBST + BSA al 1 %. Las placas se incubaron a temperatura ambiente durante una hora. Los anticuerpos contra PDGFR $\beta$ /VEGFA y los anticuerpos de control (Herceptin, por ejemplo) se diluyeron en NaPO<sub>4</sub> 100 mM, Tween 20 al 0,05 % (v/v), + BSA al 0,1 % ajustado a pH 6,0 (tampón de pH 6,0) a concentraciones que varían de 150 nM a 0,07 nM. Las muestras se ensayaron por duplicado a un volumen de 50  $\mu$ l/pocillo de cada concentración. El tampón de pH 6,0 se procesó solamente como control para determinar los niveles de fondo en cada placa. Las placas se incubaron a temperatura ambiente durante dos horas. Después de la etapa de unión, cada placa se lavó en tampones diferentes: una placa se lavó con 250  $\mu$ l/pocillo de tampón de pH 6,0, y una placa se lavó con 250  $\mu$ l/pocillo de NaPO<sub>4</sub> 100 mM, Tween 20 al 0,05 % (v/v), BSA al 0,1 % ajustado a pH 7,4 (tampón de pH 7,4). Las placas se incubaron en tampones de lavado a temperatura ambiente durante un total de una hora con una etapa de lavado realizada cada veinte minutos. Después de las etapas de lavado, el anticuerpo unido se detectó con 100  $\mu$ l/pocillo de anticuerpo secundario de cabra específico anti-fragmento F(ab)<sub>2</sub> de IgG humana Fc gamma conjugado con HRP (Jackson ImmunoResearch N<sup>o</sup> cat. 109-036-098). El anticuerpo secundario se diluyó 1:5.000 en el tampón de pH 6,0, y la incubación se hizo durante una hora a temperatura ambiente. Las placas después se lavaron 5 veces con PBST. Finalmente, se añadieron 100  $\mu$ l de TMB (TMBW-1000-01, BioFX Laboratories) a cada pocillo, y las placas se revelaron a temperatura ambiente durante aproximadamente tres minutos. En este punto, se añadieron 100  $\mu$ l/pocillo de tampón de parada (STPR-100-01, BioFX Laboratories) para detener la reacción. Las placas se leyeron en un espectrofotómetro a una longitud de onda de 450/570 nm. Se examinaron los valores de DO para comparar los patrones de unión a pH 6,0 y los patrones de liberación a pH 7,4.

## Resultados

Todas las moléculas biespecíficas ensayadas (biscFv c1035/c1039, biscFv c1035/c868, biscFv c1035/c870, biAb c597/c1039, biAb c597/c868, biAb c597/c870, biAb c600/c1039, biAb c600/c870, biAb c600/c868) se unieron bien a FcRn a pH 6,0 y mostraron menos unión (liberación) a pH 7,4. Las curvas obtenidas fueron similares a las observadas con el anticuerpo anti-VEGF-A bevacizumab (Avastin®). Estos datos demuestran que las moléculas biespecíficas se unen a FcRn como se esperaba para proteínas que contienen IgG y se esperaba que tuvieran buenas semividas en suero.

### **Ejemplo 78: Inhibición de células de glioblastoma humano *in vivo* usando anticuerpo biespecífico anti-PDGFR $\beta$ /VEGF-A**

Para evaluar la actividad antitumoral de un anticuerpo biespecífico anti-PDGFR $\beta$ /VEGF-A contra células de glioblastoma humano *in vivo*, se inyectó a grupos de ratones desnudos BALB/c o C.B-17 SCID células de glioblastoma U118, U251 o U87-MG en el Día 0. Los grupos (n=10/grupo) de ratones que albergan tumor reciben 5-75  $\mu$ g de anticuerpo biespecífico humano anti-PDGFR $\beta$ /anti-VEGF-A por inyección i.p. o peritumoral en días alternos (EOD) desde los Días 5-33. El volumen del tumor se controla 3x/semana durante 6 semanas. La inhibición del crecimiento de tumor (volumen o peso) por el anticuerpo biespecífico anti-PDGFR $\beta$ /anti-VEGF-A sugiere que la proteína respectiva tiene efectos inhibidores sobre células de glioblastoma humano *in vivo*.

Diseño del estudio: A ratones BALB/c desnudos o C.B-17 SCID (Charles River Laboratories) hembra de ocho semanas de edad se les inyecta s.v. en el flanco derecho o por vía ortotópica en la pared craneal 6 x 10<sup>6</sup> células U118, U251 o U87-MG en el Día 0. A los grupos de ratones (n=10/grupo) se les inyecta i.p. o por vía peritumoral (para el modelo s.c. solamente) con 5  $\mu$ g-75  $\mu$ g de un anticuerpo humano biespecífico anti-PDGFR $\beta$ /anti-VEGF desde los días 5-33 o cuando los tumores alcanzan un volumen de 200 mm<sup>3</sup>. Las inyecciones se dan en un volumen total de 200  $\mu$ l. Para tumores s.c., el crecimiento del tumor se controla 3X/semana durante 6 semanas usando mediciones con calibre. El volumen del tumor se calcula usando la fórmula  $\frac{1}{2} \times (B)^2 \times L$  (mm<sup>3</sup>). Para tumores ortotópicos, se sacrifica a los ratones al final del estudio y se pesa el tumor para posibilitar la evaluación de la carga tumoral.

### **Ejemplo 79: El tratamiento profiláctico con anticuerpos biespecíficos para PDGFR $\beta$ /VEGF-A inhibe el crecimiento de células de rabdomiosarcoma A673 en ratones SCID**

## Sumario

Para ensayar si el antagonista biespecífico de PDGFR $\beta$ /VEGF-A tiene actividad sobre el crecimiento tumoral en ratones, se inyectó s.c. a grupos de ratones el tumor de rabdomiosarcoma A673 en el Día 0. Después se inyectó a los grupos de ratones (n=10/gp) 0,01 mg/kg a 10 mg/kg de reactivo de control, antagonista de VEGF-A, antagonista

de PDGFR $\beta$  o antagonista de PDGFR $\beta$ /VEGF-A 2X/semana durante 4 semanas, comenzando un día después de la inoculación del tumor. El volumen del tumor se controló 3X/semana durante 4 semanas. Tumores significativamente más pequeños en ratones inyectados con antagonista de VEGF-A, antagonista de PDGFR $\beta$ -VEGF-A, en comparación con ratones inyectados con reactivo de control, indicaban eficacia del antagonista para la inhibición del crecimiento tumoral. Como el brazo anti-PDGFR $\beta$  de cada antagonista de PDGFR $\beta$ /VEGF-A ensayado no reacciona de forma cruzada con PDGFR $\beta$  murino, este modelo solamente ensaya la eficacia dirigida a VEGF.

#### Diseño del estudio

A ratones C.B-17 SCID hembra de ocho a diez semanas de edad (Charles River Laboratories) se les inyectó s.c. en el flanco derecho con  $2 \times 10^6$  células A673 en el Día 0. Empezando en el Día 1, se inyectó i.p. a los grupos de ratones (n=10/grupo) concentraciones entre 0,01 mg/kg a 10 mg/kg de reactivo de control, antagonista de VEGF-A, antagonista de PDGFR $\beta$  o antagonista de PDGFR $\beta$ /VEGF-A 2X/semana durante 4 semanas. El crecimiento del tumor se controló 3X/semana durante 4 semanas usando mediciones con calibre. El volumen del tumor se calculó usando la fórmula  $\frac{1}{2} \times (B)^2 \times L$  (mm<sup>3</sup>). Al final del estudio (24 h después de la última dosis), se sacrificó a los animales y se pesaron los tumores y se sometieron a histología. Los tumores se fijaron en NBF y se después se ensayaron para la densidad de vasos sanguíneos por inmunohistoquímica usando el anticuerpo MECA-32 que es específico para células endoteliales de ratón.

#### Resultados

Como se muestra a continuación en las siguientes Tablas 49-51, anticuerpos biespecíficos a dosis variables inhibían significativamente el crecimiento tumoral en comparación con ratones tratados con vehículo. La eficacia observada con los anticuerpos biespecíficos fue comparable con la observada con bevacizumab (antagonista de VEGF).

**Tabla 49: Inhibición del crecimiento de células de rhabdomyosarcoma A673 en ratones SCID por tratamiento profiláctico con anticuerpos biespecíficos contra PDGFR $\beta$ /VEGF-A (Experimento 1)**

Grupo	Volumen del tumor (mm <sup>3</sup> )*	DESV TIP	valor-p†
Vehículo	1854,34	395,416	NA
anti-PDGFR $\beta$ humano	1481,55	667,331	ns
10 mg/kg bevacizumab	235,796	156,302	p<0,0001
1 mg/kg bevacizumab	317,491	140,164	p<0,0001
0,25 mg/kg bevacizumab	366,067	332,667	p<0,0001
10 mg/kg c597/c1039 biAb	105,488	47,4274	p<0,0001
1 mg/kg c597/c 1039 biAb	338,714	263,772	p<0,0001
0,25 mg/kg c597/c1039 biAb	541,033	222,8	p<0,0001
10 mg/kg c1035/c1039 biscFv	142,116	44,3071	p<0,0001
1 mg/kg c1035/c1039 biscFv	214,489	253,271	p<0,0001
0,25 mg/kg c1035/c1039 biscFv	709,549	410,836	p<0,001
*Volumen del tumor mostrado en la terminación (Día 25, 24 h después de la última dosis)			
†valor-p comparado con los controles de vehículo			



**Tabla 50: Inhibición del crecimiento de células de rabdomiosarcoma A673 en ratones SCID por tratamiento profiláctico con anticuerpos biespecíficos contra PDGFR $\beta$ /VEGF-A (Experimento 2)**

Grupo	Volumen del tumor (mm <sup>3</sup> )*	DESV TIP	valor-p†
Vehículo	1404,93	852,953	NA
10 mg/kg Bevacizumab	127,673	76,2626	p<0,0001
1 mg/kg Bevacizumab	136,778	112,317	p<0,0001
0,25 mg/kg Bevacizumab	260,484	233,558	p<0,0001
10mg/kg c600/c 1039 biAb	102,988	89,5476	P<0,0001
1 mg/kg c600/c1039 biAb	99,1523	98,8491	p<0,0001
0,25mg/kg c600/c1039 biAb	206,719	229,873	p<0,0001
10mg/kg c1039/c868 biscFv	165,217	78,6582	p<0,0001
1 mg/kg c1039/c868 biscFv	239,939	226,698	p<0,0001
0,25 c 1039/c868 biscFv	466,38	528,251	p<0,0001

\*Volumen del tumor mostrado en la terminación (Día 30, 24 h después de la última dosis)

†valor-p comparado con los controles de vehículo

**Tabla 51: Inhibición del crecimiento de células de rabdomiosarcoma A673 en ratones SCID por tratamiento profiláctico con anticuerpos biespecíficos contra PDGFR $\beta$ /VEGF-A (Experimento 3)**

Grupo	Volumen del tumor (mm <sup>3</sup> )		Peso del tumor (g)	
	Promedio	DESV TIP	Promedio	DESV TIP
Vehículo	1310	676	1,392	0,87
1 mg/kg bevacizumab	416	244	0,358	0,12
0,1 mg/kg bevacizumab	921	478	0,933	0,50
0,01 mg/kg bevacizumab	1237	777	1,523	0,89
1 mg/kg c1035/c868 biscFv	320	175	0,327	0,24
0,1 mg/kg c1035/c868 biscFv	893	752	0,942	0,96
0,01 mg/kg c1035/c868 biscFv	1462	713	1,645	0,73
1 mg/kg c1035/c1039 biscFv	311	140	0,226	0,08
0,1 mg/kg c1035/c1039 biscFv	505	431	0,496	0,40
0,01 mg/kg c1035/c1039 biscFv	1427	753	1,618	0,84

### Ejemplo 80: El tratamiento terapéutico con anticuerpos biespecíficos contra PDGFR $\beta$ /VEGF-A inhibe el crecimiento de células de rabdomiosarcoma A673 en ratones SCID

#### Sumario

- 5 Para ensayar si el antagonista biespecífico de PDGFR $\beta$ /VEGF-A tiene actividad sobre el crecimiento tumoral en ratones, se inyectó s.c. a grupos de ratones el tumor de rabdomiosarcoma A673 en el Día 0. Cuando los tumores alcanzaron un tamaño de 200 mm<sup>3</sup>, entonces se inyectó a los grupos de ratones (n=10/gp) 5 mg/kg de reactivo de control, antagonista de VEGF-A, o antagonista de PDGFR $\beta$ /VEGF-A 2X/semana para un total de 5 dosis. El volumen del tumor se controló 3X/semana. Tumores significativamente más pequeños en ratones inyectados con antagonista de VEGF-A, o antagonista de PDGFR $\beta$ /VEGF-A, en comparación con ratones inyectados con reactivo de control, indicaban eficacia del antagonista para la inhibición del crecimiento tumoral. Como el brazo anti-PDGFR $\beta$  de cada antagonista de PDGFR $\beta$ /VEGF-A no reacciona de forma cruzada con PDGFR $\beta$  murino, este modelo solamente ensaya la eficacia dirigida a VEGF.

#### Diseño del estudio

- 15 A ratones C.B-17 SCID hembra de ocho a diez semanas de edad (Charles River Laboratories) se les inyectó s.c. en el flanco derecho con  $2 \times 10^6$  células A673 en el Día 0. Cuando los tumores alcanzaron un tamaño de 200 mm<sup>3</sup>, se inyectó i.p. a los grupos de ratones (n=10/grupo) 5 mg/kg de reactivo de control, antagonista de VEGF-A, o antagonista de PDGFR $\beta$ /VEGF-A 2X/semana para 5 dosis. El crecimiento del tumor se controló 3X/semana usando mediciones con calibre. El volumen del tumor se calculó usando la fórmula  $\frac{1}{2} \times (B)^2 \times L$  (mm<sup>3</sup>). Al final del estudio (24 h después de la última dosis), se sacrificó a los ratones y se pesaron los tumores.

#### Resultados

Como se muestra en la siguiente Tabla 52, los anticuerpos biespecíficos inhibieron significativamente el crecimiento tumoral en comparación con ratones tratados con vehículo. La eficacia observada con los anticuerpos biespecíficos fue comparable con la observada con bevacizumab (antagonista de VEGF) a la misma dosis.

**Tabla 52: Inhibición del crecimiento de células de rabdomiosarcoma A673 en ratones SCID por tratamiento terapéutico con anticuerpos biespecíficos contra PDGFR $\beta$ /VEGF-A**

Grupo	Volumen (mm <sup>3</sup> )*	STDEV	valor-p†
Vehículo	1014	341,89	NA
5mg/kg bevacizumab	343	59,23	p<0,001
5mg/kg c1035/c868 biscFv	359	122,34	p<0,001
5mg/kg c1035/c1039 biscFv	292	133,73	p<0,001

\*El volumen se muestra 24h después de la 5ª dosis del tratamiento  
†valor-p comparado con los controles

### 25 Ejemplo 81: Ensayo Luminex para determinar la actividad neutralizante de anticuerpos biespecíficos contra PDGFR $\beta$ /VEGF-A contra la fosforilación de PDGFR $\beta$ inducida por ligandos PDGF

- Para explorar la actividad neutralizante de anticuerpos biespecíficos contra diversos ligandos PDGFR, se realizó un ensayo basado en Luminex después de estimulación con PDGF de células BHK transfectadas con PDGFR $\beta$  humano PDGFR $\beta$  (BHK 570 E10.2 B3, véanse los Ejemplos 20 y 21). El ensayo detecta la cantidad de PDGFR $\beta$  fosforilado que está presente en lisados celulares. Se sembraron células BHK 570 E10.2 B3 transfectadas con PDGFR $\beta$  humano en placas de fondo plano de 96 pocillos (Falcon, Colorado Springs, CO) a una densidad de 7.500 células por pocillo en un volumen de 100  $\mu$ l en medio completo a 37 °C en CO<sub>2</sub> al 5 %. El siguiente día, se retiró el medio de las células y se añadieron los moléculas biespecíficas diluidas en serie (BiscFv y BiAb) y anticuerpo monoclonal de control contra PDGFR $\beta$  (E9899) en medio de ensayo sin suero en un volumen de 50  $\mu$ l y se incubaron durante 60 minutos a 37 °C y CO<sub>2</sub> al 5 %. Se añadió PDGF-BB humano (0,2 nM, CE<sub>80</sub>, concentración eficaz al 80 %), PDGF-AB humano (3 nM, CE<sub>80</sub>, R & D systems), PDGF-CC humano (1 nM, CE<sub>80</sub>), o PDGF-DD humano (0,2 nM, DE<sub>80</sub>), a las células en un volumen de 50  $\mu$ l y se incubaron durante 10 minutos a 37 °C y CO<sub>2</sub> al 5 %.

- 40 Las células después se lavaron con tampón de lavado celular Bio-Plex, se lisaron con solución de lisis de acuerdo con las directrices del fabricante (BioRad, Hercules, CA), y se congelaron los sobrenadantes celulares a -20 °C. A los sobrenadantes celulares descongelados, se añadieron perlas fosfo-PDGFR $\beta$  1x y se incubaron a temperatura ambiente en un agitador durante 18 horas. Se añadieron anticuerpos de detección a las perlas lavadas y se incubaron a temperatura ambiente en un agitador durante 30 minutos, y después se incubó estreptavidina-PE con las perlas a temperatura ambiente durante 15 minutos. Las perlas se re-suspendieron en tampón de re-suspensión

Bio-Plex y se analizaron en un lector de serie Bio-Plex (Bio-Rad Laboratories).

#### Resultados

5 Los BiscFv y BiAb mostraron potente neutralización de la fosforilación de PDGFR inducida por diversos ligandos PDGF como se muestra por los bajos valores nM de  $CI_{50}$  en las siguientes tablas. Estos datos sugieren que los BiscFv y BiAb neutralizan la actividad mediada a través del homodímero PDGFR $\beta/\beta$  y también debido al heterodímero PDGFR $\alpha/\beta$  ya que estas células BHK expresan niveles residuales de PDGFR $\alpha$  bovino.

**Tabla 53: Neutralización de fosforilación de PDGFR $\beta$  inducida por ligando PDGF por BiscFv y BiAb ( $CI_{50}$ -nM)**

Moléculas	PDGF-AB	PDCF-BB	PDCF-CC	PDCF-DD
E9899	0,2	0,1	0,2	0,05
c1035/c1039	0,1	0,2	0,1	0,01
c1035/c868	0,2	0,3	0,2	0,003
c597/c 1039	0,1	0,2	0,2	0,007
c600/c1039	0,2	0,6	0,2	0,2

#### LISTADO DE SECUENCIAS

<110> SIVAKUMAR, Pallavur V. GILBERTSON, Debra G. SNAVELY, Marshall D. MABRY, George R. YI, Eugene C. YAO, Yue PRESNELL, Scott R.

<120> COMPOSICIONES Y PROCEDIMIENTOS PARA INHIBIR PDGFRB Y VEGF-A

<130> 08-02PC

<150> 61/144.547

<151> 14-01-2009

<150> 61.040.068

<151> 27-03-2008

<160> 650

<170> PatentIn versión 3.5

<210> 1

<211> 576

<212> ADN

<213> Homo sapiens

<400> 1

```

atgaactttc tgctgtcttg ggtgcattgg agcctgcct tgctgtctta cctccaccat      60
gccaaagtggc cccaggctgc acccatggca gaaggaggag ggcagaatca tcacgaagtg      120
gtgaagttca tggatgtcta tcagcgcagc tactgccatc caatcgagac cctggtggac      180
atcttccagg agtaccctga tgagatcgag tacatcttca agccatcctg tgtgcccctg      240
atgcgatgcg ggggctgctg caatgacgag ggctggagt gtgtgccac tgaggagtcc      300
aacatcacca tgcagattat gcggatcaaa cctcaccaag gccagcacat aggagagatg      360
agcttcctac agcacaacaa atgtgaatgc agaccaaaga aagatagagc aagacaagaa      420
aatocctgtg ggccttgctc agagcggaga aagcatttgt ttgtacaaga tccgcagacg      480
tgtaaattgtt cctgcaaaaa cacagactcg cgttgcaagg cgaggcagct tgagttaaac      540
gaacgtactt gcagatgtga caagccgagg cgggtga                                576

```

<210> 2  
 <211> 191  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens  
  
 <400> 2

```

Met Asn Phe Leu Leu Ser Trp Val His Trp Ser Leu Ala Leu Leu Leu
1              5              10              15

Tyr Leu His His Ala Lys Trp Ser Gln Ala Ala Pro Met Ala Glu Gly
              20              25              30

```

Gly Gly Gln Asn His His Glu Val Val Lys Phe Met Asp Val Tyr Gln  
35 40 45

Arg Ser Tyr Cys His Pro Ile Glu Thr Leu Val Asp Ile Phe Gln Glu  
50 55 60

Tyr Pro Asp Glu Ile Glu Tyr Ile Phe Lys Pro Ser Cys Val Pro Leu  
65 70 75 80

Met Arg Cys Gly Gly Cys Cys Asn Asp Glu Gly Leu Glu Cys Val Pro  
85 90 95

Thr Glu Glu Ser Asn Ile Thr Met Gln Ile Met Arg Ile Lys Pro His  
100 105 110

Gln Gly Gln His Ile Gly Glu Met Ser Phe Leu Gln His Asn Lys Cys  
115 120 125

Glu Cys Arg Pro Lys Lys Asp Arg Ala Arg Gln Glu Asn Pro Cys Gly  
130 135 140

Pro Cys Ser Glu Arg Arg Lys His Leu Phe Val Gln Asp Pro Gln Thr  
145 150 155 160

Cys Lys Cys Ser Cys Lys Asn Thr Asp Ser Arg Cys Lys Ala Arg Gln  
165 170 175

Leu Glu Leu Asn Glu Arg Thr Cys Arg Cys Asp Lys Pro Arg Arg  
180 185 190

<210> 3  
<211> 3321  
<212> ADN  
<213> Homo sapiens

<400> 3

atgogggttc cgggtgcgat gccagctctg gccctcaaag gcgagctgct gttgctgtct 60

ctcctgttac ttctggaacc acagatctct cagggcctgg tcgtcacacc ccgggggcca 120

gagcttgctc tcaatgtctc cagcaccttc gttctgacct gctcgggttc agctccggtg 180

gtgtgggaac ggatgtccca ggagcccca caggaaatgg ccaaggcca ggatggcacc 240

ttctccagcg tgctcacact gaccaacctc actgggctag acacgggaga atacttttgc 300

accacaaatg actcccggtg actggagacc gatgagcgga aacggctcta catctttgtg 360

ccagatccca ccgtgggctt cctccctaact gatgccgagg aactattcat ctttctcagc 420

gaaataactg agatcaccat tccatgccga gtaacagacc cacagctggt ggtgacactg 480

cacgagaaga aaggggacgt tgcactgcct gtcccctatg atcaccaacg tggcttttct 540

ggtatctttg aggcacagaag ctacatctgc aaaaccacca ttggggacag ggaggtggat	600
tctgatgcct actatgtcta cagactccag gtgtcatcca tcaacgtctc tgtgaacgca	660
gtgcagactg tgggccgcca ggggtgagaac atcacccctca tgtgcattgt gatcgggaat	720
gaggtgggtca acttcgagtg gacatacccc cgcaaagaaa gtggggggct ggtggagccg	780
gtgactgact tctcttggga tatgccttac cacatccgct ccatcctgca catccccagt	840
gocgagttag aagactcggg gacctacacc tgcaatgtga cggagagtggt gaatgaccat	900
caggatgaaa aggccatcaa catcacctgt gttgagagcg gctacgtgcg gctcctggga	960
gaggtgggca cactacaatt tgctgagctg catcggagcc ggacactgca ggtagtgttc	1020
gaggcctacc caccgcccac tgtcctgtgg ttcaaagaca accgcacctt gggcgactcc	1080
agcgctggcg aaatcgccct gtccacgcgc aacgtgtcgg agaccggta tgtgtcagag	1140
ctgacactgg ttccggtgaa ggtggcagag gctggccact acaccatgcg ggccttccat	1200
gaggatgctg aggtccagct ctccctccag ctacagatca atgtccctgt ccgagtgtg	1260
gagctaagtg agagccaccc tgacagtggg gaacagacag tccgctgtcg tggccggggc	1320
atgccccagc cgaacatcat ctggtctgac tgcagagacc tcaaaagggtg tccacgtgag	1380
ctgccgcccc cgtctctggg gaacagttcc gaagaggaga gccagctgga gactaacgtg	1440
acgtactggg agggaggagca ggagtttgag gtggtgagca cactgctct gcagcacgtg	1500
gatcggccac tgtcgggtcg ctgcacgctg cgcaacgctg tgggccagga cacgcaggag	1560
gtcatcgtgg tgccacactc cttgcccttt aagggtggtg tgatctcagc catcctggcc	1620
ctggtggtgc tcaccatcat ctcccttacc atcctcatca tgctttggca gaagaagcca	1680
cgttacgaga tccgatggaa ggtgattgag tctgtgagct ctgacggcca tgagtacatc	1740
taegtggacc ccatgcagct gccctatgac tccacgtggg agctgccgcg ggaccagctt	1800
gtgctgggac gcaccctcgg ctctggggcc tttgggcagg tgggtggagc cacggctcat	1860
ggcctgagcc attctcagga cacgatgaaa gtggccgtca agatgcttaa atccacagcc	1920
cgcagcagtg agaagcaagc ccttatgtcg gagctgaaga tcatgagtca ccttgggccc	1980
cacctgaacg tggtaacct gttgggggcc tgcaccaaag gaggacctat ctatatcatc	2040
actgagtact gccgctacgg agaactggtg gactacctgc accgcaacaa acacaccttc	2100
ctgcagcacc actccgacaa gcgccgccc cccagcgcg agctctacag caatgctctg	2160
cccgttgggc tccccctgcc cagccatgtg tccttgaccg gggagagcga cgggtggctac	2220
atggacatga gcaaggacga gtcggtggac tatgtgcca tgctggacat gaaaggagac	2280
gtcaaatatg cagacatcga gtccctcaac tacatggccc cttacgataa ctacgttccc	2340
tctgcccttg agaggacct ccgagcaact ttgatcaacg agtctccagt gctaagctac	2400
atggacctcg tgggcttcag ctaccaggtg gccaatggca tggagtttct ggctccaag	2460
aactgcgtcc acagagacct ggcggctagg aacgtgtcga tctgtgaagg caagctggtc	2520

aagatctgtg actttggcct ggctcgagac atcatgcggg actcgaatta catctccaaa 2580  
 ggcagcacct ttttgccttt aaagtggatg gctccggaga gcattctcaa cagcctctac 2640  
 accaccctga ggcacgtgtg gtccttcggg atcctgctct gggagatctt caccttgggt 2700  
 ggcacccctt acccagagct gcccatgaac gagcagttct acaatgccat caaacggggt 2760  
 taaccgatgg ccagcctgc ccattgctcc gacgagatct atgagatcat gcagaagtgc 2820  
 tgggaagaga agtttgagat tcggccccc ttctcccagc tgggtgctgct tctcgagaga 2880  
 ctgttgggcg aaggttacia aaagaagtac cagcaggtgg atgaggagtt tctgaggagt 2940  
 gaccaccag ccattcttcg gtcccaggcc cgcttgctg ggttccatgg cctccgatct 3000  
 cccctggaca ccagctcctt cctctatact gccgtgcagc ccaatgaggg tgacaacgac 3060  
 tatatcatcc cctgcctga ccccaaacc gaggttgctg acgagggccc actggaggggt 3120  
 tccccagcc tagccagctc caccctgaat gaagtcaaca cctcctcaac catctcctgt 3180  
 gacagccccc tggagcccca ggacgaacca gagccagagc ccagccttga gctccaggtg 3240  
 gagccggagc cagagctgga acagttgccg gattcggggg gccctgcgcc tcggggggaa 3300  
 gcagaggata gcttcctgta g 3321

<210> 4  
 <211> 1106  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens  
 <400> 4

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

Arg Lys Arg Leu Tyr Ile Phe Val Pro Asp Pro Thr Val Gly Phe Leu  
 115 120 125

Pro Asn Asp Ala Glu Glu Leu Phe Ile Phe Leu Thr Glu Ile Thr Glu  
 130 135 140

Ile Thr Ile Pro Cys Arg Val Thr Asp Pro Gln Leu Val Val Thr Leu  
 145 150 155 160

His Glu Lys Lys Gly Asp Val Ala Leu Pro Val Pro Tyr Asp His Gln  
 165 170 175

Arg Gly Phe Ser Gly Ile Phe Glu Asp Arg Ser Tyr Ile Cys Lys Thr  
 180 185 190

Thr Ile Gly Asp Arg Glu Val Asp Ser Asp Ala Tyr Tyr Val Tyr Arg  
 195 200 205

Leu Gln Val Ser Ser Ile Asn Val Ser Val Asn Ala Val Gln Thr Val  
 210 215 220

Val Arg Gln Gly Glu Asn Ile Thr Leu Met Cys Ile Val Ile Gly Asn  
 225 230 235 240

Glu Val Val Asn Phe Glu Trp Thr Tyr Pro Arg Lys Glu Ser Gly Arg  
 245 250 255

Leu Val Glu Pro Val Thr Asp Phe Leu Leu Asp Met Pro Tyr His Ile  
 260 265 270

Arg Ser Ile Leu His Ile Pro Ser Ala Glu Leu Glu Asp Ser Gly Thr  
 275 280 285

Tyr Thr Cys Asn Val Thr Glu Ser Val Asn Asp His Gln Asp Glu Lys  
 290 295 300

Ala Ile Asn Ile Thr Val Val Glu Ser Gly Tyr Val Arg Leu Leu Gly  
 305 310 315 320

Glu Val Gly Thr Leu Gln Phe Ala Glu Leu His Arg Ser Arg Thr Leu  
 325 330 335

Gln Val Val Phe Glu Ala Tyr Pro Pro Pro Thr Val Leu Trp Phe Lys  
 340 345 350

Asp Asn Arg Thr Leu Gly Asp Ser Ser Ala Gly Glu Ile Ala Leu Ser  
 355 360 365

Thr Arg Asn Val Ser Glu Thr Arg Tyr Val Ser Glu Leu Thr Leu Val



370		375		380
Arg Val Lys Val Ala Glu Ala Gly His Tyr Thr Met Arg Ala Phe His				
385		390		395 400
Glu Asp Ala Glu Val Gln Leu Ser Phe Gln Leu Gln Ile Asn Val Pro				
	405		410	415
Val Arg Val Leu Glu Leu Ser Glu Ser His Pro Asp Ser Gly Glu Gln				
	420		425	430
Thr Val Arg Cys Arg Gly Arg Gly Met Pro Gln Pro Asn Ile Ile Trp				
	435		440	445
Ser Ala Cys Arg Asp Leu Lys Arg Cys Pro Arg Glu Leu Pro Pro Thr				
	450		455	460
Leu Leu Gly Asn Ser Ser Glu Glu Glu Ser Gln Leu Glu Thr Asn Val				
	465		470	475 480
Thr Tyr Trp Glu Glu Glu Gln Glu Phe Glu Val Val Ser Thr Leu Arg				
	485		490	495
Leu Gln His Val Asp Arg Pro Leu Ser Val Arg Cys Thr Leu Arg Asn				
	500		505	510
Ala Val Gly Gln Asp Thr Gln Glu Val Ile Val Val Pro His Ser Leu				
	515		520	525
Pro Phe Lys Val Val Val Ile Ser Ala Ile Leu Ala Leu Val Val Leu				
	530		535	540
Thr Ile Ile Ser Leu Ile Ile Leu Ile Met Leu Trp Gln Lys Lys Pro				
	545		550	555 560
Arg Tyr Glu Ile Arg Trp Lys Val Ile Glu Ser Val Ser Ser Asp Gly				
	565		570	575
His Glu Tyr Ile Tyr Val Asp Pro Met Gln Leu Pro Tyr Asp Ser Thr				
	580		585	590
Trp Glu Leu Pro Arg Asp Gln Leu Val Leu Gly Arg Thr Leu Gly Ser				
	595		600	605
Gly Ala Phe Gly Gln Val Val Glu Ala Thr Ala His Gly Leu Ser His				
	610		615	620
Ser Gln Ala Thr Met Lys Val Ala Val Lys Met Leu Lys Ser Thr Ala				
	625		630	635 640

Arg Ser Ser Glu Lys Gln Ala Leu Met Ser Glu Leu Lys Ile Met Ser  
 645 650 655  
 His Leu Gly Pro His Leu Asn Val Val Asn Leu Leu Gly Ala Cys Thr  
 660 665 670  
 Lys Gly Gly Pro Ile Tyr Ile Ile Thr Glu Tyr Cys Arg Tyr Gly Asp  
 675 680 685  
 Leu Val Asp Tyr Leu His Arg Asn Lys His Thr Phe Leu Gln His His  
 690 695 700  
 Ser Asp Lys Arg Arg Pro Pro Ser Ala Glu Leu Tyr Ser Asn Ala Leu  
 705 710 715 720  
 Pro Val Gly Leu Pro Leu Pro Ser His Val Ser Leu Thr Gly Glu Ser  
 725 730 735  
 Asp Gly Gly Tyr Met Asp Met Ser Lys Asp Glu Ser Val Asp Tyr Val  
 740 745 750  
 Pro Met Leu Asp Met Lys Gly Asp Val Lys Tyr Ala Asp Ile Glu Ser  
 755 760 765  
 Ser Asn Tyr Met Ala Pro Tyr Asp Asn Tyr Val Pro Ser Ala Pro Glu  
 770 775 780  
 Arg Thr Cys Arg Ala Thr Leu Ile Asn Glu Ser Pro Val Leu Ser Tyr  
 785 790 795 800  
 Met Asp Leu Val Gly Phe Ser Tyr Gln Val Ala Asn Gly Met Glu Phe  
 805 810 815  
 Leu Ala Ser Lys Asn Cys Val His Arg Asp Leu Ala Ala Arg Asn Val  
 820 825 830  
 Leu Ile Cys Glu Gly Lys Leu Val Lys Ile Cys Asp Phe Gly Leu Ala  
 835 840 845  
 Arg Asp Ile Met Arg Asp Ser Asn Tyr Ile Ser Lys Gly Ser Thr Phe  
 850 855 860  
 Leu Pro Leu Lys Trp Met Ala Pro Glu Ser Ile Phe Asn Ser Leu Tyr  
 865 870 875 880  
 Thr Thr Leu Ser Asp Val Trp Ser Phe Gly Ile Leu Leu Trp Glu Ile  
 885 890 895

Phe Thr Leu Gly Gly Thr Pro Tyr Pro Glu Leu Pro Met Asn Glu Gln  
 900 905 910  
 Phe Tyr Asn Ala Ile Lys Arg Gly Tyr Arg Met Ala Gln Pro Ala His  
 915 920 925  
 Ala Ser Asp Glu Ile Tyr Glu Ile Met Gln Lys Cys Trp Glu Glu Lys  
 930 935 940  
 Phe Glu Ile Arg Pro Pro Phe Ser Gln Leu Val Leu Leu Leu Glu Arg  
 945 950 955 960  
 Leu Leu Gly Glu Gly Tyr Lys Lys Lys Tyr Gln Gln Val Asp Glu Glu  
 965 970 975  
 Phe Leu Arg Ser Asp His Pro Ala Ile Leu Arg Ser Gln Ala Arg Leu  
 980 985 990  
 Pro Gly Phe His Gly Leu Arg Ser Pro Leu Asp Thr Ser Ser Val Leu  
 995 1000 1005  
 Tyr Thr Ala Val Gln Pro Asn Glu Gly Asp Asn Asp Tyr Ile Ile  
 1010 1015 1020  
 Pro Leu Pro Asp Pro Lys Pro Glu Val Ala Asp Glu Gly Pro Leu  
 1025 1030 1035  
 Glu Gly Ser Pro Ser Leu Ala Ser Ser Thr Leu Asn Glu Val Asn  
 1040 1045 1050  
 Thr Ser Ser Thr Ile Ser Cys Asp Ser Pro Leu Glu Pro Gln Asp  
 1055 1060 1065  
 Glu Pro Glu Pro Glu Pro Gln Leu Glu Leu Gln Val Glu Pro Glu  
 1070 1075 1080  
 Pro Glu Leu Glu Gln Leu Pro Asp Ser Gly Cys Pro Ala Pro Arg  
 1085 1090 1095  
 Ala Glu Ala Glu Asp Ser Phe Leu  
 1100 1105

<210> 5  
 <211> 340  
 <212> ADN  
 <213> Homo sapiens  
 <400> 5

gacatccaga tgacccagtc tccagactcc ctggctgtgt ctctgggcga gagggccacc 60  
atcaactgca agtccagcca gagtgtttta tacagctcca acaataagaa ctacttagct 120  
tggtaccagc agaaaccagg acagcctcct aagctgctca tttactgggc atctaccgg 180  
gaatccgggg tccctgaccg attcagtggc agcgggtctg ggacagattt cactctcacc 240  
atcagcagcc tgcaggctga agatgtggca gtttattact gtcagcaata ttatagtact 300  
ccgtacactt ttggccaggg gaccaagctg gagatcaaac 340

<210> 6  
<211> 113  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens  
<400> 6

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

Lys

<210> 7  
<211> 364  
<212> ADN  
<213> Homo sapiens  
<400> 7

```

gaagttcaat tgtagagtc tggtagcggt cttgttcagc ctggtggttc ttacgtctt      60
tcttgcgctg ctccggatt cactttctct aagtacaaga tgctttgggt tcgccaagct      120
cctggtaaag gtttgagtg ggtttctctt atctatcctt ctggtggcgt tactttttat      180
gctgactccg ttaaaggctg cttcactatc tctagagaca actctaagaa tactctctac      240
ttgcagatga acagcttaag ggctgaggac acggccgtgt attactgtgc aagagatggg      300

gagatgattt cgggtagttt ctttgactcc tggggccagg gaaccctggt caccgtctca      360
agcg                                                                364

```

<210> 8  
 <211> 121  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens  
  
 <400> 8

```

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

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

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

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

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
          65           70           75           80

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

Ala Arg Asp Gly Glu Met Ile Ser Gly Ser Phe Phe Asp Ser Trp Gly
          100          105          110

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
          115          120

```

<210> 9  
 <211> 340  
 <212> ADN  
 <213> Homo sapiens  
  
 <400> 9

gacatccaga tgacccagtc tccagactcc ctggctgtgt ctctgggcga gagggccacc 60  
atcaactgca agtccagcca gagtgtttta tacagctcca acaataagaa ctacttagct 120  
tggtaccagc agaaaccagg acagcctcct aagctgctca tttactgggc atctaccgg 180  
gaatccgggg tccctgaccg attcagtggc agcgggtctg ggacagattt cactctcacc 240  
atcagcagcc tgcaggctga agatgtggca gtttattact gtcagcaata ttatagtact 300  
ccgtacactt ttggccaggg gaccaagctg gagatcaaac 340

<210> 10  
<211> 113  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens  
<400> 10

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

Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Lys Ser Ser Gln Ser Val Leu Tyr Ser  
20 25 30

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

Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val  
50 55 60

Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr  
65 70 75 80

Ile Ser Ser Leu Gln Ala Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln  
85 90 95

Tyr Tyr Ser Thr Pro Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile  
100 105 110

Lys

<210> 11  
<211> 364  
<212> ADN  
<213> Homo sapiens  
<400> 11

```

gaagttcaat tgtagagtc tggtagcgt cttgttcagc ctggtggttc tttacgtctt      60
tcttgcgctg cttccggatt cactttctct cagtacatga tgctttgggt tcgccaagct      120
cctggtaaag gtttgagtg ggtttctggt atctctcctt ctggtggcat tactacttat      180
gctgactccg ttaaaggctg cttcactatc tctagagaca actctaagaa tactctctac      240
ttgcagatga acagcttaag ggctgaggac acggccgtgt attactgtgc gagagcttat      300
agcagtggct ggtccttacc ctttgactac tggggccagg gaaccctggt caccgtctca      360
agcg                                                                    364

```

<210> 12  
 <211> 121  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens  
  
 <400> 12

```

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

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

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

Ser Gly Ile Ser Pro Ser Gly Gly Ile Thr Thr Tyr Ala Asp Ser Val
    50              55              60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
    65              70              75              80

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

Ala Arg Ala Tyr Ser Ser Gly Trp Ser Leu Pro Phe Asp Tyr Trp Gly
                100              105              110

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
    115              120

```

<210> 13  
 <211> 340  
 <212> ADN  
 <213> Homo sapiens  
  
 <400> 13

```

gacatccaga tgaccagtc tccagactcc ctggctgtgt ctctggggga gagggtcacc      60
atcaactgca agtccagcca gagtgtttta tacagctcca acaataagaa ctacttagct      120
tggtaccagc agaaaccagg acagcctcct aagctactca tttactgggc atctaccogg      180
gaatccgggg tccctgcccg attcagtggc agcgggtctg ggacagattt cactctcacc      240
atcagcagcc tgcaggctga agatgtggca gtttattact gtcagcaata ttatagtact      300
ccgttcactt ttggccaggg gaccaagctg gagatcatgc      340

```

<210> 14  
 <211> 113  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens  
  
 <400> 14

```

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

Glu Arg Val Thr Ile Asn Cys Lys Ser Ser Gln Ser Val Leu Tyr Ser
          20           25           30

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

Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val
          50           55           60

Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr
65           70           75           80

Ile Ser Ser Leu Gln Ala Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln
          85           90           95

Tyr Tyr Ser Thr Pro Phe Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile
          100          105          110

```

**Met**

<210> 15  
 <211> 364  
 <212> ADN  
 <213> Homo sapiens  
  
 <400> 15



```

gaagttcaat tgtagagtc tggtagcgt cttgttcagc ctggtggtc tttacgtctt      60
tcttgogctg cttccggatt cactttctct cagtacatga tgctttgggt tcgccaagct    120
cctggtaaag gtttgagtg ggtttctggt atctctcctt ctggtggcat tactacttat     180
gctgactccg ttaaaggctg cttcactatc tctagagaca actctaagaa tactctctac     240
ttgcagatga acagcttaag ggctgaggac acggccgtgt attactgtgc gagagcttat     300
agcagtggct ggtccttacc ctttgactac tggggccagg gaaccctggt caccgtctca     360
agcg                                                                    364

```

<210> 16  
 <211> 121  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens  
 <400> 16

```

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

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

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

Ser Gly Ile Ser Pro Ser Gly Gly Ile Thr Thr Tyr Ala Asp Ser Val
          50              55              60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65              70              75              80

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

Ala Arg Ala Tyr Ser Ser Gly Trp Ser Leu Pro Phe Asp Tyr Trp Gly
          100              105              110

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115              120

```

<210> 17  
 <211> 322  
 <212> ADN  
 <213> Homo sapiens  
 <400> 17

gacatccaga tgacccagtc tccactctcc ctgtctgcat ctgtgggaga cagagtcacc 60  
 atcacttgcc gggcaagtca gagtgttggc agttatttaa attggtatca gcagaaacca 120  
 gggaaagccc ctaagctcct gatttttgct gcatacagtt tgcaaactgg ggtcccatca 180  
 aggttcagtg gcagtggatc tgagacagaa ttctctctca caatcagcgg cctgcagcct 240  
 gaagattttg caacttatta ctgtcaacag ctttaatttt accctttcac tttcggcct 300  
 gggaccacag tggatatcaa ac 322

<210> 18  
 <211> 107  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens  
 <400> 18

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

<210> 19  
 <211> 379  
 <212> ADN  
 <213> Homo sapiens  
 <400> 19

gaagttcaat tgtagagtc tggtagcgt cttgttcagc ctggtggttc tttacgtctt 60  
tcttgcgctg cttccggatt cactttctct aattaccata tgttttgggt tgcgcaagct 120  
cctggtaaaag gtttggagtg ggtttctgtt atctctcctt ctggtggctc tactggttat 180  
gctgactccg ttaaaggctg cttcactatc tctagagaca actctaagaa tactctctac 240  
ttgcagatga acagcttaag ggctgaggac accgccatgt attactgtgc gagatttgac 300  
ggtgattacc tttgggacga ttatcgccat gatgcttttg atatctgggg ccaagggaca 360  
atggtcaccg tctcaagcg 379

<210> 20  
<211> 126  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens  
<400> 20

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

<210> 21  
<211> 340  
<212> ADN  
<213> Homo sapiens  
<400> 21

```

gccatccagt tgaccagtc tccagactcc ctggctgtgt ctctgggcca gagggccacc      60
atcaactgca agtccagcca gagtgtttta tacagctcca acaataagaa ctacttagct      120
tggtaccagc agaaaccagg acagcctcct aagctgctca tttaccgggc atctaccgg      180
gaatccgggg tccctgaccg attcagtggc agcgggtctg ggacagattt cactctcacc      240
atcagcagcc tgcaggctga agatgtggca gtttattact gtcagcaata ttatagtacc      300
ccgtggacgt tcggccaagg gaccaaggtg gaaatcaaac      340

```

<210> 22  
 <211> 113  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens  
  
 <400> 22

```

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

Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Lys Ser Ser Gln Ser Val Leu Tyr Ser
          20           25           30

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

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

Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr
65           70           75           80

Ile Ser Ser Leu Gln Ala Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln
          85           90           95

Tyr Tyr Ser Thr Pro Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile
          100          105          110

```

Lys

<210> 23  
 <211> 367  
 <212> ADN  
 <213> Homo sapiens  
  
 <400> 23

```

gaagttcaat tgtagagtc tggtagcggt cttgttcagc ctggtggttc ttacgtctt      60
tcttgccgtg cttccggatt cactttctct aagtacaaga tgcagtgggt tcgccaagct    120
cctggtaaag gtttgagtg ggtttctctt atctctcctt ctggtggcct tactttttat    180
gctgactccg ttaaaggctg cttcactatc tctagagaca actctaagaa tactctctac    240
ttgcagatga acagcttaag ggctgaggac acggccgtgt attactgtgc gaaagcccgt    300
cggatgagaa gcctatggga ggcttttgat atctggggcc aagggacaat ggtcaccgtc    360
tcaagcg

```

<210> 24  
 <211> 122  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

<400> 24

```

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

```

```

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

```

```

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

```

```

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

```

```

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65           70           75           80

```

```

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

```

```

Ala Lys Ala Arg Arg Met Arg Ser Leu Trp Glu Ala Phe Asp Ile Trp
100          105          110

```

```

Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser
115          120

```

<210> 25  
 <211> 340  
 <212> ADN  
 <213> Homo sapiens

<400> 25

```

gccatccagt tgacccagtc tccggactcc ctggtgtgtgt ctctgggcga gagggccacc      60

atcaactgta agtccagcca gagtgtttta tacagctcca acaataagaa ctacttagct      120

tggtaccagc agaaaccagg acagcctcct aagctgctca tttactgggc atctaccgg      180

gaatccgggg tccctgaccg attcagtggc agcgggtctg ggacagattt cactctcacc      240

atcagcagcc tgcaggctga agatgtggca gtttattact gtcagcaata ttatagtact      300

ccgtacactt ttggccaggg gaccaaggtg gagatcaaac      340

```

<210> 26  
 <211> 113  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens  
  
 <400> 26

```

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

Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Lys Ser Ser Gln Ser Val Leu Tyr Ser
          20           25           30

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

Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val
          50           55           60

Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr
65           70           75           80

Ile Ser Ser Leu Gln Ala Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln
          85           90           95

Tyr Tyr Ser Thr Pro Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile
          100          105          110

```

**Lys**

<210> 27  
 <211> 364  
 <212> ADN  
 <213> Homo sapiens  
  
 <400> 27

```

gaagttcaat tgtagagtc tggtagcggc cttgttcagc ctggtggttc tttacgtctt      60
tcttgcgctg cttccggatt cactttctct aagtacaaga tgctttgggt tcgccaagct      120
cctggtaaag gtttgagtg ggtttcttct atctatcctt ctggtggcgt tactttttat      180
gctgactccg ttaaaggctg cttcactatc tctagagaca actctaagaa tactctctac      240

ttgcagatga acagcttaag ggtgaggac acggccgtgt attactgtgc aagagatggg      300
gagatgattt cgggtagttt ctttgactcc tggggccagg ggaccctggt caccgtctca      360
agcg                                                                364

```

<210> 28  
 <211> 121  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

<400> 28

```

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

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

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

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

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65              70              75              80

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

Ala Arg Asp Gly Glu Met Ile Ser Gly Ser Phe Phe Asp Ser Trp Gly
          100             105             110

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
          115             120

```

<210> 29  
 <211> 340  
 <212> ADN  
 <213> Homo sapiens

<400> 29

```

gccatccgga tgaccagtc tccagactcc ctggtgtgt ctctgggcga gagggccacc      60
atcaactgca agtccagcca gagtgtttta tacagctcca acaataagaa ctacttagct      120
tggtaccagc agaaaccagg acagcctcct aagctgctca tttactgggc atctaccgg      180
gaatccgggg tccctgaccg attcagtggc agcgggtotg ggacagattt cactctcacc      240
atcagcagcc tgcaggctga agatgtggca gtttattact gtcagcaata ttatagtact      300
ccgtacactt ttggccaggg gaccaagctg gagatcaaac      340

```

<210> 30  
 <211> 113  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens  
  
 <400> 30

```

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

Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Lys Ser Ser Gln Ser Val Leu Tyr Ser
          20           25           30

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

Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val
          50           55           60

Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr
          65           70           75           80

Ile Ser Ser Leu Gln Ala Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln
          85           90           95

Tyr Tyr Ser Thr Pro Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile
          100          105          110

```

**Lys**

<210> 31  
 <211> 364  
 <212> ADN  
 <213> Homo sapiens  
  
 <400> 31



```

gaagttcaat tgtagagtc tggtagcgt cttgttcagc ctggtggttc tttacgtctt      60
tcttgcgctg cttccggatt cactttctct aagtacaaga tgctttgggt tcgccaagct      120
cctggtaaag gtttgagtg ggtttctctt atctatcctt ctggtggttc tactttttat      180
gctgactccg ttaaaggtag cttcactatc tctagagaca actctaagaa tactctctac      240
ttgcagatga acagcttaag ggctgaggac acggccgtgt attactgtgc aagagatggg      300
gagatgattt cgggtagttt ctttgactcc tggggccagg ggaccctggt caccgtctca      360
agcg                                                                    364

```

<210> 32  
 <211> 121  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

<400> 32

```

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

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

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

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

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65          70          75          80

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

Ala Arg Asp Gly Glu Met Ile Ser Gly Ser Phe Phe Asp Ser Trp Gly
100         105         110

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115          120

```

<210> 33  
 <211> 340  
 <212> ADN  
 <213> Homo sapiens

<400> 33

```

gccatccaga tgacccagtc tccagactcc ctggctgtgt ctctgggcca gagggccacc      60
atcaactgca agtccagcca gagtgtttta tacagctcca acaataagaa ctacttagct      120
tggtaccagc agaaaccagg acagcctcct aagctgctca tttactgggc atctaccggg      180
gaatccgggg tccctgaccg attcagtggc agcgggtctg ggacagaytt cactctcacc      240
atcagcagcc tgcaggctga agatgtggca gtttattact gtcagcaata ttatagtacy      300
ccgtggacgt tcggccaagg gaccaagggtg gaaatcaarc      340

```

<210> 34  
 <211> 113  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

<400> 34

```

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

Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Lys Ser Ser Gln Ser Val Leu Tyr Ser

                20                25                30

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

Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val
          50                55                60

Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr
65                70                75                80

Ile Ser Ser Leu Gln Ala Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln
          85                90                95

Tyr Tyr Ser Thr Pro Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile
          100               105               110

```

Lys

<210> 35  
 <211> 364  
 <212> ADN  
 <213> Homo sapiens

<400> 35

```

gaagttcaat tgtagagtc tggtaggggt cttgttcagc ctggtaggtc tttacgtctt      60
tcttgogctg cttccggatt cactttctct cgttacgtta tgacttgggt tcgccaagct      120
cctggtaaag gtttgagtg ggtttctctt atctggcctt ctggtagcat gactgtttat      180
gctgactcog ttaaaggctg cttcactatc tctagagaca actctaagaa tactctctac      240
ttgcagatga acagcttaag ggctgaggac acggccgtgt attactgtgc gagagatcgt      300
cctaccggga aaacgggata cttccagcac tggggccagg gcaccctggt cactgtctca      360
agcg                                                                    364

```

<210> 36  
 <211> 121  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens  
 <400> 36

```

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

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

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

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

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65          70          75          80

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

Ala Arg Asp Arg Pro Thr Gly Lys Thr Gly Tyr Phe Gln His Trp Gly
100         105         110

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115          120

```

<210> 37  
 <211> 340  
 <212> ADN  
 <213> Homo sapiens  
 <400> 37

```

gccatccaga tgaccagtc tccagactcc ctggctgtgt ctctgggcca gagggccacc      60
atcaactgca agtccagcca gagtgtttta tacagctcca acaataagaa ctacttagct      120
tggtaccagc agaaaccagg acagcctcct aagctgctca tttactgggc atctaccgg      180
gaatccgggg tcctgaccg attcagtggc agcgggtctg ggacagattt cactctcacc      240
atcagcagcc tgcaggctga agatgtggca gtttattact gtcagcaata ttatagtact      300
ccgtacactt ttggccaggg gaccaagctg gagatcaaac      340

```

<210> 38  
 <211> 113  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens  
 <400> 38

```

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

Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Lys Ser Ser Gln Ser Val Leu Tyr Ser
                20           25           30

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

Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val
          50           55           60

Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr

65           70           75           80

Ile Ser Ser Leu Gln Ala Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln
          85           90           95

Tyr Tyr Ser Thr Pro Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile
          100          105          110

```

**Lys**

<210> 39  
 <211> 364  
 <212> ADN  
 <213> Homo sapiens  
 <400> 39

```

gaagttcaat tgtagagtc tggtagcgt cttgttcagc ctggtggttc tttacgtctt      60
tcttgcgctg cttccggatt cactttctct aagtacaaga tgctttgggt tcgccaagct      120
cctggtaaag gtttgagtg ggtttcttct atctatcctt ctggtggttc tactttttat      180
gctgactccg ttaaaggctg cttcactatc tctagagaca actctaagaa tactctctac      240
ttgcagatga acagcttaag ggctgaggac acggcogtgt attactgtgc aagagatggg      300
gagatgattt cgggtagttt ctttgactcc tggggccagg ggaccctggt caccgtctca      360
agcg                                                                    364

```

<210> 40  
 <211> 121  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens  
 <400> 40

```

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

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

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

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

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
          65          70          75          80

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

Ala Arg Asp Gly Glu Met Ile Ser Gly Ser Phe Phe Asp Ser Trp Gly
          100          105          110

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
          115          120

```

<210> 41  
 <211> 340  
 <212> ADN  
 <213> Homo sapiens  
 <400> 41

```

gccatctgga tgaccagtc tccagactcc ctggctgtgt ctctgggcga gagggccacc      60
atcaactgca agtccagcca gagtgtttta tacagctcca acaataagaa ctacttagct      120
tggtaccagc agaaaccagg acagcctcct aagctgctca tttactgggc atctaccgg      180
gaatccgggg tccctgaccg attcagtggc agcgggtctg ggacagattt cactctcacc      240
atcagcagcc tgcaggctga agatgtggca gtttattact gtcagcaata ttatagtact      300
ccgtacactt ttggccaggg gaccaagctg gagatcaaac      340

```

<210> 42  
 <211> 113  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens  
  
 <400> 42

```

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

Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Lys Ser Ser Gln Ser Val Leu Tyr Ser
          20           25           30

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

Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val
          50           55           60

Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr
65           70           75           80

Ile Ser Ser Leu Gln Ala Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln
          85           90           95

Tyr Tyr Ser Thr Pro Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile
          100          105          110

```

Lys

<210> 43  
 <211> 364  
 <212> ADN  
 <213> Homo sapiens  
  
 <400> 43

```

gaagttcaat tgtagagtc tggtagcgt cttgttcagc ctggtggtc tttacgtctt      60
tcttgogctg cttccggatt cactttctct cagtacatga tgctttgggt tcgccaagct    120
cctggtaaag gtttgagtg ggtttctggt atctctcctt ctggtggcat tactacttat    180
gctgactccg ttaaaggctg cttcactatc tctagagaca actctaagaa tactctctac    240
ttgcagatga acagcttaag ggctgaggac acggccgtgt attactgtgc gagagcttat    300
agcagtggct ggtccttacc ctttgactac tggggccagg ggaccctggt caccgtctca    360
agcg                                                                    364

```

<210> 44  
 <211> 121  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens  
 <400> 44

```

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

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

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

Ser Gly Ile Ser Pro Ser Gly Gly Ile Thr Thr Tyr Ala Asp Ser Val
          50          55          60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
          65          70          75          80

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

Ala Arg Ala Tyr Ser Ser Gly Trp Ser Leu Pro Phe Asp Tyr Trp Gly
          100          105          110

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
          115          120

```

<210> 45  
 <211> 340  
 <212> ADN  
 <213> Homo sapiens  
 <400> 45

gccatccaga tgaccagtc tccagactcc ctggctgtgt ctctgggcga gagggccacc 60  
 atcaactgca agtccagcca gagtgtttta tacagctcca acaataagaa ctacttagct 120  
 tggtagcagc agaaaccagg acagcctect aagctgctca tttactgggc atctaccgg 180  
 gaatccgggg tccctgaccg attcagtggc agcgggtctg ggacagattt cactctcacc 240  
 atcagcagcc tgcaggctga agatgtggca gtttattact gtcagcaata ttatagtact 300  
 cccatcacct tcggccaagg gacacgactg gagattaaac 340

<210> 46  
 <211> 113  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens  
 <400> 46

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

Lys

<210> 47  
 <211> 367  
 <212> ADN  
 <213> Homo sapiens  
 <400> 47

gaagttcaat tgtagagtc tggtagcggg ctggttcagc ctggtggttc tttacgtctt 60  
 tcttgcgctg cttccggatt cactttctct atgtaqttta tgtcttgggt tcgccaagct 120



```

cctggtaaag gtttgagtg ggtttctggt atctctcctt ctggtggcat gactttttat      180
gtgactccg ttaaaggtag cttcactatc tctagagaca actctaagaa tactctctac      240
ttgcagatga acagcttaag ggctgaggac acggccgtgt attactgtgc aaaagatggc      300
atccccctat ctatagctgc gccgattgac tactggggcc aggggaccct ggtcaccgtc      360
tcaagcg                                     367

```

<210> 48  
 <211> 122  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens  
  
 <400> 48

```

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

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

Phe Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
            35              40              45

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

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65              70              75              80

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

Ala Lys Asp Gly Ile Pro Leu Ser Ile Ala Ala Pro Ile Asp Tyr Trp
            100              105              110

Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
            115              120

```

<210> 49  
 <211> 340  
 <212> ADN  
 <213> Homo sapiens  
  
 <400> 49

gacatcgtga tgacccagtc tccagactcc ctggctgtgt ctctgggcga gagggccacc 60  
atcaactgca agtccagcca gagtggttta tacagttcca acaataagaa ctacttagcc 120  
tggtaccagc agaagccagg acagcctcct aagttgctca tttactgggc atctaccggg 180  
gaatccgggg tccctgaccg attcagtggc agcgggtctg ggacagattt cactctcacc 240  
atcagcagcc tgcaggctga agatgtggca gtttattact gtcagcaata ttatagtatt 300  
ccgtggacgt tcggccaagg gaccaagggtg gaaatcaaac 340

<210> 50  
<211> 113  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens  
<400> 50

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

Lys

<210> 51  
<211> 364  
<212> ADN  
<213> Homo sapiens  
<400> 51

```

gaagttcaat tgtagagtc tggtagcggt cttgttcagc ctggtgggtc tttagctctt      60
tattgagctg cttccggact cactttctct cgttacgtta tgacttgggt tggccaagct      120
cctggtaaag gtttggagtg ggtttcttct atctggcctt ctggtggcat gactgtttat      180
gctgactccg ttaaaggteg cttcactatc tctagagaca actctaagaa tactctctac      240
ttgcagatga acagcttaag ggctgaggac acggccgtgt attactgtgc gagagatcgt      300
cctaccggga aaacgggata cttccagcac tggggccagg gcaccctggt cactgtctca      360
agcg                                                                    364

```

<210> 52  
 <211> 121  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens  
 <400> 52

```

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

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

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

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

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65              70              75              80

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

Ala Arg Asp Arg Pro Thr Gly Lys Thr Gly Tyr Phe Gln His Trp Gly
          100              105              110

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115              120

```

<210> 53  
 <211> 340  
 <212> ADN  
 <213> Homo sapiens  
 <400> 53

```

aacatccaga tgaccagtc tccagactcc ctggctgtgt ctctgggcga gagggtcacc      60
atcaactgca agtccagcca gagtgtttta tacagctcca acaataagaa ctacttagct      120
tggtaccagc agaaaccagg acagcctcct aagctactca tttactgggc atctaccgg      180
gaatccgggg tccctgcccg attcagtggc agcgggtctg ggacagattt cactctcacc      240
atcagcagcc tgcaggctga agatgtggca gtttattact gtcagcaata ttatagtact      300
ccgttcactt ttggccaggg gaccaaggtg gaaatcaagc      340

```

<210> 54  
 <211> 113  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens  
  
 <400> 54

```

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

Glu Arg Val Thr Ile Asn Cys Lys Ser Ser Gln Ser Val Leu Tyr Ser
          20              25              30

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

Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val
          50              55              60

Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr
65              70              75              80

Ile Ser Ser Leu Gln Ala Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln
          85              90              95

Tyr Tyr Ser Thr Pro Phe Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile
          100              105              110

```

Lys

<210> 55  
 <211> 364  
 <212> ADN  
 <213> Homo sapiens  
  
 <400> 55

```

gaagttcaat tgtagagtc tggtaggggt cttgttcagc ctggtggttc ttacgtctt      60
tcttgcgctg cttccggatt cactttctct cagtacatga tgctttgggt tcgccaagct      120
cctggtaaag gtttgagtg ggtttctggt atctctcctt ctggtggcat tactacttat      180
gctgactccg ttaaaggctg cttcactatc tctagagaca actctaagaa tactctctac      240
ttgcagatga acagcttaag ggctgaggac acggccgtgt attactgtgc gagagcttat      300
agcagtggct ggtccttacc ctttgactac tggggccagg ggaccctggt caccgtctca      360
agcg                                                                    364

```

<210> 56  
 <211> 121  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens  
 <400> 56

```

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Gln Tyr

          20          25          30

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

Ser Gly Ile Ser Pro Ser Gly Gly Ile Thr Thr Tyr Ala Asp Ser Val
50          55          60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65          70          75          80

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

Ala Arg Ala Tyr Ser Ser Gly Trp Ser Leu Pro Phe Asp Tyr Trp Gly
100          105          110

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115          120

```

<210> 57  
 <211> 340  
 <212> ADN  
 <213> Homo sapiens  
 <400> 57

```

gccatccaga tgacccagtc tccagactcc ctggctgtgt ctctgggcga gagggccacc      60
atcaactgca agtccagcca gagtgtttta tacagctcca acaataagaa ctacttagct      120
tggtaccagc agaaaccagg acagcctcct aagctgctca tttactgggc atctaccgg      180
gaatccgggg tccctgaccg attcagtggc agcgggtctg ggacagattt cactctcacc      240
atcagcagcc tgcaggctga agatgtggca gtttattact gtcagcaata ttatagtacc      300
ccgtggacgt tcggccaagg gaccaagctg gagatcaaac      340

```

<210> 58  
 <211> 113  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens  
  
 <400> 58

```

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

Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Lys Ser Ser Gln Ser Val Leu Tyr Ser
          20           25           30

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

Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val
          50           55           60

Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr
65           70           75           80

Ile Ser Ser Leu Gln Ala Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln
          85           90           95

Tyr Tyr Ser Thr Pro Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile
          100          105          110

```

**Lys**

<210> 59  
 <211> 367  
 <212> ADN  
 <213> Homo sapiens  
  
 <400> 59

```

gaagttcaat tgtagagtc tggtaggggt cttgttcagc ctggtgggtc ttacgtctt      60
tcttgcgctg cttccggatt cactttctct ggtagacatta tgcagtgggt tcgccaagct      120
cctggtaaaag gtttggagtg ggtttctctt atctctcctt ctggtggcct tactttttat      180
gctgactccg ttaaaggctg cttcactatc tctagagaca actctaagaa tactctctac      240
ttgcagatga acagcttaag ggctgaggac acggccgtgt attactgtgc gaaagcccgt      300
cggatgagaa gcctatggga ggcttttgat gtctggggcc aagggaccac ggtcacccgc      360
tcaagcg                                          367

```

<210> 60  
 <211> 122  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens  
 <400> 60

```

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

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

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

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

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr

65          70          75          80

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

Ala Lys Ala Arg Arg Met Arg Ser Leu Trp Glu Ala Phe Asp Val Trp
100         105         110

Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115         120

```

<210> 61  
 <211> 340  
 <212> ADN  
 <213> Homo sapiens  
 <400> 61

```

gccatccaga tgaccagtc tccagactcc ctggtgtgtgt ctctgggcga gagggccacc      60
atcaactgca agtccagcca gagtgtttta tacagctcca acaataagaa ctacttagct      120
tggtaccagc agaaaccagg acagtctcct aagctgctca tttactgggc atctaccgg      180
gaatccgggg tccctgaccg attcagtggc agcgggtctg ggacagattt cactctcacc      240
atcagcagcc tgcaggctga agatgtggca gtttattact gtcagcaata ttatagtact      300
cccatcacct tcggccaagg gacacgactg gagcttagac      340

```

<210> 62  
 <211> 113  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

<400> 62

```

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

Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Lys Ser Ser Gln Ser Val Leu Tyr Ser
          20           25           30

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

Ser Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val
          50           55           60

Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr
65           70           75           80

Ile Ser Ser Leu Gln Ala Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln
          85           90           95

Tyr Tyr Ser Thr Pro Ile Thr Phe Gly Gln Gly Thr Arg Leu Glu Leu
          100          105          110

```

Arg

<210> 63  
 <211> 367  
 <212> ADN  
 <213> Homo sapiens

<400> 63



gaagttcaat tgtagagtc tggtagcgggt cttgttcagc ctggtggttc tttacgtctt 60  
 tcttgcgctg cttccggatt cactttctct aagtacaaga tggagtgggt tgcccaagct 120  
 cctggtaaag gtttgagtg ggtttctctt atctctcctt ctggtggcct tactttttat 180  
 gctgactccg ttaaaggtcg cttcactatc tctagagaca actctaagaa tactctctac 240  
 ttgcagatga acagcttaag ggctgaggac acggccgtgt attactgtgc gaaagcccgt 300  
 cggatgagaa gcctatggga ggcttttgat gtctggggcc aagggacaat ggtcaccgtc 360  
 tcaagcg 367

<210> 64  
 <211> 122  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens  
 <400> 64

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

115 120

<210> 65  
 <211> 340  
 <212> ADN  
 <213> Homo sapiens  
 <400> 65

gccatccagt tgaccagtc tccagactcc ctggctgtgt ctctgggcga gagggccacc 60  
 atcaactgca agtccagcca gagtgtttta tacagctcca acaataagaa ctacttagct 120  
 tgggtaccagc agaaaccagg acagcctcct aagctgctca tttaccgggc atctaccgg 180  
 gaatccgggg tccctgaccg attcagtggc agcgggtctg ggacagattt cactctcacc 240  
 atcagcagcc tgcaggctga agatgtggca gtttattact gtcagcaata ttatagtacc 300  
 ccgtggacgt tccggccaagg gaccaaggtg gaaatcaaac 340

<210> 66  
 <211> 113  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

<400> 66

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

Lys

<210> 67  
 <211> 367  
 <212> ADN  
 <213> Homo sapiens

<400> 67

gaagttcaat tgtagagtc tggtagcggg cttgttcagc ctggtggttc tttacgtctt 60  
 tcttgcgctg cttccggatt cactttctct aattactcta tgacgtgggt tcgccaagct 120  
 cctggtaaag gtttgagtg ggtttcttct atctctcctt ctggtggcct tactttttat 180  
 gctgactccg ttaaaggctg cttcactatc tctagagaca actctaagaa tactctctac 240  
 ttgcagatga acagcttaag ggctgaggac acggccgtgt attactgtgc gaaagcccg 300  
 cggatgagaa gcctatggga ggcttttgat atctggggcc aagggacaat ggtcaccgtc 360  
 tcaagcg 367

<210> 68  
 <211> 122  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens  
 <400> 68

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

<210> 69  
 <211> 340  
 <212> ADN  
 <213> Homo sapiens  
 <400> 69

gaaatagtga tgacgcagtc tccagactcc ctggctgtgt ctctgggcga gagggccacc 60  
atcaactgca agtccagcca gagtgtttta tacagctcca acaataagaa ctacttagct 120  
  
tggtaccagc agaaaccagg acagcctoct aagctgctca tttactgggc atctaccggg 180  
gaatccgggg tccctgaccg attcagtggc agcgggtctg ggacagattt cactctcacc 240  
atcagcagcc tgcaggctga agatgtggca gtttattact gtcagcaata ttatagtact 300  
ccgtggacgt tcggccaagg gaccaaggtg gaaatcaaac 340

<210> 70  
<211> 113  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens  
  
<400> 70

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

Lys

<210> 71  
<211> 364  
<212> ADN  
<213> Homo sapiens  
  
<400> 71

```

gaagttcaat tgtttagagtc tggtaggcgt cttgttcagc ctggtgggtc tttacgtctt      60
tcttgccgtg cttccggatt cactttctct aagtacccta tgacttgggt tcgccaaagct      120
cctggtaaag gtttggagtg ggtttctctt atctggcctt ctggtggcat gactgtttat      180
gctgactccg ttaaaggctg cttcactatc tctagagaca actctaagaa tactctctac      240
ttgcagatga acagcttaag ggctgaggac acggccgtgt attactgtgc gagagatcgt      300

cctaccggga aaacgggata cttccagcac tggggccagg gcaccctggt cactgtctca      360
agcg                                                                    364

```

<210> 72  
 <211> 121  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

<400> 72

```

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

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

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

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

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65              70              75              80

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

Ala Arg Asp Arg Pro Thr Gly Lys Thr Gly Tyr Phe Gln His Trp Gly
100             105             110

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115              120

```

<210> 73  
 <211> 340  
 <212> ADN  
 <213> Homo sapiens

<400> 73

gacatccaga tgaccagtc tccagactcc ctggtgtgt ctctgggcga gagggccacc 60  
atcaactgca agtccagcca gagtgtttta tacagctcca acaataagaa ctacttagct 120  
tggtaccagc agaaaccagg acagcctcct aagctactca ttactgggc atctaccgg 180  
gaatccgggg tccctgaccg attcagtggc agcgggtctg ggacagattt cactctcacc 240  
atcagcagcc tgcaggctga agatgtggca gtttattact gtcagcaata ttatagtact 300  
ccgtacactt ttggccaggg gaccaagctg gagatcaaac 340

<210> 74  
<211> 113  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens  
<400> 74

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

Lys

<210> 75  
<211> 364  
<212> ADN  
<213> Homo sapiens  
<400> 75

gaagttcaat tgtagagtc tggtagcgt cttgttcagc ctggtggttc tttacgtctt 60  
tcttgcgctg cttccggatt cactttctct cagtacatga tgctttgggt tcgccaagct 120  
cctggtaaag gtttgagtg ggtttctggt atctctcctt ctggtggcat tactacttat 180  
gctgactccg ttaaaggctg cttcactatc tctagagaca actctaagaa tactctctac 240  
ttgcggatga acagcttaag ggctgaggac acggccgtgt attactgtgc gagagcttat 300  
agcagtggtt ggtccttacc ctttgactac tggggccagg ggaccctggt caccgtctca 360  
agcg 364

<210> 76  
<211> 121  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 76

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

<210> 77  
<211> 340  
<212> ADN  
<213> Homo sapiens

<400> 77

```

gccatccaga tgaccagtc tccagactcc ctggctgtgt ctctgggcga gagggccacc      60
atcaactgca agtccagcca gagtgtttta tacagctcca acaataagaa ctacttagct      120
tggtaccagc agaaaccagg acagcctcct aagctgctca ttactgggc atctaaccgg      180
gaatccgggg tccctgaccg attcagtggc agcgggtctg ggacagattt cactctcacc      240
atcagcagcc tgcaggctga agatgtggca gtttattact gtcagcaata ttatagtact      300
ccgtacactt ttggccaggg gaccaagctg gagatcaaac      340

```

<210> 78  
 <211> 113  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens  
  
 <400> 78

```

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

Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Lys Ser Ser Gln Ser Val Leu Tyr Ser
          20           25           30

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

Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val
          50           55           60

Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr
65           70           75           80

Ile Ser Ser Leu Gln Ala Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln
          85           90           95

Tyr Tyr Ser Thr Pro Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile
          100          105          110

```

**Lys**

<210> 79  
 <211> 364  
 <212> ADN  
 <213> Homo sapiens  
  
 <400> 79



gaagttcaat tgtagagtc tggtagcgt cttgttcagc ctggtggtc tttacgtctt 60  
 tcttgcgctg cttccggatt cactttctct atgtacatga tgctttgggt tcgccaagct 120  
 cctggtaaag gtttgagtg ggtttctggt atctctcctt ctggtggcat tactacttat 180  
 gctgactccg ttaaaggctg cttcactatc tctagagaca actctaagaa tactctctac 240  
 ttgcagatga acagcttaag ggctgaggac acggccgtgt attactgtgc gagagcttat 300  
 agcagtggct ggtccttacc ctttgactac tggggccagg ggaccctggt caccgtctca 360  
 agcg 364

<210> 80  
 <211> 121  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens  
 <400> 80

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

<210> 81  
 <211> 340  
 <212> ADN  
 <213> Homo sapiens  
 <400> 81

```

aacatccaga tgacccagtc tccagactcc ctggtgtgt ctctgggcca gagggccacc      60
atcaactgca agtccagcca gagtgtttta tacagctcca acaataagaa ctacttagct      120
tggtaccagc agaaaccagg acagcctcct aagctgctca tttactgggc atctaccggg      180
gaatccgggg tccctgaccg attcagtggc agcgggtctg ggacagattt cactctcacc      240
atcagcagcc tgcaggtga agatgtggca gtttattact gtcagcaata ttatagtact      300
ccgtacactt ttggccaggg gaccaagggt gagatcaaac      340

```

<210> 82  
 <211> 113  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

<400> 82

```

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

Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Lys Ser Ser Gln Ser Val Leu Tyr Ser
          20           25           30

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

Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val
          50           55           60

Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr
65           70           75           80

Ile Ser Ser Leu Gln Ala Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln
          85           90           95

Tyr Tyr Ser Thr Pro Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile
          100          105          110

```

Lys

<210> 83  
 <211> 364  
 <212> ADN  
 <213> Homo sapiens

<400> 83

gaagttcaat tgtagagtc tggtagcgtt cttgttcagc ctggtgggtc tttacgtctt 60  
tcttgcgctg cttccggatt cactttctct cagtacatga tgctttgggt tgcceaagct 120  
cctggtaaag gtttggagtg ggtttctggt atctctcctt ctggtggcat tactacttat 180  
gctgactccg ttaaagggtc cttcactatc tctagagaca actctaagaa tactctctac 240  
ttgcagatga acagcttaag ggctgaggac acggccgtgt attactgtgc gagagcttat 300  
agcagtggct ggtccttacc ctttgactac tggggccagg gcaccctggt caccgtctca 360  
agcg 364

<210> 84  
<211> 121  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens  
<400> 84

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

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

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

Ser Gly Ile Ser Pro Ser Gly Gly Ile Thr Thr Tyr Ala Asp Ser Val  
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr  
65 70 75 80

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

Ala Arg Ala Tyr Ser Ser Gly Trp Ser Leu Pro Phe Asp Tyr Trp Gly  
100 105 110

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser  
115 120

<210> 85  
<211> 340  
<212> ADN  
<213> Homo sapiens  
<400> 85

gacatccagt tgaccagtc tccagactcc ctggctgtgt ctctgggcca gagggccacc 60  
atcaactgca agtcagcca gagtgtttta tacagctcca acaataagaa ctacttagct 120  
tggtaccagc agaaaccagg acagcctcct aagctgctca ttactgggc atctaccgg 180  
gaatccgggg tccctgaccg attcagtggc agcgggtctg ggacagattt cactctcacc 240  
atcagcagcc tgcaggctga agatgtggca gtttattact gtcagcaata ttatagtact 300  
ccgtggacgt tcggccaagg gaccaagggtg gaaatcaaac 340

<210> 86  
<211> 113  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens  
<400> 86

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

Lys

<210> 87  
<211> 367  
<212> ADN  
<213> Homo sapiens  
<400> 87

gaagttcaat tgtagagtc tggtagcgt cttgttcagc ctggtggttc ttacgtctt 60  
tcttgcgctg cttccggatt cactttctct aagtacccta tgacttgggt tgcgcaagct 120  
cctggtaaag gtttgagtg ggtttctct atctctcctt ctggtggcct tactttttat 180  
gctgactcog ttaaaggctg cttcactatc tctagagaca actctaagaa tactctctac 240  
ttgcagatga acagcttaag ggctgaggac acggccgtgt attactgtgc gaaagcccgt 300  
cggatgagaa gcctatggga ggcttttgat gtctggggcc aagggacaat ggtcaccgtc 360  
tcaagcg 367

<210> 88  
<211> 122  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens  
<400> 88

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

<210> 89  
<211> 340  
<212> ADN  
<213> Homo sapiens  
<400> 89

gacatcgtga tgaccagtc tccagactcc ctggtgtgt ctctgggcca gagggccacc 60  
atcaactgca agtccagcca gagtgtttta tacagctcca acaataagaa ctacttagct 120  
tggtaccagc agaaaccagg acagcctcct aagctgctca tttactgggc atctaccgg 180  
gaatccgggg tccctgaccg attcagtggc agcgggtctg ggacagattt cactctcacc 240  
atcagcagcc tgcaggctga agatgtggca gtttattact gtcagcaata ttatagtacc 300  
ccgtggacgt tcggccaagg gaccaaggtg gaaatcaagc 340

<210> 90  
<211> 113  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 90

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

Lys

<210> 91  
<211> 364  
<212> ADN  
<213> Homo sapiens

<400> 91

```

gaagttcaat tgtagagtc tggtagcggt cttgttcagc ctggtgggtc tttacgtctt      60
tcttgcgctg cttccggatt cactttctct cgttacgtta tgacttgggt tcgccaagct      120
cctggtaaag gtttggagtg ggtttcttct atctggcctt ctggtggcat gactgtttat      180
gctgactccg ttaaaggctg cttcactatc tctagagaca actctaagaa tactctctac      240
ttgcagatga acagcttaag ggctgaggac acggccgtgt attactgtgc gagagatcgt      300
cctaccggga aaacgggata cttccagcac tggggccagg gcaccctggt cactgtctca      360
agcg                                                                    364

```

<210> 92  
 <211> 121  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens  
  
 <400> 92

```

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

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

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

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

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65           70           75           80

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

Ala Arg Asp Arg Pro Thr Gly Lys Thr Gly Tyr Phe Gln His Trp Gly
100          105          110

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115          120

```

<210> 93  
 <211> 340  
 <212> ADN  
 <213> Homo sapiens  
  
 <400> 93

gacatccagt tgaccagtc tccagactcc ctggctgtgt ctctgggcga gagggccacc 60  
 atcaactgca agtccagcca gagtgtttta tacagctcca acaataagaa ctacttagct 120  
 tggtagcagc agaaaccagg acagcctcct aagctgctca tttactgggc atctaccggg 180  
 gaatccgggg tccctgaccg attcagtggc agcgggtctg ggacagattt cactctcacc 240  
 atcagcagcc tgcaggctga agatgtggca gtttattact gtcagcaata ttatagtact 300  
 ccgtggacgt tcggccaagg gaccaagggtg gaaatcaaac 340

<210> 94  
 <211> 113  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens  
 <400> 94

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

Lys

<210> 95  
 <211> 364  
 <212> ADN  
 <213> Homo sapiens  
 <400> 95



gaagttcaat tgtagagtc tggtagcggc cttgttcagc ctggtgggtc tttacgtctt 60  
tcttgcgctg cttccggatt cactttctct cgttacgcta tgacttgggt togecaagct 120  
cctggtaaaag gtttggagtg ggtttcttct atctggcctt ctggtggcat gactgtttat 180  
gctgactccg ttaaaggtag cttcactatc tctagagaca actctaagaa tactctctac 240  
ttgcagatga acagcttaag ggctgaggac acggccgtgt attactgtgc gagagatcgt 300  
cctaccggga aaacgggata cttccagcac tggggccagg gcaccctggt caccgtctca 360  
agcg 364

<210> 96  
<211> 121  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens  
<400> 96

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

<210> 97  
<211> 340  
<212> ADN  
<213> Homo sapiens  
<400> 97

```

gccatccaga tgacccagtc tccagactcc ctggctgtgt ctctgggcca gagggccacc      60
atcaactgca agtccagcca gagtgtttta tacagctcca acaataagaa ctacttagct      120
tggtaccagc agaaaccagg acagcctcct aagctgctca ttactgggc atctaccgc      180
gaatcggggg tccctgaccg attcagtggc accgggtctg ggacagattt cactctcacc      240
atcagcagcc tgcaggctga agatgtggca gtttattact gtcagcaata ttatagtact      300
ccattcacct tcggccaagg gacacgactg gagcttagac      340

```

<210> 98  
 <211> 113  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens  
 <400> 98

5

```

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

Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Lys Ser Ser Gln Ser Val Leu Tyr Ser
          20           25           30

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

Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val
50           55           60

Pro Asp Arg Phe Ser Gly Thr Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr
65           70           75           80

Ile Ser Ser Leu Gln Ala Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln
          85           90           95

Tyr Tyr Ser Thr Pro Phe Thr Phe Gly Gln Gly Thr Arg Leu Glu Leu
          100          105          110

```

10

**Arg**

<210> 99  
 <211> 364  
 <212> ADN  
 <213> Homo sapiens  
 <400> 99

15

```

gaagttcaat tgtagagtc tggtagcgtt cttgttcagc ctggtggttc ttacgtctt      60
tcttgcgctg cttccggatt cactttctct aagtacaaga tgctttgggt tcgccaagct      120
cctggtaaag gtttgagtg ggtttcttct atctatcctt ctggtggcgt tactttttat      180
gctgactccg ttaaaggctg cttcactatc tctagagaca actctaagaa tactctctac      240
ttgcagatga acagcttaag ggctgaggac acggccgtgt attactgtgc aagagatggg      300
gagatgattt cgggtagttt ctttgactcc tggggccagg ggaccctggt caccgtctca      360
agcg                                                                    364

```

<210> 100  
 <211> 121  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens  
 <400> 100

```

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

```

```

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

```

```

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

```

```

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

```

```

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65              70              75              80

```

```

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

```

```

Ala Arg Asp Gly Glu Met Ile Ser Gly Ser Phe Phe Asp Ser Trp Gly
100              105              110

```

```

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115              120

```

<210> 101  
 <211> 340  
 <212> ADN  
 <213> Homo sapiens  
 <400> 101

```

gccatccaga tgaccagtc tccagactcc ctggctgtgt ctctgggcga gagggccacc      60
atcaactgca agtccagcca gagtgtttta tacagctcca acaataagaa ctacttagct      120
tggtaccagc agaaaccagg acagcctcct aagctgctca tttactgggc atctaccogg      180
gaatccgggg tccctgaccg rttcagtggc agcgggtctg ggacagattt cactctcacc      240
atcagcagcc tgcaggctga agatgtggca gtttattact gtcagcaata ttatagtact      300
ccgtacactt ttggccaggg gaccaagctg gagatcaaac      340

```

<210> 102  
 <211> 113  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens  
  
 <400> 102

```

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

Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Lys Ser Ser Gln Ser Val Leu Tyr Ser
          20           25           30

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

Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val
          50           55           60

Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr
65           70           75           80

Ile Ser Ser Leu Gln Ala Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln
          85           90           95

Tyr Tyr Ser Thr Pro Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile
          100          105          110

```

Lys

<210> 103  
 <211> 364  
 <212> ADN  
 <213> Homo sapiens  
  
 <400> 103

```

gaagttcaat tgtagagtc tggtagcgtt cttgttcagc ctggtggttc ttacgtctt      60
tcttgcgctg cttccggatt cactttctct cagtacatga tgctttgggt tcgccaagct    120
cctggtaaag gtttgagtg ggtttctggt atctctcctt ctggtggcat tactacttat     180
gctgactccg ttaaaggtag cttcactatc tctagagaca actctaagaa tactctctac     240
ttgcagatga acagcttaag ggctgaggac acggccgtgt attactgtgc gagrgcttat     300
agcagtggct ggtccttacc ctttgactac tggggccagg gsaccctggt cacygtctca     360
agcg                                                                    364

```

<210> 104  
 <211> 121  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens  
 <400> 104

```

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

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

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

Ser Gly Ile Ser Pro Ser Gly Gly Ile Thr Thr Tyr Ala Asp Ser Val
50          55          60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65          70          75          80

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

Ala Arg Ala Tyr Ser Ser Gly Trp Ser Leu Pro Phe Asp Tyr Trp Gly
100         105         110

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115         120

```

<210> 105  
 <211> 340  
 <212> ADN  
 <213> Homo sapiens  
 <400> 105

```

aacatccaga tgacccagtc tccagactcc ctggctgtgt ctctgggcga gagggccacc      60
atcaactgca agtcagcca gagtgtttta tacagctcca acaataagaa ctacttagct      120
tggtaccagc agaaaccagg acagcctcct aagctgctca tttactgggc atctaccgg      180
gaatccgggg tccctgaccg attcagtggc agcgggtctg ggacagattt cactctcacc      240
atcagcagcc tgcaggctga agatgtggca gtttattact gtcagcaata ttatagtact      300
ccgtacactt ttggccaggg gaccaagctg gagatcaaac      340

```

<210> 106  
 <211> 113  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens  
  
 <400> 106

```

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

Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Lys Ser Ser Gln Ser Val Leu Tyr Ser
          20           25           30

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

Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val
          50           55           60

Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr
65           70           75           80

Ile Ser Ser Leu Gln Ala Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln
          85           90           95

Tyr Tyr Ser Thr Pro Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile
          100          105          110

```

Lys

<210> 107  
 <211> 364  
 <212> ADN  
 <213> Homo sapiens  
  
 <400> 107

```

gaagttcaat tgtagagtc tggtaggggt cttgttcagc ctggtgggtc tttacgtctt      60
tcttgccgtg cttccggatt cactttctct cagtacatga tgctttgggt tcgccaagct      120
cctggtaaag gtttgagtg ggtttctggt atctctcctt ctggtggcat tactacttat      180
gctgactccg ttaaagggtg cttcactatc tctagagaca actctaagaa tactctctac      240
ttgcagatga acagcttaag ggctgaggac acggccgtgt attactgtgc gagagcttat      300
agcagtggct ggtccttacc ctttgactac tggggccagg gcaccctggt cacygtctca      360
agcg                                                                    364

```

<210> 108  
 <211> 121  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens  
 <400> 108

```

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

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

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

Ser Gly Ile Ser Pro Ser Gly Gly Ile Thr Thr Tyr Ala Asp Ser Val
50          55          60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65          70          75          80

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

Ala Arg Ala Tyr Ser Ser Gly Trp Ser Leu Pro Phe Asp Tyr Trp Gly
          100          105          110

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115          120

```

<210> 109  
 <211> 340  
 <212> ADN  
 <213> Homo sapiens  
 <400> 109

gacatccagt tgaccagtc tccaggctcc ctggctgtgt ctctgggcga gagggccacc 60  
atcaactgca agtccagcca gagtgtttta tacagctcca acaataagaa ctacttagct 120  
tggtaccagc agaaaccagg acagcctcct aagctgctca tttactgggc atctaccggg 180  
gaatccgggg tccctgaccg attcagtggc agcgggtctg ggacagattt cactctcacc 240  
atcagcagcc tgcaggctga agatgtggca gtttattact gtcagcaata ttatagtact 300  
ccgtacactt ttggccaggg gaccaagctg gagatcaaac 340

<210> 110  
<211> 113  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 110

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

Lys

<210> 111  
<211> 364  
<212> ADN  
<213> Homo sapiens

<400> 111



```

gaagttcaat tgtagagtc tggtagcggc cttgttcagc ctggtggttc tttacgtctt      60
tcttgcgctg cttccggatt cactttctct cagtacatga tgctttgggt tcgccaagct      120
cctggtaaag gtttgagtg ggtttctggc atctctcctt ctggtggcat tactacttat      180
gctgactccg ttaaaggctg cttcactatc tctagagaca actotaagaa tactctctac      240
ttgcagatga acagcttaag ggctgaggac acggccgtgt attactgtgc gagagcttat      300
agcagtggct ggtccttacc ctttgactac tggggccagg ggaccctggt caccgtctca      360
agcg                                                                    364

```

<210> 112  
 <211> 121  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens  
 <400> 112

```

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

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

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

Ser Gly Ile Ser Pro Ser Gly Gly Ile Thr Thr Tyr Ala Asp Ser Val
          50          55          60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
          65          70          75          80

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

Ala Arg Ala Tyr Ser Ser Gly Trp Ser Leu Pro Phe Asp Tyr Trp Gly
          100          105          110

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
          115          120

```

<210> 113  
 <211> 340  
 <212> ADN  
 <213> Homo sapiens  
 <400> 113

```

gccatccgga tgaccagtc tccagactcc ctggctgtgt ctctgggcga gagggccacc      60
atcaactgca agtcagcca gagtgtttta tacagctcca acaataagaa ctacttagct      120
tggtaccagc agaaaccagg acagcctcct aagctgctca tttactgggc atctaccgg      180
gaatccgggg tccctgaccg attcagtggc agcgggtctg ggacagattt cactctcacc      240
atcagcagcc tgcaggctga agatgtggca gtttattact gtcagcaata ttatagtact      300
ccgtacactt ttggccaggg gaccaagctg gagatcaaac      340

```

<210> 114  
 <211> 113  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens  
 <400> 114

```

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

Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Lys Ser Ser Gln Ser Val Leu Tyr Ser
          20           25           30

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

Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val
          50           55           60

Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr
          65           70           75           80

Ile Ser Ser Leu Gln Ala Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln
          85           90           95

Tyr Tyr Ser Thr Pro Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile
          100          105          110

```

**Lys**

<210> 115  
 <211> 364  
 <212> ADN  
 <213> Homo sapiens  
 <400> 115

# ES 2 456 296 T3

```

gaagttcaat tgtagagtc tggtagcgt cttgttcagc ctggtgggtc ttacgtctt      60
tcttgcgctg cttccggatt cactttctct cagtacatga tgctttgggt tcgccaagct    120
cctggtaaag gtttgagtg ggtttctggt atctctcctt ctggtggcat tactacttat    180
gctgactccg ttaaaggctg cttcactatc tctagagaca actctaagaa tactctctac    240
ttgcagatga acagcttaag ggctgaggac acggccgtgt attactgtgc gagagcttat    300
agcagtggct ggtccttacc ctttgactac tggggccagg gsaccctggt caccgtctca    360

agcg                                                                    364

```

<210> 116  
 <211> 121  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens  
 <400> 116

```

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

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

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

Ser Gly Ile Ser Pro Ser Gly Gly Ile Thr Thr Tyr Ala Asp Ser Val
50          55          60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65          70          75          80

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

Ala Arg Ala Tyr Ser Ser Gly Trp Ser Leu Pro Phe Asp Tyr Trp Gly
100         105         110

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115          120

```

<210> 117  
 <211> 340  
 <212> ADN  
 <213> Homo sapiens  
 <400> 117

```

gccatccaga tgacccagtc tccagactcc ctggctgtgt ctctgggcga gagggccacc      60
atcaactgca agtcagcca gagtgtttta tacagctcca acaataagaa ctacttagct      120
tggtaccagc agaaaccagg acagcctcct aagctgctca tttactgggc atctaccgg.     180
gaatccgggg tccctgaccg attcagtggc agcgggtctg ggacrgaytt cactctcacc      240
atcagcagcc tgcaggctga agatgtggca gtttattact gtcagcaata ttatagtact      300
cccatcacct tcggccaagg gacacgactg gagattaaac                             340

```

<210> 118  
 <211> 113  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

<400> 118

```

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

Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Lys Ser Ser Gln Ser Val Leu Tyr Ser
20          25          30

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

Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val
50          55          60

Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr
65          70          75          80

Ile Ser Ser Leu Gln Ala Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln
85          90          95

Tyr Tyr Ser Thr Pro Ile Thr Phe Gly Gln Gly Thr Arg Leu Glu Ile
100         105         110

```

**Lys**

<210> 119  
 <211> 367  
 <212> ADN  
 <213> Homo sapiens

<400> 119

# ES 2 456 296 T3

```

gaagtycaat tgtagagtc tggtagcgt cttgttcagc ctggtggttc tttacgtctt      60
tcttgcgctg cttccggatt cactttctct aagtacaaga tggagtgggt tcgccaagct      120
cctggtaaag gtttggagtg ggtttctctt atctctcctt ctggtggcct tactttttat      180
gctgactccg ttaaaggctg cttcactatc tctagagaca actctaagaa tactctctac      240
ttgcagatga acagcttaag ggctgaggac acggccgtgt attactgtgc gaaagcccgt      300
cggatgagaa gcctatggga ggcttttgat gtctggggcc aagggacaat ggtcaccgtc      360
tcaagcg                                     367

```

<210> 120  
 <211> 122  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens  
 <400> 120

```

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

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

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

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

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65          70          75          80

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

Ala Lys Ala Arg Arg Met Arg Ser Leu Trp Glu Ala Phe Asp Val Trp
          100          105          110

Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser
          115          120

```

<210> 121  
 <211> 340  
 <212> ADN  
 <213> Homo sapiens  
 <400> 121

```

gccatccagt tgaccagtc tccagactcc ctggctgtgt ctctgggcga gagggccacc      60
atcaactgca agtccagcca gagtgtttta tacagctcca acaataagaa ctacttagct      120
tggtaccagc agaaccagg acagcctcct aagctgctca tttactgggc atctaaccgg      180
gaatccgggg tccctgaccg attcagtggc agcgggtctg ggacagattt cactctcacc      240
atcagcagcc tgcaggctga agatgtggca gtttattact gtcagcaata ttatagtact      300
cccatcacct tcggccaagg gacacgactg gagattaaac      340

```

<210> 122  
 <211> 113  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

<400> 122

```

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

```

```

Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Lys Ser Ser Gln Ser Val Leu Tyr Ser
20           25           30

```

```

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

```

```

Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val
50           55           60

```

```

Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr
65           70           75           80

```

```

Ile Ser Ser Leu Gln Ala Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln
85           90           95

```

```

Tyr Tyr Ser Thr Pro Ile Thr Phe Gly Gln Gly Thr Arg Leu Glu Ile
100          105          110

```

**Lys**

<210> 123  
 <211> 367  
 <212> ADN  
 <213> Homo sapiens

<400> 123

```

gaagttcaat tgtagagtc tggtagcgtt cttgttcagc ctggtggttc ttacgtctt      60
tcttgcgctg cttccggatt cactttctct aagtacaaga tggagtgggt tcgccaagct      120
cctggtaaag gtttggagtg ggtttctctt atctctctct ctggtggcct tactttttat      180
gctgactccg ttaaaggtcg cttcactatc tctagagaca actctaagaa tactctctac      240
ttgcagatga acagcttaag ggctgaggac acggccgtgt attactgtgc gaaagcccg      300
cggatgagaa gcctatggga ggcttttgat gtctggggcc aagggacaat ggtcacccgc      360
tcaagcg                                          367

```

<210> 124  
 <211> 122  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

<400> 124

```

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

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

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

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

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65              70              75              80

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

Ala Lys Ala Arg Arg Met Arg Ser Leu Trp Glu Ala Phe Asp Val Trp
100             105             110

Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser
115              120

```

<210> 125  
 <211> 340  
 <212> ADN  
 <213> Homo sapiens

<400> 125

```

gccatccaga tgaccagtc tccagactcc ctggctgtgt ctctgggcga gagggccacc      60
atcaactgca agtccagcca gagtgtttta tacagctcca acaataagaa ctacttagct      120
tggtaccage agaaccagg acagcctcct aggctgtctca ttactgggc atctaccgg      180
gaatccgggg tccctgcccg attcagtggc agcgggtctg ggacagattt cactctcacc      240
atcagcagcc tgcaggctga agatgtggca gtttattact gtcagcaata ttatagtact      300
ccgttcactt ttggccaggg gaccaagctg gagatcaaac      340

```

<210> 126  
 <211> 113  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens  
 <400> 126

```

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

Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Lys Ser Ser Gln Ser Val Leu Tyr Ser
20           25           30

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

Pro Pro Arg Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val
50           55           60

Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr
65           70           75           80

Ile Ser Ser Leu Gln Ala Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln
85           90           95

Tyr Tyr Ser Thr Pro Phe Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile
100          105          110

Lys

```

<210> 127  
 <211> 367  
 <212> ADN  
 <213> Homo sapiens  
 <400> 127



gaagttcaat tgtagagtc tggtagcggt cttgttcagc ctggtggttc tttacgtctt 60  
tcttgcgctg cttccggatt cactttctct aagtacaaga tgctttgggt tcgccaagct 120  
cctggtaaag gtttgagtg ggtttcttct atctctcctt ctggtggcct tactttttat 180  
gctgactccg ttaaaggctg cttcactatc tctagagaca actctaagaa tactctctac 240  
ttgcagatga acagcttaag ggctgaggac acggccgcgt attactgtgc gaaagcccg 300  
cggatgagaa gcctatggga ggcttttgat gtctggggcc aagggacaat ggtcaccgtc 360  
tcaagcg 367

<210> 128  
<211> 122  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens  
<400> 128

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

<210> 129  
<211> 340  
<212> ADN  
<213> Homo sapiens  
<400> 129

```

aacatccaga tgacccagtc tccagactcc ctggctgtgt ctctgggcga gagggccacc      60
atcaactgca agtccagcca gagtgtttta tacagctcca acaataagaa ctacttagct      120
tggtaccagc agaaaccagg acagcctcct aagctgctca tttactgggc atctaccogg      180
gaatccgggg tccctgaccg attcagtggc agcgggtctg ggacagattt cactctcacc      240
atcagcagcc tgcaggctga agatgtggca gtttattact gtcagcaata ttatagtact      300
cccatcacct tcggccaagg gacacgactg gagcttagac      340

```

<210> 130  
 <211> 113  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens  
  
 <400> 130

```

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

Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Lys Ser Ser Gln Ser Val Leu Tyr Ser
          20           25           30

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

Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val
          50           55           60

Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr
65           70           75           80

Ile Ser Ser Leu Gln Ala Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln
          85           90           95

Tyr Tyr Ser Thr Pro Ile Thr Phe Gly Gln Gly Thr Arg Leu Glu Leu
          100          105          110

```

Arg

<210> 131  
 <211> 367  
 <212> ADN  
 <213> Homo sapiens  
  
 <400> 131

gaagttcaat tgtagagtc tggtaggggt cttgttcagc ctggtgggtc ttacgtctt 60  
 tcttgcgctg cttccggatt cactttctct aagtacaaga tggagtgggt tcgccaagct 120  
 cctggtaaag gtttggagtg ggtttctctt atctctcctt ctggtggcct tactttttat 180  
 gctgactccg ttaaaggctg cttcactatc tctagagaca actctaagaa tactctctac 240  
 ttgcagatga acagcttaag ggctgaggac acggccgtgt attactgtgc gaaagcccg 300  
 cggatgagaa gcctatggga ggcttttgat gtctggggcc aagggacaat ggtcacgcgc 360  
 tcaagcg 367

<210> 132  
 <211> 122  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens  
 <400> 132

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

<210> 133  
 <211> 340  
 <212> ADN  
 <213> Homo sapiens  
 <400> 133

```

gccatccagt tgacccagtc tccagactcc ctggctgtgt ctctgggcga gagggccacc      60
atcaactgca agtccagcca gagtgtttta tacagctcca acaataagaa ctacttagct      120
tggtaccagc agaaaccagg acagcctcct aagctgctca tttactgggc atctaccggg      180
gaatccgggg tccctgaccg attcagtggc agcgggtctg ggacagattt cactctcacc      240
atcagcagcc tgcaggctga agatgtggca gtttattact gtcagcaata ttatagtact      300
ccgtacactt ttggccaggg gaccaagctg gagatcaaac      340

```

<210> 134  
 <211> 113  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens  
 <400> 134

```

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

Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Lys Ser Ser Gln Ser Val Leu Tyr Ser
          20              25              30

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

Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val
          50              55              60

Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr
65              70              75              80

Ile Ser Ser Leu Gln Ala Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln
          85              90              95

Tyr Tyr Ser Thr Pro Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile
          100              105              110

```

**Lys**

<210> 135  
 <211> 364  
 <212> ADN  
 <213> Homo sapiens  
 <400> 135

```

gaagttcaat tgtagagtc tggtagcggt cttgttcagc ctggtggttc tttacgtctt      60
tcttgcgctg cttccggatt cactttctct cagtacatga tgctttgggt tcgccaagct      120
cctggtaaag gtttggagtg ggtttctggt atctctcctt ctggtggcat tactacttat      180
gctgactccg ttaaaggteg cttcactatc tctagagaca actctaagaa tactctctac      240

ttgcagatga acagcttaag ggctgaggac acggccgtgt attactgtgc gagagcttat      300
agcagtggct ggtccttacc ctttgactac tggggccagg ggaccctggt caccgtctca      360
agcg                                                                364

```

<210> 136  
 <211> 121  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens  
  
 <400> 136

```

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

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

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

Ser Gly Ile Ser Pro Ser Gly Gly Ile Thr Thr Tyr Ala Asp Ser Val
          50              55              60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
          65              70              75              80

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

Ala Arg Ala Tyr Ser Ser Gly Trp Ser Leu Pro Phe Asp Tyr Trp Gly
                100              105              110

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
          115              120

```

<210> 137  
 <211> 340  
 <212> ADN  
 <213> Homo sapiens  
  
 <400> 137

```

gccatccaga tgacccagtc tccagactcc ctggtgtgt ctctgggcga gagggccacc      60
atcaactgca agtccagcca gagtgtttta tacagctcca acaataagaa ctacttagct      120
tggtaccagc agaaaccagg acagcctcct aagctgctca ttactgggc atctaccgg      180
gaatccgggg tccctgaccg attcagtggc agcgggtctg ggacagattt cactctcacc      240
atcagcagcc tgcaggctga agatgtggca gtttattact gtcagcaata ttatagtact      300
ccgtggacgt tcggccaagg gaccaaggtg gagatcaaac      340

```

<210> 138  
 <211> 113  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

<400> 138

```

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

Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Lys Ser Ser Gln Ser Val Leu Tyr Ser
      20              25              30

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

Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val
      50              55              60

Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr
65              70              75              80

Ile Ser Ser Leu Gln Ala Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln
      85              90              95

Tyr Tyr Ser Thr Pro Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile
      100              105              110

```

**Lys**

<210> 139  
 <211> 361  
 <212> ADN  
 <213> Homo sapiens

<400> 139

```

gaagttcaat tgtagagtc tggtagcgtt cttgttcagc ctggtgggtc ttacgtctt      60
tcttgcgctg ctcccgatt cactttctct aagtagccta tgggttggtt tcgccaagct      120
cctggtaaag gtttgagtg ggtttctctt atctctcctt ctggtggcct tactttttat      180
gctgactccg ttaaaggtcg cttcactatc tctagagaca actctaagaa tactctctac      240
ttgcagatga acagcttaag ggctgaggac acggccgtgt attactgtgc gaaagccogt      300
cggatgagaa gcctatggga ggcttttgat gtctggggcc aagggaccac ggtcaccgtc      360
t                                                                           361

```

<210> 140  
 <211> 120  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens  
 <400> 140

```

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

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

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

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

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65           70           75           80

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

Ala Lys Ala Arg Arg Met Arg Ser Leu Trp Glu Ala Phe Asp Val Trp
100          105          110

Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val
115          120

```

<210> 141  
 <211> 340  
 <212> ADN  
 <213> Homo sapiens  
 <400> 141

```

gccatccaga tgaccagtc tccagactcc ctggtgtgt ctctgggaga gagggccacc      60
atcaactgca agtccagcca gagtcttttg tacagtgcc acaataagaa ctacttagct      120
tggtaccagc agaaaccggg acagcctcct aagctgctca tttactgggc atctaccgg      180
gaatccgggg tccctgaccg attcagtggc agcgggtctg ggacagattt cactctcacc      240
atcagcagcc tgcaggctga agatgtggca gtttattact gtcagcaata ttatagtacc      300
ccgtggacgt tcggccaagg gaccaaggtg gaaatcaaac      340

```

<210> 142  
 <211> 113  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

<400> 142

```

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

```

```

Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Tyr Ser
                20           25           30

```

```

Ala Asn Asn Lys Asn Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln
    35           40           45

```

```

Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val
    50           55           60

```

```

Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr
    65           70           75           80

```

```

Ile Ser Ser Leu Gln Ala Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln
                85           90           95

```

```

Tyr Tyr Ser Thr Pro Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile
                100           105           110

```

**Lys**

<210> 143  
 <211> 364  
 <212> ADN  
 <213> Homo sapiens

<400> 143



```

gaagttcaat tgtagagtc tggtagcgtt cttgttcagc ctggtgggtc tttacgtctt      60
tcttgccgtg cttccggatt cactttctct cgttacgcta tgacttgggt tcgccaaagt      120
cctggtaaag gtttgagtg ggtttctctt atctggcctt ctggtggcat gactgtttat      180
gctgactccg ttaaaggtag cttcactatc tctagagaca actctaagaa tactctctac      240
ttgcagatga acagcttaag ggctgaggac acggccgtgt attactgtgc gagagatcgt      300
cctaccggga aaacgggata cttccagcac tggggccagg gcaccctggt cactgtctca      360
agcg                                                                    364

```

<210> 144  
 <211> 121  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens  
 <400> 144

```

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

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

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

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

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65              70              75              80

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

Ala Arg Asp Arg Pro Thr Gly Lys Thr Gly Tyr Phe Gln His Trp Gly
100              105              110

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115              120

```

<210> 145  
 <211> 340  
 <212> ADN  
 <213> Homo sapiens  
 <400> 145

```

aacatccaga tgacccagtc tccagactcc ctggctgtgt ctctgggcga gagggccacc      60
atcaactgca agtccagcca gagtgtttta tacagctcca acaataagaa ctacttagct      120
tggtaccagc agaaaccagg acagcctcct aagctgctca tttactgggc atctaccgg      180
gaatccgggg tccctgaccg attcagtggc agcgggtctg ggacagattt cactctcacc      240
atcagcagcc tgcaggctga agatgtggca gtttattact gtcagcaata ttatagtact      300
cccatcacct tcggccaagg gacacgactg gagcttagac      340

```

<210> 146  
 <211> 113  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

<400> 146

```

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

Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Lys Ser Ser Gln Ser Val Leu Tyr Ser
          20           25           30

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

Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val
          50           55           60

Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr
65           70           75           80

Ile Ser Ser Leu Gln Ala Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln
          85           90           95

Tyr Tyr Ser Thr Pro Ile Thr Phe Gly Gln Gly Thr Arg Leu Glu Leu
          100          105          110

```

**Arg**

<210> 147  
 <211> 364  
 <212> ADN  
 <213> Homo sapiens

<400> 147

```

gaagttcaat tgtagagtc tggtagcgtt cttgttcagc ctggtggttc tttacgtctt      60
tcttgcgctg cttccggatt cactttctct aagtagatga tgggctgggt tcgccaagct      120
cctggtaaag gtttgagtg ggtttctggt atctctcctt ctggtggcat tactacttat      180
gctgactccg ttaaaggctg cttcactatc tctagagaca actctaagaa tactctctac      240
ttgcagatga acagcttaag ggctgaggac acggccgtgt attactgtgc gagagcttat      300
agcagtggtt ggtccttacc ctttgactac tggggccagg ggaccctggt caccgtctca      360
agcg                                                                 364

```

<210> 148  
 <211> 121  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens  
 <400> 148

```

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

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

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

Ser Gly Ile Ser Pro Ser Gly Gly Ile Thr Thr Tyr Ala Asp Ser Val
50           55           60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65           70           75           80

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

Ala Arg Ala Tyr Ser Ser Gly Trp Ser Leu Pro Phe Asp Tyr Trp Gly
100          105          110

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115          120

```

<210> 149  
 <211> 340  
 <212> ADN  
 <213> Homo sapiens  
 <400> 149

```

gccatccaga tgacccagtc tccagactcc ctggtgtgtgt ctctgggcga gagggccacc      60
atcaattgca agtccagcca gagtgtttta tacagcccca acaagaagaa ctacttagct      120
tggtaccagc aaaaaccagg acagcctcct aagctgctca ttactgggc atctaccgg      180
gaatccgggg tccctgaccg attcagtggc agcgggtctg ggacagattt cactctcacc      240
atcagcagcc tgcaggctga agatgtggca gtttattact gtcagcaata ttatagtact      300
ccgtacactt ttggccaggg gaccaagctg gagatcaaac      340

```

<210> 150  
 <211> 113  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

<400> 150

```

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

Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Lys Ser Ser Gln Ser Val Leu Tyr Ser
                20              25              30

Pro Asn Lys Lys Asn Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln
          35              40              45

Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val
          50              55              60

Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr
65              70              75              80

Ile Ser Ser Leu Gln Ala Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln
          85              90              95

Tyr Tyr Ser Thr Pro Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile
          100             105             110

```

Lys

<210> 151  
 <211> 364  
 <212> ADN  
 <213> Homo sapiens

<400> 151

```

gaagttcaat tgtagagtc tggtagcgt cttgttcagc ctggtgggtc tttacgtctt      60
tcttgcgctg cttccggatt cactttctct aagtacaaga tgctttgggt tcgccaagct      120
cctggtaaag gtttgagtg ggtttcttct atctatcctt ctggtggcgt tactttttat      180
gctgactccg ttaaaggctg cttcactatc tctagagaca actctaagaa tactctctac      240
ttgcagatga acagcttaag ggctgaggac acggccgtgt attactgtgc aagagatggg      300
gagatgattt cgggtagttt ctttgactcc tggggccagg ggaccctggt caccgtctca      360
agcg                                                                    364

```

<210> 152  
 <211> 121  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens  
 <400> 152

```

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

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

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

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

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65          70          75          80

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

Ala Arg Asp Gly Glu Met Ile Ser Gly Ser Phe Phe Asp Ser Trp Gly
100         105         110

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115         120

```

<210> 153  
 <211> 340  
 <212> ADN  
 <213> Homo sapiens  
 <400> 153

```

gaaattgtgt tgacgcagtc tccagactcc ctggctgtgt ctctgggcga gagggccacc      60
atcaactgca agtccagcca gagtgtttta tacagctcca acaataagaa ctacttagct      120
tggtaccagc agaaaccagg acagcctcct aagctgctca ttactgggc atctaccgg      180
gaatccgggg tccctgaccg attcagtggc agcgggtctg ggacagattt cactctcacc      240
atcagcagcc tgcaggctga agatgtggca gtttattact gtcagcaata ttatagtact      300
ccgtggacgt tcggccaagg gacacgactg gagattaaac      340

```

<210> 154  
 <211> 113  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

<400> 154

```

Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Asp Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly
1           5           10           15

```

```

Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Lys Ser Ser Gln Ser Val Leu Tyr Ser
20           25           30

```

```

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

```

```

Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val
50           55           60

```

```

Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr
65           70           75           80

```

```

Ile Ser Ser Leu Gln Ala Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln
85           90           95

```

```

Tyr Tyr Ser Thr Pro Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Arg Leu Glu Ile
100          105          110

```

**Lys**

<210> 155  
 <211> 367  
 <212> ADN  
 <213> Homo sapiens

<400> 155

```

gaagttcaat tgtagagtc tggtagcggc cttgttcagc ctggtggttc ttacgtctt      60

```

tcttgcgctg cttccggatt cactttctct aagtacccta tggtttgggt tcgccaagct 120  
 cctggtaaag gtttggagtg ggttttctct atctctcctt ctggtggcct tactttttat 180  
 gctgactccg ttaaaggctg cttcactatc tctagagaca actctaagaa tactctctac 240  
 ttgcagatga acagcttaag ggctgaggac acggccgtgt attactgtgc gaaagcccgt 300  
 cggatgagaa gcctatggga ggcttttgat gtctggggcc aagggaccct ggtcacccgc 360  
 tcaagcg 367

<210> 156  
 <211> 122  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

<400> 156

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

<210> 157  
 <211> 340  
 <212> ADN  
 <213> Homo sapiens

<400> 157

```

gccatctgga tgaccagtc tccagactcc ctggctgtgt ctctgggcga gagggccacc      60
atcaactgca agtccagcca gagtggttta tacagctcca acaataagaa ctacttagct      120
tggtaccagc agaaaccagg acagcctcct aagctgctca ttactgggc atctaccgg      180
gaatccgggg tcctgaccg attcagtggc agcgggtctg ggacagattt cactctcacc      240

atcagcagcc tgcaggctga agatgtggca gtttattact gtcagcaata ttatagtact      300
cccatcacct tcggccaagg gacacgactg gagcttagac      340

```

<210> 158  
 <211> 113  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens  
  
 <400> 158

```

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

Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Lys Ser Ser Gln Ser Val Leu Tyr Ser
20           25           30

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

Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val
50           55           60

Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr
65           70           75           80

Ile Ser Ser Leu Gln Ala Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln
85           90           95

Tyr Tyr Ser Thr Pro Ile Thr Phe Gly Gln Gly Thr Arg Leu Glu Leu
100          105          110

```

**Arg**

<210> 159  
 <211> 367  
 <212> ADN  
 <213> Homo sapiens  
  
 <400> 159



# ES 2 456 296 T3

```

gaagttcaat tgtagagtc tggtagcggg cttgttcagc ctggtgggtc tttacgtott      60
tcttgcgctg cttccggatt cactttctct aagtacaaga tggagtgggt tcgccaagct      120
cctggtaaag gtttggagtg ggtttcttct atctctcctt ctggtggcct tactttttat      180
gctgactccg ttaaaggctg cttcactatc tctagagaca actctaagaa tactctctac      240
ttgcagatga acagcttaag ggctgaggac acggccgtgt attactgtgc gaaagcccg      300
cggatgagaa gcctatggga ggcttttgat gtctggggcc aagggacaat ggtcacccgc      360
tcaagcg                                         367

```

<210> 160  
 <211> 122  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens  
  
 <400> 160

```

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

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

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

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

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65              70              75              80

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

Ala Lys Ala Arg Arg Met Arg Ser Leu Trp Glu Ala Phe Asp Val Trp
          100             105             110

Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser
          115             120

```

<210> 161  
 <211> 340  
 <212> ADN  
 <213> Homo sapiens  
  
 <400> 161

```

gccatccaga tgacccagtc tccagactcc ctggctgtgt ctctgggcga gagggccacc      60
atcaactgca agtccagoca gagtgtttta tacagctcca acaataagaa ctacttagct      120
tggtaccagc agaaaccagg acagcctcct aagctgctca tttactgggc atctaccgg      180
gaatccgggg tccctgaccg attcagtggc agcgggtctg ggacagattt cactctcacc      240
atcagcagcc tgcaggctga agatgtggca gtttattact gtcagcaata ttatagtact      300
ccgtggacgt tgggccaagg gaccaaggtg gaaatcaagc      340

```

<210> 162  
 <211> 113  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens  
  
 <400> 162

```

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

```

```

Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Lys Ser Ser Gln Ser Val Leu Tyr Ser
          20           25           30

```

```

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

```

```

Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val
          50           55           60

```

```

Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr
65           70           75           80

```

```

Ile Ser Ser Leu Gln Ala Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln
          85           90           95

```

```

Tyr Tyr Ser Thr Pro Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile
          100          105          110

```

**Lys**

<210> 163  
 <211> 367  
 <212> ADN  
 <213> Homo sapiens  
  
 <400> 163

```

gaagttcaat tgtagagtc tggtagcgtt cttgttcagc ctggtgggtc tttacgtctt      60
tcttgccgtg cttccggatt cactttctct aagtagcgtt tgtcttgggt tcgccaagct      120
cctggtaaag gtttggagtg ggtttctctt atctctcctt ctggtggcct tactttttat      180
gctgactccg ttaaaggctg cttcactatc tctagagaca actctaagaa tactctctac      240
ttgcagatga acagcttaag ggctgaggac acggccgtgt attactgtgc gaaagcccgt      300
cggatgagaa gcctatggga ggcttttgat gtctggggcc aagggaccct ggtcaccgtc      360
tcaagcg                                         367

```

<210> 164  
 <211> 122  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens  
 <400> 164

```

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

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

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

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

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65              70              75              80

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

Ala Lys Ala Arg Arg Met Arg Ser Leu Trp Glu Ala Phe Asp Val Trp
100             105             110

Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115              120

```

<210> 165  
 <211> 322  
 <212> ADN  
 <213> Homo sapiens  
 <400> 165

gacatcgtga tgacccagtc tccatcctcc ctgtctgcat ctgtaggaga cagagtcacc 60  
 atcacttgcc gggcaagtca gagcattagc agctatttaa attggtatta gcagaaacca 120  
 gggaaagccc ctaagctcct gatctatgct gcatccagtt tgcaaagtgg ggtcccatca 180  
 aggttcagtg gcagtggatc tgggacagat ttcactctca ccatcagcag tctgcaacct 240  
 gaagattttg caacttacta ctgtcaacag agttacagta cccctctgac gttcggccaa 300  
 gggaccaagg tggaaatcaa gc 322

<210> 166  
 <211> 107  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens  
 <400> 166

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser Ser Tyr  
 20 25 30

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

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

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

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

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys  
 100 105

<210> 167  
 <211> 364  
 <212> ADN  
 <213> Homo sapiens  
 <400> 167

```

gaagttcaat tgtagagtc tggtagcgtt ctgttcagc ctggtggttc ttacgtctt      60
tcttgccgtg cttccggatt cactttctct aagtagata tgcattgggt tcgccaagct      120
cctggtaaag gtttgagtg ggtttctgtt atctctcctt ctggtggctg gacttcttat      180
gctgactccg ttaaaggctg cttcactatc tctagagaca actctaagaa tactctctac      240
ttgcagatga acagcttaag ggctgaggac accgccatgt attactgtgc gagggatgac      300
tacagtaaag gacgggatgc ttttgatatc tggggccaag ggaccacggt caccgtctca      360
agcg                                                                    364

```

<210> 168  
 <211> 121  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens  
 <400> 168

```

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

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

Asp Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35          40          45

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

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65          70          75          80

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

Ala Arg Asp Asp Tyr Ser Lys Gly Arg Asp Ala Phe Asp Ile Trp Gly
100         105         110

Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115          120

```

<210> 169  
 <211> 322  
 <212> ADN  
 <213> Homo sapiens  
 <400> 169

gatgttgtga tgacacagtc tccatcctcc ctgtctgcat ctgtaggaga cagagtcacc 60  
atcacttgcc gggcaagtca gagcattagc agctatttaa attggtatta gcagaaacca 120  
gggaaagccc ctaagctcct gatctatgct gcattccagtt tgcaaagtgg ggtcccatca 180  
aggttcagtg gcagtggatc tgggacagat ttactctca ccatcagcag tctgcaacct 240  
gaggattttg caacttacta ctgtcagcag agttacacta ccccgtaac ttttgccag 300  
gggaccaagc tggagatcaa ac 322

<210> 170  
<211> 107  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens  
<400> 170

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

<210> 171  
<211> 340  
<212> ADN  
<213> Homo sapiens  
<400> 171

```

gaagttcaat tgtagagtc tggtagcgtt cttgttcagc ctggtgggtc tttacgtctt      60
tcttgagctg cttccggatt caatttctct ggttacatta tgtggtgggt tcgccaagct      120
cctggtaaag gtttggagtg ggtttctgtt atctctcctt ctggtggcga tacttggtat      180
gctgactccg ttaaaggctg cttcactatc tctagagaca actctaagaa tactotctac      240
ttgcagatga acagcttaag ggctgaggac acggccgtgt attactgtgc cacagcggga      300
gactactggg gccagggcac cctggtcacc gtctcaagcg      340

```

<210> 172  
 <211> 113  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens  
  
 <400> 172

```

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

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

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

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

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65           70           75           80

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

Ala Thr Ala Gly Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser
100          105          110

```

Ser

<210> 173  
 <211> 322  
 <212> ADN  
 <213> Homo sapiens  
  
 <400> 173

gccatccaga tgaccagtc tccatcctcc ctgtctgcat ctgtaggaga cagagtcacc 60  
 atcacttgcc gggcaagtca gagcattagc agctatttaa attggtatta gcagaaacca 120  
 gggaaagccc ctaagctcct gatctatgct gcatccagtt tgcaaagtgg ggtcccatca 180  
 aggttcagtg gcagtggatc tgggacagat ttcactctca ccatcagcag tctgcaacct 240  
 gaagattttg caacttacta ctgtcaacag agttacagta cccccctcac ttccggcgga 300  
 gggaccaagg tggagatcaa ac 322

<210> 174  
 <211> 107  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

<400> 174

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

<210> 175  
 <211> 364  
 <212> ADN  
 <213> Homo sapiens

<400> 175



```

gaagttcaat tgtagagtc tggtagcggt cttgttcagc ctggtgggtc tttacgtctt      60
tcttgcgctg cttccggatt cactttctct aagtagcata tgcattgggt tcgccaagct      120
cctggtaaag gtttggagtg ggtttctgtt atctctcctt ctggtggctg gacttcttat      180
gctgactcog ttaaaggctg cttcactatc tctagagaca actctaagaa tactctctac      240
ttgcagatga acagcttaag ggctgaggac accgccatgt attactgtgc gagggatgac      300
tacagtaaag gacgggatgc ttttgatata tggggccaag ggaccctggt caccgtctca      360

agcg                                                                    364

```

<210> 176  
 <211> 121  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

<400> 176

```

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

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

Asp Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35              40              45

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

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65              70              75              80

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

Ala Arg Asp Asp Tyr Ser Lys Gly Arg Asp Ala Phe Asp Ile Trp Gly
100            105            110

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115              120

```

<210> 177  
 <211> 322  
 <212> ADN  
 <213> Homo sapiens

<400> 177

```

gaaattgtgt tgacacagtc tccatcctcc ctgtctgcat ctgtaggaga cagagtcacc      60
atcacttgcc gggcaagtca gagcattagc agctatttaa attggtatca acagaaacca      120
gggaaagccc ctaagctcct gatctatgct gcatccactt tgcaaagtgg ggtcccatca      180
aggttcagtg gcagtggatc tgggacagat ttcactctca ccatcagcag tctgcaacct      240
gaagattttg caacttacta ctgtcaacag agttacagta cccctccgac gttcggccaa      300
gggaccaagg tggaaatcaa ac                                              322

```

<210> 178  
 <211> 107  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens  
  
 <400> 178

```

Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1           5           10           15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser Ser Tyr
          20           25           30

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

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

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

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

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
          100          105

```

<210> 179  
 <211> 364  
 <212> ADN  
 <213> Homo sapiens  
  
 <400> 179

gaagttcaat tgtagagtc tggtagcggc cttgttcagc ctggtgggtc tttacgtctt 60  
 tcttgccgtg cttccggatt cactttctct aagtagcata tgcattgggt tgcccaagct 120  
 cctggtaaag gtttgagtg ggtttctgtt atctctcctt ctggtgggtg gacttcttat 180  
 gctgactccg ttaaaggctg cttcactatc tctagagaca actctaagaa tactctctac 240  
 ttgcagatga acagcttaag ggctgaggac accgccatgt attactgtgc gagggatgac 300  
 tacagtaaag gacgggatgc ttttgatatc tggggccaag ggacaatggt caccgtctca 360  
 agcg 364

<210> 180  
 <211> 121  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens  
 <400> 180

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

<210> 181  
 <211> 322  
 <212> ADN  
 <213> Homo sapiens  
 <400> 181

gacatcgtga tgacccagtc tccatcctcc ctgtctgcat ctgtaggaga cagagtcacc 60  
 atcacttgcc gggcaagtca gagcattagc agctatttaa attggtatta gcagaaacca 120  
 gggaaagccc ctaacctcct gatctatgct gcatccagtt tgcaaagtgg ggtcccatca 180  
 aggttcagtg gcagtggatc tgggacagat ttcactctca ccatcagcag tctgcaacct 240  
 gaagattttg caacttacta ctgtcaacag agttacagta cccctctgac gtcgggcaa 300  
 gggaccaagg tggaaatcaa ac 322

<210> 182  
 <211> 107  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens  
 <400> 182

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

<210> 183  
 <211> 364  
 <212> ADN  
 <213> Homo sapiens  
 <400> 183

# ES 2 456 296 T3

```

gaagttcaat tgtagagtc tggtagcggg cttgttcagc ctggtgggtc ttacgtctt      60
tcttgccgccg cttccggatt cactttctct aagtagcata tgcattgggt tcgccaagct    120
cctggtaaag gtttgagtg ggtttctgtt atctctcctt ctggtggctg gacttcttat     180
gctgactccg ttaaagggtcg cttcactatc tctagagaca actctaagaa tactctctac    240
ttgcagatga acagcttaag ggctgaggac accgccatgt attactgtgc gagggatgac     300
tacagtaaag gacgggatgc ttttgatata tggggccaag ggacaatggt caccgtctca    360
agcg                                                                    364

```

<210> 184  
 <211> 121  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens  
 <400> 184

```

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

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

Asp Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35          40          45

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

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65          70          75          80

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

Ala Arg Asp Asp Tyr Ser Lys Gly Arg Asp Ala Phe Asp Ile Trp Gly
100          105          110

Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser
115          120

```

<210> 185  
 <211> 322  
 <212> ADN  
 <213> Homo sapiens  
 <400> 185

gacatcgtga tgacccagtc tccatcttct gtgtctgcat ctgtaggaga cagagtcacc 60  
 atcacttgtc gggcgagtca gggattagc agctatttaa attggtatta gcagaaacca 120  
 gggaaagccc ctaagctcct gatctatgct gcatccagtt tgcaaagtgg ggtcccatca 180  
 aggttcagtg gcagtggatc tgggacagat ttcaactotca ccatcagcag totgcaacct 240  
 gaagattttg caacttacta ttgtcaacag agttacagta cccaatcac tttcggcgga 300  
 gggaccaagg tggagatcaa ac 322

<210> 186  
 <211> 107  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens  
 <400> 186

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

<210> 187  
 <211> 364  
 <212> ADN  
 <213> Homo sapiens  
 <400> 187

```

gaagttcaat tgtagagtc tggtagcgt cttgttcagc ctggtggttc ttacgtctt      60
tcttgcgctg cttccggatt cactttctct aagtagata tgcattgggt tcgccaagct      120
cctggtaaag gtttggagtg ggtttctgtt atctctcctt ctggtggctg gacttcttat      180
gctgactccg ttaaaggctg cttcactatc tctagagaca actctaagaa tactctctac      240
ttgcagatga acagcttaag ggctgaggac accgccatgt attactgtgc gagggatgac      300
tacagtaaag gacgggatgc ttttgatata tggggccaag ggaccctggt caccgtotca      360
agcg                                                                    364

```

<210> 188  
 <211> 121  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens  
  
 <400> 188

```

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

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

Asp Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
          35          40          45

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

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65          70          75          80

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

Ala Arg Asp Asp Tyr Ser Lys Gly Arg Asp Ala Phe Asp Ile Trp Gly
          100          105          110

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
          115          120

```

<210> 189  
 <211> 322  
 <212> ADN  
 <213> Homo sapiens  
  
 <400> 189

gaaacgacac tcacgcagtc tccatcctcc ctgtctgcat ctgtaggaga cagagtcacc 60  
atcacttgcc gggcaagtca gagcattagc agctatttaa attggtatta gcagaaacca 120  
gggaaagccc ctaagctcct gatctatgct gcatccagtt tgcaaagtgg ggtcccatca 180  
aggttcagtg gcagtggatc tgggacagat ttcaactctca ccatcagcag tctgcaacct 240  
gaagattttg caacttacta ctgtcaacag agttacagta cccctcggac gttcggccaa 300  
gggaccaagg tggaaatcaa gc 322

<210> 190  
<211> 107  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens  
<400> 190

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

<210> 191  
<211> 364  
<212> ADN  
<213> Homo sapiens  
<400> 191



```

gaagttcaat tgtagagtc tggtagcggt cttgttcagc ctggtgggtc tttacgtctt      60
tcttgcgctg cttccggatt cactttctct aagtaggata tgcattgggt tgcgcaagct      120
cctggtaaag gtttggagtg ggtttctgtt atctctcctt ctggtggctg gacttcttat      180
gctgactccg ttaaaggctg cttcactatc tctagagaca actctaagaa tactctctac      240
ttgcagatga acagcttaag ggctgaggac accgccatgt attactgtgc gagggatgac      300

tacagtaaag gacgggatgc ttttgatata tggggccaag ggaccctggt caccgtctca      360
agcg                                                                364

```

<210> 192  
 <211> 121  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

<400> 192

```

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

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

Asp Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
          35              40              45

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

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65              70              75              80

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

Ala Arg Asp Asp Tyr Ser Lys Gly Arg Asp Ala Phe Asp Ile Trp Gly
          100             105             110

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
          115             120

```

<210> 193  
 <211> 322  
 <212> ADN  
 <213> Homo sapiens

<400> 193

gaaatagtga tgacgcagtc tccatcctcc ctgtctgcat ctgtaggaga cagagtcacc 60  
atcacttgcc gggcaagtca gagcattagc agctatttaa attggtatta gcagaaacca 120  
gggaaagccc ctaagctcct gatctatgct gcatccagtt tgcaaagtgg ggtcccatca 180  
aggttcagtg gcagtggatc tgggacagat ttcactctca ccacagcag tctgcaacct 240  
gaagattttg caacttacta ctgtcaacag agttacagta ccccccctcac tttcggcgga 300  
gggaccaagg tggaaatcaa ac 322

<210> 194  
<211> 107  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens  
<400> 194

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

<210> 195  
<211> 364  
<212> ADN  
<213> Homo sapiens  
<400> 195

# ES 2 456 296 T3

```

gaagttcaat tgtagagtc tggtagcggg cttgttcagc ctggtgggtc ttacgtctt      60
tcttgcgctg cttccggatt cactttctct aagtagata tgcattgggt tcgccaagct      120
cctggtaaag gtttggagtg ggtttctgtt atctctcctt ctggtggctg gacttcttat      180
gctgactccg ttaaaggtag cttcactatc tctagagaca actctaagaa tactctctac      240
ttgcagatga acagcttaag ggctgaggac accgccatgt attactgtgc gagggatgac      300
tacagtaaag gacgggatgc ttttgatata tggggccaag ggaccacggt caccgtctca      360
agcg                                                                    364

```

<210> 196  
 <211> 121  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens  
 <400> 196

```

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

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

Asp Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35          40          45

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

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65          70          75          80

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

Ala Arg Asp Asp Tyr Ser Lys Gly Arg Asp Ala Phe Asp Ile Trp Gly
100         105         110

Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115          120

```

<210> 197  
 <211> 322  
 <212> ADN  
 <213> Homo sapiens  
 <400> 197

```

gccatccaga tgacccagtc tccatcctcc ctgtctgcat ctgtaggaga cagagtcacc      60
atcacttgcc gggcaagtca gagcattagc agctatttaa attgggtatta gcagaaacca      120
gggaaagccc ctaagctcct gatctatgct gcatccagtt tgcaaagtgg ggtcccatca      180
aggttcagtg gcagtggatc tgggacagat ttcactctca ccatcagcag tctgcaacct      240
gaagattttg caacttacta ctgtcaacag agttacagta cccccctcac tttcggcgga      300
gggaccaagg tggaaatcaa ac                                              322

```

<210> 198  
 <211> 107  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens  
  
 <400> 198

```

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser Ser Tyr
          20           25           30

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

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

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

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

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
          100          105

```

<210> 199  
 <211> 364  
 <212> ADN  
 <213> Homo sapiens  
  
 <400> 199

```

gaagttcaat tgtagagtc tggtagcgt cttgttcagc ctggtgggtc tttacgtctt      60
tcttgcgctg cttccggatt cactttctct aagtagata tgcattgggt tgcgcaagct      120
cccggtaaag gtttgagtg ggtttctgtt atctctctct ctggtgggtg gacttcttat      180
gctgactccg ttaaaggtcg cttcactatc tctagagaca actctaagaa tactctctac      240
ttgcagatga acagcctaag ggctgaggac accgccatgt attactgtgc gagggatgac      300
tacagtaaag gacgggatgc ttttgatatc tggggccaag ggaccacggt caccgtctca      360
agcg                                                                    364

```

<210> 200  
 <211> 121  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens  
 <400> 200

```

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

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

Asp Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35              40              45

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

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65              70              75              80

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

Ala Arg Asp Asp Tyr Ser Lys Gly Arg Asp Ala Phe Asp Ile Trp Gly
100              105              110

Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115              120

```

<210> 201  
 <211> 322  
 <212> ADN  
 <213> Homo sapiens  
 <400> 201

gccatccagt tgaccagtc tccatcctcc ctgtotgcat ctgtaggaga cagagtcacc 60  
 atcacttgcc gggcaagtca gagcattagc agctatttaa attggtatta gcagaaacca 120  
 gggaaagccc ctaagctcct gatctatgct gcatccagtt tgcaaagtgg ggtcccatca 180  
 aggttcagtg gcagtggatc tgggacagat ttcactctca ccatcagcag tctgcaacct 240  
 gaagattttg caacttacta ctgtcaacag agttacagta cccccctcac tttcggcgga 300  
 gggaccaaag tggatatcaa ac 322

<210> 202  
 <211> 107  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens  
 <400> 202

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

<210> 203  
 <211> 364  
 <212> ADN  
 <213> Homo sapiens  
 <400> 203

```

gaagttcaat tgtagagtc tggtagcgtt cttgttcagc ctggtggttc ttacgtctt      60
tcttgcgctg cttccgatt cactttctct aagtagcata tgcattgggt tcgccaagct      120
cctggtaaag gtttgagtg ggtttctgtt atctctcctt ctggtggttg gacttcttat      180
gccgactccg ttaaaggtag cttcactatc tctagagaca actctaagaa tactctctac      240
ttgcagatga acagcttaag ggctgaggac accgccatgt attactgtgc gagggatgac      300
tacagtaaag gacgggatgc ttttgatata tggggccaag ggaccacggt caccgtctca      360
agcg                                                                    364

```

<210> 204  
 <211> 121  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens  
 <400> 204

```

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

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

Asp Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35          40          45

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

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65          70          75          80

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

Ala Arg Asp Asp Tyr Ser Lys Gly Arg Asp Ala Phe Asp Ile Trp Gly
100         105         110

Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115          120

```

<210> 205  
 <211> 322  
 <212> ADN  
 <213> Homo sapiens  
 <400> 205

gatgttgtga tgactcagtc tccactctcc ccgtctgcat ctgtgggaga cagagtcgcc 60  
 atcacttgcc gcgcaagtca gagcatcgac acctatttaa attggtatca gcagaaacca 120  
 gggacagccc ctaagctcct gatctatgct gcatccagtt tgcaaagtgg ggtcccatca 180  
 aggttcagtg gcagtggatc tgggacagat ttcactctca ccatcagcag tctgcaacct 240  
 gaggattttg caacttacta ctgtcaacag agttacagta ccccgatcac cttcggccaa 300  
 gggacacgac tggagcttag ac 322

<210> 206  
 <211> 107  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens  
 <400> 206

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

<210> 207  
 <211> 364  
 <212> ADN  
 <213> Homo sapiens  
 <400> 207



gaagttcaat tgtagagtc tggtagcgt cttgttcagc ctggtggtc tttacgtctt 60  
 tcttgcgctg cttccggatt cactttctct aagtagata tgcattgggt tcgccaagct 120  
 cctggtaaag gtttggagtg ggtttctgtt atctctcctt ctggtggctg gacttcttat 180  
 gctgactccg ttaaaggctg cttcactatc tctagagaca actctaagaa tactctctac 240  
 ttgcagatga acagcttaag ggctgaggac accgccatgt attactgtgc gagggatgac 300  
  
 tacagtaaag gacgggatgc ttttgatata tggggccaag ggacaatggt caccgtctca 360  
 agcg 364

<210> 208  
 <211> 121  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

<400> 208

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

<210> 209  
 <211> 322  
 <212> ADN  
 <213> Homo sapiens

<400> 209

```

gccatctgga tgaccacgtc tccatcctcc ctgtctgcat ctgtaggaga cagagtcacc      60
atcacttgcc gggcaagtca gagcattagc agctatttaa attggtatta gcagaaacca      120
gggaaagccc ctaagctcct gatctatgct gcatccaagt tggaagacgg ggtcccatca      180
agattcagtg gcagtggagc tgggacagat ttcactctca ccatcagcag actggagcct      240
gaagattttg caacttacta ctgtcaacag agttacagta ccccgctcac ttccggcgga      300
gggaccaagg tggaaatcaa ac                                             322

```

<210> 210  
 <211> 107  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

<400> 210

```

Ala Ile Trp Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1           5           10           15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser Ser Tyr
          20           25           30

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

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

Ser Gly Ala Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu Pro
          65           70           75           80

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

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
          100           105

```

<210> 211  
 <211> 364  
 <212> ADN  
 <213> Homo sapiens

<400> 211

```

gaagttcaat tgtagagtc tggtagcggc cttgttcagc ctggtgggtc tttacgtctt      60
tcttgcgctg cttccggact cactttctct aagtagcata tgcattgggt togccaagct      120
cctggtaaag gtttggagtg ggtttctgtt atctctcctt ctggtgggtg gacttcttat      180
gctgactccg ttaaagggtc cttcactatc tctagagaca actctaagaa tactctctac      240
ttgcagatga acagcttaag ggctgaggac accgccatgt attactgtgc gagggatgac      300
tacagtaaag gacgggatgc ttttgatatc tggggccaag ggaccacggt caccgtctca      360
agcg                                                                    364

```

<210> 212  
 <211> 121  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens  
 <400> 212

```

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

```

```

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

```

```

Asp Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
        35              40              45

```

```

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

```

```

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65              70              75              80

```

```

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

```

```

Ala Arg Asp Asp Tyr Ser Lys Gly Arg Asp Ala Phe Asp Ile Trp Gly
                100              105              110

```

```

Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
        115              120

```

<210> 213  
 <211> 331  
 <212> ADN  
 <213> Homo sapiens  
 <400> 213

cagcctgtgc tgactcagcc accctcagcg tctgggaccc ccgggcagag ggtcaccatc 60  
tcttgttctg gaagcagctc caacatcgga agcaatactg tgaactggta ccagcagctc 120  
ccaggaatgc cccccaaggt cctcatctct ggtaataatc agcggccccc cggggtccct 180  
ggccgattct ctggctccaa gtctggcacc tcagcctccc tggccatcag tggcctccag 240  
tctgaggatg aggctgatta tcaactgtaca gcctgggatg acaacctgaa tggtcgggta 300  
ttcggcggag gcaccagct gaccgtctc g 331

<210> 214  
<211> 110  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 214

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

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

Thr Val Asn Trp Tyr Gln Gln Leu Pro Gly Met Pro Pro Lys Val Leu  
35 40 45

Ile Ser Gly Asn Asn Gln Arg Pro Pro Gly Val Pro Gly Arg Phe Ser  
50 55 60

Gly Ser Lys Ser Gly Thr Ser Ala Ser Leu Ala Ile Ser Gly Leu Gln  
65 70 75 80

Ser Glu Asp Glu Ala Asp Tyr His Cys Thr Ala Trp Asp Asp Asn Leu  
85 90 95

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

<210> 215  
<211> 364  
<212> ADN  
<213> Homo sapiens

<400> 215

```

gaagttcaat tgtagagtc tggtagcggt cttgttcagc ctggtggttc ttacgtctt      60
tcttgcgctg cttccggatt cactttctct gattacotta tggtttgggt tcgccaagct      120
cctggtaaag gtttgagtg ggtttcttat atctctctt ctggtggctg gactgcttat      180
gctgactcgg ttaaaggtag cttcactatc tctagagaca actctaagaa tactctctac      240
ttgcagatga acagcttaag ggctgaggac actgcagctt actattgtgc gagagtgggt      300
gaactacggg ccggcgacgc ttttgatata tggggccaag gcacctggt caccgtctca      360
agcg                                                                    364

```

<210> 216  
 <211> 121  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens  
 <400> 216

```

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

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

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

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

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65              70              75              80

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

Ala Arg Val Val Glu Leu Arg Ala Gly Asp Ala Phe Asp Ile Trp Gly
100             105             110

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115             120

```

<210> 217  
 <211> 322  
 <212> ADN  
 <213> Homo sapiens  
 <400> 217

```

gccatccgga tgaccagtc tccatcctcc ctgtctgcat ctgtaggaga cagagtcacc      60
atcaattgcc gggcaagtca gagcattagc agctatttaa attggtatta gcagaaacca      120
gggaaagccc ctaagctcct gatctatgct gcatccagtt tgcaaagtgg ggtcccatca      180
aggttcagtg gcagtggatc tgggacagat ttcactctca ccatcagcag tctgcaacct      240
gaagattttg caacttacta ctgtcaacag agttacagta ccccgctcac tttcggcgga      300
gggaccaagg tggagatcaa ac                                              322

```

<210> 218  
 <211> 107  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens  
  
 <400> 218

```

Ala Ile Arg Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1           5           10           15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser Ser Tyr
          20           25           30

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

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

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

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

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
          100          105

```

<210> 219  
 <211> 364  
 <212> ADN  
 <213> Homo sapiens  
  
 <400> 219

```

gaagttcaat tgtagagtc tggtagcggc cttgttcagc ctggtgggtc ttacgtctt      60
tcttgccgtg cttccggatt cactttctct aagtagata tgcattgggt tcgccaagct      120
cctggtaaag gtttgagtg ggtttctgtt atctctcctt ctggtggctg gacttcttat      180
gctgactccg ttaaaggtag cttcactatc tctagagaca actctaagaa tactctctac      240
ttgcagatga acagcttaag ggctgaggac accgccatgt attactgtgc gagggatgac      300
tacagtaaag gacgggatgc ttttgatata tggggccaag ggacaatggt caccgtctca      360
agcg                                                                    364

```

<210> 220  
 <211> 121  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens  
 <400> 220

```

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

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

Asp Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35          40          45

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

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65          70          75          80

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

Ala Arg Asp Asp Tyr Ser Lys Gly Arg Asp Ala Phe Asp Ile Trp Gly
100         105         110

Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser
115          120

```

<210> 221  
 <211> 322  
 <212> ADN  
 <213> Homo sapiens  
 <400> 221

```

aacatccaga tgaccagtc tccatcctcc ctgtctgcat ctgtaggaga cagagtcacc      60
atcaattgcc gggcaagtca gaccattagc acctatttaa attggtatca gcagaaacca      120
gggaaagccc ctaagctcct gatctatggt gcatccagtt tgcaaagtgg ggtcccatca      180
aggttcagtg gcagtggatc tgggacagat ttcactctca ccatcagcag tctgcaacct      240
gaagattttg caacttacta ctgtcaacag agttacagta cccccgtgac gttcggccaa      300
gggaccaagg tggaaatcaa gc                                              322

```

&lt;210&gt; 222

&lt;211&gt; 107

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Homo sapiens

&lt;400&gt; 222

```

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

```

```

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Thr Ile Ser Thr Tyr
                20              25              30

```

```

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

```

```

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

```

```

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

```

```

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

```

```

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100              105

```

&lt;210&gt; 223

&lt;211&gt; 364

&lt;212&gt; ADN

&lt;213&gt; Homo sapiens

&lt;400&gt; 223



```

gaagttcaat tgtagagtc tggtagcgt cttgttcagc ctggtgggtc tttacgtctt      60
tcttgcgctg cttccggatt cactttctct aagtagcata tgcattgggt tgcaccaagct    120
cctggtaaag gtttggagtg ggtttctgtt atctctcctt ctggtgggtg gacttcttat     180
gctgactccg ttaaaggctg cttcactatc tctagagaca actctaagaa tactctctac     240

ttgcagatga acagcttaag ggctgaggac accgccatgt attactgtgc gagggatgac     300
tacagtaaag gacgggatgc ttttgatata tggggccaag ggaccctggt cacogtctca     360
agcg                                                                    364

```

<210> 224  
 <211> 121  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

<400> 224

```

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

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

Asp Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
                35              40              45

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

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65              70              75              80

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

Ala Arg Asp Asp Tyr Ser Lys Gly Arg Asp Ala Phe Asp Ile Trp Gly
                100             105             110

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115              120

```

<210> 225  
 <211> 322  
 <212> ADN  
 <213> Homo sapiens

<400> 225

gacatccaga tgacccagtc tccatcctcc ctgtctgcat ctgtaggaga cagagtcacc 60  
atcaattgcc gggcaagtca gagcattagc agctatttaa attggtatca gcagaaacca 120  
gggaaagccc ctaagctcct gatctatgct gcattccagtt tgcaaagtgg ggtcccatca 180  
aggttcagtg gcagtggatc tgggacagat ttcaactctca ccatcagcag tctgcaacct 240  
gaagattttg caacttacta ctgtcaacag agttacagta cccctcggac gttcggccaa 300  
gggaccaagg tggaaatcaa ac 322

<210> 226  
<211> 107  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens  
<400> 226

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

<210> 227  
<211> 364  
<212> ADN  
<213> Homo sapiens  
<400> 227

```

gaagttcaat tgttagagtc tggtagcggt cttgttcagc ctggtgggtc ttacgtctt      60
tcttgccgtg cttccggatt cactttctct cgttacgata tggagtgggt tcgccaagct      120
cctggtaaag gtttggagtg ggtttcttct atctctcctt ctggtggctg gacttcttat      180
gctgactccg ttaaaggctg cttcactatc tctagagaca actctaagaa tactctctac      240
ttgcagatga acagcttaag ggctgaggac acggccgtgt attactgtgc gagagatcat      300
agtggctacg attctgaata ctttgactac tggggccagg gaaccctggt caccgtctca      360
agcg                                                                    364

```

<210> 228  
 <211> 121  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens  
 <400> 228

```

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

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

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

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

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65              70              75              80

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

Ala Arg Asp His Ser Gly Tyr Asp Ser Glu Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly
100             105             110

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115              120

```

<210> 229  
 <211> 319  
 <212> ADN  
 <213> Homo sapiens  
 <400> 229

gacatcgtga tgaccacagtc tccatccctcc ctgtctgcat ctgtaggaga cagagtcacc 60  
atcacttgcc gggcaagtca gagcattagc agctatttaa attggtatca gcagaaacca 120  
gggaaagccc ctaagctcct gatctatgct gcacccaatt tgcaaagtgg ggtcccatca 180  
aggttcagtg gcagtggatc tgggacagat ttcactctca ccatcagtag tctgcaacgt 240  
gaagattttg caacttacta ctgtcaacag agttacagtg ccccgacgtt cggccaaggg 300  
accaaggtgg aaatcaagc 319

<210> 230  
<211> 106  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 230

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser Ser Tyr  
20 25 30

Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile

35 40 45

Tyr Ala Ala Ser Asn Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly  
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Arg  
65 70 75 80

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

Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys  
100 105

<210> 231  
<211> 364  
<212> ADN  
<213> Homo sapiens

<400> 231

```

gaagttcaat tgtagaatc tggtagcggt cttgttcagc ctggtgggtc tttacgtctt      60
tcttgcgctg cttccggatt cactttctct aagtagata tgcattgggt tgcccaagct      120
cctggtaaag gtttgagtg ggtttctgtt atctctcctt ctggtggctg gacttcttat      180
gctgactccg ttaaaggctg cttcactatc tctagagaca actctaagaa tactctctac      240
ttgcagatga acagcttaag ggctgaggac accgccatgt attactgtgc gagggatgac      300
tacagtaaag gacgggatgc ttttgatata tggggccaag ggaacaatggt caccgtctca      360
agcg                                                                    364

```

<210> 232  
 <211> 121  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens  
 <400> 232

```

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

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

Asp Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
          35          40          45

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

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65          70          75          80

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

Ala Arg Asp Asp Tyr Ser Lys Gly Arg Asp Ala Phe Asp Ile Trp Gly
          100          105          110

Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser
          115          120

```

<210> 233  
 <211> 331  
 <212> ADN  
 <213> Homo sapiens  
 <400> 233

cagtctgtgc tgacgcagcc gccctcagcg tctgggaccc ccgggcagag ggtcaccatc 60  
tcttgttctg gaagcagctc caacatcgga agcaatcctg ttaactggta ccagcaactc 120  
ccaggaacgg cccccaact cctcatctat agtaataggc agcggccctc aggggtccct 180  
gaccgattct ctggctccag gtctggcacc tcaggctccc tggccatcag tggactccag 240  
tctgaggatg aggcggatta ctactgtgca acatgggatg acagcctgaa tggttgggtg 300  
ttcggcggag gcacccagct gaccgtcctc g 331

<210> 234  
<211> 110  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens  
<400> 234

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

100 105 110

<210> 235  
<211> 340  
<212> ADN  
<213> Homo sapiens  
<400> 235

```

gaagttcaat tgtagagtc tggtaggggt cttgttcagc ctggtgggtc ttacgtctt      60
tcttgcgctg cttccggatt cactttctct ggtagacatta tgggtgggtc tggccaagct    120
cctggtaaag gtttgagtg ggtttctgtt atctctcctt ctggtggcga tacttggtat     180
gctgactcog ttaaaggtag cttcactatc tctagagaca actctaagaa tactctctac     240
ttgcagatga acagcttaag ggctgaggac acggccgtgt attactgtgc cacagcggga     300
gactactggg gccagggcac cctggtcacc gtctcaagcg                             340

```

<210> 236  
 <211> 113  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens  
 <400> 236

```

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

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

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

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

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65              70              75              80

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

Ala Thr Ala Gly Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser
100            105            110

```

Ser

<210> 237  
 <211> 322  
 <212> ADN  
 <213> Homo sapiens  
 <400> 237

gatgttgtga tgactcagtc tccactctcc ctgtctgcat ctgtaggaga cagagtcacc 60  
atcacttgcc gggcaagtca gaccattagc aggtatttaa attggtatca gcagaaacca 120  
gggacagccc ctaagctcct gatctatgct gcattccagtt tgcaaagtgg ggtcccatca 180  
aggttcagtg gcagtggatc tgggacagat ttactctca ccatcagcag tctgcaacct 240  
gaagattttg caacttacta ctgtcaacag agttacagta cccctccaac gttcggccaa 300  
gggaccaagg tggaaatcaa ac 322

<210> 238  
<211> 107  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 238

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

<210> 239  
<211> 364  
<212> ADN  
<213> Homo sapiens

<400> 239



```

gaagttcaat tgtagagtc tggtagcggc cttgttcagc ctggtgggtc tttacgtctt      60
tcttgcgctg cttccggatt cactttctct aagtagcata tgcattgggt tggccaagct      120
cctggtaaag gtttgagtg ggtttctgtt atctctcctt ctggtggctg gacttcttat      180
gctgactcog ttaaaggctg cttcactatc tctagagaca actctaagaa tactctctac      240
ttgcagatga acagcttaag ggctgaggac accgccatgt attactgtgc gagggatgac      300

tacagtaaag gacgggatgc ttttgatata tggggccaag ggacaatggt caccgtctca      360
agcg                                                                    364

```

<210> 240  
 <211> 121  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

<400> 240

```

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

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

Asp Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35              40              45

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

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65              70              75              80

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

Ala Arg Asp Asp Tyr Ser Lys Gly Arg Asp Ala Phe Asp Ile Trp Gly
100            105            110

Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser
115              120

```

<210> 241  
 <211> 322  
 <212> ADN  
 <213> Homo sapiens

<400> 241

gccaaccaga tgaccacagtc tccatcctcc ctgtctgcat ctgtaggaga cagagtcacc 60  
 atcacttgcc gggcaagtca gagcattagc agctatttaa attggtatca gcagaaacca 120  
 gggaaagccc ctaaactcct gatccatgct gcatccaatt tgcagagtgg ggtcccatca 180  
 aggttcagtg gcagtggatc tgggacagat ttcactctca ccatcagcag tctgcaacct 240  
 gaagattttg caacttacta ctgtcaacag agttacagta cccctctcac tttcggcgga 300  
 gggaccaagg tggagatcaa gc 322

<210> 242  
 <211> 107  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

<400> 242

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

<210> 243  
 <211> 355  
 <212> ADN  
 <213> Homo sapiens

<400> 243

gaagttcaat tgtagagtc tggtagcgt cttgttcagc ctggtggttc ttacgtctt 60  
 tcttgcgctg cttccggatt cactttctct cattacgaga tgggttgggt tcgccaagct 120  
 cctggtaaag gtttgagtg ggtttcttat atctcttctt ctggtggtg gactgcttat 180  
 gctgactccg ttaaaggctg cttcactatc tctagagaca actctaagaa tactctctac 240  
 ttgcagatga acagcttaag ggctgaggac acggcgtgt attactgtgc aaggattggc 300  
 tacgcagatg cttttgatat ctggggccaa gggaccacgg tcaccgtctc aagcg 355

<210> 244  
 <211> 118  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens  
 <400> 244

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

<210> 245  
 <211> 331  
 <212> ADN  
 <213> Homo sapiens  
 <400> 245

cagagcgaat tgactcagcc accctcagcg tctgggaccc ccgggcagag ggtcaccatc 60  
tcttgttctg gaagcagctc caacatcgga aggaatcctg taaactggta ccagcacctc 120  
ccaggaacgg cccccaaact cctcatctat ggtgataatc agcggccctc aggggtccct 180  
gaccgattct ctggctccag gtctggcacc tcagcctccc tggccatcag tgggctccag 240  
tctgaggatg aggctgatta ttactgtgca gcatgggatg acagcctgaa tgggtgtggta 300  
ttcggcggag ggaccaagct gaccgtccta g 331

<210> 246  
<211> 110  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 246

Gln Ser Glu Leu Thr Gln Pro Pro Ser Ala Ser Gly Thr Pro Gly Gln  
1 5 10 15

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

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

Ile Tyr Gly Asp Asn Gln Arg Pro Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser  
50 55 60

Gly Ser Arg Ser Gly Thr Ser Ala Ser Leu Ala Ile Ser Gly Leu Gln  
65 70 75 80

Ser Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ala Ala Trp Asp Asp Ser Leu  
85 90 95

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

<210> 247  
<211> 340  
<212> ADN  
<213> Homo sapiens

<400> 247

# ES 2 456 296 T3

```

gaagttcaat tgtagagtc tggtagcgtt cttgttcagc ctggtggttc ttacgtctt      60
tcttgcgctg cttccggatt cactttctct ggttacatta tgggtgggtt tggccaagct    120
cctggtaaag gtttggagtg ggtttctgtt atctctcctt ctggtggcga tacttggtat    180
gctgactccg ttaaaggctg cttcactatc tctagagaca actctaagaa tactctctac    240
ttacagatga acagcttaag ggctgaggac acggccgtgt attactgtgc cacagcggga    300
gactactggg gccagggcac cctggtcacc gtctcaagcg                          340

```

<210> 248  
 <211> 113  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens  
  
 <400> 248

```

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

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

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

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

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65           70           75           80

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

Ala Thr Ala Gly Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser
          100          105          110

```

**Ser**

<210> 249  
 <211> 322  
 <212> ADN  
 <213> Homo sapiens  
  
 <400> 249

# ES 2 456 296 T3

```

gccatccaga tgaccacgac tocagactcc ctgtctgcat ctgtaggaga cagagtcacc      60
atcacttgcc gggcaagtca gagtattaga agctatttaa attggtatca gcagaaacca      120
gggaaagccc ctaagctcct gatctatgct gcatccagtt tgcaaagtgg ggtcccatca      180
aggttcagtg gcagtggatc tgggacagat ttcactctca ccatcagcag tctgcaacct      240
gaagattttg caacttacta ctgtcaacag agttacagta cccctcggac gttcggccaa      300
gggaccaagg tggaaatcaa ac                                              322

```

<210> 250  
 <211> 107  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens  
 <400> 250

```

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser Ser Tyr
          20           25           30

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

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

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

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

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
          100          105

```

<210> 251  
 <211> 364  
 <212> ADN  
 <213> Homo sapiens  
 <400> 251

```

gaagttcaat tgtaggggtc tggtaggggt cttgttcagc ctggtaggtc ttacgtctt      60
tcttgcgctg cttccggatt cactttctct cgttacgata tggagtgggt tcgccaagct      120
cctggtaaag gtttggagtg ggtttcttct atctctcctt ctggtaggtg gacttcttat      180
gctgactccg ttaaagggtc cttcactatc tctagagaca actctaagaa tactctctac      240
ttgcagatga acagcttaag ggctgaggac acggccgtgt attactgtgc gagagatcat      300
agtggctacg attctgaata ctttgactac tggggccagg ggaccctggt caccgtctca      360
agcg                                                                    364

```

<210> 252  
 <211> 121  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens  
  
 <400> 252

```

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

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

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

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

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65          70          75          80

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

Ala Arg Asp His Ser Gly Tyr Asp Ser Glu Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly
100         105         110

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115          120

```

<210> 253  
 <211> 319  
 <212> ADN  
 <213> Homo sapiens  
  
 <400> 253

gacatcgtga tgacccagtc tccatcctcc ctgtctgcat ctgtaggaga cagagtcacc 60  
 atcacttgcc gggcaagtca gagcattagc agctatttaa attggtatca gcagaaacca 120  
 gggaaagccc ctaagctcct gatctatgct gcatccagtt tgcaaagtgg ggtcccatca 180  
 aggttcagtg gcagtggatc tgggacagat ttcactctca ccatcagcag tctgcaacct 240  
 gaagattttg caacttacta ctgtcaacag agttacagtg ccccgacgtt cggccaaggg 300  
 accaaggtgg aaatcaagc 319

<210> 254  
 <211> 106  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens  
 <400> 254

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

<210> 255  
 <211> 364  
 <212> ADN  
 <213> Homo sapiens  
 <400> 255



gaagttcaat tgtagagtc tggtagcggg cttgttcagc ctggtgggtc tttacgtctt 60  
tcttgcgctg cttccggatt cactttctct aagtagata tgcattgggt tgcccaagct 120  
cctggtaaag gtttgagtg ggtttctgtt atctctcctt ctggtggctg gacttcttat 180  
gctgactccg ttaaaggctg cttcactatc tctagagaca actctaagaa tactctctac 240  
ttgcagatga acagcttaag ggctgaggac accgccatgt attactgtgc gagggatgac 300  
tacagtaaag gacgggatgc ttttgatata tggggccaag ggaccctggt caccgtctca 360  
agcg 364

<210> 256  
<211> 121  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 256

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

<210> 257  
<211> 322  
<212> ADN  
<213> Homo sapiens

<400> 257

gccatccgga tgaccagtc tccatcctcc ctgtctgcat ctgtaggaga cagagtcacc 60  
 atcaattgcc gggcaagtca gagcattagc agctatttaa attggtatta gcagaaacca 120  
 gggaaagccc ctaagctcct gatctatgct gcatccagtt tgcaaagtgg ggtcccatca 180  
 aggttcagtg gcagtggatc tgggacagat ttcactctca ccatcagcag tctgcaacct 240  
 gaagattttg caacttacta ctgtcaacag agttacagta ccccccctcac ttccggcgga 300  
 gggaccaagc tgaccgtcct ag 322

<210> 258  
 <211> 107  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

<400> 258

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

<210> 259  
 <211> 364  
 <212> ADN  
 <213> Homo sapiens

<400> 259

```

gaagttcaat tgtagagtc tggtagcgt cttgttcagc ctggtgggtc tttacgtctt      60
tcttgogctg cttcoggatt cactttctct aagtagcata tgcattgggt tggccaagct      120
cctggtaaag gtttggagtg ggtttctgtt atctctcctt ctggtgggtg gacttcttat      180
gctgactccg ttaaaggctg cttcactatc tctagagaca actctaagaa tactctctac      240
ttgcagatga acagcttaag ggctgaggac accgccatgt attactgtgc gagggatggc      300
tacagtaaag gacgggatgc ttttgatatc tggggccaag gcaccctggt caccgtctca      360
agcg                                                                    364

```

<210> 260  
 <211> 121  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

<400> 260

```

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

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

Asp Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35          40          45

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

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65          70          75          80

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

Ala Arg Asp Gly Tyr Ser Lys Gly Arg Asp Ala Phe Asp Ile Trp Gly
100         105         110

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115          120

```

<210> 261  
 <211> 322  
 <212> ADN  
 <213> Homo sapiens

<400> 261

```

gacatccagt tgaccagtc tccatcctcc ctgtctgcat ctctgggaga cagagtcacc      60
atcacttgcc gggcaagtga gagtattagg ggctatttaa attggtatca gcagaaacca      120
gggaaagccc ctaagctcct gatctatgct gcctccagtt tgcaaagtgg ggtcccatca      180
aggttcagtg gcagtggatc tgggacagat ttcactotca ccatcagcag tctgcaacct      240
gaagattttg caacttactt ctgtcaacag agttacagta ccccttacac ttttggccag      300
gggaccaagc tggagatcaa ac                                              322

```

<210> 262  
 <211> 107  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens  
  
 <400> 262

```

Asp Ile Gln Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Leu Gly
1           5           10           15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Glu Ser Ile Arg Gly Tyr
          20           25           30

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

Tyr Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly

          50           55           60

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

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

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
          100          105

```

<210> 263  
 <211> 364  
 <212> ADN  
 <213> Homo sapiens  
  
 <400> 263

```

gaagttcaat tgtagagtc tggtagcgtt cttgttcagc ctggtgggtc tttacgtctt      60
tcttgogctg cttccggatt cactttctct aagtaggata tgcattgggt tcgccaagct      120
cctggtaaag gtttggagtg ggtttctgtt atctctcctt ctggtggctg aacttcttat      180
gctgactccg ttaaaggctg cttcactatc tctagagaca actotaagaa tactctctac      240
ttgcagatga acagcttaag ggctgaggac accgccatgt attactgtgc gagggatgac      300
tacagtaaag gacgggatgc ttttgatata tggggccaag ggaccctggt caccgtctca      360
agcg                                                                    364

```

<210> 264  
 <211> 121  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens  
 <400> 264

```

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

```

```

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

```

```

Asp Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35              40              45

```

```

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

```

```

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65              70              75              80

```

```

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

```

```

Ala Arg Asp Asp Tyr Ser Lys Gly Arg Asp Ala Phe Asp Ile Trp Gly
100              105              110

```

```

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115              120

```

<210> 265  
 <211> 322  
 <212> ADN  
 <213> Homo sapiens  
 <400> 265

```
gccatccagt tgaccagtc tccatcttct gtgtctgcat ctgtaggaga cagagtcacc      60
atcacttgcc gggcaagtca gagcattagc agctatttaa attggtatca gcagaaacca      120
gggaaagccc ctaagctcct gatctatgct gcatccagtt tgcaaagtgg ggtcccatca      180
aggttcagtg gcagtggatc tgggacagat ttcactctca ccatcagcag tctgcaacct      240
gaagattttg caacttacta ctgtcaacag agttacagta ccccgctcac tttcggcgga      300
gggaccaagc tggagatcaa ac                                              322
```

<210> 266  
 <211> 107  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens  
 <400> 266

```
Ala Ile Gln Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ser Val Ser Ala Ser Val Gly
 1              5              10              15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser Ser Tyr
          20              25              30

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

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

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

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

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
          100              105
```

<210> 267  
 <211> 364  
 <212> ADN  
 <213> Homo sapiens  
 <400> 267

```

gaagttcaat tgtagagtc tggtagcgt cttgttcagc ctggtggttc ttacgtctt      60
tcttgcgctg cttccggatt cactttctct aagtagata tgcattgggt togccaagct    120
cctggtaaag gtttgagtg ggtttctgtt atctctcctt ctggtggtg gacttcttat    180
gctgactccg ttaaaggctg cttcactatc tctagagaca actctaagaa tactctctac    240
ttgcagatga acagottaag ggctgaggac accgccatgt attactgtgc gagggatgac    300
tacagtaaag gacgggatgc ttttgatatc tggggccaag ggaccctggt caccgtctca    360
agcg                                                                    364

```

<210> 268  
 <211> 121  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

<400> 268

```

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

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

Asp Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35          40          45

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

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65          70          75          80

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

Ala Arg Asp Asp Tyr Ser Lys Gly Arg Asp Ala Phe Asp Ile Trp Gly
100         105         110

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115          120

```

<210> 269  
 <211> 322  
 <212> ADN  
 <213> Homo sapiens

<400> 269

gatgttgtga tgacacagtc tccatcctcc ctgtctgcat ctgtaggaga cagagtcacc 60  
 atcacttgcc gggcaagtca gagcattagc agctatttaa attggtatta gcagaaacca 120  
 gggaaagccc ctaagctcct gatctatgct gcatccagtt tgcaaagtgg ggtcccatca 180  
 aggttcagtg gcagtggatc tgggacagat ttcactctca ccatcagcag tctgcaacct 240  
 gaagattttg caacttacta ctgtcaacag agttacagta cccccctcac tttcggcgga 300  
 gggaccaagc tggagatcaa ac 322

<210> 270  
 <211> 107  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

<400> 270

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

<210> 271  
 <211> 364  
 <212> ADN  
 <213> Homo sapiens

<400> 271



```

gaagttcaat tgtagagtc tggtagcgtt cttgttcagc ctggtggttc tttacgtctt      60
tcttgcgctg cttccggatt cactttctct aagtaggata tgcattgggt tcgccaagct      120
cctggtaaag gtttggagtg ggtttctgtt atctctcctt ctggtggttg gacttcttat      180
gctgactccg ttaaaggctg cttcactatc tctagagaca actctaagaa tactctctac      240
ttgcagatga acagcttaag ggctgaggac accgccatgt attactgtgc gagggatgac      300
tacagtaaag gacgggatgc ttttgatata tggggccaag ggacaatggt caccgtctca      360

agcg                                                                    364

```

<210> 272  
 <211> 121  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens  
  
 <400> 272

```

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

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

Asp Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
          35           40           45

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

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65           70           75           80

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

Ala Arg Asp Asp Tyr Ser Lys Gly Arg Asp Ala Phe Asp Ile Trp Gly
          100          105          110

Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser
          115          120

```

<210> 273  
 <211> 331  
 <212> ADN  
 <213> Homo sapiens  
  
 <400> 273

cagtctgtgc tgacgcagcc gccctcagcg tctgggaccc ccgggcagag ggtcaccatc 60  
tcttgttctg gaagcagctc caacatcgga agtaataatg tcaactggta ccagcaactc 120  
ccaggaacgg ccccccact cctcatctac agtaatgatc agcggccctc aggggtccct 180  
gaccgattct ctggctccag gtctggcacc tcaggctccc tggccatcag tggactccag 240  
tctgaggatg aggcggatta ctactgtgca acatgggatg acagcctgaa tggttgggtg 300  
ttcggcggag ggaccaagct gaccgtccta g 331

<210> 274  
<211> 110  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 274

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

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

Asn Val Asn Trp Tyr Gln Gln Leu Pro Gly Thr Ala Pro Lys Leu Leu  
35 40 45

Ile Tyr Ser Asn Asp Gln Arg Pro Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser  
50 55 60

Gly Ser Arg Ser Gly Thr Ser Gly Ser Leu Ala Ile Ser Gly Leu Gln  
65 70 75 80

Ser Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ala Thr Trp Asp Asp Ser Leu  
85 90 95

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

<210> 275  
<211> 340  
<212> ADN  
<213> Homo sapiens

<400> 275

```

gaagttcaat tgtagagtc tggtagcgt cttgttcagc ctggtggttc tttacgtctt      60
tcttgcgctg cttccggatt cactttctct ggttacatta tgtggtgggt tgcceaagct    120
cctggtaaag gtttgagtg ggtttctgtt atctctcctt ctggtggcga tacttggtat    180
gctgactccg ttaaaggctg cttcactatc tctagagaca actctaagaa tactctctac    240
ttgcagatga acagcttaag ggctgaggac acggccgtgt attactgtgc cacagcggga    300
gactactggg gccagggcac cctggtcact gtctcaagcg                             340

```

<210> 276  
 <211> 113  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

<400> 276

```

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

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

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

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

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65          70          75          80

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

Ala Thr Ala Gly Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser
100          105          110

```

**Ser**

<210> 277  
 <211> 322  
 <212> ADN  
 <213> Homo sapiens

<400> 277

aacatccaga tgacccagtc tccatcctcc ctgtctgcat ctgtaggaga cagagtcacc 60  
atcaottgcc gggcaagtca gagcattagc agctatttaa attggtatca gcagaaacca 120  
gggaaagccc ctaagctcct gatctatgct gcatccagtt tgcaaagtgg ggtcccatca 180  
aggttcagtg gcagtggatc tgggacagat ttcactctca ccatcagcag tctgcaacct 240  
gaagattttg caacttacta ctgtcaacag agttacagta ccccgtagac ttttgccag 300  
gggaccaagc tggagatcaa ac 322

<210> 278  
<211> 107  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens  
<400> 278

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

<210> 279  
<211> 364  
<212> ADN  
<213> Homo sapiens  
<400> 279

```

gaagttcaat tgtagagtc tggtagcgtt cttgttcagc ctggtggttc tttacgtctt      60
tcttgccgtg cttccggatt cactttctct tgtagagata tggtttgggt tcgccaagct      120
cctggtaaag gtttggagtg ggtttctgtt atctctcctt ctggtggctg gacttcttat      180
gctgactccg ttaaaggctg cttcactatc tctagagaca actctaagaa tactctctac      240
ttgcagatga acagcttaag ggctgaggac acggccgtgt attactgtgc gagagatcat      300
agtggctacg attctgaata ctttgactac tggggccagg gcaccctggt caccgtctca      360
agcg                                                                    364

```

<210> 280  
 <211> 121  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens  
 <400> 280

```

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

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

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

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

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65              70              75              80

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

Ala Arg Asp His Ser Gly Tyr Asp Ser Glu Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly
          100             105             110

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
          115              120

```

<210> 281  
 <211> 322  
 <212> ADN  
 <213> Homo sapiens  
 <400> 281

gaaatagtga tgacgcagtc tccatcctcc ctgtctgcat ctgtaggaga cagagtcacc 60  
 atcacttgcc gggcaagtca gagcattagc agctatttaa attggtatca gcagaaacca 120  
 gggaaagccc ctaagctcct gatctatgct gcatccagtt tgcaaagtgg ggtcccatca 180  
 aggttcagtg gcagtggatc tgggacagat ttcactctca ccatcagcag tctgcaacct 240  
 gaagattttg caacctacta ctgtcaacag agttacagta cccctctcac tttcggccct 300  
 gggaccaaaag tggatatcaa ac 322

<210> 282  
 <211> 107  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens  
 <400> 282

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

<210> 283  
 <211> 355  
 <212> ADN  
 <213> Homo sapiens  
 <400> 283

```

gaagttcaat tgtagagtc tggtagcgtt cttgttcagc ctggtgggtc ttacgtctt      60
tcttgcgctg cttccggatt cactttctct cattacgaga tgggttgggt tcgccaagct      120
cctggtaaag gtttggagtg ggtttcttat atctctcctt ctggtggctg gactgcttat      180
gctgactccg ttaaaggctg cttcactatc tctagagaca actctaagaa tactctctac      240
ttgcagatga acagcttaag ggctgaggac acggccgtgt attactgtgc aaggattgac      300
tacgcagatg cttttgatat ctggggccaa gggaccctgg tcaccgtctc aagcg          355

```

<210> 284  
 <211> 118  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens  
  
 <400> 284

```

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

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

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

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

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
          65          70          75          80

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

Ala Arg Ile Asp Tyr Ala Asp Ala Phe Asp Ile Trp Gly Gln Gly Thr
          100          105          110

Leu Val Thr Val Ser Ser
          115

```

<210> 285  
 <211> 331  
 <212> ADN  
 <213> Homo sapiens  
  
 <400> 285

cagtctgtgt tgactcagcc accctcagca tctgagaccc ccgggcagag ggtcaccatc 60  
 tcttgttctg gagtcagctc caacatcgga aggaattctg ttacctggtc ccagcagctc 120  
 ccaggaacgg cccccaaact cctcatctat aggaataatc agcggccctc aggggtccct 180  
 gaccgattct ctggctccaa gtctggcacc tcagcctccc tggccatcag tgggctccgg 240  
 tccgaggatg aggctgatta ttactgtgca acatgggatg acagcctgag tggttgggtg 300  
 ttcggcggag ggaccaagct gaccgtccta g 331

<210> 286  
 <211> 110  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens  
 <400> 286

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

<210> 287  
 <211> 340  
 <212> ADN  
 <213> Homo sapiens  
 <400> 287



gaagttcaat tgtagagtc tggtagcgt cttgttcagc ctggtggttc ttacgtctt 60  
tcttgcgctg cttcgggatt cactttctct ggttacatta tgtggtgggt tcgccaagct 120  
cctggtaaag gtttggagtg ggtttctgtt atctctcctt ctggtggcga tacttggtat 180  
gctgactccg ttaaaggctg cttcactatc tctagagaca actctaagaa tactctctac 240  
ttgcagatga acagcttaag ggctgaggac acggccgtgt attactgtgc cacagcgga 300  
gactactggg gccaggggac cctggtcacc gtctcaagcg 340

<210> 288  
<211> 113  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 288

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

Ser

<210> 289  
<211> 322  
<212> ADN  
<213> Homo sapiens

<400> 289

```

gccatccgga tgacacagtc tccgtcctcc ctgtctgcat ctgtaggaga cagagtcacc      60
atcacttgcc gggcaagtca gagcattagc agctatttaa attggtatta gcagaaacca      120
gggaaagccc ctaagctcct gatctatgct gcatccagtt tgcaaagtgg ggtcccatca      180
aggttcagtg gcagtggatc tgggacagat ttcactctca ccatcagcag tctgcaacct      240
gaagattttg caacttacta ctgtcaacag agttacagta cccccctcac tttcggcgga      300
gggaccaagc tggagatcaa ac                                              322

```

<210> 290  
 <211> 107  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens  
  
 <400> 290

Ala Ile Arg Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly

```

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

```

<210> 291  
 <211> 364  
 <212> ADN  
 <213> Homo sapiens  
  
 <400> 291

```

gaagttcaat tgtagagtc tggtagcgt cttgttcagc ctggtggttc ttacgtctt      60
tcttgcgctg cttcgggatt cactttctct aagtagata tgcattgggt tcgccaagct      120
cctggtaaaag gtttggagtg ggtttctgtt atctctcctt ctggtggtcg gacttcttat      180
gctgactccg ttaaaggctg cttcactatc tctagagaca actctaagaa tactctctac      240
ttgcagatga acagcttaag ggctgaggac accgccatgt attactgtgc gagggatgac      300
tacagtaaag gacgggatgc tttgatatc tggggccaag ggacaatggt caccgtctca      360
agcg                                                                    364

```

<210> 292  
 <211> 121  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens  
 <400> 292

```

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

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

Asp Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35              40              45

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

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65              70              75              80

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

Ala Arg Asp Asp Tyr Ser Lys Gly Arg Asp Ala Phe Asp Ile Trp Gly
100            105            110

Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser
115              120

```

<210> 293  
 <211> 322  
 <212> ADN  
 <213> Homo sapiens  
 <400> 293

aacatccaga tgacccagtc tccatcctcc ctgtctgcat ctgtaggaga cagagtcacc 60  
 atcacttgcc gggcaagtca gagcattagc agctatttaa attggtacta gcagaaacca 120  
 gggaaagccc ctaagctcct gatctatgct gcattccagtt tgcaaagtgg ggtcccatca 180  
 aggttcagtg gcagtggatc tgggacagat ttcactctca ccatcagcag tctgcaacct 240  
 gaagattttg caacttacta ctgtcaacag agttacagta cccccctcac ttctggcgga 300  
 gggaccaagg tggagatcaa ac 322

<210> 294  
 <211> 107  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

<400> 294

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser Ser Tyr  
 20 25 30

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

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

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro

65 70 75 80

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

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys  
 100 105

<210> 295  
 <211> 364  
 <212> ADN  
 <213> Homo sapiens

<400> 295

```

gaagttcaat tgctagagtc tgggtggcggc cttgttcagc ctggtgggtc tttacgtctt      60
tcttgogctg cttccggatt cactttctct aagtacgata tgcattgggt tcgccaagct      120
cctggtaaag gtttggagtg ggtttctgtt atctctcctt ctggtggctg gacttcttat      180
gotgactccg ttaaaggctg cttcactatc tctagagaca actctaagaa tactctctac      240
ttgcagatga acagcttaag ggctgaggac accgccatgt attactgtgc gagggatgac      300
tacagtaaag gacgggatgc ttttgatata tggggccaag ggaccacggt caccgtctca      360
agcg                                                                    364

```

<210> 296  
 <211> 121  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens  
 <400> 296

```

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

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

Asp Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
          35              40              45

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

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65              70              75              80

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

Ala Arg Asp Asp Tyr Ser Lys Gly Arg Asp Ala Phe Asp Ile Trp Gly
          100              105              110

                Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
                  115              120

```

<210> 297  
 <211> 319  
 <212> ADN  
 <213> Homo sapiens  
 <400> 297

# ES 2 456 296 T3

```

gccatcogga tgacccagtc tccatcctcc ctgtctgcat ctgtaggaga cagagtcacc      60
atcacttgcc gggcaagtca gagcattagc agctatttaa attgggtatca gcagaaacca      120
gggaaagccc ctaagctcct gatctatgct gcatccagtt tgcaaagtgg ggtcccatca      180
aggttcagtg gcagtggatc tgggacagat ttcactctca ccatcagcag tctgcaacct      240
gaagattttg caacttacta ctgtcaacag agttacagtg ccccgacgtt cggccaaggg      300
accaaggtgg gaatcaagc                                          319

```

<210> 298  
 <211> 106  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

<400> 298

```

Ala Ile Arg Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1           5           10           15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser Ser Tyr
20          25          30

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

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

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

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

Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Gly Ile Lys
100          105

```

<210> 299  
 <211> 364  
 <212> ADN  
 <213> Homo sapiens

<400> 299

```

gaagttcaat tgtagagtc tggtagcggt cttgttcagc ctggtggttc tttacgtctt      60
tcttgcgctg cttccggatt cactttctct aagtagcata tgcattgggt tcgccaagct      120
cctggtaaag gtttgagtg ggtttctggt atctctcctt ctggtggtg gacttcttat      180
gctgactccg ttaaaggteg cttcactatc tctagagaca actctaagaa tactctctac      240
ttgcagatga acagcttaag ggctgaggac accgccatgt attactgtgc gagggatgac      300
tacagtaaag gacgggatgc ttttgatata tggggccaag ggacaatggt caccgtctca      360
agcg                                                                    364

```

<210> 300  
 <211> 121  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens  
  
 <400> 300

```

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

```

```

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

```

```

Asp Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
          35           40           45

```

```

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

```

```

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
          65           70           75           80

```

```

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

```

```

Ala Arg Asp Asp Tyr Ser Lys Gly Arg Asp Ala Phe Asp Ile Trp Gly
          100          105          110

```

```

Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser
          115          120

```

<210> 301  
 <211> 331  
 <212> ADN  
 <213> Homo sapiens  
  
 <400> 301

```

cagagcgaat tgactcagcc accctcagcg tctgggaccc ccgggcagag ggtcaccatc      60
tcttggtctg gaagcagctc caacatcgga agcaatcctg ttaactggta ccagcaactc      120

ccaggaacgg cccccaaact cctcatctat agtaataggc agcggccctc aggggtccct      180
gaccgattct ctggctccag gtctggcacc tcaggctccc tggccatcag tggactccag      240
tctgaggatg aggcggatta ctactgtgca acatgggatg acagcotgaa tggttgggtg      300
ttcggcggag gcaccagct gaccgtcctc g                                     331

```

<210> 302  
 <211> 110  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

<400> 302

```

Gln Ser Glu Leu Thr Gln Pro Pro Ser Ala Ser Gly Thr Pro Gly Gln
1           5           10           15

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

Pro Val Asn Trp Tyr Gln Gln Leu Pro Gly Thr Ala Pro Lys Leu Leu
          35           40           45

Ile Tyr Ser Asn Arg Gln Arg Pro Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser
50           55           60

Gly Ser Arg Ser Gly Thr Ser Gly Ser Leu Ala Ile Ser Gly Leu Gln
65           70           75           80

Ser Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ala Thr Trp Asp Asp Ser Leu
          85           90           95

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

```

<210> 303  
 <211> 340  
 <212> ADN  
 <213> Homo sapiens

<400> 303



gaagttcaat tgtagagtc tggtagcggt cttgttcagc ctggtggttc tttacgtctt 60  
 tcttgcgctg cttccggatt cactttctct ggtagacatta tgggtgggt tcgccaagct 120  
 cctggtaaag gtttgagtg ggtttctgtt atctctcctt ctggtggcga tacttggtat 180  
 gctgactccg ttaaaggtag cttcactatc tctagagaca actctaagaa tactctctac 240  
 ttgcagatga acagcttaag ggctgaggac acggcgtgt attactgtgc cacagcgga 300  
 gactactggg gccagggcac cctggtcacc gtctcaagcg 340

<210> 304  
 <211> 113  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens  
 <400> 304

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

Ser

<210> 305  
 <211> 322  
 <212> ADN  
 <213> Homo sapiens  
 <400> 305

gacatccagt tgacccagtc tccatcttcc ctgtctgcat ctgtaggaga cagagtcacc 60  
 atcacttgcc gggcaagtca gagcattagc agctatttaa attggtatca gcagaaacca 120  
 gggaaagccc ctaagctcct gatctatgct gcatccagtt tgcaaagtgg ggtcccatca 180  
 aggttcagtg gcagtggatc tgggacagat ttcactctca ccatcagcag tctgcaacct 240  
 gaagattttg caacttacta ctgtcaacag agttacagta ccccgtagac ttttggccag 300  
 gggaccaagc tggagatcaa ac 322

<210> 306  
 <211> 107  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens  
 <400> 306

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

<210> 307  
 <211> 364  
 <212> ADN  
 <213> Homo sapiens  
 <400> 307

```

gaagttcaat tgtagagtc tggtagcgtt cttgttcagc ctggtgggtc ttacgtctt      60
tcttgcgctg cttccggatt cactttctct aagtagcata tgcattgggt tcgccaagct      120
cctggtaaag gtttgagtg ggtttctgtt atctctcctt ctggtggctg gacttcttat      180
gctgactccg ttaaaggctg cttcactatc tctagagaca actctaagaa tactctctac      240
ttgcagatga acagcttaag ggctgaggac accgccatgt attactgtgc gagggatgac      300
tacagtaaag gacgggatgc ttttgatata tggggccaag ggaccctggt cacogtotca      360
agcg                                                                    364

```

<210> 308  
 <211> 121  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens  
 <400> 308

```

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

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

Asp Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35          40          45

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

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65          70          75          80

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

Ala Arg Asp Asp Tyr Ser Lys Gly Arg Asp Ala Phe Asp Ile Trp Gly
100         105         110

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115          120

```

<210> 309  
 <211> 331  
 <212> ADN  
 <213> Homo sapiens  
 <400> 309

cagagcgaat tgactcagcc accctcagcg tctgggaccc ccgggcaggg ggtcaccatc 60  
tcttgttctg gaagtagttc caacatcgga agtaatactg ttcagtggta ccagcagttc 120  
ccaggaaggg cccccaaact cctcatctat agtaataatc ggcgccctc aggggtccct 180  
gaccgattct ctggttccaa gtctggcacc tcagcctccc tggccatcag tgggctccgg 240  
tccgaggatt aggctgatta ttactgtgca gcatgggatg acagcctgag tgtcgtggta 300  
ttcggcggag ggaccaagct gaccgtccta g 331

<210> 310  
<211> 110  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens  
<400> 310

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

<210> 311  
<211> 340  
<212> ADN  
<213> Homo sapiens  
<400> 311

```

gaagttcaat tgttagagtc tggtaggggt cttgttcagc ctggtgggtc ttacgtctt      60
tcttgcgctg cttccggatt cactttctct ggtagacatta tgtggtgggt tcgccaaagt      120
cctggtaaag gtttggagtg ggtttctggt atctctcctt ctggtggcga tacttggtat      180
gctgactccg ttaaaggctg ottcactatc tctagagaca actctaagaa tactctctac      240
ttgcagatga acagcttaag ggctgaggac acggcctgtg attactgtgc cacagcggga      300
gactactggg gccagggcac cctggtcact gtctcaagcg      340

```

<210> 312  
 <211> 113  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

<400> 312

```

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

```

```

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

```

```

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

```

```

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

```

```

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65           70           75           80

```

```

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

```

```

Ala Thr Ala Gly Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser
100          105          110

```

**Ser**

<210> 313  
 <211> 322  
 <212> ADN  
 <213> Homo sapiens

<400> 313

```

gccatctgga tgacccagtc tccatcctcc ctgtctgcat ctgtaggaga cagagtcacc      60
atcaacttgcc ggacaagtca gagcattagt aactatttaa attggtatca acagaagcca      120
gggaaagccc caaagctcct gatctatgcc agatccagtt tgcaaagtgg ggtcccatca      180
aggttcagtg gcagtggatc tgggacagat ttcactctca ccatcagcag tctgcaacct      240
gaagattttg caacttacta ctgtcaacag agttacagta ccccgatcac cttcggccaa      300
gggacacgac tggagattaa ac                                              322

```

<210> 314  
 <211> 107  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens  
 <400> 314

```

Ala Ile Trp Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1              5              10              15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Thr Ser Gln Ser Ile Ser Asn Tyr
                20              25              30

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

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

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

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

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Arg Leu Glu Ile Lys
            100             105

```

<210> 315  
 <211> 364  
 <212> ADN  
 <213> Homo sapiens  
 <400> 315

```

gaagttcaat tgtagagtc tggtagcggt cttgttcagc ctggtggttc tttacgtctt      60

```

tcttgcgctg cttccggatt cactttctct aagtagagata tgcattgggt tgcgcaagct 120  
 cctggtaaag gtttgagtg ggtttctggt atctctcctt ctggtggctg gacttcttat 180  
 gctgactccg ttaaaggctg cttcactatc tctagagaca actctaagaa tactctctac 240  
 ttgcagatga acagcttaag ggctgaggac accgccatgt attactgtgc gagggatgac 300  
 tacagtaaag gacgggatgc ttttgatata tggggccaag ggaccctggt caccgtctca 360  
 agcg 364

<210> 316  
 <211> 121  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

<400> 316

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

<210> 317  
 <211> 331  
 <212> ADN  
 <213> Homo sapiens

<400> 317

```

cagtctgtgt tgactcagcc accctcagcg tctgggaccc ccgggcagag ggtcaccatc      60
tcttgtttctg gaagcagctc caacatcgga agtaatattg taaactgggt ccagcaactc      120
ccaggaacgg cccccaaact cctcatctat agtgataatc agcggccctc aggggtccct      180
gaccgattct ctggctccag gtctggcacc tcaggctccc tggccatcag tggactccag      240

tctgaggatg aggcggatta ctactgtgca acatgggatg acagcctgaa tggttgggtg      300
ttcggcggag ggaccaagct gaccgtccta g                                     331

```

<210> 318  
 <211> 110  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens  
 <400> 318

```

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

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

Ile Val Asn Trp Phe Gln Gln Leu Pro Gly Thr Ala Pro Lys Leu Leu
              35              40              45

Ile Tyr Ser Asp Asn Gln Arg Pro Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser
              50              55              60

Gly Ser Arg Ser Gly Thr Ser Gly Ser Leu Ala Ile Ser Gly Leu Gln
65              70              75              80

Ser Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ala Thr Trp Asp Asp Ser Leu
              85              90              95

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

```

<210> 319  
 <211> 340  
 <212> ADN  
 <213> Homo sapiens  
 <400> 319



gaagttcaat tgtagagtc tggtagcgtt cttgttcagc ctggtgggtc tttacgtctt 60  
tcttgcgctg cttccggatt cactttctct ggtagacatta tgtggtgggt tgcgcaagct 120  
cctggtaaag gtttggagtg ggtttctgtt atctctcctt ctggtggcga tacttggtat 180  
gctgactccg ttaaaggctg cttcactatc tctagagaca actctaagaa tactctctac 240  
ttgcagatga acagcttaag ggctgaggac acggccgtgt attactgtgc cacagcgga 300  
gactactggg gccagggcac cctggtcact gtctcaagcg 340

<210> 320  
<211> 113  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens  
<400> 320

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

Ser

<210> 321  
<211> 322  
<212> ADN  
<213> Homo sapiens  
<400> 321

```

aacatccaga tgaccagtc tccatcctcc ctgtctgcat ctgtaggaga cagagtcacc      60
atcaattgcc gggcaagtca gagcattagc agctatttaa attggtatca gcagaaacca      120
gggaaagccc ctaaactcct gatctatgat gcatocagtt tgcaaagtgg ggtcccatta      180
aggttcagtg gcagtggatc tgggacagat ttcactctca ccatcagcag tctgcaacct      240
gaagattttg caacttacta ctgtcaacag agttacagta ccccgctcac tttcggcgga      300
gggaccaaag tggatatcaa ac                                              322

```

<210> 322  
 <211> 107  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens  
 <400> 322

```

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser Ser Tyr

              20              25              30

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

Tyr Asp Ala Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro Leu Arg Phe Ser Gly
      50              55              60

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

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

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Asp Ile Lys
              100              105

```

<210> 323  
 <211> 367  
 <212> ADN  
 <213> Homo sapiens  
 <400> 323

# ES 2 456 296 T3

```

gaagttcaat tgtagagtc tggtagcggc cttgttcagc ctggtgggtc ttacgtctt      60
tcttgcgctg cttccggatt cactttctct tggtacgata tggattgggt tgcccaagct      120
cctggtaaag gtttggagtg ggtttctgtt atctctcctt ctggtggctg gactgcttat      180
gctgactccg ttaaaggctg cttcactatc tctagagaca actctaagaa tactctctac      240
ttgcagatga acagcttaag ggctgaggac acggccgtgt attactgtgc gagagatagt      300
agtggttatt actcacctga tgcttttgat atctggggcc aagggaacct ggtcacccgc      360
tcaagcg                                     367

```

<210> 324  
 <211> 122  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens  
 <400> 324

```

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

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

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

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

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65          70          75          80

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

Ala Arg Asp Ser Ser Gly Tyr Tyr Ser Pro Asp Ala Phe Asp Ile Trp
          100          105          110

Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
          115          120

```

<210> 325  
 <211> 322  
 <212> ADN  
 <213> Homo sapiens  
 <400> 325

```

gccatccagt tgaoccagtc tccatcctcc ctgtctgcat ctgtaggaga cagagtcacc      60
atcacttgcc gggcaagtca gagcattagc agctatttaa attggtatca gcagaaacca      120
gggaaagccc ctaagctcct gatctatgct gcatccagtt tgcaaagtgg ggtcccatca      180
aggttcagtg gcagtggatc tgggacagac ttcactctca ccatcagcag tctgcaacct      240
gaagattttg cagcttacta ctgtcaacag agttacacaa cacctctgac gttcggccaa      300
gggaccaagg tggaaatcaa ac                                              322

```

<210> 326  
 <211> 107  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens  
  
 <400> 326

```

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser Ser Tyr
          20           25           30

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

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

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

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

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
          100          105

```

<210> 327  
 <211> 364  
 <212> ADN  
 <213> Homo sapiens  
  
 <400> 327

```

gaagttcaat tgtagagtc tggtagcgtt cttgttcagc ctggtggttc tttacgtctt      60
tcttgcgctg cttccggatt cactttctct aagtaagata tgcattgggt tcgccaagct      120
cctggtaaag gtttggagtg ggtttctgtt atctctcctt ctggtggttg gacttcttat      180
gctgactccg ttaaaggctg cttcactatc tctagagaca actctaagaa tactctctac      240
ttgcagatga acagcttaag ggctgaggac accgccatgt attactgtgc gagggatgac      300
tacagttaaag gacgggatgc ttttgatata tggggccaag ggaccctggt caccgtctca      360
agcg                                                                    364

```

<210> 328  
 <211> 121  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens  
 <400> 328

```

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

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

Asp Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
          35          40          45

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

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65          70          75          80

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

Ala Arg Asp Asp Tyr Ser Lys Gly Arg Asp Ala Phe Asp Ile Trp Gly
          100          105          110

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115          120

```

<210> 329  
 <211> 322  
 <212> ADN  
 <213> Homo sapiens  
 <400> 329

gccatctgga tgaccagtc tccatcctcc ctgtctgcat ctgtcggaga cagagtcacc 60  
 attccttgcc ggtcaagtc gaacattaac aactttgtga attggtatca acagaaacca 120  
 gggaaagccc ctaaactcct gatctatgct gcatccagat tgaaagggtg ggtcccttca 180  
 aggttcagtg gcagtggatc tgggacagat ttcactctca ccatcagcag tctgcaacct 240  
 gaagattttg caacttacta ctgtcaacag agttacagta cccctctcac tttcggcgga 300  
 gggaccaagc tggagatcaa ac 322

<210> 330  
 <211> 107  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens  
 <400> 330

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

<210> 331  
 <211> 340  
 <212> ADN  
 <213> Homo sapiens  
 <400> 331

gaagttcaat tgtagagtc tgggtggcggc cttgttcagc ctgggtggttc tttacgtctt 60  
 tcttgcgctg cttccggatt cactttctct ggttacatta tgtgggtgggt tcgccaagct 120

cctggtaaag gtttggagtg ggtttctgtt atctctcctt ctggtggcga tacttggtat 180  
gctgactcog ttaaaggteg cttcactatc tctagagaca actctaagaa tactctctac 240  
ttgcagatga acagcttaag ggctgaggac acggccgtgt attactgtgc cacagcggga 300  
gactactggg gccagggcac cctggtcacc gtctcaagcg 340

<210> 332  
<211> 113  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens  
  
<400> 332

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

Ser

<210> 333  
<211> 322  
<212> ADN  
<213> Homo sapiens  
  
<400> 333

gatgttgtga tgacacagtc tccatcctcc ctgtctgcat ctgtaggaga cagagtcacc 60  
atcacttgcc gggcaagtca gagcattagc agctatttaa attggtatca gcagaaacca 120  
gggaaagccc ctaagctcct gatctatgct gcatccagtt tgcaaagtgg ggtcccatca 180  
aggttcagtg gcagtggatc tgggacagat ttcactotca ccatcagcag tctgcaacct 240  
gaagattttg caacttacta ctgtcaacag agttacagta ccccgctcac tttcggcgga 300  
  
gggaccaagg tggaaatcaa ac 322

<210> 334  
 <211> 107  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

5

<400> 334

```

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser Ser Tyr
      20              25              30

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

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

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

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

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
      100              105
    
```

<210> 335  
 <211> 355  
 <212> ADN  
 <213> Homo sapiens

10

<400> 335

15

```

gaagttcaat tgtagagtc tggtagcgt cttgttcagc ctggtggttc tttacgtctt      60
tcttgagctg cttccggatt cactttctct cgttacgaga tgggttggtt tggccaagct      120
cctggttaaag gtttgagtg ggtttcttat atctctcctt ctggtggttg gactgcttat      180
gctgactccg ttaaagggtcg cttcactatc tctagagaca actctaagaa tactctctac      240
ttgcagatga acagcttaag ggctgaggac acggccgtgt attactgtgc aaggattgac      300
tacgcagatg cttttgatat ctggggccaa gggacaatgg tcaccgtctc aagcgc      355
    
```

<210> 336  
 <211> 118  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

20

<400> 336

25



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

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

<210> 337  
 <211> 331  
 <212> ADN  
 <213> Homo sapiens  
 <400> 337

cagtcctgtgc	tgactcagcc	accctcgggtg	tctgaagccc	cccggcagag	ggtcaccatc	60
tcctgtttctg	gaagcagctc	caacatcggc	aaaaatgctg	tacactggta	ccagcagctc	120
ccaggcaagg	ctcccagact	cctcatctat	tatgatgatt	tattgccttc	aggggtctct	180
gaccgattct	ctggctccag	gtctggcacc	tcagcctccc	tggccatcag	tgggctccgg	240
tccgaggatg	aggctgatta	ttactgtgca	gcatgggatg	acagcctgag	tgggtgggtg	300
ttcggcggag	ggaccaagct	gaccgtccta	g			331

<210> 338  
 <211> 110  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens  
 <400> 338

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

<210> 339  
 <211> 340  
 <212> ADN  
 <213> Homo sapiens  
 <400> 339

gaagttcaat	tgttagagtc	tggtggcggc	cttggtcagc	ctggtgggtc	tttacgtctt	60
tcttgcgctg	cttcgggatt	cactttctct	ggttacatta	tgtggtgggt	tcgccaagct	120
cctggtaaag	gtttggagtg	ggtttctggt	atctctcctt	ctggtggcga	tacttggtat	180
gctgactccg	ttaaaggctc	cttcactatc	tctagagaca	actctaagaa	tactctctac	240
ttgcagatga	acagcttaag	ggctgaggac	acggccgtgt	attactgtgc	cacagcggga	300
gactactggg	gccaggggac	cctggtcacc	gtctcaagcg			340

<210> 340  
 <211> 113  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens  
 <400> 340

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

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

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

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

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr  
65 70 75 80

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

Ala Thr Ala Gly Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser  
100 105 110

Ser

<210> 341  
<211> 322  
<212> ADN  
<213> Homo sapiens  
  
<400> 341

gaaattgtgc tgactcagtc tccatcctcc ctgtctgcat ctgtaggaga cagagtcacc 60  
atcacttgcc gggcaagtca gagcattagc agctatttaa attggtatca gcagaaacca 120  
gggaaagccc ctaagctcct gatctatgct gcattccagtt tgcaaagtgg ggtcccatca 180  
aggttcagtg gcagtggatc tgggacagat ttcactctca ccatcagcgg tctgcaacct 240  
gaagattttg caacctacta ctgtcaacag agttacagtt ccccccttac tttcggcgga 300  
gggaccaagg tggaaatcaa ac 322

<210> 342  
<211> 107  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens  
  
<400> 342

Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly  
1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser Ser Tyr  
20 25 30

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

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

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

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

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys  
100 105

<210> 343  
<211> 364  
<212> ADN  
<213> Homo sapiens

<400> 343

gaagttcaat tgtagagtc tggtagcgtt cttgttcagc ctggtggttc tttagctctt 60  
tcttgcgctg cttccggatt cactttctct aagtaggata tgcattgggt tgcgaagct 120  
cctggtaaag gtttgagtg ggtttctgtt atctctcctt ctggtggttg aacttcttat 180  
gctgactccg ttaaaggctg cttcactatc tctagagaca actctaagaa tactctctac 240  
ttgcagatga acagcttaag ggetgaggac accgccatgt attactgtgc gagggatgac 300  
tacagtaaag gacgggatgc ttttgatata tggggccaag ggaccctggt caccgtctca 360  
agcg 364

<210> 344  
<211> 121  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 344

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

<210> 345  
 <211> 322  
 <212> ADN  
 <213> Homo sapiens

<400> 345

gaaattgtaa tgacgcagtc tccatcctcc ctgtctgcat ctgtaggaga cagagtcacc 60  
 atcacttgcc gggcaagtca gagcattagc agctatttaa attggtatta gcagaaacca 120  
 gggaaagccc ctaagctcct gatctatgct gcatccagtt tgcaaagtgg ggtcccatca 180  
 aggttcagtg gcagtggtac tgggacagat ttcactctca ccatcagcag tctgcaacct 240  
 gaagattttg caacttacta ctgtcaacag agttacagta ccccccctcac tttcggcgga 300  
 gggaccaagg tggaaatcaa gc 322

<210> 346  
 <211> 107  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

<400> 346

Glu Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly  
1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser Ser Tyr  
20 25 30

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

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

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

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

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys  
100 105

<210> 347  
<211> 355  
<212> ADN  
<213> Homo sapiens

<400> 347

gaagttcaat tgtagagtc tgggtggcggc cttgttcagc ctggtgggttc ttacgtctt 60

tcttgcgctg cttccggatt cactttctct cattacgaga tggcttgggt tcgccaagct 120

cctggtaaag gtttggagtg ggtttcttat atctcttctt ctggtggctg gacttcttat 180

gctgactccg ttaaaggctg cttcactatc tctagagaca actctaagaa tactctctac 240

ttgcagatga acagcttaag ggctgaggac acggcogtgt attactgtgc aaggattgac 300

tacgcagatg cttttgatat ctggggccaa gggaccacgg tcaccgtctc aagcg 355

<210> 348  
<211> 118  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 348

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

<210> 349  
 <211> 322  
 <212> ADN  
 <213> Homo sapiens

<400> 349

gatattgtga tgaccagac tccactctcc ctgtctgcat ctgtaggaga cagagtcacc 60  
 atcacttgcc gggcaagtca gagcatcgac acctatttaa attggtatca gcagaaacca 120  
 gggaaagccc ctaaactcct gatctatgct gcatccagtt tgcaaagtgg ggtcccatca 180  
 aggttcagtg gcagtggtac tgggacagat ttcactctca ccatcagcag tctgcaacct 240  
 gaagattttg caacttacta ctgtcaacag agttacagta ccccgctcac tttcggcgga 300  
 gggaccaaag tggatatcaa ac 322

<210> 350  
 <211> 107  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

<400> 350

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Asp Thr Tyr  
20 25 30

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

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

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

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

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Asp Ile Lys  
100 105

<210> 351  
<211> 355  
<212> ADN  
<213> Homo sapiens

<400> 351

gaagttcaat tgtagagtc tggtagcggt cttgttcagc ctggtggttc tttacgtctt 60  
tcttgcgctg cttcgggatt cactttctct tggtacgata tggtttgggt togccaagct 120  
cctgggtaaag gtttgagtg ggtttctgtt atctctcctt ctggtggctg aacttcttat 180  
gctgactccg ttaaaggtag cttcactatc tctagagaca actctaagaa tactctctac 240  
ttgcagatga acagcttaag ggctgaggac acggccgtgt attactgtgc gagagcgagc 300  
agtggtagtg cttttgatat ctggggccaa gggaccacgg tcaccgtctc aagcg 355

<210> 352  
<211> 118  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 352



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

<210> 353  
 <211> 349  
 <212> ADN  
 <213> Homo sapiens

<400> 353

cagtctgtgc tgacgcagcc gccctcagcg tctgggaccc ccggacagag ggtcagtatc 60  
 tcgtgttctg gaagcagttc caacatcgga gctaattatg tttcctggta ccagcagctc 120  
 ccaggaacgg cccccagact cctcatctat actaatgata agcggccctc aggggtccct 180  
 gaccgattct ctggctccaa gtctggcacc tcagcctccc tggccatcag tggcctcgg 240  
 tccgaagatg aggtgatta ttactgtgca gcgtgggatg acagcccagac tggatgatgac 300  
 agcctgagtt cgtatgtctt cggaactggg accaaggcca ccgtcctag 349

<210> 354  
 <211> 116  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

<400> 354

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

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

Tyr Val Ser Trp Tyr Gln Gln Leu Pro Gly Thr Ala Pro Arg Leu Leu  
35 40 45

Ile Tyr Thr Asn Asp Gln Arg Pro Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser

50 55 60

Gly Ser Lys Ser Gly Thr Ser Ala Ser Leu Ala Ile Ser Gly Leu Arg  
65 70 75 80

Ser Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ala Ala Trp Asp Asp Ser Pro  
85 90 95

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

Val Thr Val Leu  
115

<210> 355  
<211> 355  
<212> ADN  
<213> Homo sapiens  
<400> 355

gaagttcaat tgtagagtc tggtagcggt cttgttcagc ctggtggttc ttacgtctt 60  
tcttgcgctg cttccggatt cactttctct cattacgaga tggttggtt tcgccaagct 120  
cctggtaaag gtttgagtg ggtttcttat atctctcctt ctggtggttg aacttcttat 180  
gctgactccg ttaaaggtag cttcactatc tctagagaca actctaagaa tactctctac 240  
ttgcagatga acagcttaag ggctgaggac acggccgtgt attactgtgc gagagagggg 300  
cccttagacg cttttgatat ctggggccaa gggaccacgg tcaccgtctc aagcg 355

<210> 356  
<211> 118  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens  
<400> 356

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

<210> 357  
 <211> 322  
 <212> ADN  
 <213> Homo sapiens

<400> 357

gaaattgtgt tgacacagtc tccatcctcc ctgtctgcat ctgtaggaga cagagtcacc 60  
 atcacttgcc gggcaagtca gagcattagc agctatttaa attggtatta gcagaaacca 120  
 gggaaagccc ctaagctcct gatctatgct gcatccagtt tgcaaagtgg ggtcccatca 180  
 aggttcagtg gcagtggatc tgggacagat ttcactetca ccatcagcag tctgcaacct 240  
 gaagattttg caacttacta ctgtcaacag agttacagta cccccctcac tttcggcgga 300  
 gggaccaagg tggaaatcaa gc 322

<210> 358  
 <211> 364  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

<400> 358

Gly Ala Ala Gly Thr Thr Cys Ala Ala Thr Thr Gly Thr Thr Ala Gly  
1 5 10 15

Ala Gly Thr Cys Thr Gly Gly Thr Gly Gly Cys Gly Gly Thr Cys Thr  
20 25 30

Thr Gly Thr Thr Cys Ala Gly Cys Cys Thr Gly Gly Thr Gly Gly Thr  
35 40 45

Thr Cys Thr Thr Thr Ala Cys Gly Thr Cys Thr Thr Thr Cys Thr Thr  
50 55 60

Gly Cys Gly Cys Thr Gly Cys Thr Thr Cys Cys Gly Gly Ala Thr Thr  
65 70 75 80

Cys Ala Cys Thr Thr Thr Cys Thr Cys Thr Ala Ala Gly Thr Ala Cys  
85 90 95

Gly Ala Thr Ala Thr Gly Cys Ala Thr Thr Gly Gly Gly Thr Thr Cys  
100 105 110

Gly Cys Cys Ala Ala Gly Cys Thr Cys Cys Thr Gly Gly Thr Ala Ala  
 115 120 125

Ala Gly Gly Thr Thr Thr Gly Gly Ala Gly Thr Gly Gly Gly Thr Thr  
 130 135 140

Thr Cys Thr Gly Thr Thr Ala Thr Cys Thr Cys Thr Cys Cys Thr Thr  
 145 150 155 160

Cys Thr Gly Gly Thr Gly Gly Cys Thr Gly Gly Ala Cys Thr Thr Cys  
 165 170 175

Thr Thr Ala Thr Gly Cys Thr Gly Ala Cys Thr Cys Cys Gly Thr Thr  
 180 185 190

Ala Ala Ala Gly Gly Thr Cys Gly Cys Thr Thr Cys Ala Cys Thr Ala  
 195 200 205

Thr Cys Thr Cys Thr Ala Gly Ala Gly Ala Cys Ala Ala Cys Thr Cys  
 210 215 220

Thr Ala Ala Gly Ala Ala Thr Ala Cys Thr Cys Thr Cys Thr Ala Cys  
 225 230 235 240

Thr Thr Gly Cys Ala Gly Ala Thr Gly Ala Ala Cys Ala Gly Cys Thr  
 245 250 255

Thr Ala Ala Gly Gly Gly Cys Thr Gly Ala Gly Gly Ala Cys Ala Cys  
 260 265 270

Cys Gly Cys Cys Ala Thr Gly Thr Ala Thr Thr Ala Cys Thr Gly Thr  
 275 280 285

Gly Cys Gly Ala Gly Gly Gly Ala Thr Gly Ala Cys Thr Ala Cys Ala  
 290 295 300

Gly Thr Ala Ala Ala Gly Gly Ala Cys Gly Gly Gly Ala Thr Gly Cys  
 305 310 315 320

Thr Thr Thr Thr Gly Ala Thr Ala Thr Cys Thr Gly Gly Gly Gly Cys  
 325 330 335

Cys Ala Ala Gly Gly Gly Ala Cys Cys Ala Cys Gly Gly Thr Cys Ala  
 340 345 350

Cys Cys Gly Thr Cys Thr Cys Ala Ala Gly Cys Gly  
 355 360

<210> 359  
<211> 364  
<212> ADN  
<213> Homo sapiens

5

<400> 359

```

gaagttcaat tgtagagtc tggtagcggc cttgttcagc ctggtgggtc tttacgtctt      60
tcttgccgtg cttccggatt cactttctct aagtagcata tgcattgggt tcgccaagct      120
cctggtaaag gtttgagtg ggtttctgtt atctctcctt ctggtgggtg gacttcttat      180
gctgactccg ttaaaggctg cttcactatc tctagagaca actctaagaa tactctctac      240
ttgcagatga acagcttaag ggctgaggac accgccatgt attactgtgc gagggatgac      300
tacagtaaag gacgggatgc ttttgatatc tggggccaag ggaccacggt caccgtctca      360
agcg                                                                    364

```

10

<210> 360  
<211> 121  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

15

<400> 360

```

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

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

Asp Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
          35              40              45

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

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65              70              75              80

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

Ala Arg Asp Asp Tyr Ser Lys Gly Arg Asp Ala Phe Asp Ile Trp Gly
          100              105              110

Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
          115              120

```

20

<210> 361  
<211> 322  
<212> ADN  
<213> Homo sapiens

<400> 361

```

gaaattgtgt tgacgcagtc tccatcctcc ctgtctgcat ctgtaggaga cagagtcacc      60
atcacttgcc gggcaagtca gagcattagc agctatttaa attggtatta gcagaaacca      120
gggaaagccc ctaagctcct gatctatgct gcatccagtt tgcaaagtgg ggtcccatca      180
aggttcagcg gcagtggatc tggcacagat ttcactctcg ccatcagcag tctgcaacct      240
gaagattttg caacttacta ctgtcaacag agttacagta ccccccctcac tttcggcgga      300
gggaccaagg tggaaatcaa ac                                              322

```

5 <210> 362  
 <211> 107  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

10 <400> 362

```

Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1           5           10           15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser Ser Tyr
          20           25           30

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

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

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

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

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
          100          105

```

15 <210> 363  
 <211> 364  
 <212> ADN  
 <213> Homo sapiens

20 <400> 363

gaagttcaat tgttagagtc tggtagcggt cttgttcagc ctggtgggtc tttacgtctt 60  
 tottgcgctg cttccggatt cactttctct aagtagcata tgcattgggt tcgccaagct 120  
 cctggtaaag gtttggagtg ggtttctgtt atctctcctt ctggtggctg ggcttcttat 180  
 gctgactccg ttaaaggctg cttcactatc tctagagaca actetaagaa tactctctac 240  
 ttgcagatga acagcttaag ggctgaggac accgccatgt attactgtgc gagggatgac 300  
 tacagtaaag gacgggatgc ttttgatata tggggccaag ggaccacggt caccgtctca 360  
 agcg 364

<210> 364  
 <211> 121  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

<400> 364

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

<210> 365  
 <211> 322  
 <212> ADN  
 <213> Homo sapiens

<400> 365



# ES 2 456 296 T3

```

gaaatttgtt tgacgcagtc tccatcctcc ctgtctgcat ctgtgggaga cagagtcgcc      60
atcacttgcc gggcaagtca gagcattagc agctatttaa attggtatta gcagaaacca      120
gggaaagccc ctaagctcct gatctatgct gcatccagtt tgcaaagtgg ggtcccatca      180
aggttcagtg gcagtggatc tgggacagat ttcactctca ccatcagcag tctgcaacct      240
gaagattttg caacttacta ctgtcaacag agttacagta ccccgtaaac ttttggccag      300
gggaccaaaag tggatatcaa ac                                             322

```

<210> 366  
 <211> 107  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

<400> 366

```

Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1           5           10           15

```

```

Asp Arg Val Ala Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser Ser Tyr
20           25           30

```

```

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

```

```

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

```

```

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

```

```

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

```

```

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Asp Ile Lys
100           105

```

<210> 367  
 <211> 364  
 <212> ADN  
 <213> Homo sapiens

<400> 367

```

gaagttcaat tgtagagtc tggtagcgt cttgttcagc ctggtggttc tttacgtctt      60
tcttgcgctg cttcgggatt cactttctct aagtagata tgcattgggt tcgccaagct      120
cctggtaaag gtttgagtg ggtttctgtt atctctcctt ctggtggctg gacttcttat      180
gctgactccg ttaaaggctg cttcactatc tctagagaca actctaagaa tactctctac      240
ttgcagatga acagcttaag ggctgaggac accgccatgt attactgtgc gagggatgac      300
tacagtaaag gacgggatgc ttttgatata tggggccaag ggaccctggt caccgtctca      360
agcg                                                                    364

```

<210> 368  
 <211> 121  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens  
 <400> 368

```

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

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

Asp Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35              40              45

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

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65              70              75              80

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

Ala Arg Asp Asp Tyr Ser Lys Gly Arg Asp Ala Phe Asp Ile Trp Gly
100              105              110

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115              120

```

<210> 369  
 <211> 322  
 <212> ADN  
 <213> Homo sapiens  
 <400> 369

gaaattgtgc tgactcagtc tccactctcc ctgtctgcat ctgtaggaga cagagtcacc 60  
atcacttgtc gggcaagtca gagcattagc agctatttaa attggtatca gcagaaacca 120  
gggaaagccc ctaagctcct gatctatgct gcatccagtt tgcaaagtgg ggtcccatca 180  
aggttcagtg gcagtggatc tgggacagat ttcactctca ccatcagcag tctgcaacct 240  
gaagattttg caacttacta ctgtcaacag agttacagta cccctcttac tttcggcgga 300  
gggaccaaag tggatatcaa ac 322

<210> 370  
<211> 107  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens  
<400> 370

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

<210> 371  
<211> 364  
<212> ADN  
<213> Homo sapiens  
<400> 371

```

gaagttcaat tgtagagtc tggtagcgtt cttgttcagc ctggtggttc tttacgtctt      60
tcttgccgtg cttccggatt cactttctct aagtagcata tgcattgggt tcgccaagct      120
cctggtaaag gtttggagtg ggtttctgtt atctctcctt ctggtggctg aacttcttat      180
gctgactccg ttaaaggctg cttcactatc tccagagaca actctaagaa tactctctac      240
ttgcagatga acagcttaag ggctgaggac accgccatgt attactgtgc gagggatgac      300
tacagtaaag gacgggatgc ttttgatatc tggggccaag ggaccctggt caccgtctca      360
agcg                                                                    364

```

<210> 372  
 <211> 121  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens  
  
 <400> 372

```

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

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

Asp Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
          35          40          45

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

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
          65          70          75          80

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

Ala Arg Asp Asp Tyr Ser Lys Gly Arg Asp Ala Phe Asp Ile Trp Gly
          100          105          110

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
          115          120

```

<210> 373  
 <211> 322  
 <212> ADN  
 <213> Homo sapiens  
  
 <400> 373

```

aacatccaga tgaccagtc tccatctcc ctgtctgcat ctgtaggaga cagagtcacc      60
atcacttgcc gggcaagtca aagcattagc agctatttaa attggtatca gcagaaacca      120
gggaaagccc ctgagctcct gatctatgct gcctccagtt tgcaaagtgg ggtcccatca      180
aggttcagtg gcagtggatc tgggacagat ttcactctca ccatcagcag tctgcaacct      240
gaagattttg caacttacta ctgtcaacag agttacagta cccctctcac tttcggcgga      300
gggaccaagg tggagatcaa ac                                              322

```

<210> 374  
 <211> 107  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

<400> 374

```

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

```

```

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser Ser Tyr
              20              25              30

```

```

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

```

```

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

```

```

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

```

```

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

```

```

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
              100              105

```

<210> 375  
 <211> 358  
 <212> ADN  
 <213> Homo sapiens

<400> 375

```

gaagttcaat tgtagagtc tggtagcgtt ctgttcagc ctggtggttc tttacgtctt      60
tcttgcgctg cttccggatt cactttctct tggtagcata tggtttgggt tcgccaagct      120
cctggtaaag gtttgagtg ggtttctgtt atctctcctt ctggtggctg aacttcttat      180
gctgactccg ttaaaggctg cttcactatc tctagagaca actctaagaa tactctctac      240
ttgcagatga acagcttaag ggctgaggac acagccacat attactgtgc gagagcggat      300
agtgactacg attcatttga ctactggggc caggggaccc tggtcaccgt ctcaagcg      358

```

<210> 376  
 <211> 119  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

5

<400> 376

```

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

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

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

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

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65           70           75           80

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

Ala Arg Ala Asp Ser Asp Tyr Asp Ser Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
          100          105          110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
          115
    
```

<210> 377  
 <211> 322  
 <212> ADN  
 <213> Homo sapiens

10

<400> 377

15

```

gaaattgtaa tgacgcagtc tccatcctcc ctgtctgcat ctgtaggaga cagagtcacc      60
atcacttgcc gggcaagtca gagcattagc agctatttaa attggtatta gcagaaacca      120
gggaaagccc ctaagctcct gatctatgct gcatccagtt tgcaaagtgg ggtcccatca      180
aggttcagtg gcagtggatc tgggacagat ttcactctca ccatcagcag tctgcaacct      240
gaagattttg caacttacta ctgtcaacag agttacagta ccccccctcac ttteggcgga      300
gggaccaagg tggaaatcaa ac                                     322
    
```

<210> 378  
 <211> 355  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

20

<400> 378

Gly Ala Ala Gly Thr Thr Cys Ala Ala Thr Thr Gly Thr Thr Ala Gly  
1 5 10 15

Ala Gly Thr Cys Thr Gly Gly Thr Gly Gly Cys Gly Gly Thr Cys Thr  
20 25 30

Thr Gly Thr Thr Cys Ala Gly Cys Cys Thr Gly Gly Thr Gly Gly Thr  
35 40 45

Thr Cys Thr Thr Thr Ala Cys Gly Thr Cys Thr Thr Thr Cys Cys Thr  
50 55 60

Gly Cys Gly Cys Thr Gly Cys Thr Thr Cys Cys Gly Gly Ala Thr Thr  
65 70 75 80

Cys Ala Cys Thr Thr Thr Cys Thr Cys Thr Cys Ala Thr Thr Ala Cys  
85 90 95

Gly Ala Gly Ala Thr Gly Gly Gly Thr Thr Gly Gly Gly Thr Thr Cys  
100 105 110

Gly Cys Cys Ala Ala Gly Cys Thr Cys Cys Thr Gly Gly Thr Ala Ala  
115 120 125

Ala Gly Gly Thr Thr Thr Gly Gly Ala Gly Thr Gly Gly Gly Thr Thr  
130 135 140

Thr Cys Thr Thr Ala Thr Ala Thr Cys Thr Cys Thr Thr Cys Thr Thr  
145 150 155 160

Cys Thr Gly Gly Thr Gly Gly Cys Thr Gly Gly Ala Cys Thr Ala Cys  
165 170 175

Thr Thr Ala Thr Gly Cys Thr Gly Ala Cys Thr Cys Cys Gly Thr Thr

180	185	190
Ala Ala Ala Gly Gly Thr Cys Gly Cys Thr Thr Cys Ala Cys Thr Ala		
195	200	205
Thr Cys Thr Cys Thr Ala Gly Ala Gly Ala Cys Ala Ala Cys Thr Cys		
210	215	220
Thr Ala Ala Gly Ala Ala Thr Ala Cys Thr Cys Thr Cys Thr Ala Cys		
225	230	235
Thr Thr Gly Cys Ala Gly Ala Thr Gly Ala Ala Cys Ala Gly Cys Thr		
245	250	255
Thr Ala Ala Gly Gly Gly Cys Thr Gly Ala Gly Gly Ala Cys Ala Cys		
260	265	270
Gly Gly Cys Cys Gly Thr Gly Thr Ala Thr Thr Ala Cys Thr Gly Thr		
275	280	285
Gly Cys Ala Ala Gly Gly Ala Thr Thr Gly Ala Cys Thr Ala Cys Gly		
290	295	300
Cys Ala Gly Ala Thr Gly Cys Thr Thr Thr Thr Gly Ala Thr Ala Thr		
305	310	315
Cys Thr Gly Gly Gly Gly Cys Cys Ala Ala Gly Gly Cys Ala Cys Cys		
325	330	335
Cys Thr Gly Gly Thr Cys Ala Cys Thr Gly Thr Cys Thr Cys Ala Ala		
340	345	350
Gly Cys Gly		
355		

<210> 379  
 <211> 355  
 <212> ADN  
 <213> Homo sapiens

<400> 379



gaagttcaat tgtagagtc tgggtggcggc cttgttcagc ctggtgggtc tttacgtctt 60  
 tcctgcgctg cttccggatt cactttctct cattacgaga tgggttgggt tcgccaagct 120  
 cctggtaaag gtttggagtg ggtttcttat atctcttctt ctggtggctg gactacttat 180  
 gctgactccg ttaaaggctg cttcactatc tctagagaca actotaagaa tactctctac 240  
 ttgcagatga acagcttaag ggctgaggac acggccgtgt attactgtgc aaggattgac 300  
 tacgcagatg cttttgatat ctggggccaa ggcaccctgg tcactgtctc aagcg 355

<210> 380  
 <211> 118  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

<400> 380

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

<210> 381  
 <211> 322  
 <212> ADN  
 <213> Homo sapiens

<400> 381

gaaattgtgt tgacgcagtc tccatcctcc ctgtctgcat ctgtgggaga cagagtcgcc 60  
atcgcttgcc ggcgaagtca gagcatcgac acctatttaa attggtatca gcaaaaacca 120  
gggaaagccc ctaagctcct gatctatgct gcatccagtt tgcaaagtgg ggtcccatca 180  
aggttcagtg gcagtggatc tgggacagat ttcactctca ccatcagcag tctgcaacct 240  
gaagattttg caacttacta ctgtcaacag agttacagta caccctcac tttcggcgga 300  
gggaccaagg tggaaatcaa gc 322

<210> 382  
<211> 107  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens  
<400> 382

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

<210> 383  
<211> 355  
<212> ADN  
<213> Homo sapiens  
<400> 383

```

gaagttcaat tgtagagtc tggtaggggt cttgttcagc ctggtgggtc ttacgtctt      60
tcttgcgctg cttcgggatt cactttctct tggtagcata tggtttgggt tcgccaagct     120
cctggtaaag gtttgagtg ggtttctgtt atctctcctt ctggtggctg aacttcttat     180
gctgactccg ttaaaggctg cttcactatc tctagagaca actctaagaa tactctctac     240
ttgcagatga acagcttaag ggctgaggac acggccgtgt attactgtgc gagagcgagc     300
agtggatgat cttttgatat ctggggccaa ggcaccctgg tcaccgtctc aagcg         355

```

<210> 384  
 <211> 118  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

<400> 384

```

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

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

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

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

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65              70              75              80

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

Ala Arg Ala Ser Ser Gly Asp Ala Phe Asp Ile Trp Gly Gln Gly Thr
          100             105             110

Leu Val Thr Val Ser Ser
          115

```

<210> 385  
 <211> 322  
 <212> ADN  
 <213> Homo sapiens

<400> 385

gaaattgtgt tgacgcagtc tccatcctcc ctgtctgcat ctgtaggaga cagagtcacc 60  
 atcacttgcc gggcaagtca gagcattagc agctatttaa attggtatca gcagaaacca 120  
 gggaaagccc ctaagctcct gatctatggt gcatccagtt tgcaaagtgg ggtcccatca 180  
 aggttcagcg gcagtggatc tggcacagat ttcactctca ccatcagcag tctgcaacct 240  
 gaagattttg caacttacta ctgtcaacag agttacagta ccccgctcac tttcggcgga 300  
 gggaccaagg tggaaatcaa gc 322

<210> 386  
 <211> 107  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens  
 <400> 386

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

<210> 387  
 <211> 355  
 <212> ADN  
 <213> Homo sapiens  
 <400> 387

gaagttcaat tgtagagtc tggtagcgtt ctgttcagc ctggtggttc ttacgtctt 60  
 tcttgcgctg cttccggatt cactttctct tggtacgata tggtttgggt tgcgaagct 120  
 cctggtaaag gtttggagtg ggtttctgtt atctctcctt ctggtggtg aacttcttat 180  
 gctgactccg ttaaaggctg cttcactatc tctagagaca actctaagaa tactctctac 240  
 ttgcagatga acagcttaag ggctgaggac actgcctgtt attactgtgc gagagcgagc 300  
 agtggatgatg cttttgatat ctggggccaa ggcacctgg tcacctctc aagcg 355

<210> 388  
 <211> 118  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

<400> 388

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

<210> 389  
 <211> 322  
 <212> ADN  
 <213> Homo sapiens

<400> 389

gaaattgtaa tgacgcagtc tccatcctcc ctgtctgcat ctgtgggaga cagagtcgcc 60  
atcacttgcc ggcgaagtca gagcatcgac acctatttaa attggtatca gcagaaacca 120  
gggaaagccc ctaagctcct gatctatgct gcatccagtt tgcaaagtgg ggtcccatca 180  
aggttcagtg gcagtggatc tggcacagat ttactctca ctatcagcag tctgcaacct 240  
gaagattttg caatttacta ctgtcaacag agttacagta cccctctcac tttcggcgga 300  
gggaccaagg tggaaatcaa gc 322

<210> 390  
<211> 107  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 390

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

<210> 391  
<211> 355  
<212> ADN  
<213> Homo sapiens

<400> 391

gaagttcaat tgtagagtc tggtaggggt cttgttcagc ctggtggttc tttacgtctt 60

tcttgcgctg cttccggatt cactttctct tggtagcata tggtttgggt tcgccaagct 120  
 cctggtaaag gtttggagtg ggtttctgtt atctctcctt ctggtggctg aacttcttat 180  
 gctgactccg ttaaaggctg cttcactatc tctagagaca actctaagaa tactctctac 240  
 ttgcagatga acagcttaag ggctgaggac acggccgtgt attactgtgc gagagcgagc 300  
 agtgggtgatg cttttgatat ctggggccaa gggacaatgg tcaccgtctc aagcg 355

<210> 392  
 <211> 118  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens  
 <400> 392

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

<210> 393  
 <211> 322  
 <212> ADN  
 <213> Homo sapiens  
 <400> 393

```

gatgttgtga tgacacagtc tccactctcc ctgtccgcat ctgtgggaga cagagtcgcc      60
atcacttgcc gcgcaagtca gagcatcgac acctatttaa attggtatta gcagaaacca      120
gggaaagccc ctaagcccct gatctatgct gcatccagtt tgcgaagtgg ggtcccatca      180
aggttcagtg gcagtggatc tgggacagat ttcactctca ccatcagcag tctgcaacct      240

gaagattttg caacttacta ctgtcaacag agttacagta cctcccttac tttcggcgga      300
gggaccaaaag tggatatcaa ac                                             322

```

<210> 394  
 <211> 107  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens  
 <400> 394

```

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

```

```

Asp Arg Val Ala Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Asp Thr Tyr
          20           25           30

```

```

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

```

```

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

```

```

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

```

```

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

```

```

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Asp Ile Lys
          100          105

```

<210> 395  
 <211> 340  
 <212> ADN  
 <213> Homo sapiens  
 <400> 395



```

gaagttcaat tgtagagtc tggtagcgtt cttgttcagc ctggtggttc tttacgtctt      60
tcttgcgctg cttccggatt cactttctct ggtagacatta tgtggtgggt tcgccaagct      120
cctggtaaag gtttgagtg ggtttctgtt atctctcctt ctggtggcga tacttggtat      180
gctgactccg ttaaaggctg cttcactatc tctagagaca actctaagaa tactctctac      240
ttgcagatga acagcttaag ggctgaggac acggccgtgt attactgtgc cacggcggga      300
gactactggg gccagggcac cctggtcact gtctcaagcg                               340

```

<210> 396  
 <211> 113  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens  
  
 <400> 396

```

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

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

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

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

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65           70           75           80

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

Ala Thr Ala Gly Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser
          100          105          110

```

Ser

<210> 397  
 <211> 322  
 <212> ADN  
 <213> Homo sapiens  
  
 <400> 397

gaaattgtaa tgacgcagtc tccatcctcc ctgtctgcat ctgtaggaga cagagtcacc 60  
 ataacttgcc gggcaagtca gagcattagc agctatttaa attggtatca gcagaaacca 120  
 gggaaagccc ctaagctcct gatctatgct gcattccagtt tgcaaagtgg ggtcccatca 180  
 aggttcagtg gcagtggatc tgggacagat ttcactctca ccatcagcag tctgcaacct 240  
 gaagattttg caacttacta ctgtcaacag agttacagta cccctctcac tttcggcctt 300  
 gggaccaagg tggaaatcaa ac 322

<210> 398  
 <211> 107  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens  
 <400> 398

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

<210> 399  
 <211> 355  
 <212> ADN  
 <213> Homo sapiens  
 <400> 399

gaagttcaat tgtagagtc tggtagcggt ctgttcagc ctggtggttc tttacgtctt 60  
tcttgcgctg cttccggatt cactttctct tggtacgata tggtttgggt tgcgcaagct 120  
cctggtaaag gtttgagtg ggtttctgtt atctctcctt ctggtggctg aacttcttat 180  
gctgactccg ttaaaggctg cttcactatc tctagagaca actctaagaa tactctctac 240  
ttgcagatga acagcttaag ggtgaggac acggccgtgt attactgtgc gagagcgagc 300  
agtggatgat cttttgatat ctggggccaa gggacaatgg tcaccgtctc aagcg 355

<210> 400  
<211> 118  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens  
<400> 400

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

<210> 401  
<211> 322  
<212> ADN  
<213> Homo sapiens  
<400> 401

```

gaaattgtgt tgacgcagtc tccactctcc ctgtctgcat ctgtaggaga cagagtcacc      60
atcacttgcc gggcaagtca gagcattagc acctatttaa attggtatca gcagaaacca      120
gggaaagccc ctagactcct gatctatgct gcatccagtt tgcaaagtgg ggtcccgtca      180
aggttcagtg gcagtggatc tgggacagat ttcactctca ccatcagcag tctgcaacct      240
gaagattttg caacttacta ctgtcaacag agttacagta ccccgatcac ottcggccaa      300
gggacacgac tggagattaa ac                                              322

```

<210> 402  
 <211> 107  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens  
 <400> 402

```

Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1              5              10              15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser Thr Tyr
                20              25              30

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

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

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

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

      Thr Phe Gly Gln Gly Thr Arg Leu Glu Ile Lys
              100              105

```

<210> 403  
 <211> 355  
 <212> ADN  
 <213> Homo sapiens  
 <400> 403

```

gaagttcaat tgtagagtc tggtagcggt cttgttcagc ctggtggttc tttacgtctt      60
tcttgcgctg cttccggatt cactttctct tggtagcata tgggttgggt tgcgcaagct      120
cctggtaaag gtttggagtg ggtttctgtt atctctcctt ctggtggctg aacttcttat      180
gctgactccg ttaaaggctg cttcactatc tctagagaca actctaagaa tactctctac      240
ttgcagatga acagcttaag ggctgaggac acggccgtgt attactgtgc gagagcgagc      300
agtgggtgatg cttttgatat ctggggccaa ggcaccctgg tcactgtctc aagcg          355

```

<210> 404  
 <211> 118  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens  
 <400> 404

```

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

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

Asp Met Gly Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Gln Trp Val
          35          40          45

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

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65          70          75          80

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

Ala Arg Ala Ser Ser Gly Asp Ala Phe Asp Ile Trp Gly Gln Gly Thr
          100          105          110

Leu Val Thr Val Ser Ser
          115

```

<210> 405  
 <211> 322  
 <212> ADN  
 <213> Homo sapiens  
 <400> 405

gacatccagt tgaccagtc tccatcctcc ctgtctgcat ctgtaggaga cagagtcacc 60  
atcacttgcc gggcaagtca gagcattagc agctatttaa attggtatta gcagaaacca 120  
gggaaagccc ctaagctcct gatctatgct gcatccagtt tgcaaagtgg ggtcccatca 180  
aggttcagtg gcagtggatc tgggacagat ttcactotca ccatcagcag tctgcaacct 240  
gaagattttg caacttacta ctgtcaacag agttacagta cccccctcac tttcggcgga 300  
gggacacgac tggagattaa ac 322

<210> 406  
<211> 107  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens  
<400> 406

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

<210> 407  
<211> 364  
<212> ADN  
<213> Homo sapiens  
<400> 407

gaagttcaat tgtagagtc tggtagcgt cttgttcagc ctggtggttc tttacgtctt 60  
 tcttgcgctg cttccggatt cactttctct aagtagata tgcattgggt tcgccaagct 120  
 cctggtaaag gtttgagtg ggtttctgtt atctctcctt ctggtggtg gacttcttat 180  
 gctgaccccg ttaaaggctg cttcactatc tctagagaca actctaagaa tactctctac 240  
 ttgcagatga acagcttaag ggctgaggac accgccatgt attactgtgc gagggatgac 300  
 tacagtaaag gacgggatgc ttttgatatc tggggccaag ggacaatggt caccgtctca 360  
 agcg 364

<210> 408  
 <211> 121  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens  
 <400> 408

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

<210> 409  
 <211> 322  
 <212> ADN  
 <213> Homo sapiens  
 <400> 409

```

gccatctgga tgaccagtc tccatcctcc ctgtctgcat ctgtaggaga cagagtcacc      60
atcacttgcc gggcaagtca gagcattagc agctatttaa attggtatca gcagaaacca      120
gggaaagccc ctaagctcct gatctacgct gcatccagtt tgcaaagtgg ggtcccatca      180
aggttcagtg gcagtgggtc tgggacagat ttcaactotca ccatcagcag tctgcaacct      240
gaagattctg caacttacta ctgtcaacag agttacagta ccccgtagac tttcggcgga      300
gggaccaagg tggagatcaa ac                                              322

```

<210> 410  
 <211> 107  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens  
  
 <400> 410

```

Ala Ile Trp Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1              5              10              15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser Ser Tyr
                20              25              30

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

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

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

Glu Asp Ser Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Tyr Ser Thr Pro Tyr
          85              90              95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
          100              105

```

<210> 411  
 <211> 349  
 <212> ADN  
 <213> Homo sapiens  
  
 <400> 411



gaagttcaat tgtagagtc tggtagcgtt cttgttcagc ctggtggttc ttacgtctt 60  
 tcttgcgctg cttcgggatt cactttctct tggtaggata tggtttgggt tcgccaagct 120  
 cctggttaaag gtttggagtg ggtttctgtt atctctcctt ctggtggttg aacttcttat 180  
 gctgactccg ttaaaggctg cttcactatc tctagagaca actctaagaa tactctctac 240  
 ttgcagatga acagcttaag ggctgaggac acggccgtgt attactgtgc gagagcgagc 300  
 agtgggtgatg cttttgatat ctggggccaa gggaccacgg tcaccgtct 349

<210> 412  
 <211> 116  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens  
 <400> 412

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

<210> 413  
 <211> 322  
 <212> ADN  
 <213> Homo sapiens  
 <400> 413

gatgttgtga tgacacagtc tccatcctcc ctgtctgcat ctgtaggaga cagagtcacc 60  
atcacttgcc gggcaagtca gagcattagc agctatttaa attggtatta gcagaaacca 120  
gggaaagccc ctaagctcct gatctatgct gcatccagtt tgcaaagtgg ggtcccatca 180  
aggttcagtg gcagtggatc tgggacagat ttcactctca ccatcagcag tctgcaacct 240  
gaagattttg caacttacta ctgtcaacag agttacagta ccccccctcac tttcggcgga 300  
gggaccaagg tggaaatcaa gc 322

<210> 414  
<211> 107  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens  
<400> 414

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser Ser Tyr  
20 25 30

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

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

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

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

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys  
100 105

<210> 415  
<211> 364  
<212> ADN  
<213> Homo sapiens  
<400> 415

```

gaagttcaat tgtagagtc tggtagcggc cttgttcagc ctggtgggtc tttacgtott      60
tcttgcgctg cttccggatt cactttctct cgttacgata tggagtgggt tcgccaagct      120
cctggtaaag gtttggagtg ggtttcttct atctctcctt ctggtggctg gacttcttat      180
gctgactccg ttaaaggctg cttcactatc tctagagaca actctaagaa tactctctac      240
ttgcagatga acagcttaag ggctgaggac acggccgtgt attactgtgc gagagatcat      300
agtggctacg attctgaata ctttgactac tggggccagg ggaccctggt caccgtctca      360
agcg                                                                    364

```

<210> 416  
 <211> 121  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens  
 <400> 416

```

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

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

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

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

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65          70          75          80

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

Ala Arg Asp His Ser Gly Tyr Asp Ser Glu Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly
100         105         110

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115          120

```

<210> 417  
 <211> 322  
 <212> ADN  
 <213> Homo sapiens  
 <400> 417

gccatctgga tgacccagtc tccatcctcc ctgtctgcat ctgtaggaga cagagtcacc 60  
 atcaattgcc gggcaagtca gagcattagc agctatttaa attggtatta gcagaaacca 120  
 gggaaagccc ctaagctcct gatctatgct gcatccagtt tgcaaagtgg ggtcccatca 180  
 aggttcagtg gcggcggatc tgggacagat ttcactctca ccatcagcag tctgcagcct 240  
 gaagattttg caacttacta ctgtcaacag agttacagta ccccccctcac tttcggcgga 300  
 gggacacgac tggagattaa ac 322

<210> 418  
 <211> 107  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens  
 <400> 418

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

<210> 419  
 <211> 340  
 <212> ADN  
 <213> Homo sapiens  
 <400> 419

gacgttcaat tgtagagtc tggtagcggc cttgttcagc ctggtgggtc tttacgtctt 60  
tcttgcgctg cttccggatt cacttcctct ggtagacatta tgggtgggtc tgcgaagct 120  
cctggtaaag gtttgagtg ggtttctgtt atctctcctt ctggtggcga tacttggtat 180  
gctgactccg ttaaaggctg cttcactatc tctagagaca actctaagaa tactctctac 240  
ttgcagatga acagcttaag ggctgaggac acggcctgtt attactgtgc cacagcggga 300  
gactactggg gccagggcac cctggtcact gtctcaagcg 340

<210> 420  
<211> 113  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens  
<400> 420

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

Ser

<210> 421  
<211> 322  
<212> ADN  
<213> Homo sapiens  
<400> 421

gaaattgtaa tgacgcagtc tccatcctcc ctgtctgcat ctgtaggaga cagagtcacc 60  
 atcacttgcc gggcaagtca gagcattagc agctatttaa attggtatta gcagaaacca 120  
 gggaaagccc ctaagctcct gatctatgct gcatccagtt tgcaaagtgg ggtcccatca 180  
 aggttcagtg gcagtggatc tgggacagat ttcactctca ccatcagcag tctgcaacct 240  
 gaagattttg caacttacta ctgtcaacag agttacagta ccccgctcac tttcggcgga 300  
 gggaccaagg tggaaatcaa ac 322

<210> 422  
 <211> 107  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens  
 <400> 422

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

<210> 423  
 <211> 364  
 <212> ADN  
 <213> Homo sapiens  
 <400> 423

```

gaagttcaat tgttagagtc tggtaggggt cttgttcagc ctggtgggtc tttacgtctt      60
tcttgcgctg cttccggatt cactttctct tggtagcata tggtttgggt tgcceaagct      120
cctggtaaag gtttgagtg ggtttctgtt atctctcctt ctggtggctg gacttcttat      180
gctgactccg ttaaaggctg cttcactatc tctagagaca actctaagaa tactctctac      240
ttgcagatga acagcttaag ggctgaggac accgccatgt attactgtgc gagggatgac      300
tacagtaaag gacgggatgc ttttgatata tggggccaag ggaccctggg caccgtctca      360

agcg                                                                           364

```

<210> 424  
 <211> 121  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens  
 <400> 424

```

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

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

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

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

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65              70              75              80

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

Ala Arg Asp Asp Tyr Ser Lys Gly Arg Asp Ala Phe Asp Ile Trp Gly
100             105             110

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115              120

```

<210> 425  
 <211> 322  
 <212> ADN  
 <213> Homo sapiens  
 <400> 425

```

gaaattgtgc tgactcagtc tccatcttcc gtgtctgcac ctgtaggaga cagagtcacc      60
atcacttgtc gggcgagtc gagtattagc acctatttaa attggtatcg gcagaaacca      120
gggaaagccc ctaacctcct gatctctact gcatccaatt tgcaaagtgg ggtcccgtca      180
aggttcagtg gcagtggatc tgggacagat ttcactctca ccatcagcag tctgcaacct      240
gaagattttg caacttactc ctgtcaacaa agttacagta cccctttcac tttcggcct      300
gggaccaaag tggatatcaa ac                                              322

```

<210> 426  
 <211> 107  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

<400> 426

```

Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ser Val Ser Ala Ser Val Gly
1           5           10           15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser Thr Tyr
          20           25           30

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

Ser Thr Ala Ser Asn Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
          50           55           60

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

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

Thr Phe Gly Pro Gly Thr Lys Val Asp Ile Lys
          100          105

```

<210> 427  
 <211> 355  
 <212> ADN  
 <213> Homo sapiens

<400> 427



gaagttcaat tgtagagtc tggtagcgtt cttgttcagc ctggtggttc tttacgtctt 60  
tcttgcgctg cttccggatt cactttctct tgtagagata tggtttgggt tggccaagct 120  
cctggttaaag gtttggagtg ggtttctgtt atctctcctt ctggtggctg aacttcttat 180  
gctgactccg ttaaaggctg cttcactatc tctagagaca actctaggaa tactctctac 240  
ttgcagatga acagcttaag ggctgaggac acggccatgt attactgtgc gagagcgagc 300  
agtggatgat cttttgatat ctggggccaa gggaccctgg tcaccgtctc aagcg 355

<210> 428  
<211> 118  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens  
<400> 428

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

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

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

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

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Arg Asn Thr Leu Tyr  
65 70 75 80

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

Ala Arg Ala Ser Ser Gly Asp Ala Phe Asp Ile Trp Gly Gln Gly Thr  
100 105 110

Leu Val Thr Val Ser Ser  
115

<210> 429  
<211> 322  
<212> ADN  
<213> Homo sapiens  
<400> 429

gatgttgtga tgacacagtc tccatcctcc ctgtctgcat ctgtaggaga cagagtcacc 60  
atcacttgcc gggcaagtca gagcattagc agctatttaa attggtatta gcagaaacca 120  
gggaaagccc ctaagctcct gatctatgct gcatccagtt tgcaaagtgg ggtcccatca 180  
aggttcagtg gcagtggatc tgggacagat ttcactctca ccatcagcag tctgcaacct 240  
gaagattttg caacttacta ctgtcaacag agttacagta ccccgtagac ttttgcccaa 300  
gggacacgac tggagattaa ac 322

<210> 430  
<211> 107  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 430

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser Ser Tyr  
20 25 30

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

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

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

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

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Arg Leu Glu Ile Lys  
100 105

<210> 431  
<211> 340  
<212> ADN  
<213> Homo sapiens

<400> 431

```

gaagttcaat tgtagagtc tggtagcgtt cttgttcagc ctggtggttc tttacgtctt      60
tcttgccgtg cttccggatt caattcctct ggtagacatta tgggtgggt tcgccaagct      120
cctggtaaag gtttgagtg ggtttctgtt atctctcctt ctggtggcga tacttggtat      180
gctgactccg ttaaaggctg cttcactatc tctagagaca actctaagaa tactctctac      240
ttgcagatga acagcttaag ggctgaggac acggccgtgt attactgtgc cacagcggga      300
gactactggg gccagggcac cctggtcact gtctcaagcg                               340

```

<210> 432  
 <211> 113  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens  
 <400> 432

```

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

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

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

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

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65              70              75              80

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

Ala Thr Ala Gly Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser

```

100 105 110

Ser

<210> 433  
 <211> 17  
 <212> PRT  
 <213> Artificial  
 <220>  
 <223> LCDR1 consenso anti-PDGFRbeta  
 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (6)..(6)  
 <223> Xaa es Val o Leu

5 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (10)..(10)  
 <223> Xaa es Ser, Ala o Pro

10 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (12)..(12)  
 <223> Xaa es Asn o Lys

<400> 433

<b>Lys</b>	<b>Ser</b>	<b>Ser</b>	<b>Gln</b>	<b>Ser</b>	<b>Xaa</b>	<b>Leu</b>	<b>Tyr</b>	<b>Ser</b>	<b>Xaa</b>	<b>Asn</b>	<b>Xaa</b>	<b>Lys</b>	<b>Asn</b>	<b>Tyr</b>	<b>Leu</b>
<b>1</b>				<b>5</b>					<b>10</b>					<b>15</b>	

15 **Ala**

20 <210> 434  
 <211> 7  
 <212> PRT  
 <213> Artificial

25 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (1)..(1)  
 <223> Xaa es Trp o Arg

30 <400> 434

	<b>Xaa</b>	<b>Ala</b>	<b>Ser</b>	<b>Thr</b>	<b>Arg</b>	<b>Glu</b>	<b>Ser</b>
	<b>1</b>				<b>5</b>		

35 <210> 435  
 <211> 9  
 <212> PRT  
 <213> Artificial

40 <220>  
 <223> LCDR3 consenso anti-PDGFRbeta

45 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (6)..(6)  
 <223> Xaa es Thr o Ile

50 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (8)..(8)  
 <223> Xaa es Tyr, Phe, Trp o Ile

<400> 435

	<b>Gln</b>	<b>Gln</b>	<b>Tyr</b>	<b>Tyr</b>	<b>Ser</b>	<b>Xaa</b>	<b>Pro</b>	<b>Xaa</b>	<b>Thr</b>
	<b>1</b>				<b>5</b>				

55 <210> 436  
 <211> 5  
 <212> PRT  
 <213> Artificial

<220>  
 <223> HCDR1 consenso anti-PDGFRbeta  
  
 5 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (1).. (1)  
 <223> Xaa es Lys, Gln, Arg, Met, Gly o Asn  
  
 10 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (3)..(3)  
 <223> Xaa es Lys, Met, Val, Phe, Ile, Ser, Arg o Pro  
  
 15 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (5)..(5)  
 <223> Xaa es Leu, Gln, Thr, Ser, Glu, Val o Gly  
  
 20 <400> 436  
  
 Xaa Tyr Xaa Met Xaa  
 1 5  
  
 25 <210> 437  
 <211> 17  
 <212> PRT  
 <213> Artificial  
  
 30 <220>  
 <223> HCDR2 consenso anti-PDGFRbeta  
  
 35 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (1)..(1)  
 <223> Xaa es Ser o Gly  
  
 40 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (3)..(3)  
 <223> Xaa es Tyr, Ser o Trp  
  
 45 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (8)..(8)  
 <223> Xaa es Val, Ile, Leu o Met  
  
 50 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
  
 <222> (10)..(10)  
 <223> Xaa es Phe, Thr o Val  
  
 <400> 437  
  
 Xaa Ile Xaa Pro Ser Gly Gly Xaa Thr Xaa Tyr Ala Asp Ser Val Lys  
 1 5 10 15  
  
 Gly  
  
 55 <210> 438  
 <211> 13  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

<400> 438

**Asp Gly Ile Pro Leu Ser Ile Ala Ala Pro Ile Asp Tyr**  
1 5 10

5 <210> 439  
<211> 12  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

10 <400> 439

**Asp Arg Pro Thr Gly Lys Thr Gly Tyr Phe Gln His**  
1 5 10

15 <210> 440  
<211> 12  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

20 <400> 440

**Ala Tyr Ser Ser Gly Trp Ser Leu Pro Phe Asp Tyr**  
1 5 10

25 <210> 441  
<211> 13  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 441

30 **Ala Arg Arg Met Arg Ser Leu Trp Glu Ala Phe Asp Ile**  
1 5 10

35 <210> 442  
<211> 12  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 442

**Asp Gly Glu Met Ile Ser Gly Ser Phe Phe Asp Ser**  
1 5 10

40 <210> 443  
<211> 17  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

45 <400> 443

**Lys Ser Ser Gln Ser Val Leu Tyr Ser Ser Asn Asn Lys Asn Tyr Leu**  
1 5 10 15

**Ala**

50 <210> 444  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

ES 2 456 296 T3

<220>  
 <223> LCDR3 consenso anti-PDGFRbeta  
 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (8)..(8)  
 <223> Xaa es Tyr, Trp o Ile  
 <400> 444  
 Gln Gln Tyr Tyr Ser Thr Pro Xaa Thr  
 1 5  
 <210> 445  
 <211> 5  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> HCDR1 consenso anti-PDGFRbeta  
 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (1)..(1)  
 <223> Xaa es Lys, Glu, Arg o Met  
 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (3).. (3)  
 <223> Xaa es Lys, Met, Val o Phe  
 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (5).. (5)  
 <223> Xaa es Leu, Gln, Thr o Ser  
 <400> 445  
 Xaa Tyr Xaa Met Xaa  
 1 5  
 <210> 446  
 <211> 5  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> HCDR1 consenso anti-PDGFRbeta  
 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (5)..(5)  
 <223> Xaa es Leu o Gln  
 <400> 446  
 Lys Tyr Lys Met Xaa  
 1 5  
 <210> 447  
 <211> 17  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> HCDR2 consenso anti-PDGFRbeta

5      <220>  
         <221> MISC\_FEATURE  
         <222> (3)..(3)  
         <223> Xaa es Tyr o Ser

10     <220>  
         <221> MISC\_FEATURE  
         <222> (8)..(8)  
         <223> Xaa es Val o Leu

15     <400> 447

	<b>Ser</b>	<b>Ile</b>	<b>Xaa</b>	<b>Pro</b>	<b>Ser</b>	<b>Gly</b>	<b>Gly</b>	<b>Xaa</b>	<b>Thr</b>	<b>Phe</b>	<b>Tyr</b>	<b>Ala</b>	<b>Asp</b>	<b>Ser</b>	<b>Val</b>	<b>Lys</b>
	<b>1</b>				<b>5</b>					<b>10</b>					<b>15</b>	

**Gly**

20     <210> 448  
         <211> 11  
         <212> PRT  
         <213> Secuencia artificial

25     <220>  
         <223> LCDR1 consenso anti-VEGF-A

30     <220>  
         <221> MISC\_FEATURE  
         <222> (2)..(2)  
         <223> Xaa es Ala, Thr o Ser

35     <220>  
         <221> MISC\_FEATURE  
         <222> (4)..(4)  
         <223> Xaa es Gln o Glu

40     <220>  
         <221> MISC\_FEATURE  
         <222> (5)..(5)  
         <223> Xaa es Ser, Gly, Thr o Asn

45     <220>  
         <221> MISC\_FEATURE  
         <222> (7)..(7)  
         <223> Xaa es Ser, Asp, Arg o Asn

50     <220>  
         <221> MISC\_FEATURE  
         <222> (8)..(8)  
         <223> Xaa es Ser, Thr, Arg, Gly o Asn

55     <220>  
         <221> MISC\_FEATURE  
         <222> (9)..(9)  
         <223> Xaa es Tyr o Phe

60     <220>  
         <221> MISC\_FEATURE  
         <222> (10)..(10)  
         <223> Xaa es Leu o Val

<400> 448



**Arg Xaa Ser Xaa Xaa Ile Xaa Xaa Xaa Xaa Asn**  
**1 5 10**

5 <210> 449  
 <211> 7  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

10 <220>  
 <223> LCDR2 consenso anti-VEGF-A

15 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (1)..(1)  
 <223> Xaa es Ala, Gly, Asp o Thr

20 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (2)..(2)  
 <223> Xaa es Ala o Arg

25 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (4)..(4)  
 <223> Xaa es Ser, Thr, Lys, Asn o Arg

30 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (6)..(6)  
 <223> Xaa es Gln, Glu, Lys o Arg

35 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (7)..(7)  
 <223> Xaa es Ser, Asp o Gly

<400> 449

**Xaa Xaa Ser Xaa Leu Xaa Xaa**  
**1 5**

40 <210> 450  
 <211> 9  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

45 <220>  
 <223> LCDR3 consenso anti-VEGF-A

50 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (5)..(5)  
 <223> Xaa es Thr o Ser

55 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (6)..(6)  
 <223> Xaa es Thr, Ala o Ser

60 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (7)..(7)  
 <223> Xaa es Pro o Ser

<220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (8) .. (8)  
 <223> Xaa es Leu, Tyr, Pro, Ile, Arg, Val o Phe o está ausente  
 5  
 <400> 450  
  
 Gln Gln Ser Tyr Xaa Xaa Xaa Xaa Thr  
 1 5  
 10  
 <210> 451  
 <211> 5  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial  
 15  
 <220>  
 <223> HCDR1 consenso anti-VEGF-A  
 20  
 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (1).. (1)  
 <223> Xaa es Lys, Gly, Arg, His o Trp  
 25  
 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (3)..(3)  
 <223> Xaa es Asp, Ile o Glu  
 30  
 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (5)..(5)  
 <223> Xss es His, Trp, Glu, Gly, Val, Asp o Ala  
 35  
 <400> 451  
  
 Xaa Tyr Xaa Met Xaa  
 1 5  
 40  
 <210> 452  
 <211> 17  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial  
 45  
 <220>  
 <223> HCDR2 consenso anti-VEGF-A  
 50  
 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (1) .. (1)  
 <223> Xaa es Val, Ser o Tyr  
 55  
 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (4)..(4)  
 <223> Xaa es Pro o Ser  
 60  
 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (8)..(8)  
 <223> Xaa es Try o Asp  
 60  
 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (9)..(9)

<223> Xaa es Thr o Ala  
 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (10)..(10)  
 <223> Xaa es Ser, Trp, Ala o Thr  
 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (14)..(14)  
 <223> Xaa es Ser o Pro  
 <400> 452  
 Xaa Ile Ser Xaa Ser Gly Gly Xaa Xaa Xaa Tyr Ala Asp Xaa Val Lys  
 1 5 10 15  
 Gly  
 <210> 453  
 <211> 12  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens  
 <400> 453  
 Asp His Ser Gly Tyr Asp Ser Glu Tyr Phe Asp Tyr  
 1 5 10  
 <210> 454  
 <211> 12  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens  
 <400> 454  
 Asp Asp Tyr Ser Lys Gly Arg Asp Ala Phe Asp Ile  
 1 5 10  
 <210> 455  
 <211> 13  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens  
 <400> 455  
 Asp Ser Ser Gly Tyr Tyr Ser Pro Asp Ala Phe Asp Ile  
 1 5 10  
 <210> 456  
 <211> 4  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens  
 <400> 456  
 Ala Gly Asp Tyr  
 1  
 <210> 457  
 <211> 9

```

<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 457
5
      Ala Ser Ser Gly Asp Ala Phe Asp Ile
      1                               5

<210> 458
<211> 10
<212> PRT
10  <213> Homo sapiens

<400> 458

      Ala Asp Ser Asp Tyr Asp Ser Phe Asp Tyr
      1                               5               10

15
<210> 459
<211> 9
<212> PRT
20  <213> Homo sapiens

<400> 459

      Ile Gly Tyr Ala Asp Ala Phe Asp Ile
      1                               5

25
<210> 460
<211> 9
<212> PRT
30  <213> Homo sapiens

<400> 460

      Ile Asp Tyr Ala Asp Ala Phe Asp Ile
      1                               5

35
<210> 461
<211> 12
<212> PRT
<213> Homo sapiens

40  <400> 461

      Asp Gly Tyr Ser Lys Gly Arg Asp Ala Phe Asp Ile
      1                               5               10

45
<210> 462
<211> 13
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

50  <220>
<223> LCDR1 consenso anti-VEGF-A

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (3)..(3)
55  <223> Xaa es Ser o Val

<220>
<221> MISC_FEATURE

```

	<222> (9) .. (9)	
	<223> Xaa es Lys, Ser, Arg o Ala	
5	<220>	
	<221> MISC_FEATURE	
	<222> (11) .. (11)	
	<223> Xaa es Ala, Thr, Pro, Asn, Ser, Tyr o Ile	
10	<220>	
	<221> MISC_FEATURE	
	<222> (13) .. (13)	
	<223> Xaa es His, Asn, Gln, Thr o Ser	
15	<400> 462	
	<b>Ser Gly Xaa Ser Ser Asn Ile Gly Xaa Asn Xaa Val Xaa</b>	
	<b>1 5 10</b>	
20	<210> 463	
	<211> 7	
	<212> PRT	
	<213> Secuencia artificial	
25	<220>	
	<223> LCDR2 consenso anti-VEGF-A	
30	<220>	
	<221> MISC_FEATURE	
	<222> (1)..(1)	
	<223> Xaa es Tyr, Gly, Ser, Arg o Thr	
35	<220>	
	<221> MISC_FEATURE	
	<222> (2) .. (2)	
	<223> Xaa es Asn o Asp	
40	<220>	
	<221> MISC_FEATURE	
	<222> (3) .. (3)	
	<223> Xaa es Asn, Arg o Asp	
45	<220>	
	<221> MISC_FEATURE	
	<222> (4) .. (4)	
	<223> Xaa es Leu, Gln o Arg	
50	<220>	
	<221> MISC_FEATURE	
	<222> (5)..(5)	
	<223> Xaa es Leu o Arg	
55	<220>	
	<221> MISC_FEATURE	
	<222> (7)..(7)	
	<223> Xaa es Pro o Ser	
	<400> 463	
60		
	<b>Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Pro Xaa</b>	
	<b>1 5</b>	
	<210> 464	
	<211> 11	
	<212> PRT	
	<213> Secuencia artificial	

<220>  
 <223> LCDR3 consenso anti-VEGF-A

5      <220>  
         <221> MISC\_FEATURE  
         <222> (1) .. (1)  
         <223> Xaa es Ala o Thr

10     <220>  
         <221> MISC\_FEATURE  
         <222> (2)..(2)  
         <223> Xaa es Ala o Thr

15     <220>  
         <221> MISC\_FEATURE  
         <222> (6) .. (6)  
         <223> Xaa es Asn o Ser

20     <220>  
         <221> MISC\_FEATURE  
         <222> (8) .. (8)  
         <223> Xaa es Asn o Ser

25     <220>  
         <221> MISC\_FEATURE  
         <222> (9) .. (9)  
         <223> Xaa es Gly o Val

30     <220>  
         <221> MISC\_FEATURE  
         <222> (10) .. (10)  
         <223> Xaa es Pro, Trp o Val

35     <400> 464

	<b>Xaa</b>	<b>Xaa</b>	<b>Trp</b>	<b>Asp</b>	<b>Asp</b>	<b>Xaa</b>	<b>Leu</b>	<b>Xaa</b>	<b>Xaa</b>	<b>Xaa</b>	<b>Val</b>
	<b>1</b>				<b>5</b>					<b>10</b>	

40     <210> 465  
         <211> 5  
         <212> PRT  
         <213> Secuencia artificial

45     <220>  
         <223> HCDR1 consenso anti-VEGF-A

50     <220>  
         <221> MISC\_FEATURE  
         <222> (1) .. (1)  
         <223> Xaa es Asp, Gly o His

55     <220>  
         <221> MISC\_FEATURE  
         <222> (3) .. (3)  
         <223> Xaa es Leu, Ile o Glu

60     <220>  
         <221> MISC\_FEATURE  
         <222> (5) .. (5)  
         <223> Xaa es Val, Trp o Ala

<400> 465

**Xaa Tyr Xaa Met Xaa**  
1 5

5  
<210> 466  
<211> 17  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens  
  
<400> 466

**Ala Ala Trp Asp Asp Ser Pro Thr Gly Asp Asp Ser Leu Ser Ser Tyr**  
1 5 10 15

10 **Val**

<210> 467  
<211> 17  
<212> PRT  
15 <213> Secuencia artificial  
  
<220>  
<223> HCDR2 consenso anti-VEGF-A

20 <220>  
<221> MISC\_FEATURE  
<222> (1) .. (1)  
<223> Xaa es Tyr o Val

25 <220>  
<221> MISC\_FEATURE  
<222> (8)..(8)  
<223> Xaa es Trp o Asp

30 <220>  
<221> MISC\_FEATURE  
<222> (10) .. (10)  
<223> Xaa es Ala, Trp o Ser

35 <400> 467

**Xaa Ile Ser Pro Ser Gly Gly Xaa Thr Xaa Tyr Ala Asp Ser Val Lys**  
1 5 10 15

**Gly**

40 <210> 468  
<211> 4  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens  
  
<400> 468

45 **Ala Gly Asp Tyr**  
1

<210> 469  
<211> 12  
50 <212> PRT  
<213> Homo sapiens  
  
<400> 469

		<b>Val Val Glu Leu Arg Ala Gly Asp Ala Phe Asp Ile</b>
		<b>1 5 10</b>
5	<210> 470	
	<211> 9	
	<212> PRT	
	<213> Homo sapiens	
10	<400> 470	
		<b>Glu Gly Pro Leu Asp Ala Phe Asp Ile</b>
		<b>1 5</b>
15	<210> 471	
	<211> 13	
	<212> PRT	
	<213> Secuencia artificial	
20	<220>	
	<223> LCDR1 consenso anti-VEGF-A	
25	<220>	
	<221> MISC_FEATURE	
	<222> (9) .. (9)	
	<223> Xaa es Ser o Arg	
30	<220>	
	<221> MISC_FEATURE	
	<222> (11) .. (11)	
	<223> Xaa es Thr, Pro, Asn o Ile	
35	<220>	
	<221> MISC_FEATURE	
	<222> (13) .. (13)	
	<223> Xaa es Asn o Gln	
	<400> 471	
40		<b>Ser Gly Ser Ser Ser Asn Ile Gly Xaa Asn Xaa Val Xaa</b>
		<b>1 5 10</b>
45	<210> 472	
	<211> 13	
	<212> PRT	
	<213> Secuencia artificial	
50	<220>	
	<223> LCDR1 consenso anti-VEGF-A	
55	<220>	
	<221> MISC_FEATURE	
	<222> (3) .. (3)	
	<223> Xaa es Ser o Val	
60	<220>	
	<221> MISC_FEATURE	
	<222> (9) .. (9)	
	<223> Xaa es Lys, Ser o Arg	
	<220>	
	<221> MISC_FEATURE	



<222> (11).. (11)  
 <223> Xaa es Ala, Thr, Pro, Asn o Ser  
  
 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (13)..(13)  
 <223> Xaa es His, Asn, Gln o Thr  
  
 <400> 472  
  
 5  
  
 10  
  
 Ser Gly Xaa Ser Ser Asn Ile Gly Xaa Asn Xaa Val Xaa  
 1 5 10  
  
 <210> 473  
 <211> 13  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial  
  
 <220>  
 <223> LCDR1 consenso anti-VEGF-A  
  
 20  
  
 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (9)..(9)  
 <223> Xaa es Ser o Arg  
  
 25  
  
 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (11)..(11)  
 <223> Xaa es Thr, Pro o Asn  
  
 30  
  
 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (13) .. (13)  
 <223> Xaa es Asn o Gln  
  
 35  
  
 <400> 473  
  
 Ser Gly Ser Ser Ser Asn Ile Gly Xaa Asn Xaa Val Xaa  
 1 5 10  
  
 40  
 <210> 474  
 <211> 7  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial  
  
 45  
 <220>  
 <223> LCDR2 consenso anti-VEGF-A  
  
 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> . (1) .. (1)  
 <223> Xaa es Gly o Ser  
  
 50  
  
 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (2) .. (2)  
 <223> Xaa es Asn o Asp  
  
 55  
  
 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (3) .. (3)  
 <223> Xaa es Asn, Arg o Asp  
  
 60  
  
 <220>

<221> MISC\_FEATURE  
 <222> (4) .. (4)  
 <223> Xaa es is Gln o Arg  
 5 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (7) .. (7)  
 <223> Xaa es Pro o Ser  
 10 <400> 474  
  

**Xaa Xaa Xaa Xaa Arg Pro Xaa**  
**1 5**

  
 15 <210> 475  
 <211> 7  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial  
  
 20 <220>  
 <223> LCDR2 consenso anti-VEGF-A  
  
 25 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (1) .. (1)  
 <223> Xaa es Tyr, Gly, Ser o Arg  
  
 30 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (2).. (2)  
 <223> Xaa es Asn o Asp  
  
 35 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (3) .. (3)  
 <223> Xaa es Asn o Asp  
  
 40 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (4) .. (4)  
 <223> Xaa es Leu, Gln o Arg  
  
 45 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (5) .. (5)  
 <223> Xaa es Leu o Arg  
  
 50 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (7) .. (7)  
 <223> Xaa es Pro o Ser  
 <400> 475  
  

**Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Pro Xaa**  
**1 5**

  
 55 <210> 476  
 <211> 7  
 <212> PRT  
 60 <213> Secuencia artificial  
  
 <220>  
 <223> LCDR2 consenso anti-VEGF-A

5 <220>  
<221> MISC\_FEATURE  
<222> (1) .. (1)  
<223> Xaa es Gly o Ser

10 <220>  
<221> MISC\_FEATURE  
<222> (2) .. (2)  
<223> Xaa es Asn o Asp

15 <220>  
<221> MISC\_FEATURE  
<222> (3) .. (3)  
<223> Xaa es Asn o Asp

20 <220>  
<221> MISC\_FEATURE  
<222> (4) .. (4)  
<223> Xaa es Gln o Arg

25 <220>  
<221> MISC\_FEATURE  
<222> (7)..(7)  
<223> Xaa es Pro o Ser

<400> 476

30 **Xaa Xaa Xaa Xaa Arg Pro Xaa**  
**1 5**

35 <210> 477  
<211> 5  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

40 <220>  
<221> MISC\_FEATURE  
<222> (1) .. (1)  
<223> Xaa es Asp o Gly

45 <220>  
<221> MISC\_FEATURE  
<222> (3) .. (3)  
<223> Xaa es Leu o Ile

50 <220>  
<221> MISC\_FEATURE  
<222> (5) .. (5)  
<223> Xaa es Val o Trp

55 <400> 477

**Xaa Tyr Xaa Met Xaa**  
**1 5**

60 <210> 478  
<211> 17  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

<220>  
<223> HCDR2 consenso anti-VEGF-A

5  
<220>  
<221> MISC\_FEATURE  
<222> (1) .. (1)  
<223> Xaa es Try o Val

10  
<220>  
<221> MISC\_FEATURE  
<222> (8) .. (8)  
<223> Xaa es Trp o Asp

15  
<220>  
<221> MISC\_FEATURE  
<222> (10) .. (10)  
<223> Xaa es Ala o Trp

20  
<400> 478

**Xaa Ile Ser Pro Ser Gly Gly Xaa Thr Xaa Tyr Ala Asp Ser Val Lys**  
**1 5 10 15**

**Gly**

25  
<210> 479  
<211> 7  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

30  
<220>  
<223> LCDR2 consenso anti-VEGF-A

35  
<220>  
<221> MISC\_FEATURE  
<222> (1) .. (1)  
<223> Xaa es Tyr, Gly, Ser o Arg

40  
<220>  
<221> MISC\_FEATURE  
<222> (2)..(2)  
<223> Xaa es Asn o Asp

45  
<220>  
<221> MISC\_FEATURE  
<222> (3) .. (3)  
<223> Xaa es Asn o Asp

50  
<220>  
<221> MISC\_FEATURE  
<222> (4) .. (4)  
<223> Xaa es Leu, Gln o Arg

55  
<220>  
<221> MISC\_FEATURE  
<222> (5) .. (5)  
<223> Xaa es Leu o Arg

<400> 479

**Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Pro Pro**  
**1 5**

60  
<210> 480

<211> 11  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

5

<220>  
 <223> LCDR3 consenso anti-VEGF-A

10

<220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (2) .. (2)  
 <223> Xaa es Ala o Thr

15

<220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (8)..(8)  
 <223> Xaa es Asn o Ser

20

<220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (9) .. (9)  
 <223> Xaa es Gly o Val

25

<220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (10) .. (10)  
 <223> Xaa es Trp o Val

<400> 480

30

	<b>Ala</b>	<b>Xaa</b>	<b>Trp</b>	<b>Asp</b>	<b>Asp</b>	<b>Ser</b>	<b>Leu</b>	<b>Xaa</b>	<b>Xaa</b>	<b>Xaa</b>	<b>Val</b>
	<b>1</b>				<b>5</b>					<b>10</b>	

<210> 481  
 <211> 339  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

35

<400> 481

<b>Arg</b>	<b>Asp</b>	<b>Glu</b>	<b>Ser</b>	<b>Asn</b>	<b>His</b>	<b>Leu</b>	<b>Thr</b>	<b>Asp</b>	<b>Leu</b>	<b>Tyr</b>	<b>Arg</b>	<b>Arg</b>	<b>Asp</b>	<b>Glu</b>	<b>Thr</b>
<b>1</b>				<b>5</b>					<b>10</b>					<b>15</b>	

**Ile** **Gln** **Val** **Lys** **Gly** **Asn** **Gly** **Tyr** **Val** **Gln** **Ser** **Pro** **Arg** **Phe** **Pro** **Asn**

20	25	30
Ser Tyr Pro Arg Asn Leu Leu Leu Thr Trp Arg Leu His Ser Gln Glu		
35	40	45
Asn Thr Arg Ile Gln Leu Val Phe Asp Asn Gln Phe Gly Leu Glu Glu		
50	55	60
Ala Glu Asn Asp Ile Cys Arg Tyr Asp Phe Val Glu Val Glu Asp Ile		
65	70	75
Ser Glu Thr Ser Thr Ile Ile Arg Gly Arg Trp Cys Gly His Lys Glu		
	85	90
Val Pro Pro Arg Ile Lys Ser Arg Thr Asn Gln Ile Lys Ile Thr Phe		
	100	105
Lys Ser Asp Asp Tyr Phe Val Ala Lys Pro Gly Phe Lys Ile Tyr Tyr		
	115	120
Ser Leu Leu Glu Asp Phe Gln Pro Ala Ala Ala Ser Glu Thr Asn Trp		
	130	135
Glu Ser Val Thr Ser Ser Ile Ser Gly Val Ser Tyr Asn Ser Pro Ser		
145	150	155
Val Thr Asp Pro Thr Leu Ile Ala Asp Ala Leu Asp Lys Lys Ile Ala		
	165	170
Glu Phe Asp Thr Val Glu Asp Leu Leu Lys Tyr Phe Asn Pro Glu Ser		
	180	185
Trp Gln Glu Asp Leu Glu Asn Met Tyr Leu Asp Thr Pro Arg Tyr Arg		
	195	200
Gly Arg Ser Tyr His Asp Arg Lys Ser Lys Val Asp Leu Asp Arg Leu		
210	215	220
Asn Asp Asp Ala Lys Arg Tyr Ser Cys Thr Pro Arg Asn Tyr Ser Val		
225	230	235
Asn Ile Arg Glu Glu Leu Lys Leu Ala Asn Val Val Phe Phe Pro Arg		
	245	250
Cys Leu Leu Val Gln Arg Cys Gly Gly Asn Cys Gly Cys Gly Thr Val		
	260	265
Asn Trp Arg Ser Cys Thr Cys Asn Ser Gly Lys Thr Val Lys Lys Tyr		
	275	280
		285

His Glu Val Leu Gln Phe Glu Pro Gly His Ile Lys Arg Arg Gly Arg  
290 295 300

Ala Lys Thr Met Ala Leu Val Asp Ile Gln Leu Asp His His Glu Arg  
305 310 315 320

Cys Asp Cys Ile Cys Ser Ser Arg Pro Pro Arg Tyr Leu Glu Tyr Met  
325 330 335

Pro Met Asp

5 <210> 482  
<211> 1002  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

10 <220>  
<223> VEGFR2-Fc  
<400> 482

Met Gln Ser Lys Val Leu Leu Ala Val Ala Leu Trp Leu Cys Val Glu  
1 5 10 15

Thr Arg Ala Ala Ser Val Gly Leu Pro Ser Val Ser Leu Asp Leu Pro  
20 25 30

Arg Leu Ser Ile Gln Lys Asp Ile Leu Thr Ile Lys Ala Asn Thr Thr  
35 40 45

Leu Gln Ile Thr Cys Arg Gly Gln Arg Asp Leu Asp Trp Leu Trp Pro  
50 55 60

Asn Asn Gln Ser Gly Ser Glu Gln Arg Val Glu Val Thr Glu Cys Ser  
65 70 75 80

Asp Gly Leu Phe Cys Lys Thr Leu Thr Ile Pro Lys Val Ile Gly Asn  
85 90 95

Asp Thr Gly Ala Tyr Lys Cys Phe Tyr Arg Glu Thr Asp Leu Ala Ser  
100 105 110

Val Ile Tyr Val Tyr Val Gln Asp Tyr Arg Ser Pro Phe Ile Ala Ser  
115 120 125

Val Ser Asp Gln His Gly Val Val Tyr Ile Thr Glu Asn Lys Asn Lys  
130 135 140

Thr Val Val Ile Pro Cys Leu Gly Ser Ile Ser Asn Leu Asn Val Ser



145		150		155		160
Leu Cys Ala Arg Tyr Pro Glu Lys Arg Phe Val Pro Asp Gly Asn Arg						
	165			170		175
Ile Ser Trp Asp Ser Lys Lys Gly Phe Thr Ile Pro Ser Tyr Met Ile						
	180		185			190
Ser Tyr Ala Gly Met Val Phe Cys Glu Ala Lys Ile Asn Asp Glu Ser						
	195		200			205
Tyr Gln Ser Ile Met Tyr Ile Val Val Val Val Gly Tyr Arg Ile Tyr						
	210		215			220
Asp Val Val Leu Ser Pro Ser His Gly Ile Glu Leu Ser Val Gly Glu						
	225		230			235
Lys Leu Val Leu Asn Cys Thr Ala Arg Thr Glu Leu Asn Val Gly Ile						
		245		250		255
Asp Phe Asn Trp Glu Tyr Pro Ser Ser Lys His Gln His Lys Lys Leu						
	260		265			270
Val Asn Arg Asp Leu Lys Thr Gln Ser Gly Ser Glu Met Lys Lys Phe						
	275		280			285
Leu Ser Thr Leu Thr Ile Asp Gly Val Thr Arg Ser Asp Gln Gly Leu						
	290		295			300
Tyr Thr Cys Ala Ala Ser Ser Gly Leu Met Thr Lys Lys Asn Ser Thr						
	305		310			315
Phe Val Arg Val His Glu Lys Pro Phe Val Ala Phe Gly Ser Gly Met						
		325		330		335
Glu Ser Leu Val Glu Ala Thr Val Gly Glu Arg Val Arg Ile Pro Ala						
		340		345		350
Lys Tyr Leu Gly Tyr Pro Pro Pro Glu Ile Lys Trp Tyr Lys Asn Gly						
	355		360			365
Ile Pro Leu Glu Ser Asn His Thr Ile Lys Ala Gly His Val Leu Thr						
	370		375			380
Ile Met Glu Val Ser Glu Arg Asp Thr Gly Asn Tyr Thr Val Ile Leu						
	385		390			395
Thr Asn Pro Ile Ser Lys Glu Lys Gln Ser His Val Val Ser Leu Val						
		405		410		415

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

Asp Ser Tyr Gln Tyr Gly Thr Thr Gln Thr Leu Thr Cys Thr Val Tyr  
 435 440 445

Ala Ile Pro Pro Pro His His Ile His Trp Tyr Trp Gln Leu Glu Glu  
 450 455 460

Glu Cys Ala Asn Glu Pro Ser His Ala Val Ser Val Thr Asn Pro Tyr  
 465 470 475 480

Pro Cys Glu Glu Trp Arg Ser Val Glu Asp Phe Gln Gly Gly Asn Lys  
 485 490 495

Ile Glu Val Asn Lys Asn Gln Phe Ala Leu Ile Glu Gly Lys Asn Lys  
 500 505 510

Thr Val Ser Thr Leu Val Ile Gln Ala Ala Asn Val Ser Ala Leu Tyr  
 515 520 525

Lys Cys Glu Ala Val Asn Lys Val Gly Arg Gly Glu Arg Val Ile Ser  
 530 535 540

Phe His Val Thr Arg Gly Pro Glu Ile Thr Leu Gln Pro Asp Met Gln  
 545 550 555 560

Pro Thr Glu Gln Glu Ser Val Ser Leu Trp Cys Thr Ala Asp Arg Ser  
 565 570 575

Thr Phe Glu Asn Leu Thr Trp Tyr Lys Leu Gly Pro Gln Pro Leu Pro  
 580 585 590

Ile His Val Gly Glu Leu Pro Thr Pro Val Cys Lys Asn Leu Asp Thr  
 595 600 605

Leu Trp Lys Leu Asn Ala Thr Met Phe Ser Asn Ser Thr Asn Asp Ile  
 610 615 620

Leu Ile Met Glu Leu Lys Asn Ala Ser Leu Gln Asp Gln Gly Asp Tyr  
 625 630 635 640

Val Cys Leu Ala Gln Asp Arg Lys Thr Lys Lys Arg His Cys Val Val  
 645 650 655

Arg Gln Leu Thr Val Leu Glu Arg Val Ala Pro Thr Ile Thr Gly Asn  
 660 665 670

Leu Glu Asn Gln Thr Thr Ser Ile Gly Glu Ser Ile Glu Val Ser Cys  
 675 680 685  
 Thr Ala Ser Gly Asn Pro Pro Pro Gln Ile Met Trp Phe Lys Asp Asn  
 690 695 700  
 Glu Thr Leu Val Glu Asp Ser Gly Ile Val Leu Lys Asp Gly Asn Arg  
 705 710 715 720  
 Asn Leu Thr Ile Arg Arg Val Arg Lys Glu Asp Glu Gly Leu Tyr Thr  
 725 730 735  
 Cys Gln Ala Cys Ser Val Leu Gly Cys Ala Lys Val Glu Ala Phe Phe  
 740 745 750  
 Ile Ile Glu Gly Ala Gln Glu Lys Thr Asn Leu Glu Gly Ser Gly Gly  
 755 760 765  
 Ser Gly Glu Pro Lys Ser Ser Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys  
 770 775 780  
 Pro Ala Pro Glu Ala Glu Gly Ala Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro  
 785 790 795 800  
 Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys  
 805 810 815  
 Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp  
 820 825 830  
 Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu  
 835 840 845  
 Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu  
 850 855 860  
 His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn  
 865 870 875 880  
 Lys Ala Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly  
 885 890 895  
 Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu  
 900 905 910  
 Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr  
 915 920 925

Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn  
930 935 940

Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe  
945 950 955 960

Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn  
965 970 975

Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr  
980 985 990

Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys  
995 1000

<210> 483  
<211> 67  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial

<220>  
<223> Cebador oligonucleotídico

<400> 483

ctctccacag gtgtcctcga gaattcatat aggccggcca ccatgaggct tccgggtgcg 60  
atgccag 67

<210> 484  
<211> 74  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial

<220>  
<223> Cebador oligonucleotídico

<400> 484

gggggtgggta caaccccaga gctgttttaa ggcgcgcctc tagattattt acccggagac 60  
aggagaggc tctt 74

<210> 485  
<211> 2289  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial

<220>  
<223> Secuencia codificante PDGFRbeta-Fc5

<400> 485

# ES 2 456 296 T3

atgcggcttc cgggtgcat gccagctctg gccctcaaag gcgagctgct gttgctgtct	60
ctoctgttac ttctggaacc acagatctct cagggcctgg tegtacaccc cccggggcca	120
gagcttgtec tcaatgtctc cagcaccttc gttctgaact gctcgggttc agtccggtg	180
gtgtgggaac ggatgtccca ggagcccca caggaaatgg ccaaggcca ggatggcacc	240

ttctccagcg tgctcacact gaccaacctc actgggctag acacgggaga atacttttgc	300
accacacaatg actcccggtg actggagacc gatgagogga aacggctcta catctttgtg	360
ccagatccca ccgtgggctt cctccctaata gatgccgagg aactattcat ctttctcacg	420
gaaataactg agatcaccat tccatgccga gtaacagacc cacagctggt ggtgacactg	480
cacgagaaga aaggggacgt tgcactgcct gtcccctatg atcaccaacg tggcttttct	540
ggtatctttg aggacagaag ctacatctgc aaaaccacca ttggggacag ggaggtggat	600
tctgatgcct actatgtcta cagactccag gtgtcatcca tcaacgtctc tgtgaacgca	660
gtgcagactg tgggccgcca gggtgagaac atcacccctca tgtgcattgt gatcgggaat	720
gaggtggtca acttcgagtg gacatacccc cgcaaagaaa gtgggcggct ggtggagccg	780
gtgactgact tccctcttga tatgccttac cacatccgct ccacccctgca catccccagt	840
gccgagttag aagactcggg gacctacacc tgcaatgtga cggagagtgt gaatgacat	900
caggatgaaa aggccatcaa catcacctgt gttgagagcg gctacgtgcg gctcctggga	960
gagtgggcca cactacaatt tgctgagctg catcggagcc ggacactgca ggtagtgttc	1020
gaggcctacc caccgccac tgtcctgtgg ttcaaagaca accgcacct gggcgactcc	1080
agcgtcggcg aaatcgccct gtccacgcgc aacgtgtcgg agaccoggta tgtgtcagag	1140
ctgacactgg ttccgctgaa ggtggcagag gctggccact acaccatgcg ggccttccat	1200
gaggatgctg aggtccagct ctccctccag ctacagatca atgtccctgt ccgagtgtg	1260
gagctaagtg agagccaccc tgacagtggg gaacagacag tccgctgtcg tggccggggc	1320
atgccccagc cgaacatcat ctggtctgcc tgcagagacc tcaaaagggtg tccacgtgag	1380
ctgccgccca cgctgctggg gaacagttcc gaagaggaga gccagctgga gactaacgtg	1440
acgtactggg aggaggagca ggagtttgag gtggtgagca cactgcgtct gcagcacgtg	1500
gatcggccac tgtcgggtgc ctgcacgtg cgcaacgtg tgggccagga cagcgaggag	1560
gtcatcgtgg tgccacactc cttgcccttt gagcccaaat cttcagacaa aactcacaca	1620
tgccaccgt gccagcacc tgaagccgag ggggcaccgt cagtcttctt cttcccccca	1680
aaacccaagg acaccctcat gatctcccg acccctgagg tcacatgcgt ggtggtggac	1740
gtgagccaag aagaccctga ggtcaagttc aactggtacg tggacggcgt ggaggtgcat	1800
aatgccaaaga caaagccgcg ggaggagcag tacaacagca cgtaccgtgt ggtcagcgtc	1860
ctcacctcc tgcaccagga ctggctgaat ggcaaggagt acaagtgcaa ggtctccaac	1920
aaagccctcc catcctccat cgagaaaacc atctccaaag ccaaaggga gccccgagaa	1980
ccacaggtgt acaccctgcc cccatcccg gatgagctga ccaagaacca ggtcagcctg	2040
acctgcctgg tcaaaggctt ctatcccagc gacatcgccg tggagtggga gagcaatggg	2100
cagccggaga acaactacaa gaccacgcct cccgtgctgg actccgacgg ctcttctctc	2160
ctctacagca agctcacctg ggacaagagc aggtggcagc aggggaacgt cttctcatgc	2220

**tccgtgatgc atgaggctct gcacaaccac tacacgcaga agagcctctc cctgtctccg 2280**

**ggtaaataa 2289**

5 <210> 486  
 <211> 762  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

10 <220>  
 <223> PDGFRbeta-Fc5  
 <400> 486

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



195	200	205
Leu Gln Val Ser Ser Ile Asn Val Ser Val Asn Ala Val Gln Thr Val 210 215 220		
Val Arg Gln Gly Glu Asn Ile Thr Leu Met Cys Ile Val Ile Gly Asn 225 230 235 240		
Glu Val Val Asn Phe Glu Trp Thr Tyr Pro Arg Lys Glu Ser Gly Arg 245 250 255		
Leu Val Glu Pro Val Thr Asp Phe Leu Leu Asp Met Pro Tyr His Ile 260 265 270		
Arg Ser Ile Leu His Ile Pro Ser Ala Glu Leu Glu Asp Ser Gly Thr 275 280 285		
Tyr Thr Cys Asn Val Thr Glu Ser Val Asn Asp His Gln Asp Glu Lys 290 295 300		
Ala Ile Asn Ile Thr Val Val Glu Ser Gly Tyr Val Arg Leu Leu Gly 305 310 315 320		
Glu Val Gly Thr Leu Gln Phe Ala Glu Leu His Arg Ser Arg Thr Leu 325 330 335		
Gln Val Val Phe Glu Ala Tyr Pro Pro Pro Thr Val Leu Trp Phe Lys 340 345 350		
Asp Asn Arg Thr Leu Gly Asp Ser Ser Ala Gly Glu Ile Ala Leu Ser 355 360 365		
Thr Arg Asn Val Ser Glu Thr Arg Tyr Val Ser Glu Leu Thr Leu Val 370 375 380		
Arg Val Lys Val Ala Glu Ala Gly His Tyr Thr Met Arg Ala Phe His 385 390 395 400		
Glu Asp Ala Glu Val Gln Leu Ser Phe Gln Leu Gln Ile Asn Val Pro 405 410 415		
Val Arg Val Leu Glu Leu Ser Glu Ser His Pro Asp Ser Gly Glu Gln 420 425 430		
Thr Val Arg Cys Arg Gly Arg Gly Met Pro Gln Pro Asn Ile Ile Trp 435 440 445		
Ser Ala Cys Arg Asp Leu Lys Arg Cys Pro Arg Glu Leu Pro Pro Thr 450 455 460		

Leu Leu Gly Asn Ser Ser Glu Glu Glu Ser Gln Leu Glu Thr Asn Val  
 465 470 475 480  
 Thr Tyr Trp Glu Glu Glu Gln Glu Phe Glu Val Val Ser Thr Leu Arg  
 485 490 495  
 Leu Gln His Val Asp Arg Pro Leu Ser Val Arg Cys Thr Leu Arg Asn  
 500 505 510  
 Ala Val Gly Gln Asp Thr Gln Glu Val Ile Val Val Pro His Ser Leu  
 515 520 525  
 Pro Phe Glu Pro Lys Ser Ser Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys  
 530 535 540  
 Pro Ala Pro Glu Ala Glu Gly Ala Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro  
 545 550 555 560  
 Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys  
 565 570 575  
 Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp  
 580 585 590  
 Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu  
 595 600 605  
 Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu  
 610 615 620  
 His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn  
 625 630 635 640  
 Lys Ala Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly  
 645 650 655  
 Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu  
 660 665 670  
 Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr  
 675 680 685  
 Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn  
 690 695 700  
 Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe  
 705 710 715 720

Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn  
725 730 735

Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr  
740 745 750

Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys  
755 760

<210> 487

<211> 744

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> IL-27RA-Fc5

<400> 487

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

Thr Leu Leu Glu Pro Glu Leu Lys Thr Ile Pro Leu Thr Pro Val Glu  
 180 185 190

Ile Gln Asp Leu Glu Leu Ala Thr Gly Tyr Lys Val Tyr Gly Arg Cys  
 195 200 205

Arg Met Glu Lys Glu Glu Asp Leu Trp Gly Glu Trp Ser Pro Ile Leu  
 210 215 220

Ser Phe Gln Thr Pro Pro Ser Ala Pro Lys Asp Val Trp Val Ser Gly  
 225 230 235 240

Asn Leu Cys Gly Thr Pro Gly Gly Glu Glu Pro Leu Leu Leu Trp Lys  
 245 250 255

Ala Pro Gly Pro Cys Val Gln Val Ser Tyr Lys Val Trp Phe Trp Val  
 260 265 270

Gly Gly Arg Glu Leu Ser Pro Glu Gly Ile Thr Cys Cys Cys Ser Leu  
 275 280 285

Ile Pro Ser Gly Ala Glu Trp Ala Arg Val Ser Ala Val Asn Ala Thr  
 290 295 300

Ser Trp Glu Pro Leu Thr Asn Leu Ser Leu Val Cys Leu Asp Ser Ala  
 305 310 315 320

Ser Ala Pro Arg Ser Val Ala Val Ser Ser Ile Ala Gly Ser Thr Glu  
 325 330 335

Leu Leu Val Thr Trp Gln Pro Gly Pro Gly Glu Pro Leu Glu His Val  
 340 345 350

Val Asp Trp Ala Arg Asp Gly Asp Pro Leu Glu Lys Leu Asn Trp Val  
 355 360 365

Arg Leu Pro Pro Gly Asn Leu Ser Ala Leu Leu Pro Gly Asn Phe Thr  
 370 375 380

Val Gly Val Pro Tyr Arg Ile Thr Val Thr Ala Val Ser Ala Ser Gly  
 385 390 395 400

Leu Ala Ser Ala Ser Ser Val Trp Gly Phe Arg Glu Glu Leu Ala Pro  
 405 410 415

Leu Val Gly Pro Thr Leu Trp Arg Leu Gln Asp Ala Pro Pro Gly Thr  
 420 425 430

Pro Ala Ile Ala Trp Gly Glu Val Pro Arg His Gln Leu Arg Gly His  
 435 440 445  
 Leu Thr His Tyr Thr Leu Cys Ala Gln Ser Gly Thr Ser Pro Ser Val  
 450 455 460  
 Cys Met Asn Val Ser Gly Asn Thr Gln Ser Val Thr Leu Pro Asp Leu  
 465 470 475 480  
 Pro Trp Gly Pro Cys Glu Leu Trp Val Thr Ala Ser Thr Ile Ala Gly  
 485 490 495  
 Gln Gly Pro Pro Gly Pro Ile Leu Arg Leu His Leu Pro Asp Asn Thr  
 500 505 510  
 Glu Pro Lys Ser Ser Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala  
 515 520 525  
 Pro Glu Ala Glu Gly Ala Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro  
 530 535 540  
 Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val  
 545 550 555 560  
 Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val  
 565 570 575  
 Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln  
 580 585 590  
 Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln  
 595 600 605  
 Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala  
 610 615 620  
 Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro  
 625 630 635 640  
 Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr  
 645 650 655  
 Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser  
 660 665 670  
 Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr  
 675 680 685

Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr  
690 695 700

Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe  
705 710 715 720

Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys  
725 730 735

Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys  
740

5

<210> 488  
<211> 241  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens  
  
<400> 488

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



# ES 2 456 296 T3

<210> 489  
 <211> 21  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 5  
 <220>  
 <223> Cebador oligonucleotídico  
 <400> 489  
 10 aggacttcct ggagggggtg a 21  
 <210> 490  
 <211> 21  
 <212> ADN  
 15 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> Cebador oligonucleotídico  
 20 <400> 490  
 gagcttcagg cagggcagg t 21  
 <210> 491  
 <211> 3431  
 25 <212> ADN  
 <213> Macaco cynomolgus  
 <400> 491  
 aggacttcct ggagggggtg actgtccaga gcctggaact ctgccacac cagaagccat 60  
 cagcagcaag gacaccatgc ggattccggg tgcgatgcca gctctggccc tcaaaggcca 120  
 gctgctgttg ctgccctgc tgttactgct ggaaccgcag gtctctcagg gcctgggtcat 180  
 cacacccccg gggccagagc ttatcctcaa tgtctccagc acctttgttc tgacctgctc 240  
 gggttcagct cccgtggtgt gggagcggat gtcccaggag ctcccacagg aaatggccaa 300  
 ggcccaggac aataccttct ccagtgtgct gacactgacc aacctcactg ggctagacac 360  
 30 gggagaatac ttttgcacct acaatgactc ccgtggactg gagcctgatg agcggaaacg 420

gctctacatc tttgtgccag atcccaccgt gggcttcctc cctaatagacg ccgaggaact	480
attcatcttt cttacggaaa taactgagat caccattcca tgccgagtaa cagaccaca	540
actggtggtg acactgcacg agaagaaagg ggacattgca ctgcctgtcc cctacgatca	600
ccagcgtggc ttttctggta tctttgagga cagaagctac atctgcaaaa ccaccattgg	660
ggacagggag gtggattccg acgcctacta tgtctacaga ctccaggtgt catccatcaa	720
cgtctccgtg aatgcagtgc agacggtggt ccgccagggt gagaacatta ccctcatgtg	780
cattgtgatc gggaaatgagg tggtaactt cgagtggatg taccoccgca aagaaagtgg	840
gcggctggtg gagccggtga ccgacttctt cttggatatg ccttaccaca tccgtccat	900
cctgcacatc ccagtgccg agttagaaga ctccgggacc tacacctgca atgtgacaga	960
gagtgtgaat gaccatcagg atgaaaaggc catcaacatc actgtggttg agagtggcta	1020
cgtgcggctc ctgggagagg tgggagcact acaatttgct gagctgcacc ggagccggac	1080
actgcaggta gtgttcgagg cctaccacc gccaccgtc ctgtggttca aagacaaccg	1140
caccttgggt gactccagcg caggcgagat cgcctgtcc acgcgcaacg tgtcagagac	1200
caggtatgtg tcagagctga cactcgttcg ggtgaagggtg gcagaggctg gccactacac	1260
catgcgggoc ttccatgagg acgctgaggt ccagctctcc ttccagctac agatcaatgt	1320
ccctgtccgc gtgctggagc taagtgagag ccaccagac agcggggaac agacagtcgg	1380
ctgtcgtggc cggggcatgc ccagccgaa catcatctgg tctgcctgca gagacctcaa	1440
aagggtgtcc cgcgagctgc cggccatgct gctggggaac agttctgaag aggagagcca	1500
gctggagacg aacgtgacat actgggagga ggagcaggag tttgaggtgg tgagcacact	1560
gcgtctgcag cacgtggatc ggccactgtc ggtgcgctgc acgctgcgca acgtgtggg	1620
ccaggacatg caggaggtca tcgtggtgcc acactctttg cccttcaagg cggtggtgat	1680
ctcagccatc ctggccctgg tggcctcac catcatctcc cttatcatcc tcatcatgct	1740
ttggcagaag aagccacgtt acgagatccg atggaagggtg attgagtctg tgagctctga	1800
tggccatgag tacatctacg tggaccccat gcagctgccc tatgactcca cgtgggagct	1860
gccgcgggac cagcttgtgc tgggacgcac cctcggctct ggggcctttg ggcagggtgt	1920
ggaggccacg gctcatggcc tgagccattc tcaggccacg atgaaagtgg ccgtcaagat	1980
gcttaaatcc acagcccgca gcagtgagaa gcaagccctc atgtcggagc tgaagatcat	2040
gagtcacctt gggcccccacc tgaacgtggt caacctgttg ggggcctgca ccaaaggagg	2100
acccatctat atcatcactg agtactgccg ctacggagac ctggtggact acctgcaccg	2160
caacaagcac acgttcctgc agcaccattc cgacaagcgc cggccgcccga gcgcggagct	2220
ctacagcaat gcgctgcctg ttgggctccc cctgcccagc cacgtgtccc tgactgggga	2280
gagcgtggt ggctacatgg acatgagcaa ggacgagtcg gtggactacg tgcccatgct	2340

```

ggacatgaaa ggagatgtaa aatatgccga catcgagtcc tccaactaca tggcccccta 2400
cgataactac gtccctctg cccctgagag gacctgtcgg gcaactttaa tcaatgagtc 2460
tccggtgcta agctacatgg accttgtggg cttcagctac caggtggcca atggcatgga 2520
gttcctggcc tccaagaact gcgtgcaccg agacctggcg gccaggaacg tgctcatctg 2580
cgagggcaag ctggtcaaga tctgtgactt tggcctggct cgagacatca tgcgggattc 2640
gaattacatc tccaaaggca gtaccttttt gcctttgaag tggatggctc cagagagcat 2700
cttcaacagc ctctacacca ccctgagcga cgtgtggtcc ttcgggatcc tgctctggga 2760
gatcttcact ttgggtggca ccccttacct agagctgccc atgaatgagc agttctacaa 2820
tgccatcaaa cggggttacc gcatggccca gcctgccac gcctccgacg agatctatga 2880
gatcatgcag aagtgtctgg aagagaagtt tgagattcgg cccctttctt ccagctggt 2940
gcttcttctc gagagactgt tgggogaagg ttacaaaaag aagtaccagc aggtggatga 3000
ggagtttctg aggagtgacc acccagccat ccttcggtcc caggcccgct tgcctgggtt 3060
ccatggcctc cgatctcccc tggacagcag ctccgtcctc tataccgccg tgcagcccaa 3120
tgagggtgac aacgactata tcatccccct gcctgacccc aaacccgagg ttgctgacga 3180
gggcccactg gagggttccc ccagcctagc cagctccacc ctgaatgaag tcaaacctc 3240
ctcgaccatc tctgtgaca gccctctgga gcccaggag gaaccagagc cagagcccca 3300
gcttgagcgc caggtggaac cagagccaga gctggaacag ctgccggatt cagggtgccc 3360
cgcgcctoga gcggaagcag aggacagctt cctgtagggg gctggccccc accctgccct 3420
gcctgaagct c 3431

```

5

<210> 492  
 <211> 232  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

10

<220>  
 <223> Fc sin función efectora (Fc5)  
 <400> 492

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

<210> 493

<211> 75

	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
5	<223> Secuencia de ADNc del enlazador (G4S)5	
	<400> 493	
	<b>ggtggtggtg gttctggcgg cggcggctcc ggcgggggtg gaagtggtgg tgggtggtct</b>	<b>60</b>
	<b>ggtggtggtg gttct</b>	<b>75</b>
10	<210> 494	
	<211> 25	
	<212> PRT	
	<213> Secuencia artificial	
15	<220>	
	<223> Enlazador (G4S)5	
	<400> 494	
20	<b>Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly</b>	
	<b>1 5 10 15</b>	
	<b>Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser</b>	
	<b>20 25</b>	
	<210> 495	
	<211> 30	
25	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Secuencia de ADNc del enlazador y el lazo (G4S)2	
30	<400> 495	
	<b>ggtggcgggg gtcgggtgg aggaggttct</b>	<b>30</b>
	<210> 496	
35	<211> 10	
	<212> PRT	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
40	<223> Enlazador y lazo (G4S)2	
	<400> 496	
	<b>Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser</b>	
	<b>1 5 10</b>	
45	<210> 497	
	<211> 765	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
50	<220>	
	<223> ADNc scFv c1111.1	
	<400> 497	
55		

gaagttcaat tgtagagtc tggtaggggt cttgttcagc ctggtaggtc tttacgtctt	60
tcttgogctg cttccggatt cactttctct tggtagcata tggattgggt tcgccaagct	120
cctggtaaag gtttgagtg ggtttctgtt atctctcctt ctggtaggtg gactgcttat	180
gctgactccg ttaaaggctg cttcactatc tctagagaca actctaagaa tactctotac	240
ttgcagatga acagcttaag ggctgaggac acggccgtgt attactgtgc gagagatagt	300
agtggttatt actcacctga tgcttttgat atctggggcc aagggaacct ggtcacogtc	360
tcaagcgttg gttctggagg ttcagggtgt ggccgctctg gtggtaggtg ttctggtagc	420
ggtggttctg gaggttcagg cggaaacatc cagatgacct agtctccatc ctccctgtct	480
gcctctgtag gagacagagt caccatcact tgccgggcaa gtcagagcat tagcagctat	540
ttaaattggt atcagcagaa accagggaaa gccctaaac tctgatcta tgatgcatcc	600
agtttgcaaa gtgggtccc attaggttc agtggcagtg gatctgggac agatttcact	660
ctcaccatca gcagtctgca acctgaagat ttgcaactt actactgtca acagagttac	720
agtacccgcg tcactttcgg cggagggacc aaagtggata tcaaa	765

<210> 498  
 <211> 255  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> scFv c1111.1

<400> 498

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

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

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

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

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr  
65 70 75 80

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

Ala Arg Asp Ser Ser Gly Tyr Tyr Ser Pro Asp Ala Phe Asp Ile Trp  
100 105 110

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

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly  
130 135 140

Gly Ser Gly Gly Asn Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser  
145 150 155 160

Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser  
165 170 175

Ile Ser Ser Tyr Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro  
180 185 190

Lys Leu Leu Ile Tyr Asp Ala Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro Leu  
195 200 205

Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser  
210 215 220

Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Tyr  
225 230 235 240

Ser Thr Pro Leu Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Asp Ile Lys  
245 250 255

<210> 499  
 <211> 744  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> ADNc scFv c870.1

<400> 499

```

gaagttcaat tgtagagtc tggtagcggc attgttcagc ctggtggttc ttacgtctt      60
tcttgcgctg cttccggatt cactttctct ggttacatta tgtggtgggt tcgccaagct      120
cctggttaaag gtttgagtg ggtttctgtt atctctcctt ctggtggcga tacttggtat      180
gctgactccg ttaaaggctg cttcactatc tctagagaca actctaagaa tactctctac      240
ttacagatga acagcttaag ggctgaggac acggccgtgt attactgtgc cacagcggga      300
gactactggg gccagggcac cctggtcacc gtctcaagcg ttggttctgg aggttcaggc      360
ggtagcggct ctggtggtgg tggttctggt ggcggtggtt ctggaggttc aggcggacag      420
agcgaattga ctcagccacc ctcagcgtct gggacccccg ggagaggggt caccatctct      480
tgttctggaa gcagctccaa catcggaagg aatcctgtaa actggtacca gcacctccca      540
ggaacggccc ccaaactcct catctatggt gataatcagc ggccctcagg ggtccctgac      600
cgattctctg gctccaggtc tggcacctca gctccctgg ccatcagtgg gctccagtct      660
gaggatgagg ctgattatta ctgtgcagca tgggatgaca gcctgaatgg tgtggtattc      720
ggcggagggg ccaagctgac cgtc                                     744
    
```

<210> 500  
 <211> 248  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> scFv c870.1

<400> 500

```

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



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

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

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

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr  
65 70 75 80

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

Ala Thr Ala Gly Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser  
100 105 110

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

Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly Gln Ser Glu Leu Thr  
130 135 140

Gln Pro Pro Ser Ala Ser Gly Thr Pro Gly Gln Arg Val Thr Ile Ser  
145 150 155 160

Cys Ser Gly Ser Ser Ser Asn Ile Gly Arg Asn Pro Val Asn Trp Tyr  
165 170 175

Gln His Leu Pro Gly Thr Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Gly Asp Asn  
180 185 190

Gln Arg Pro Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Arg Ser Gly  
195 200 205

Thr Ser Ala Ser Leu Ala Ile Ser Gly Leu Gln Ser Glu Asp Glu Ala  
210 215 220

Asp Tyr Tyr Cys Ala Ala Trp Asp Asp Ser Leu Asn Gly Val Val Phe  
225 230 235 240

Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val  
245

<210> 501  
<211> 762  
<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> ADNc scFv c1091.1

5

<400> 501

gaagttcaat tgtagagtc tggtagcgt cttgttcagc ctggtggttc tttacgtctt	60
tcttgcgctg cttcgggatt cactttctct aagtagata tgcattgggt tggccaagct	120
cctggtaaag gtttgagtg ggtttctgtt atctctcctt ctggtggctg gacttcttat	180
gctgactccg ttaaaggctg cttcactatc tctagagaca actctaagaa tactctctac	240
ttgcagatga acagcttaag ggctgaggac accgccatgt attactgtgc gagggatgac	300
tacagtaaag gacgggatgc ttttgatata tggggccaag ggaccctggt caccgtctca	360
agcgttggtt ctggaggttc aggtggtggc ggctctggtg gtggtggttc tggtagcgtt	420
ggttctggag gttcaggcgg agacatccag ttgaaccagt ctccatcttc cctgtctgca	480
tctgtaggag acagagtcac catcacttgc cgggcaagtc agagcattag cagctattta	540
aattggtatc agcagaaacc agggaaagcc cctaagctcc tgatctatgc tgcattcagt	600
ttgcaaagtg ggtcccatc aaggttcagt ggcagtggt ctgggacaga tttcactctc	660
accatcagca gtctgcaacc tgaagatttt gcaacttact actgtcaaca gagttacagt	720
accccgtaac cttttggcca ggggaccaag ctggagatca aa	762

10

<210> 502

<211> 254

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

15

<220>

<223> scFv c1092.1

<400> 502

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

<210> 503  
 <211> 762  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

5

<220>  
 <223> ADNc scFv c1039.1

<400> 503

10

gaagttcaat tgtagagtc tgggtggcggc cttgttcagc ctgggtgggtc tttacgtctt	60
tcttgogctg cttccggatt cactttctct tggtagcata tgggttggtg tcgccaagct	120
cctggtaaag gtttgagtg ggtttctgtt atctctcctt ctgggtggctg gacttcttat	180
gctgactccg ttaaaggctg cttcactatc tctagagaca actctaagaa tactctctac	240
ttgcagatga acagcttaag ggctgaggac acggccgtgt attactgtgc gagagatcat	300
agtggctacg attctgaata ctttgactac tggggccagg gcaccctggt caccgtctca	360
agcgttggtt ctggaggttc aggcgggtggc ggctctgggtg gtgggtgggtc tgggtggcggc	420
ggttctggag gttcaggcgg aaacatccag atgaccagc ctccatctc cctgtctgca	480
tctgtaggag acagagtcac catcacttgc cgggcaagtc agagcattag cagctattta	540
aattggtatc agcagaaacc agggaaagcc cctaagctcc tgatctatgc tgcattccagt	600
ttgcaaagtg ggggtccatc aagggttcagt ggcagtggat ctgggacaga tttcactctc	660
accatcagca gtctgcaacc tgaagatttt gcaacttact actgtcaaca gagttacagt	720
accccgtaga cttttggcca ggggaccaag ctggagatca aa	762

<210> 504  
 <211> 254  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

15

<220>  
 <223> scFv2 c1039.1

20

<400> 504

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

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

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

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

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr  
65 70 75 80

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

Ala Arg Asp His Ser Gly Tyr Asp Ser Glu Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly  
100 105 110

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

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly  
130 135 140

Ser Gly Gly Asn Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala  
145 150 155 160

Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile  
165 170 175

Ser Ser Tyr Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys  
180 185 190

Leu Leu Ile Tyr Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg  
195 200 205

Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser  
210 215 220

Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Tyr Ser  
225 230 235 240

Thr Pro Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys  
245 250

<210> 505  
 <211> 753  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

5

<220>  
 <223> ADNc scFv2 c868.1

<400> 505

10

```

gccatccaga tgacccagtc tccatcctcc ctgtctgcat ctgtaggaga cagagtcacc      60
atcaacttgcc gggcaagtca gagcattagc agctatttaa attggtatca gcagaaacca      120
gggaaagccc ctaaactcct gatccatgct gcattccaatt tgcagagtgg ggtcccatca      180
aggttcagtg gcagtggatc tgggacagat ttcactctca ccatcagcag tctgcaacct      240
gaagattttg caacttacta ctgtcaacag agttacagta cccctctcac ttccggcgga      300
gggaccaagg tggagatcaa gcttggttct ggaggttcag gcggtggcgg ctctggtggt      360
ggtggttctg gtggcggtgg ttctggaggt tcaggcggag aagttcaatt gttagagtct      420
ggtggcggtc ttgttcagcc tgggtggtct ttacgtcttt ctgcgctgc ttccggattc      480
actttctctc attacgagat gggttgggtt cgccaagctc ctggtaaagg tttggagtgg      540
gtttcttata tctcttcttc tgggtggctgg actgcttatg ctgactccgt taaaggctcg      600
ttcactatct ctagagacaa ctctaagaat actctctact tgcagatgaa cagcttaagg      660
gctgaggaca cggccgtgta ttactgtgca aggattggct acgcagatgc ttttgatata      720
tggggccaag ggaccacggt caccgtctca agc                                     753

```

<210> 506  
 <211> 251  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

15

<220>  
 <223> scFv c868.1

20

<400> 506

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

<210> 507  
 <211> 756  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> ADNc scFv c1081.1

<400> 507

```

gaagttcaat tgtagagtc tggtagcgt cttgttcagc ctggtggttc tttacgtctt      60
tcttgcgctg cttccggatt cactttctct acttacgata tgcattgggt tgcgcaggct      120
cctggtaaag gtttgagtg ggtttctgtt atctctcctt ctggtggttg gactgcttat      180
gctgactccg ttaaaggtag cttcactatc tctagagaca actctaagaa tactctctac      240
ttgcagatga acagcttaag ggctgaggac acggccgtgt attactgtgc aagagcagca      300
gctggatatg atgcttttga tatctggggc caagggacaa tggtaaccgt ctcaagcgtt      360
ggttctggag gttcaggcgg tggcggctct ggtggtggtg gttctggtgg cgggtggttct      420
ggaggttcag gggagaaaat tgtgttgacg cagtctccat cccccctgtc tgcactctgc      480
ggagacagag tcaccatcac ttgccgggca agtcacaaca tcaacaaata tttaaattgg      540
tatcaacaaa aaccggggaa agcccctaag ctctgatctt ttggtgcacg cagtttgccg      600
agtggggtcc catcaagggt cagtggcagt ggatctggca cagatttcac tctcactatc      660
agcagctctg aacctgagga tttggcaact tacttctgtc aacagactta caataccccc      720
ctcactttcg ggggagggac caagctggag atcaaa                                756
    
```

<210> 508  
 <211> 252  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> scFv c1081.1

<400> 508

```

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

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

Asp Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35          40          45

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

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
    
```



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

<210> 509

<211> 1410

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> ADNc de IgG1 completa c597.1

<400> 509

```

atgggatgga gctgtatcat cctcttcttg gtagcaacag ctacaggcgc gcactccgaa      60
gttcaattgt tagagtctgg tggcggctctt gttcagcctg gtggttcttt acgtctttct      120
tgcgctgctt ccggattcac tttctctaag tacaagatgc tttgggttcg ccaagctcct      180
ggtaaagggt tggagtgggt ttcttctatc tctcctctg gtggcggtac tttttatgct      240
gactccgtta aaggtcgctt cactatctct agagacaact ctaagaatac tctctacttg      300

cagatgaaca gcttaagggc tgaggacacg gccgtgtatt actgtgcaag agatggggag      360
atgatttcgg gtagtttctt tgactcctgg ggccagggaa ccctggtcac cgtctcaagc      420
gcctccacca agggcccatc ggtcttcccg ctagcaccct cctccaagag cacctctggg      480
ggcacagcgg ccctgggctg cctgggtcaag gactacttcc ccgaaccggt gacgggtgtcg      540
tggaactcag gcgccctgac cagcggcgctc cacaccttcc cggtctgctt acagtcctcc      600
ggactctact ccctcagcag cgtagtgaac gtgccctcca gcagcttggg caccagacc      660
tacatctgca acgtgaatca caagcccagc aacaccaagg tggacaagaa agttgagccc      720
aaatcttgtg acaaaaactca cacatgccca ccgtgccag cacctgaact cctgggggga      780
cogtcagtct tcctcttccc cccaaaaccc aaggacacc tcctgatctc ccggaccctt      840
gaggtcacat gcgtgggtgt ggacgtgagc cacgaagacc ctgaggtcaa gttcaactgg      900
tacgtggacg gcgtggaggt gcataatgcc aagacaaagc cgcgggagga gcagtacaac      960
agcacgtacc gtgtggtcag cgctctcacc gtctctgacc aggactggct gaatggcaag     1020
gagtacaagt gcaaggtctc caacaaagcc ctcccagccc ccacgagaa aaccatctcc     1080
aaagccaaag ggcagccccg agaaccacag gtgtacacc tgcccccatc ccgggatgag     1140
ctgaccaaga accaggtcag cctgacctgc ctggtcaaag gcttctatcc cagcgacatc     1200
gccgtggagt gggagagcaa tgggcagccg gagaacaact acaagaccac gcctcccgtg     1260
ctggactccg acggctcctt ctctctctac agcaagctca ccgtggacaa gagcaggtgg     1320
cagcagggga acgtcttctc atgctccgtg atgcatgagg ctctgcacaa ccactacacg     1380
cagaagagcc tctccctgtc tccgggtaaa                                1410

```

<210> 510  
 <211> 470  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> IgG1 completa c597.1  
 <400> 510

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

Ala His Ser Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln  
20 25 30

Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe  
35 40 45

Ser Lys Tyr Lys Met Leu Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu  
50 55 60

Glu Trp Val Ser Ser Ile Tyr Pro Ser Gly Gly Val Thr Phe Tyr Ala  
 65 70 75 80  
 Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn  
 85 90 95  
 Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val  
 100 105 110  
 Tyr Tyr Cys Ala Arg Asp Gly Glu Met Ile Ser Gly Ser Phe Phe Asp  
 115 120 125  
 Ser Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys  
 130 135 140  
 Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly  
 145 150 155 160  
 Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro  
 165 170 175  
 Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr  
 180 185 190  
 Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val  
 195 200 205  
 Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn  
 210 215 220  
 Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro  
 225 230 235 240  
 Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu  
 245 250 255  
 Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp  
 260 265 270  
 Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp  
 275 280 285  
 Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly  
 290 295 300  
 Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn  
 305 310 315 320

Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp  
325 330 335

Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro  
340 345 350

Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu  
355 360 365

Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn  
370 375 380

Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile  
385 390 395 400

Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr  
405 410 415

Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys  
420 425 430

Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys  
435 440 445

Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu  
450 455 460

Ser Leu Ser Pro Gly Lys  
465 470

<210> 511

<211> 2202

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> ADNc de IgG1 enlazadora de 10 monómeros en biAb c597.1-c1111.1

<400> 511

atgggatgga gctgtatcat cctcttcttg gtagcaacag ctacaggcgc gcactccgaa	60
gttcaattgt tagagtctgg tggcgggtctt gttcagcctg gtggttcttt acgtctttct	120
tgcgctgctt ccggattcac tttctctaag tacaagatgc tttgggttcg ccaagctcct	180
ggtaaagggt tgagatgggt ttcttctatc tatccttctg gtggcggtac tttttatgct	240
gactccgtta aaggctgctt cactatctct agagacaact ctaagaatac tctctacttg	300
cagatgaaca gcttaagggc tgaggacacg gccgtgtatt actgtgcaag agatggggag	360
atgatttcgg gtagtttctt tgactcctgg ggccagggaa ccctggtcac cgtctcaagc	420
gcctccacca agggcccatc ggtcttcccg ctagcacctt cctccaagag cacctctggg	480

```

ggcacagcgg ccctgggctg cctgggtcaag gactacttcc ccgaaccggt gacgggtgtcg      540
tggaactcag gcgcctgac cagcggcgctc cacacottcc cggctgtcct acagtctctcc      600
ggactctact ccctcagcag cgtagtgacc gtgccctcca gcagcttggg caccagacc      660
tacatctgca acgtgaatca caagcccagc aacaccaagg tggacaagaa agttgagccc      720
aaatcttgtg acaaaactca cacatgccc cctgtcccag cacctgaact cctgggggga      780
ccgtcagtct tctcttccc cccaaaaccc aaggacaccc tcatgatctc cgggacccct      840
gaggtcacat gcgtgggtgt ggacgtgagc cacgaagacc ctgaggtcaa gttcaactgg      900
tacgtggacg gcgtggaggt gcataatgcc aagacaaagc cgcgggagga gcagtacaac      960
agcacgtacc gtgtgggtcag cgtcctcacc gtcctgcacc aggactggct gaatggcaag     1020
gagtacaagt gcaaggtctc caacaaagcc ctcccagccc ccatcgagaa aaccatctcc     1080
aaagccaaag ggcagccccg agaaccacag gtgtacaccc tgccccatc cggggatgag     1140
ctgaccaaga accaggtcag cctgacctgc ctgggtcaaag gcttctatcc cagcgacatc     1200
gccgtggagt gggagagcaa tgggcagccg gagaacaact acaagaccac gcctcccggt     1260
ctggactccg acggctcctt cttcctctac agcaagctca ccgtggacaa gagcaggtgg     1320
cagcagggga acgttttctc atgctcogtg atgcatgagg ctctgcacaa ccactacacg     1380
cagaagagcc tctccctgtc tccgggtgtt ggcgggggtt cgggtggagg aggttctgaa     1440
gttcaattgt tagagtctgg tggcgggtctt gttcagcctg gtggttcttt acgtctttct     1500
tgcgctgctt ccggattcac tttctcttgg tacgatatgg attgggttcg ccaagctcct     1560
ggtaaaggtt tggagtgggt ttctgttata tctccttotg gtggctggac tgcttatgct     1620
gactcogtta aaggtcgctt cactatctct agagacaact ctaagaatac tctctacttg     1680
cagatgaaca gcttaagggc tgaggacacg gccgtgtatt actgtgcgag agatagtagt     1740
ggttattact cacctgatgc ttttgatata tggggccaag ggaccctggt caccgtctca     1800
agcgttggtt ctggaggttc aggtgggtggc ggctctggtg gtggtggttc tgggtggcgt     1860
ggttctggag gttcaggcgg aaacatccag atgacccagt ctccatcctc cctgtctgca     1920
tctgtaggag acagagtcac catcacttgc cgggcaagtc agagcattag cagctattta     1980
aattggtatc agcagaaacc agggaaagcc cctaaactcc tgatctatga tgcattcagt     2040
ttgcaaagtg ggggtccatt aaggttcagt ggcagtggat ctgggacaga tttcactctc     2100
accatcagca gtctgcaacc tgaagatctt gcaacttact actgtcaaca gagttacagt     2160
accccgctca ctttcggcgg agggacccaa gtggatatca aa                        2202

```

&lt;210&gt; 512

&lt;211&gt; 734

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Secuencia artificial

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; IgG1 enlazadora de 10 monómeros en biAb c597.1-c1111.1

&lt;400&gt; 512

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



245										250					255				
Leu	Leu	Gly	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp				
			260					265					270						
Thr	Leu	Met	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp				
		275					280					285							
Val	Ser	His	Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Lys	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly				
	290					295					300								
Val	Glu	Val	His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Tyr	Asn				
305					310					315					320				
Ser	Thr	Tyr	Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu	His	Gln	Asp	Trp				
				325					330					335					
Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Ala	Leu	Pro				
			340					345					350						
Ala	Pro	Ile	Glu	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg	Glu				
		355					360					365							
Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro	Ser	Arg	Asp	Glu	Leu	Thr	Lys	Asn				
	370					375					380								
Gln	Val	Ser	Leu	Thr	Cys	Leu	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp	Ile				
385					390					395					400				
Ala	Val	Glu	Trp	Glu	Ser	Asn	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn	Asn	Tyr	Lys	Thr				
				405					410					415					
Thr	Pro	Pro	Val	Leu	Asp	Ser	Asp	Gly	Ser	Phe	Phe	Leu	Tyr	Ser	Lys				
			420					425					430						
Leu	Thr	Val	Asp	Lys	Ser	Arg	Trp	Gln	Gln	Gly	Asn	Val	Phe	Ser	Cys				
		435					440					445							
Ser	Val	Met	His	Glu	Ala	Leu	His	Asn	His	Tyr	Thr	Gln	Lys	Ser	Leu				
	450					455					460								
Ser	Leu	Ser	Pro	Gly	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Glu				
465				470						475					480				
Val	Gln	Leu	Leu	Glu	Ser	Gly	Gly	Gly	Leu	Val	Gln	Pro	Gly	Gly	Ser				
				485					490					495					
Leu	Arg	Leu	Ser	Cys	Ala	Ala	Ser	Gly	Phe	Thr	Phe	Ser	Trp	Tyr	Asp				
				500				505					510						

Met Asp Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ser  
515 520 525

Val Ile Ser Pro Ser Gly Gly Trp Thr Ala Tyr Ala Asp Ser Val Lys  
530 535 540

Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu  
545 550 555 560

Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala  
565 570 575

Arg Asp Ser Ser Gly Tyr Tyr Ser Pro Asp Ala Phe Asp Ile Trp Gly  
580 585 590

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Val Gly Ser Gly Gly Ser Gly  
595 600 605

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly  
610 615 620

Ser Gly Gly Asn Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala  
625 630 635 640

Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile  
645 650 655

Ser Ser Tyr Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys  
660 665 670

Leu Leu Ile Tyr Asp Ala Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro Leu Arg  
675 680 685

Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser  
690 695 700

Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Tyr Ser  
705 710 715 720

Thr Pro Leu Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Asp Ile Lys  
725 730

<210> 513  
<211> 2181  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial

<220>  
<223> ADNc de IgG1 enlazadora de 10 monómeros en biAb c597.1-c870.1

<400> 513

atgggatgga gctgtatcat cctcttcttg gtagcaacag ctacaggcgc gcactccgaa	60
gttcaattgt tagagtctgg tggcgggtctt gttcagcctg gtggttcttt acgtctttct	120
tgcgctgctt ccggattcac tttctctaag tacaagatgc tttgggttcg ccaagtcct	180
ggtaaagggt tggagtgggt ttcttctatc tatccttctg gtggcggttac tttttatgct	240
gactccgtta aaggtcgctt cactatctct agagacaact ctaagaatac tctctacttg	300
cagatgaaca gcttaagggc tgaggacacg gccgtgtatt actgtgcaag agatggggag	360
atgatttcgg gtagtttctt tgactcctgg gccagggaa ccctggtcac cgtctcaagc	420
gcctccacca agggcccatc ggtcttcccg ctagcaccct cctccaagag cacctctggg	480
ggcacagcgg ccctgggctg cctgggtcaag gactacttcc ccgaaccggt gacggtgtcg	540
tggaaactcag gcgcctgac cagcggcgtc cacaccttcc cggctgtcct acagtctctc	600
ggactctact ccctcagcag cgtagtgaac gtgccctcca gcagcttggg caccagacc	660
tacatctgca acgtgaatca caagcccagc aacaccaagg tggacaagaa agttgagccc	720
aaatcttgtg aaaaaactca cacatgccca ccgtgccag cacctgaact cctgggggga	780
cgtcagctct tctcttccc cccaaaacc aaggacacc tcctgatctc ccggaccct	840
gaggtcacat gcgtggtggt ggacgtgagc cacgaagacc ctgaggtcaa gttcaactgg	900
tacgtggacg gcgtggaggt gcataatgcc aagacaaagc cgcgggagga gcagtacaac	960
agcacgtacc gtgtggtcag cgtcctcacc gtctgcacc aggactggct gaatggcaag	1020
gagtacaagt gcaaggcttc caacaaagcc ctcccagccc ccctcgagaa aaccatctcc	1080
aaagccaaag ggcagccccg agaaccacag gtgtacaccc tgccccatc ccgggatgag	1140
ctgaccaaga accaggtcag cctgacctgc ctggtcaaag gcttctatcc cagcgacatc	1200
gccgtggagt gggagagcaa tgggcagccg gagaacaact acaagaccac gcctcccggtg	1260
ctggactccg acggtctctt ctctctctac agcaagctca ccgtggacaa gagcaggtgg	1320
cagcagggga acgtcttctc atgctccgtg atgcatgagg ctctgcacaa ccactacacg	1380
cagaagagcc tctccctgtc tccgggtggt ggcgggggtt cgggtggagg aggttctgaa	1440
gttcaattgt tagagtctgg tggcgggtctt gttcagcctg gtggttcttt acgtctttct	1500
tgcgctgctt ccggattcac tttctctggt tacattatgt ggtgggttcg ccaagtcct	1560
ggtaaagggt tggagtgggt ttctgttctc tctcttctg gtggcgatac ttggtatgct	1620
gactccgtta aaggtcgctt cactatctct agagacaact ctaagaatac tctctactta	1680
cagatgaaca gcttaagggc tgaggacacg gccgtgtatt actgtgccac agcgggagac	1740
tactggggcc agggcacctt ggtcacctgc tcaagcgttg gttctggagg ttcaggcgggt	1800
ggcggctctg gtggtggtgg ttctggtggc ggtggttctg gaggttcagg cggacagagc	1860
gaattgactc agccaccctc agcgtctggg acccccgggc agagggtcac catctcttgt	1920

<b>tctggaagca gctccaacat cggaaggaat cctgtaaact ggtaccagca cctcccagga</b>	<b>1980</b>
<b>acggcoccga aactectcat ctatggtgat aatcagcggc cctcaggggt ccctgaccga</b>	<b>2040</b>
<b>ttctctgget ccaggtctgg cacctcagcc tccctggcca tcagtgggct ccagtctgag</b>	<b>2100</b>
<b>gatgaggctg attattactg tgcagcatgg gatgacagcc tgaatggtgt ggtattcggc</b>	<b>2160</b>
<b>ggagggacca agctgaccgt c</b>	<b>2181</b>

<210> 514

<211> 727

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> IgG1 enlazadora de 10 monómeros en biAb c597.1-c870.1

<400> 514

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

Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr  
 180 185 190  
 Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val  
 195 200 205  
 Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn  
 210 215 220  
 Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro  
 225 230 235 240  
 Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu  
 245 250 255  
 Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp  
 260 265 270  
 Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp  
 275 280 285  
 Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly  
 290 295 300  
 Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn  
 305 310 315 320  
 Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp  
 325 330 335  
 Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro  
 340 345 350  
 Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu  
 355 360 365  
 Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn  
 370 375 380  
 Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile  
 385 390 395 400  
 Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr  
 405 410 415  
 Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys  
 420 425 430

Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys  
 435 440 445  
 Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu  
 450 455 460  
 Ser Leu Ser Pro Gly Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Glu  
 465 470 475 480  
 Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser  
 485 490 495  
 Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Gly Tyr Ile  
 500 505 510  
 Met Trp Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ser  
 515 520 525  
 Val Ile Ser Pro Ser Gly Gly Asp Thr Trp Tyr Ala Asp Ser Val Lys  
 530 535 540  
 Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu  
 545 550 555 560  
 Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala  
 565 570 575  
 Thr Ala Gly Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser  
 580 585 590  
 Val Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser  
 595 600 605  
 Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly Gln Ser Glu Leu Thr Gln  
 610 615 620  
 Pro Pro Ser Ala Ser Gly Thr Pro Gly Gln Arg Val Thr Ile Ser Cys  
 625 630 635 640  
 Ser Gly Ser Ser Ser Asn Ile Gly Arg Asn Pro Val Asn Trp Tyr Gln  
 645 650 655  
 His Leu Pro Gly Thr Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Gly Asp Asn Gln  
 660 665 670  
 Arg Pro Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Arg Ser Gly Thr  
 675 680 685  
 Ser Ala Ser Leu Ala Ile Ser Gly Leu Gln Ser Glu Asp Glu Ala Asp

690

695

700

Tyr Tyr Cys Ala Ala Trp Asp Asp Ser Leu Asn Gly Val Val Phe Gly  
705 710 715 720

Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val  
725

<210> 515

<211> 2199

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> ADNc de IgG1 enlazadora de 10 monómeros en biAb c597.1-c1092.1

<400> 515



atgggatgga gctgtatcat cctcttcttg gtagcaacag ctacaggcgc gcactccgaa	60
gttcaattgt tagagtctgg tggcggctctt gttcagcctg gtggttcttt acgtctttct	120
tgcgctgctt ccggattcac ttctcttaag tacaagatgc tttgggttcg ccaagctcct	180
ggtaaagggtt tggagtgggt ttcttctatc tatccttctg gtggcggttac tttttatgct	240
gactccgtta aaggctcgctt cactatctct agagacaact ctaagaatac tctctacttg	300
cagatgaaca gcttaagggc tgaggacacg gccgtgtatt actgtgcaag agatggggag	360
atgatttcgg gtagtttctt tgactcctgg ggccaggga cctgggtcac cgtctcaage	420
gcctccacca agggcccatc ggtcttccc ctagcacctt cctccaagag cacctctggg	480
ggcacagcgg cctgggctg cctgggtcaag gactacttcc ccgaaccggg gacgggtgctg	540
tggaaactcag gcgcctgac cagcggcgctc cacaccttcc cggtgtcct acagtctctc	600
ggactctact cctcagcag cgtagtgaac gtgccctcca gcagcttggg caccagacc	660
tacatctgca acgtgaatca caagcccagc aacaccaagg tggacaagaa agttgagccc	720
aaatcttgtg aaaaaactca cacatgccca ccgtgccag cacctgaact cctgggggga	780
ccgtcagctt tcctcttccc cccaaaaccc aaggacaccc tcatgatctc ccggaccctt	840
gaggtcacat gcgtgggtgg ggacgtgagc cacgaagacc ctgaggtcaa gttcaactgg	900
tacgtggacg gcgtggaggt gcataatgcc aagacaaagc cgcgggagga gcagtacaac	960
agcacgtacc gtgtggtcag cgtcctcacc gtcctgcacc aggactggct gaatggcaag	1020
gagtacaagt gcaaggctct caacaaagcc ctcccagccc ccatcgagaa aaccatctcc	1080
aaagccaaag ggcagccccg agaaccacag gtgtacaccc tgcccccatc ccgggatgag	1140
ctgaccaaga accaggtcag cctgacctgc ctgggtcaaag gcttctatcc cagcgacatc	1200
gccgtggagt gggagagcaa tgggcagccg gagaacaact acaagaccac gcctcccgtg	1260
ctggactccg acggctcctt ctctctctac agcaagctca ccgtggacaa gagcaggtgg	1320
cagcagggga acgtcttctc atgctccgtg atgcatgagg ctctgcacaa ccactacacg	1380

cagaagagcc tctccctgtc tccgggtggt ggcgggggtt cgggtggagg aggttctgaa 1440  
 gttcaattgt tagagtctgg tggcgggtctt gttcagcctg gtggttcttt acgtotttct 1500  
 tgcgctgctt ccggattcac tttctctaag tacgatatgc attgggttcg cdaagctcct 1560  
 ggtaaagggt tggagtgggt ttctgttata tctccttctg gtggctggac ttcttatgct 1620  
 gactccgtta aaggctcgctt cactatctct agagacaact ctaagaatac tctctacttg 1680  
 cagatgaaca gcttaagggc tgaggacacc gccatgtatt actgtgcgag ggatgactac 1740  
 agtaaaggac gggatgcttt tgatatctgg ggccaaggga ccctggtcac cgtotcaagc 1800  
 gttggttctg gaggttcagg tgggtggcggc tctggtggtg gtggttctgg tggcgggtgt 1860  
 tctggagggt caggcggaga catocagttg acccagtcct catcttccct gtctgcatct 1920  
 gtaggagaca ggtcaccat cacttgccgg gcaagtcaga gcattagcag ctatttaaata 1980  
 tggatcagc agaaaccagg gaaagccctt aagctcctga tctatgctgc atccagtttg 2040  
 caaagtgggg tcccatcaag gttcagtggc agtggatctg ggacagattt cactctcacc 2100  
 atcagcagtc tgcaacctga agattttgca acttactact gtcaacagag ttacagtacc 2160  
 ccgtacactt ttggccaggg gaccaagctg gagatcaaa 2199

<210> 516  
 <211> 733  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> IgG1 enlazadora de 10 monómeros en biAb c597.1-c1092.1

<400> 516

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

100	105	110
Tyr Tyr Cys Ala Arg Asp Gly Glu Met Ile Ser Gly Ser Phe Phe Asp 115 120 125		
Ser Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys 130 135 140		
Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly 145 150 155 160		
Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro 165 170 175		
Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr 180 185 190		
Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val 195 200 205		
Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn 210 215 220		
Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro 225 230 235 240		
Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu 245 250 255		
Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp 260 265 270		
Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp 275 280 285		
Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly 290 295 300		
Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn 305 310 315 320		
Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp 325 330 335		
Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro 340 345 350		
Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu 355 360 365		

Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn  
370 375 380

Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile  
385 390 395 400

Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr  
405 410 415

Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys  
420 425 430

Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys  
435 440 445

Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu  
450 455 460

Ser Leu Ser Pro Gly Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Glu  
465 470 475 480

Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser  
485 490 495

Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Lys Tyr Asp  
500 505 510

Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ser  
515 520 525

Val Ile Ser Pro Ser Gly Gly Trp Thr Ser Tyr Ala Asp Ser Val Lys  
530 535 540

Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu  
545 550 555 560

Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys Ala  
565 570 575

Arg Asp Asp Tyr Ser Lys Gly Arg Asp Ala Phe Asp Ile Trp Gly Gln  
580 585 590

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Val Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly  
595 600 605

Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Ser  
610 615 620

Gly Gly Asp Ile Gln Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser  
625 630 635 640

Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser  
645 650 655

Ser Tyr Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu  
660 665 670

Leu Ile Tyr Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe  
675 680 685

Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu  
690 695 700

Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Tyr Ser Thr  
705 710 715 720

Pro Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys  
725 730

<210> 517

<211> 2199

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> ADNc de IgG1 enlazadora de 10 monómeros en biAb c597.1-c1039.1

<400> 517

```

atgggatgga gctgtatcat cctcttcttg gtagcaacag ctacaggcgc gcaactccgaa      60
gttcaattgt tagagtctgg tggcgggtctt gttcagcctg gtggttcttt acgtctttct      120
tgcgctgctt ccggattcac tttctctaag tacaagatgc tttgggttcg ccaagctcct      180
ggtaaagggt tggagtgggt ttcttctatc tctcttctg gtggcggttac tttttatgct      240
gactccgtaa aaggctcgctt cactatctct agagacaact ctaagaatac tctctacttg      300
cagatgaaca gcttaagggc tgaggacacg gccgtgtatt actgtgcaag agatggggag      360
atgatttcgg gtagtttctt tgactcctgg ggccaggga cctgggtcac cgtctcaagc      420
gcctccacca agggcccatc ggtcttcccg ctagcaccct cctccaagag cacctctggg      480
ggcacagcgg cctgggctg cctgggtcaag gactacttcc ccgaaccggt gacgggtgtcg      540
tggaactcag gcgccttgac cagcggcgctc cacaccttcc cggctgtcct acagtctctc      600
ggactctact cctcagcag cgtagtgaac gtgccctcca gcagcttggg caccagacc      660
tacatctgca acgtgaatca caagcccagc aacaccaagg tggacaagaa agttgagccc      720
aaatcttgtg acaaaactca cacatgccca ccgtgccag cacctgaact cctgggggga      780
ccgtcagtct tctcttccc cccaaaaccc aaggacacc tcattgatctc ccggaccct      840

```

gaggtcacat gcgtggtggt ggacgtgagc cacgaagacc ctgaggtcaa gttcaactgg 900  
 tacgtggacg gcgtggaggt gcataatgcc aagacaaagc cgcgggagga gcagtacaac 960  
 agcacgtacc gtgtggtcag cgtcctcacc gtcctgcacc aggactggct gaatggcaag 1020  
 gagtacaagt gcaaggtctc caacaaagcc ctcccagccc ccatcgagaa aaccatctcc 1080  
 aaagccaaaag ggcagccccg agaaccacag gtgtacaccc tgcccccatc ccgggatgag 1140  
 ctgaccaaga accaggtcag cctgacctgc ctggtcaaag gcttctatcc cagcgacatc 1200  
 gccgtggagt gggagagcaa tgggcagccg gagaacaact acaagaccac gcctcccgtg 1260  
 ctggactccg acggctcctt cttcctctac agcaagctca ccgtggacaa gaggaggtgg 1320  
 cagcagggga acgtcttctc atgctccgtg atgcatgagg ctctgcacaa ccactacacg 1380  
 cagaagagcc tctcctgtc tccgggtggt ggcggggggt cgggtggagg aggttctgaa 1440  
 gttcaattgt tagagtctgg tggcggctctt gttcagcctg gtggttcttt acgtctttct 1500  
 tgcgtgctt ccggtatcac tttctcttgg tacgatatgg tttgggttcg ocaagctcct 1560  
 ggtaaagggt tggagtgggt ttctgttata tctccttctg gtggctggac ttcttatgct 1620  
 gactccgtta aaggtoctt cactatctct agagacaact ctaagaatac tctctacttg 1680  
 cagatgaaca gcttaagggc tgaggacacg gccgtgtatt actgtgcgag agatcatagt 1740  
 ggctacgatt ctgaatactt tgactactgg ggccagggca ccctggtcac cgtctcaagc 1800  
 gttggttctg gaggttcagg cgggtggcgc tctggtggtg gtggttcttg tggcgggtgt 1860  
 tctggaggtt caggcggaaa catccagatg acccagtctc catcctccct gtctgcatct 1920  
 gtaggagaca gagtccaccat cacttgccgg gcaagtcaga gcattagcag ctattttaat 1980  
 tggtatcagc agaaaccagg gaaagcccct aagctcctga tctatgotgc atccagtttg 2040  
 caaagtgggg tcccatcaag gttcagtggc agtggatctg ggacagattt cactctcacc 2100  
 atcagcagtc tgcaacctga agattttgca acttactact gtcaacagag ttacagtacc 2160  
 ccgtacactt ttggccaggg gaccaagctg gagatcaaa 2199

<210> 518

<211> 733

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Aminoácidos de IgG1 enlazadora de 10 monómeros en biAb c597.1-c1039.1

<400> 518

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

Ala His Ser Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln  
 20 25 30

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



Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly  
290 295 300

Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn  
305 310 315 320

Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp  
325 330 335

Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro  
340 345 350

Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu  
355 360 365

Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn  
370 375 380

Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile  
385 390 395 400

Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr  
405 410 415

Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys  
420 425 430

Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys  
435 440 445

Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu  
450 455 460

Ser Leu Ser Pro Gly Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Glu  
465 470 475 480

Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser  
485 490 495

Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Trp Tyr Asp  
500 505 510

Met Val Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ser  
515 520 525

Val Ile Ser Pro Ser Gly Gly Trp Thr Ser Tyr Ala Asp Ser Val Lys  
530 535 540

Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu

545		550		555		560
Gln Met Asn Ser	Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala					
	565		570			575
Arg Asp His Ser	Gly Tyr Asp Ser Glu Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln					
	580		585			590
Gly Thr Leu Val	Thr Val Ser Ser Val Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly					
	595		600			605
Gly Gly Ser Gly	Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Ser					
	610		615			620
Gly Gly Asn Ile	Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser					
	625		630			635
Val Gly Asp Arg	Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser					
	645		650			655
Ser Tyr Leu Asn	Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu					
	660		665			670
Leu Ile Tyr Ala	Ala Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe					
	675		680			685
Ser Gly Ser Gly	Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu					
	690		695			700
Gln Pro Glu Asp	Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Tyr Ser Thr					
	705		710			715
Pro Tyr Thr Phe	Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys					
	725		730			

<210> 519  
 <211> 2190  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> ADNc de IgG1 enlazadora de 10 monómeros en biAb c597.1-c868.1

<400> 519

atgggatgga gctgtatcat cctcttcttg gtagcaacag ctacaggcgc gcactccgaa	60
gttcaattgt tagagtctgg tggcggctct gttcagcctg gtggttcttt acgtctttct	120
tgcgctgctt ccgattcac tttctctaag tacaagatgc ttggggttcg ccaagctcct	180
ggtaaagggt tggagtgggt ttcttctatc tatccttctg gtggcgttac tttttatgct	240
gactccgta aaggtcgtt cactatctct agagacaact ctaagaatac tctctacttg	300

cagatgaaca gcttaagggc tgaggacacg gccgtgtatt actgtgcaag agatggggag	360
atgatttcgg gtagtttctt tgactcctgg ggcagggaa ccctggtcac cgtctcaagc	420
gcctccacca agggcccatc ggtcttcccg ctagcaccct cctccaagag cacctctggg	480
ggcacagcgg ccctgggctg cctggtcaag gactacttcc ccgaaccggg gacgggtgctg	540
tggaactcag gcgccctgac cagcggcgctc cacaccttcc cggtctgctt acagtctctc	600
ggactctact ccctcagcag cgtagtgaac gtgccctcca gcagcttggg caccagacc	660
tacatctgca acgtgaatca caagcccagc aacaccaagg tggacaagaa agttgagccc	720
aaatcttggt acaaaactca cacatgccca ccgtgccag cacctgaact cctgggggga	780
ccgtcagctt tctcttccc cccaaaaccc aaggacacc tcctgatctc ccggaccct	840
gaggtcacat gcgtggtggt ggacgtgagc cacgaagacc ctgaggtcaa gttcaactgg	900
tacgtggacg gcgtggaggt gcataatgcc aagacaaagc cgcgggagga gcagtacaac	960
agcacgtacc gtgtggtcag cgtctcacc gtctgcacc aggactggct gaatggcaag	1020
gagtacaagt gcaaggtctc caacaaagcc ctcccagccc ccctogagaa aaccatctcc	1080
aaagccaaag ggcagccccc agaaccacag gtgtacaccc tgcccccatc ccgggatgag	1140
ctgaccaaga accaggtcag cctgacctgc ctggtcaaag gcttctatcc cagcgacatc	1200
gccgtggagt gggagagcaa tgggcagccg gagaacaact acaagaccac gcctcccgtg	1260
ctggactccg acggctcctt ctctctctac agcaagctca ccgtggacaa gagcaggtgg	1320
cagcagggga acgtcttctc atgctccgtg atgcatgagg ctctgcacaa ccactacag	1380
cagaagagcc tctccctgtc tccgggtggt ggcgggggtt cgggtggagg aggttctgcc	1440
atccagatga ccagctctcc atcctccctg tctgcatctg taggagacag agtcaccatc	1500
acttgccggg caagtcagag cattagcagc tatttaaat ggtatcagca gaaaccaggg	1560
aaagccccta aactcctgat ccctgctgca tccaatttgc agagtggggt cccatcaagg	1620
ttcagtgcca gtggtctgg gacagatttc actctacca tcagcagctc gcaacctgaa	1680
gattttgcaa ctactactg tcaacagagt tacagtacc ctctcacttt cggcggaggg	1740
accaaggtgg agatcaagct tgggtctgga ggttcaggcg gtggcggctc tgggtggtgt	1800
ggttctggtg gcggtggttc tggaggttca ggcggagaag ttcaattgtt agagtctggt	1860
ggcggctctg ttcagcctgg tgggtcttta cgtctttctt gcgctgcttc cggattcact	1920
ttctctcatt acgagatggg ttgggttcgc caagctcctg gttaaagggtt ggagtgggtt	1980
tcttatatct cttcttctgg tggctggact gcttatgctg actccgttaa aggtcgcttc	2040
actatctcta gagacaactc taagaatact ctctacttgc agatgaacag cttaaaggct	2100
gaggacacgg ccgtgtatta ctgtgcaagg attggtacg cagatgcttt tgatatctgg	2160
ggccaaggga ccacggtcac cgtctcaagc	2190

<211> 730  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

5

<220>  
<223> IgG1 enlazadora de 10 monómeros en biAb c597.1-c868.1  
  
<400> 520

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

Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro  
 225 230 235 240  
 Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu  
 245 250 255  
 Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp  
 260 265 270  
 Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp  
 275 280 285  
 Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly  
 290 295 300  
 Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn  
 305 310 315 320  
 Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp  
 325 330 335  
 Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro  
 340 345 350  
 Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu  
 355 360 365  
 Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn  
 370 375 380  
 Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile  
 385 390 395 400  
 Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr  
 405 410 415  
 Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys  
 420 425 430  
 Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys  
 435 440 445  
 Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu  
 450 455 460  
 Ser Leu Ser Pro Gly Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Ala  
 465 470 475 480

Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly Asp  
485 490 495

Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser Ser Tyr Leu  
500 505 510

Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile His  
515 520 525

Ala Ala Ser Asn Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser  
530 535 540

Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu  
545 550 555 560

Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Tyr Ser Thr Pro Leu Thr  
565 570 575

Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Leu Gly Ser Gly Gly Ser  
580 585 590

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly  
595 600 605

Gly Ser Gly Gly Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val  
610 615 620

Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr  
625 630 635 640

Phe Ser His Tyr Glu Met Gly Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly  
645 650 655

Leu Glu Trp Val Ser Tyr Ile Ser Ser Ser Gly Gly Trp Thr Ala Tyr  
660 665 670

Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys  
675 680 685

Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala  
690 695 700

Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Ile Gly Tyr Ala Asp Ala Phe Asp Ile Trp  
705 710 715 720

Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser  
725 730



<210> 521  
 <211> 2193  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> ADNc de IgG1 enlazadora de 10 monómeros en biAb c597.1-c1081.1

<400> 521

```

atgggatgga gctgtatcat cctcttcttg gtagcaacag ctacaggcgc gcactccgaa      60
gttcaattgt tagagtctgg tggcgggtctt gttcagcctg gtggttcttt acgtctttct      120
tgcgctgctt ccggattcac tttctctaag tacaagatgc tttgggttcg ccaagctcct      180
ggtaaagggt tggagtgggt ttcttctatc tctcctcttg gtggcgttac tttttatgct      240
gactccgtta aaggctcgctt cactatctct agagacaact ctaagaatac tctctacttg      300
cagatgaaca gcttaagggc tgaggacacg gccgtgtatt actgtgcaag agatggggag      360
atgatttcgg gtagtttctt tgactcctgg ggccaggga cctcgtcac cgtctcaagc      420
gcctccacca agggcccatc ggtcttcccg ctgacacctt cctccaagag cacctctggg      480
ggcacagcgg cctcgggctg cctcgtcaag gactacttcc ccgaaccggt gacgggtgctg      540
tggaactcag gcgccctgac cagcggcgctc cacaccttcc cggtctcctt acagtcctcc      600
ggactctact ccctcagcag cgtagtgaac gtgccctcca gcagcttggg caccagacc      660
tacatctgca acgtgaatca caagcccagc aacaccaagg tggacaagaa agttgagccc      720
aaatcttgtg aaaaaactca cacatgccca ccgtgccag cacctgaact cctgggggga      780
ccgtcagctt tctcttccc cccaaaaccc aaggacacct tcatgatctc ccggacctct      840
gaggtcacat gcgtgggtgt ggacgtgagc cacgaagacc ctgaggtcaa gttcaactgg      900
tacgtggacg gcgtggaggt gcataatgcc aagacaaagc cgcgggagga gcagtacaac      960
agcacgtacc gtgtgggtcag cgtcctcacc gtcctgcacc aggactgggt gaatggcaag     1020
gagtacaagt gcaaggtctc caacaaagcc ctcccagccc ccatcgagaa aaccatctcc     1080
aaagccaaag ggcagccccg agaaccacag gtgtacaccc tgccccatc ccgggatgag     1140
ctgaccaaga accaggtcag cctgacctgc ctggtcaaag gcttctatcc cagcgacatc     1200
gccgtggagt gggagagcaa tgggcagccg gagaacaact acaagaccac gcctcccgtg     1260
ctggactccg acggctcctt ctctctctac agcaagctca ccgtggacaa gagcaggtgg     1320
cagcagggga acgtcttctc atgctccgtg atgcatgagg ctctgcacaa ccactacacg     1380
cagaagagcc tctccctgtc tccgggtggg ggcgggggtt cgggtggagg aggttctgaa     1440
gttcaattgt tagagtctgg tggcgggtctt gttcagcctg gtggttcttt acgtctttct     1500
tgcgctgctt ccggattcac tttctctact tacgatatgc attgggttcg ccaggctcct     1560
ggtaaagggt tggagtgggt ttctgttata tctcctcttg gtggctggac tgcttatgct     1620
gactccgtta aaggctcgctt cactatctct agagacaact ctaagaatac tctctacttg     1680

```

```

cagatgaaca gcttaagggc tgaggacacg gccgtgtatt actgtgcaag agcagcagct      1740
ggatatgatg cttttgatat ctggggccaa gggacaatgg tcaccgtctc aagcgttggt      1800
tctggaggtt caggcgggtg cggctctggt ggtggtggtt ctggtggcgg tggttctgga      1860
ggttcaggcg gagaaattgt gttgacgcag tctccatccc ccctgtctgc atctgtcgga      1920
gacagagtca ccatcacttg ccgggcaagt cacaacatca acaaatattt aaattggtat      1980
caacaaaaac cggggaaagc ccctaagctc ctgatctttg gtgcatccag tttgcgcagt      2040
ggggtcccat caaggttcag tggcagtgga tctggcacag atttcactct cactatcagc      2100
agtctggaac ctgaggattt ggcaacttac ttctgtcaac agacttacaa taccocgctc      2160
actttcggcg gagggacca gctggagatc aaa                                     2193

```

&lt;210&gt; 522

&lt;211&gt; 731

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Secuencia artificial

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; IgG1 enlazadora de 10 monómeros en biAb c597.1-c1081.1

&lt;400&gt; 522

```

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

```

```

Ala His Ser Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln
          20           25           30

```

```

Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe
35           40           45

```

```

Ser Lys Tyr Lys Met Leu Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu
50           55           60

```

```

Glu Trp Val Ser Ser Ile Tyr Pro Ser Gly Gly Val Thr Phe Tyr Ala
65           70           75           80

```

```

Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn
          85           90           95

```

```

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

```

```

Tyr Tyr Cys Ala Arg Asp Gly Glu Met Ile Ser Gly Ser Phe Phe Asp
115          120          125

```

```

Ser Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys
130          135          140

```

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

Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro  
 165 170 175

Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr  
 180 185 190

Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val  
 195 200 205

Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn  
 210 215 220

Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro  
 225 230 235 240

Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu  
 245 250 255

Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp  
 260 265 270

Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp  
 275 280 285

Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly  
 290 295 300

Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn  
 305 310 315 320

Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp  
 325 330 335

Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro  
 340 345 350

Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu  
 355 360 365

Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn  
 370 375 380

Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile  
 385 390 395 400

Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr

				405						410						415
Thr	Pro	Pro	Val	Leu	Asp	Ser	Asp	Gly	Ser	Phe	Phe	Leu	Tyr	Ser	Lys	
			420					425					430			
Leu	Thr	Val	Asp	Lys	Ser	Arg	Trp	Gln	Gln	Gly	Asn	Val	Phe	Ser	Cys	
		435					440					445				
Ser	Val	Met	His	Glu	Ala	Leu	His	Asn	His	Tyr	Thr	Gln	Lys	Ser	Leu	
	450					455					460					
Ser	Leu	Ser	Pro	Gly	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Glu	
465				470						475					480	
Val	Gln	Leu	Leu	Glu	Ser	Gly	Gly	Gly	Leu	Val	Gln	Pro	Gly	Gly	Ser	
				485					490					495		
Leu	Arg	Leu	Ser	Cys	Ala	Ala	Ser	Gly	Phe	Thr	Phe	Ser	Thr	Tyr	Asp	
			500					505					510			
Met	His	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu	Glu	Trp	Val	Ser	
		515					520					525				
Val	Ile	Ser	Pro	Ser	Gly	Gly	Trp	Thr	Ala	Tyr	Ala	Asp	Ser	Val	Lys	
	530				535						540					
Gly	Arg	Phe	Thr	Ile	Ser	Arg	Asp	Asn	Ser	Lys	Asn	Thr	Leu	Tyr	Leu	
545				550						555					560	
Gln	Met	Asn	Ser	Leu	Arg	Ala	Glu	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	Ala	
				565					570					575		
Arg	Ala	Ala	Ala	Gly	Tyr	Asp	Ala	Phe	Asp	Ile	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	
			580					585					590			
Met	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Val	Gly	Ser	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	
	595						600					605				
Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	
	610					615					620					
Glu	Ile	Val	Leu	Thr	Gln	Ser	Pro	Ser	Pro	Leu	Ser	Ala	Ser	Val	Gly	
625					630					635					640	
Asp	Arg	Val	Thr	Ile	Thr	Cys	Arg	Ala	Ser	His	Asn	Ile	Asn	Lys	Tyr	
				645					650					655		
Leu	Asn	Trp	Tyr	Gln	Gln	Lys	Pro	Gly	Lys	Ala	Pro	Lys	Leu	Leu	Ile	
				660				665					670			

Phe Gly Ala Ser Ser Leu Arg Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly  
675 680 685

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro  
690 695 700

Glu Asp Leu Ala Thr Tyr Phe Cys Gln Gln Thr Tyr Asn Thr Pro Leu  
705 710 715 720

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys  
725 730

5 <210> 523  
<211> 54  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial

10 <220>  
<223> Cebador oligonucleotídico

<400> 523  
atctccaaag ccaaagggca gccccgagaa ccacaggtgt acaccctgcc ccca 54

15 <210> 524  
<211> 48  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial

20 <220>  
<223> Cebador oligonucleotídico

<400> 524  
gggtggcgggg gttcgggtgg aggaggttct gaagttcaat tgtagag 48

25 <210> 525  
<211> 48  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial

30 <220>  
<223> Cebador oligonucleotídico

35 <400> 525  
aggaacctct ccaccgaac ccccgccacc acccgagag agggagag 48

40 <210> 526  
<211> 51  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial

<220>  
<223> Cebador oligonucleotídico

45 <400> 526  
agtcgaggct gatcagcgag ctctagatt ttatttgata tccactttgg t 51

50 <210> 527  
<211> 52  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial

	<220>	
	<223> Cebador oligonucleotídico	
5	<400> 527 agtcgaggct gatcagcgag cttctagatt ttagacggtc agcttggtcc ct	52
	<210> 528	
	<211> 51	
10	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Cebador oligonucleotídico	
15	<400> 528 agtcgaggct gatcagcgag cttctagatt ttattgac tccagctgg t 51	
	<210> 529	
	<211> 51	
20	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Cebador oligonucleotídico	
25	<400> 529 agtcgaggct gatcagcgag cttctagatt ttagcttgag acggtgaccg t	51
	<210> 530	
30	<211> 48	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
35	<223> Cebador oligonucleotídico	
	<400> 530 ggtggcgggg gttcgggtgg aggaggttct gccatccaga tgacccag	48
40	<210> 531	
	<211> 232	
	<212> PRT	
	<213> Homo sapiens	
45	<400> 531	

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

# ES 2 456 296 T3

<211> 232  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

5

<220>  
 <223> Fc-488

<400> 532

10

**Glu Pro Arg Ser Ser Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala**  
**1 5 10 15**



Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro  
20 25 30

Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val  
35 40 45

Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val  
50 55 60

Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln  
65 70 75 80

Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln  
85 90 95

Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala  
100 105 110

Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro  
115 120 125

Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr  
130 135 140

Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser  
145 150 155 160

Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr  
165 170 175

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

Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe  
195 200 205

Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys  
210 215 220

Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys  
225 230

<210> 533  
<211> 232  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial  
<220>

&lt;223&gt; Fc-4

&lt;400&gt; 533

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

5	<210> 534
	<211> 231
	<212> PRT
	<213> Secuencia artificial
10	<220>
	<223> Fc6
	<400> 534

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

<210> 535  
 <211> 232  
 <212> PRT

&lt;213&gt; Secuencia artificial

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Fc7

5

&lt;400&gt; 535

Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala  
1 5 10 15

Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro  
20 25 30

Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val  
35 40 45

Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val  
50 55 60

Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln  
65 70 75 80

Tyr Glu Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln  
85 90 95

Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala  
100 105 110

Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro  
115 120 125

Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr  
130 135 140

Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser  
145 150 155 160

Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr  
165 170 175

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

Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe  
195 200 205

Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys  
210 215 220

Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys  
225 230

5 <210> 536  
<211> 717  
<212> ADN  
<213> Artificial

10 <220>  
<223> ADNc de cadena kappa c597.1  
<400> 536

atgggatgga gctgtatcat cctcttcttg gtagcaacag ctacaggcgt gcactctgac 60  
atccagatga occagtctcc agactccctg gctgtgtctc tgggcgagag ggccaccatc 120  
aactgcaagt ccagccagag tgttttatac agctccaaca ataagaacta cttagcttgg 180  
taccagcaga aaccaggaca gcttcctaag ctgctcattt actgggcac taccgggaa 240  
tccgggggtcc ctgaccgatt cagtggcagc ggggtctggga cagatttcac tctcaccatc 300  
agcagcctgc aggctgaaga tgtggcagtt tattactgtc agcaatatta tagtactcgg 360  
tacacttttg gccaggggac caagctggag atcaaacgaa ctgtggctgc accatctgtc 420  
ttcatcttcc cgccatctga tgagcagttg aaatctggaa ctgcctctgt tgtgtgcctg 480  
ctgaataact tctatcccag agaggccaaa gtacagtgga aggtggataa cgccctccaa 540  
tcgggtaact ccaggagag tgtcacagag caggacagca aggacagcac ctacagcctc 600  
agcagcacc ctagcgtgag caaagcagac tacgagaaac acaaagtcta cgcctgcgaa 660  
gtcaccatc agggcctgag ctgcgccgtc acaaagagct tcaacagggg agagtgt 717

15 <210> 537  
<211> 239  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

20 <220>  
<223> cadena kappa c597.1  
<400> 537

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

<211> 17  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

5 <400> 538

**Val Ile Ser Pro Ser Gly Gly Trp Thr Ser Tyr Ala Asp Ser Val Lys**  
**1 5 10 15**

**Gly**

10 <210> 539  
 <211> 15  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

15 <220>  
 <223> enlazador peptídico

<400> 539

**Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser**  
**1 5 10 15**

20 <210> 540  
 <211> 17  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

25 <220>  
 <223> enlazador peptídico

30 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (2)..(5)  
 <223> Xaa es Gly o está ausente

35 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (6) .. (6)  
 <223> Xaa es cualquier aminoácido de origen natural

40 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (8) .. (11)  
 <223> Xaa es Gly o está ausente

45 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (12)..(12)  
 <223> Xaa es cualquier aminoácido de origen natural

50 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (14) .. (17)  
 <223> Xaa es Gly o está ausente

55 <400> 540



**Gly Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Gly Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Gly Xaa Xaa Xaa**  
**1 5 10 15**

**Xaa**

5 <210> 541  
 <211> 11  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

10 <220>  
 <223> Enlazador peptídico

15 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (4) .. (4)  
 <223> Xaa es cualquier aminoácido de origen natural

20 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (8)..(8)  
 <223> Xaa es cualquier aminoácido de origen natural

<400> 541

**Gly Gly Gly Xaa Gly Gly Gly Xaa Gly Gly Gly**  
**1 5 10**

25 <210> 542  
 <211> 25  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

30 <220>  
 <223> enlazador peptídico

35 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (2) .. (12)  
 <223> Xaa es Gly o está ausente

40 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (15) .. (25)  
 <223> Xaa es Gly o está ausente

<400> 542

**Gly Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Cys Gly Xaa Xaa**  
**1 5 10 15**

**Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa**  
**20 25**

45 <210> 543  
 <211> 11  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

50 <220>  
 <223> enlazador peptídico

<400> 543

Gly Gly Gly Gly Gly Cys Gly Gly Gly Gly Gly  
1 5 10

5

<210> 544  
<211> 13  
<212> PRT  
<213> Artificial

10

<220>  
<223> Péptido VEGF-A

<400> 544

15

His Glu Val Val Lys Phe Met Asp Val Tyr Gln Arg Ser  
1 5 10

<210> 545  
<211> 13  
<212> PRT  
<213> Artificial

20

<220>  
<223> Péptido VEGF-A

25

<400> 545

Val Val Lys Phe Met Asp Val Tyr Gln Arg Ser Tyr Ser  
1 5 10

30

<210> 546  
<211> 13  
<212> PRT  
<213> Artificial

35

<220>  
<223> Péptido VEGF-A

<400> 546

Lys Phe Met Asp Val Tyr Gln Arg Ser Tyr Ser His Pro  
1 5 10

40

<210> 547  
<211> 13  
<212> PRT  
<213> Artificial

45

<220>  
<223> Péptido VEGF-A

<400> 547

50

Met Asp Val Tyr Gln Arg Ser Tyr Ser His Pro Ile Glu  
1 5 10

55

<210> 548  
<211> 13  
<212> PRT  
<213> Artificial

<220>  
 <223> Péptido VEGF-A

5 <400> 548

Val Tyr Gln Arg Ser Tyr Ser His Pro Ile Glu Thr Leu  
 1 5 10

<210> 549  
 <211> 13  
 <212> PRT  
 <213> Artificial

10

<220>  
 <223> Péptido VEGF-A

15 <400> 549

Asp Ile Phe Gln Glu Tyr Pro Asp Glu Ile Glu Tyr Ile  
 1 5 10

20

<210> 550  
 <211> 13  
 <212> PRT  
 <213> Artificial

25

<220>  
 <223> Péptido VEGF-A

30 <400> 550

Phe Gln Glu Tyr Pro Asp Glu Ile Glu Tyr Ile Phe Lys  
 1 5 10

35

<210> 551  
 <211> 13  
 <212> PRT  
 <213> Artificial

40

<220>  
 <223> Péptido VEGF-A

40 <400> 551

Glu Tyr Pro Asp Glu Ile Glu Tyr Ile Phe Lys Pro Ser  
 1 5 10

45

<210> 552  
 <211> 13  
 <212> PRT  
 <213> Artificial

50

<220>  
 <223> Péptido VEGF-A

50 <400> 552

Glu Tyr Ile Phe Lys Pro Ser Ser Val Pro Leu Met Arg  
 1 5 10

55

<210> 553  
 <211> 13  
 <212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Péptido VEGF-A

5

<400> 553

**Ile Phe Lys Pro Ser Ser Val Pro Leu Met Arg Ser Gly**  
**1 5 10**

10

<210> 554  
 <211> 13  
 <212> PRT  
 <213> Artificial

15

<220>

<223> Péptido VEGF-A

<400> 554

**Leu Glu Ser Val Pro Thr Glu Glu Ser Asn Ile Thr Met**  
**1 5 10**

20

<210> 555  
 <211> 13  
 <212> PRT  
 <213> Artificial

25

<220>

<223> Péptido VEGF-A

30

<400> 555

**Pro Thr Glu Glu Ser Asn Ile Thr Met Gln Ile Met Arg**  
**1 5 10**

35

<210> 556  
 <211> 13  
 <212> PRT  
 <213> Artificial

40

<220>

<223> Péptido VEGF-A

<400> 556

**Glu Glu Ser Asn Ile Thr Met Gln Ile Met Arg Ile Lys**  
**1 5 10**

45

<210> 557  
 <211> 13  
 <212> PRT  
 <213> Artificial

50

<220>

<223> Péptido VEGF-A

<400> 557

55

**Ser Asn Ile Thr Met Gln Ile Met Arg Ile Lys Pro His**  
**1 5 10**

<210> 558

<211> 13  
 <212> PRT  
 <213> Artificial

5

<220>  
 <223> Péptido VEGF-A  
 <400> 558

10

Ile Thr Met Gln Ile Met Arg Ile Lys Pro His Gln Gly  
 1 5 10

<210> 559  
 <211> 13  
 <212> PRT  
 <213> Artificial

15

<220>  
 <223> Péptido VEGF-A

20

<400> 559

Ile Met Arg Ile Lys Pro His Gln Gly Gln His Ile Gly  
 1 5 10

<210> 560  
 <211> 13  
 <212> PRT  
 <213> Artificial

25

<220>  
 <223> Péptido VEGF-A

30

<400> 560

Pro Ser Gly Pro Ser Ser Glu Arg Arg Lys His Leu Phe  
 1 5 10

35

<210> 561  
 <211> 13  
 <212> PRT  
 <213> Artificial

40

<220>  
 <223> Péptido VEGF-A

45

<400> 561

Gly Pro Ser Ser Glu Arg Arg Lys His Leu Phe Val Gln  
 1 5 10

<210> 562  
 <211> 13  
 <212> PRT  
 <213> Artificial

50

<220>  
 <223> Péptido VEGF-A

55

<400> 562

Ala Arg Gln Leu Glu Leu Asn Glu Arg Thr Ser Arg Ser  
 1 5 10

<210> 563  
 <211> 13  
 <212> PRT  
 <213> Artificial  
 5  
 <220>  
 <223> Péptido VEGF-A  
 <400> 563  
 10  
 Gln Leu Glu Leu Asn Glu Arg Thr Ser Arg Ser Asp Lys  
 1 5 10  
 <210> 564  
 <211> 13  
 <212> PRT  
 <213> Artificial  
 15  
 <220>  
 <223> Péptido VEGF-A  
 20  
 <400> 564  
 Glu Leu Asn Glu Arg Thr Ser Arg Ser Asp Lys Pro Arg  
 1 5 10  
 25  
 <210> 565  
 <211> 13  
 <212> PRT  
 <213> Artificial  
 30  
 <220>  
 <223> Péptido VEGF-A  
 <900> 565  
 Leu Asn Glu Arg Thr Ser Arg Ser Asp Lys Pro Arg Arg  
 1 5 10  
 35  
 <210> 566  
 <211> 20  
 <212> PRT  
 <213> Artificial  
 40  
 <220>  
 <223> Péptido PDGFRbeta  
 45  
 <400> 566  
 Arg Ser Tyr Ile Ser Lys Thr Thr Ile Gly Asp Arg Glu Val Asp Ser  
 1 5 10 15  
 Asp Ala Tyr Tyr  
 20  
 50  
 <210> 567  
 <211> 20  
 <212> PRT  
 <213> Artificial  
 55  
 <220>  
 <223> Péptido PDGFRbeta  
 <400> 567

Lys Thr Thr Ile Gly Asp Arg Glu Val Asp Ser Asp Ala Tyr Tyr Val  
1 5 10 15

Tyr Arg Leu Gln  
20

5 <210> 568  
<211> 20  
<212> PRT  
<213> Artificial

10 <220>  
<223> Péptido PDGFRbeta  
<400> 568

Asp Arg Glu Val Asp Ser Asp Ala Tyr Tyr Val Tyr Arg Leu Gln Val  
1 5 10 15

Ser Ser Ile Asn  
20

15 <210> 569  
<211> 20  
<212> PRT  
<213> Artificial

20 <220>  
<223> Péptido PDGFRbeta  
<400> 569

Arg Lys Glu Ser Gly Arg Leu Val Glu Pro Val Thr Asp Phe Leu Leu  
1 5 10 15

Asp Met Pro Tyr  
20

25 <210> 570  
<211> 20  
<212> PRT  
<213> Artificial

30 <220>  
<223> Péptido PDGFRbeta  
35 <400> 570

His Arg Ser Arg Thr Leu Gln Val Val Phe Glu Ala Tyr Pro Pro Pro  
1 5 10 15

Thr Val Leu Trp  
20

40 <210> 571  
<211> 20  
<212> PRT  
<213> Artificial

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Péptido PDGFRbeta

&lt;400&gt; 571

5

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

Pro Pro Gly Pro  
 20

&lt;210&gt; 572

&lt;211&gt; 20

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial

10

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Péptido PDGFRbeta

15

&lt;400&gt; 572

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

Leu Val Leu Asn  
 20

20

&lt;210&gt; 573

&lt;211&gt; 20

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial

25

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Péptido PDGFRbeta

&lt;400&gt; 573

Gln Gly Leu Val Val Thr Pro Pro Gly Pro Glu Leu Val Leu Asn Val  
 1 5 10 15

Ser Ser Thr Phe  
 20

30

&lt;210&gt; 574

&lt;211&gt; 20

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial

35

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Péptido PDGFRbeta

40

&lt;400&gt; 574

Val Leu Thr Ser Ser Gly Ser Ala Pro Val Val Trp Glu Arg Met Ser  
 1 5 10 15

Gln Glu Pro Pro  
 20



5  
 <210> 575  
 <211> 20  
 <212> PRT  
 <213> Artificial  
 <220>  
 <223> Péptido PDGFRbeta  
 <400> 575

10  
 Gly Ser Ala Pro Val Val Trp Glu Arg Met Ser Gln Glu Pro Pro Gln  
 1 5 10 15  
 Glu Met Ala Lys  
 20

15  
 <210> 576  
 <211> 20  
 <212> PRT  
 <213> Artificial  
 <220>  
 <223> Péptido PDGFRbeta  
 <400> 576

20  
 Asp Glu Arg Lys Arg Leu Tyr Ile Phe Val Pro Asp Pro Thr Val Gly  
 1 5 10 15  
 Phe Leu Pro Asn  
 20

25  
 <210> 577  
 <211> 20  
 <212> PRT  
 <213> Artificial  
 <220>  
 <223> Péptido PDGFRbeta  
 <400> 577

30  
 Leu Tyr Ile Phe Val Pro Asp Pro Thr Val Gly Phe Leu Pro Asn Asp  
 1 5 10 15  
 Ala Glu Glu Leu  
 20

35  
 <210> 578  
 <211> 20  
 <212> PRT  
 <213> Artificial  
 <220>  
 <223> Péptido PDGFRbeta  
 <400> 578

40  
 <210> 578  
 <211> 20  
 <212> PRT  
 <213> Artificial  
 <220>  
 <223> Péptido PDGFRbeta  
 <400> 578

45  
 <210> 578  
 <211> 20  
 <212> PRT  
 <213> Artificial  
 <220>  
 <223> Péptido PDGFRbeta  
 <400> 578

Val Pro Tyr Asp His Gln Arg Gly Phe Ser Gly Ile Phe Glu Asp Arg  
1 5 10 15

Ser Tyr Ile Ser  
20

<210> 579  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> Artificial

<220>  
<223> Péptido VEGF-A

<400> 579

Lys Phe Met Asp Val Tyr Gln Arg Ser  
1 5

<210> 580  
<211> 11  
<212> PRT  
<213> Artificial

<220>  
<223> Péptido VEGF-A

<400> 580

Ile Phe Lys Pro Ser Ser Val Pro Leu Met Arg  
1 5 10

<210> 581  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> Artificial

<220>  
<223> Péptido VEGF-A

<400> 581

Ile Met Arg Ile Lys Pro His Gln Gly  
1 5

<210> 582  
<211> 11  
<212> PRT  
<213> Artificial

<220>  
<223> Péptido VEGF-A

<400> 582

Gly Pro Ser Ser Glu Arg Arg Lys His Leu Phe  
1 5 10

<210> 583  
<211> 10  
<212> PRT  
<213> Artificial

<220>  
<223> péptido PDGFRbeta

<400> 583

5

Asp Arg Glu Val Asp Ser Asp Ala Tyr Tyr  
1 5 10

<210> 584  
<211> 36  
<212> ADN  
<213> Artificial

10

<220>  
<223> Cebador oligonucleotídico zc24945

15

<400> 584  
gagcccaaat cttcagacaa aactcacaca tgccca 36

<210> 585  
<211> 71  
<212> ADN  
<213> Artificial

20

<220>  
<223> Cebador oligonucleotídico zc56626

25

<400> 585

actttgcctt tctctccaca ggtgtccagg gaattcatat aggccggcca ccatgggatg 60

gagctggatc t 71

30

<210> 586  
<211> 75  
<212> ADN  
<213> Artificial

35

<220>  
<223> Cebador oligonucleotídico zc56626

<400> 586

40

accaccacca ccacttccac ccccgccgga gccgccgccg ccagaaccac caccaccgct 60

tgagacggtg accag 75

<210> 587  
<211> 69  
<212> ADN  
<213> Artificial

45

<220>  
<223> Cebador oligonucleotídico zc60139

50

<400> 587

ggctccggcg ggggtggaag tgggtggtggt ggttctggtg gtggtggttc tgaagttcaa 60

ttgttagag 69

55

<210> 588  
<211> 75

# ES 2 456 296 T3

	<212> ADN		
	<213> Artificial		
	<220>		
5	<223> Cebador oligonucleotídico zc60427		
	<400> 588		
	<b>atgggatgga gctggatctt tctctttctt ctgtcaggaa ctgcaggtgt cctctctgaa</b>	<b>60</b>	
	<b>gttcaattgt tagag</b>	<b>75</b>	
10	<210> 589		
	<211> 48		
	<212> ADN		
	<213> Artificial		
15	<220>		
	<223> Cebador oligonucleotídico zc60496		
	<400> 589		
20	tggtgagtt ttgtctgaag atttgggctc ttgattcc acctggt 48		
	<210> 590		
	<211> 69		
	<212> ADN		
25	<213> Artificial		
	<220>		
	<223> Cebador oligonucleotídico zc60500		
30	<400> 590		
	<b>ggctccggcg ggggtggaag tggtggtggt ggttctggtg gtggtggttc taacatccag</b>	<b>60</b>	
	<b>atgacccag</b>	<b>69</b>	
35	<210> 591		
	<211> 75		
	<212> ADN		
	<213> Artificial		
40	<220>		
	<223> Cebador oligonucleotídico zc61436		
	<400> 591		
	<b>accaccacca ccacttccac ccccgccgga gccgcccgcg ccagaaccac caccaccgct</b>	<b>60</b>	
45	<b>tgagacggtg accat</b>	<b>75</b>	
	<210> 592		
	<211> 69		
	<212> ADN		
50	<213> Artificial		
	<220>		
	<223> Cebador oligonucleotídico zc61437		
55	<400> 592		

	<b>ggctccggcg ggggtggaag tgggtggtggt ggttctggtg gtggtggttc tgccatccag</b>	<b>60</b>
	<b>ttgacccag</b>	<b>69</b>
5	<210> 593 <211> 48 <212> ADN <213> Artificial	
10	<220> <223> Cebador oligonucleotídico zc61438	
	<400> 593 ggtggcgggg gttcgggtgg aggaggttct gccatccaga tgacccag	48
15	<210> 594 <211> 75 <212> ADN <213> Artificial	
20	<220> <223> Cebador oligonucleotídico zc61439	
25	<210> 595 <211> 69 <212> ADN <213> Artificial	
	<400> 594	
	<b>accaccacca ccacttccac ccccgccgga gccgcgcgcg ccagaaccac caccacccctt</b>	<b>60</b>
30	<b>gatctccacc ttggt</b>	<b>75</b>
35	<210> 595 <211> 69 <212> ADN <213> Artificial	
	<220> <223> Cebador oligonucleotídico zc61440	
40	<400> 595	
	<b>ggctccggcg ggggtggaag tgggtggtggt ggttctggtg gtggtggttc tcagagcgaa</b>	<b>60</b>
	<b>ttgactcag</b>	<b>69</b>
45	<210> 596 <211> 69 <212> ADN <213> Artificial	
50	<220> <223> (Cebador oligonucleotídico zc61443)	
	<400> 596	
	<b>ggctccggcg ggggtggaag tgggtggtggt ggttctggtg gtggtggttc tgccatccag</b>	<b>60</b>
	<b>atgacccag</b>	<b>69</b>
55	<210> 597 <211> 48	

	<212> ADN	
	<213> Artificial	
	<220>	
5	<223> Cebador oligonucleotídico zc61444	
	<400> 597	
	tgtgtgagtt ttgtctgaag atttgggctc ttaatctcc agtcgtgt	48
10	<210> 598	
	<211> 52	
	<212> ADN	
	<213> Artificial	
15	<220>	
	<223> Cebador oligonucleotídico zc61445	
	<400> 598	
20	cccagagctg tttaaggcg cgcctctaga ttagcttga gacggtgacc gt	52
	<210> 599	
	<211> 52	
	<212> ADN	
	<213> Artificial	
25	<220>	
	<223> Cebador oligonucleotídico zc61447	
	<400> 599	
30	cccagagctg tttaaggcg cgcctctaga ttataggac ggtcagcttg gt	52
	<210> 600	
	<211> 52	
	<212> ADN	
35	<213> Artificial	
	<220>	
	<223> Cebador oligonucleotídico zc61448	
40	<400> 600	
	cccagagctg tttaaggcg cgcctctaga ttatttgat ctccagcttg gt52	
	<210> 601	
	<211> 45	
45	<212> ADN	
	<213> Artificial	
	<220>	
	<223> Cebador oligonucleotídico zc62580	
50	<400> 601	
	ccatcggtct tccgctagc accctctcc aagagcacct ctggg	45
	<210> 602	
55	<211> 51	
	<212> ADN	
	<213> Artificial	
	<220>	
60	<223> Cebador oligonucleotídico zc62593	
	<400> 602	
	agtcgaggct gatcagcgag cttctagatt ttataggacg gtcagcttg t	51
65	<210> 603	
	<211> 780	

<212> ADN  
<213> Artificial

<220>  
<223> ADNc c941.1 scFv

<400> 603

```

gaagttcaat tgtagagtc tggtagcgt cttgttcagc ctggtggttc ttacgtctt      60
tcttgcgctg cttccggatt cactttctct aagtacaaga tgcagtgggt tcgccaaagct    120
cctggtaaag gtttgagtg ggtttctctt atctctcctt ctggtggcct tactttttat    180
gctgactccg ttaaaggtcg cttcactatc tctagagaca actctaagaa tactctctac    240
ttgcagatga acagcttaag ggctgaggac acggccgtgt attactgtgc gaaagcccgt    300
cggatgagaa gcctatggga ggcttttgat atctggggcc aagggaacaat ggtcaccgtc    360
tcaagcgggtg gtggtggttc tggcggcggc ggtccggcg ggggtggaag tgggtggtgt    420
ggttctggtg gtggtggttc tgccatccag ttgaccoagt ctccagactc cctggctgtg    480
tctctgggcg agagggccac catcaactgc aagtccagcc agagtgtttt atacagctcc    540
aacaataaga actacttagc ttggtaccag cagaaaccag gacagcctcc taagctgtct    600
atttaccggg catctaccg ggaatccggg gtccctgacc gattcagtgg cagcgggtct    660
gggacagatt tcaactctac catcagcagc ctgcaggctg aagatgtggc agtttattac    720
tgtcagcaat attatagtac cccgtggacg ttccggccaag ggaccaaggt ggaaatcaaa    780

```

<210> 604  
<211> 260  
<212> PRT  
<213> Artificial

<220>  
<223> c941.1 scFv

<400> 604

```

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

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

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

Ser Ser Ile Ser Pro Ser Gly Gly Leu Thr Phe Tyr Ala Asp Ser Val

```

50		55		60
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr				
65		70		75
				80
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys				
		85		90
				95
Ala Lys Ala Arg Arg Met Arg Ser Leu Trp Glu Ala Phe Asp Ile Trp				
		100		105
				110
Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly				
		115		120
				125
Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly				
		130		135
				140
Gly Gly Ser Ala Ile Gln Leu Thr Gln Ser Pro Asp Ser Leu Ala Val				
		145		150
				155
Ser Leu Gly Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Lys Ser Ser Gln Ser Val				
		165		170
				175
Leu Tyr Ser Ser Asn Asn Lys Asn Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys				
		180		185
				190
Pro Gly Gln Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Arg Ala Ser Thr Arg Glu				
		195		200
				205
Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe				
		210		215
				220
Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Ala Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr				
		225		230
				235
Cys Gln Gln Tyr Tyr Ser Thr Pro Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys				
		245		250
				255
Val Glu Ile Lys				
		260		

<210> 605  
 <211> 780  
 <212> ADN  
 <213> Artificial

<220>  
 <223> ADNc scFv c1035.1



<400> 605

gaagttcaat	tgtagagtc	tggtggcggc	ctgttcagc	ctgggtggtc	tttacgtctt	60
tcttgcgctg	cttcgggatt	cactttctct	atgtacttta	tgtcttgggt	tcgccaagct	120
cctggtaaag	gtttggagtg	ggtttctggt	atctctcctt	ctgggtggcat	gactttttat	180
gctgactcog	ttaaaggctg	cttcactatc	tctagagaca	actctaagaa	tactctctac	240
ttgcagatga	acagcttaag	ggctgaggac	acggccgtgt	attactgtgc	aaaagatggc	300
atccccctat	ctatagctgc	gccgattgac	tactggggcc	aggggaccct	ggtcaccgtc	360
tcaagcggtg	gtgggtggtc	tggcggcggc	ggctccggcg	ggggtggaag	tggtggtggt	420
ggttctggtg	gtgggtggtc	tgccatccag	atgaccagct	ctccagactc	cctggctgtg	480
tctctgggcg	agagggccac	catcaactgc	aagtccagcc	agagtgtttt	atacagctcc	540
aacaataaga	actacttagc	ttggtaccag	cagaaaccag	gacagcctcc	taagctgtct	600
atttactggg	catctaccog	ggaatccggg	gtccctgacc	gattcagtg	cagcgggtct	660
gggacagatt	tcactctcac	catcagcagc	ctgcaggctg	aagatgtggc	agtttattac	720
tgtcagcaat	attatagtag	tcccatcacc	ttcggccaag	ggacacgact	ggagattaaa	780

5 <210> 606  
 <211> 260  
 <212> PRT  
 <213> Artificial

10 <220>  
 <223> scFv c1035.1  
 <400> 606

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

115	120	125
Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly		
130	135	140
Gly Gly Ser Ala Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Asp Ser Leu Ala Val		
145	150	155
Ser Leu Gly Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Lys Ser Ser Gln Ser Val		
165	170	175
Leu Tyr Ser Ser Asn Asn Lys Asn Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys		
180	185	190
Pro Gly Gln Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Glu		
195	200	205
Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe		
210	215	220
Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Ala Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr		
225	230	235
Cys Gln Gln Tyr Tyr Ser Thr Pro Ile Thr Phe Gly Gln Gly Thr Arg		
245	250	255
Leu Glu Ile Lys		
260		

<210> 607  
 <211> 750  
 <212> ADN  
 <213> Artificial

<220>  
 <223> ADNc scFv c868.1

<400> 607

```

gccatccaga tgacccagtc tccatcctcc ctgtctgcat ctgtaggaga cagagtcacc      60
atcacttgcc gggcaagtca gagcattagc agctatttaa attggtatca gcagaaacca      120
gggaaagccc ctaaactcct gatccatgct gcacccaatt tgcagagtgg ggteccatca      180
aggttcagtg gcagtgatc tgggacagat ttcactctca ccatcagcag tctgcaacct      240
gaagattttg caacttacta ctgtcaacag agttacagta cccctctcac tttcggcgga      300
gggaccaagg tggagatcaa ggggtgggtgt ggttctggcg gcggcggtc cggcggggt      360
ggaagtggtg gtggtggttc tgggtgggtgt ggttctgaag ttcaattggt agagtctggt      420
ggcgggtcttg ttcagcctgg tgggtcttta cgtcttctt gcgctgcttc cggattcact      480
ttctctcatt acgagatggg ttgggttcgc caagctcctg gtaaagggtt ggagtgggt      540

tcttatatct cttcttctgg tggctggact gcttatgctg actccgtaa aggtcgcttc      600
actatctcta gagacaactc taagaatact ctctacttgc agatgaacag ctttaagggt      660
gaggacacgg ccgtgtatta ctgtgcaagg attggctacg cagatgcttt tgatatctgg      720
ggccaaggga ccacggtcac cgtctcaagc      750

```

<210> 608  
 <211> 250  
 <212> PRT  
 <213> Artificial

<220>  
 <223> scFv c868.1

<400> 608

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

	180		185		190
Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys					
195		200		205	
Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala					
210		215		220	
Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Ile Gly Tyr Ala Asp Ala Phe Asp Ile Trp					
225		230		235	240
Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser					
	245		250		

<210> 609  
 <211> 744  
 <212> ADN  
 <213> Artificial

<220>  
 <223> ADNc scFv c870.1

<400> 609

gaagttcaat tgtagagtc tggtagcgt cttgttcagc ctggtggttc tttacgtctt	60
tcttgcgctg cttccggatt cactttctct ggtagacatta tgtggtgggt tcgccaagct	120
cctggtaaag gtttgagtg ggtttctgtt atctctcctt ctggtggcga tacttggtat	180
gctgactccg ttaaaggctg cttcactatc tctagagaca actctaagaa tactctctac	240
ttacagatga acagcttaag ggctgaggac acggccgtgt attactgtgc cacagcggga	300
gactactggg gccagggcac cctggtcacc gtctcaagcg gtggtggtgg ttctggcggc	360
ggcggctccg gcgggggtgg aagtgggtgt ggtggttctg gtggtggtgg ttctcagagc	420
gaattgactc agccaccctc agcgtctggg acccccgggc agagggtcac catctcttgt	480
tctggaagca gctccaacat cggaaggaat cctgtaaact ggtaccagca cctcccagga	540
acggccccca aactcctcat ctatggtgat aatcagcggc cctcaggggt ccctgaccga	600
ttctctgggt ccaggtctgg cacctcagcc tccctggcca tcagtgggct ccagtctgag	660
gatgaggctg attattactg tgcagcatgg gatgacagcc tgaatggtgt ggtattcggc	720
ggagggacca agctgaccgt ccta	744

<210> 610  
 <211> 248  
 <212> PRT  
 <213> Artificial

<220>  
 <223> scFv c870.1

<400> 610

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

<210> 611  
 <211> 759  
 <212> ADN  
 <213> Artificial

5

<220>  
 <223> ADNc scFv c1039.1

<400> 611

10

<b>gaagttcaat tgtagagtc tggtagcggc cttgttcagc ctggtgggtc tttacgtctt</b>	<b>60</b>
<b>tcttgcgctg cttccggatt cactttctct tggtacgata tggtttgggt tcgccaaact</b>	<b>120</b>
<b>cctggtaaag gtttgagtg ggtttctgtt atctctcctt ctggtggctg gacttcttat</b>	<b>180</b>
<b>gctgactccg ttaaaggctg cttcactatc tctagagaca actctaagaa tactctctac</b>	<b>240</b>
<b>ttgcagatga acagcttaag ggctgaggac acggccgtgt attactgtgc gagagatcat</b>	<b>300</b>
<b>agtggctacg attctgaata ctttgactac tggggccagg gcaccctggt caccgtctca</b>	<b>360</b>
<b>agcggtggtg gtggttcttg cggcggcggc tccggcgggg gtggaagtgg tggtggtggt</b>	<b>420</b>
<b>tctggtggtg gtggttctaa catccagatg acccagtctc catcctccct gtctgcatct</b>	<b>480</b>
<b>gtaggagaca gagtcacat cacttgccgg gcaagtcaga gcattagcag ctatttaaata</b>	<b>540</b>
<b>tggtatcagc agaaaccagg gaaagccctt aagctcctga tctatgctgc atccagtttg</b>	<b>600</b>
<b>caaagtgggg tcccatcaag gttcagtggc agtggatctg ggacagattt cactctcacc</b>	<b>660</b>
<b>atcagcagtc tgcaacctga agattttgca acttactact gtcaacagag ttacagtacc</b>	<b>720</b>
<b>ccgtacactt ttggccaggg gaccaagctg gagatcaaa</b>	<b>759</b>

<210> 612  
 <211> 253  
 <212> PRT  
 <213> Artificial

15

<220>  
 <223> scFv c1039.1

20

<400> 612



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

<210> 613  
 <211> 717  
 <212> ADN  
 <213> Artificial

5

<220>  
 <223> ADNc VL kappa c600.1

<400> 613

10

```

atgggatgga gctgtatcat cctcttcttg gtagcaacag ctacaggcgt gcactctgac      60
atccagatga cccagtctcc agactccctg gctgtgtctc tgggcgagag ggccaccatc      120
aactgcaagt ccagccagag tgttttatac agctccaaca ataagaacta cttagcttgg      180
taccagcaga aaccaggaca gcctcctaag ctgctcattt actgggcata taccgggaa      240
tccgggggtcc ctgaccgatt cagtggcagc gggctctggga cagatttcac tctcaccatc      300
agcagcctgc aggotgaaga tgtggcagtt tattactgtc agcaatatta tagtactccg      360

tacacttttg gccaggggac caagctggag atcaaacgaa ctgtggctgc accatctgtc      420
ttcatcttcc cgccatctga tgagcagttg aaatctggaa ctgcctctgt tgtgtgcctg      480
ctgaataaact tctatcccag agaggccaaa gtacagtgga aggtggataa cgccctccaa      540
tcgggtaact cccaggagag tgtcacagag caggacagca aggacagcac ctacagcctc      600
agcagcacc c tgacgctgag caaagcagac tacgagaaac acaaagtcta cgctgcgaa      660
gtcaccatc agggcctgag ctgcgccgtc acaaagagct tcaacagggg agagtgt      717

```

<210> 614  
 <211> 239  
 <212> PRT  
 <213> Artificial

15

<220>  
 <223> VL kappa c600.1

20

<400> 614

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

Val His Ser Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Asp Ser Leu Ala Val  
20 25 30

Ser Leu Gly Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Lys Ser Ser Gln Ser Val  
35 40 45

Leu Tyr Ser Ser Asn Asn Lys Asn Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys  
50 55 60

Pro Gly Gln Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Glu  
65 70 75 80

Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe  
85 90 95

Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Ala Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr  
100 105 110

Cys Gln Gln Tyr Tyr Ser Thr Pro Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys  
115 120 125

Leu Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro  
130 135 140

Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu  
145 150 155 160

Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp  
165 170 175

Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp  
180 185 190

Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys  
195 200 205

Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln  
210 215 220

Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys  
225 230 235

<210> 615  
<211> 1410  
<212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> ADNc de IgG1 completa c600.1

5

<400> 615

```

atgggatgga gctgtatcat cctcttcttg gtagcaacag ctacaggcgc gcactccgaa      60
gttcaattgt tagagtctgg tggcgggtctt gttcagcctg gtggttcttt acgtctttct      120
tgcgctgctt ccggattcac tttctctcag tacatgatgc tttgggttcg ccaagctcct      180
ggtaaagggt tggagtgggt ttctgggtatc tctccttctg gtggcattac tacttatgct      240
gactccgtta aaggtcgctt cactatctct agagacaact ctaagaatac tctctacttg      300
cagatgaaca gcttaagggc tgaggacacg gccgtgtatt actgtgcgag agcttatagc      360
agtggctggg ccttaccctt tgactactgg ggccaggga ccttgggtcac cgtctcaagc      420
gcctccacca agggcccatc ggtcttcccg ctagcaccct cctccaagag cacctctggg      480
ggcacagcgg ccctgggctg cctgggtcaag gactacttcc ccgaaccggt gacgggtgtg      540
tggaactcag gcgccctgac cagcggcgctc cacaccttcc cggctgtcct acagtcctcc      600
ggactctact ccctcagcag cgtagtgacc gtgccctcca gcagcttggg caccagagcc      660
tacatctgca acgtgaatca caagcccagc aacaccaagg tggacaagaa agttgagccc      720
aaatcttgtg acaaaaactca cacatgcccc ccgtgcccag cacctgaact cctgggggga      780
ccgtcagttc tcctcttccc cccaaaaccc aaggacaccc tcatgatctc ccggaccctc      840
gaggtcacat gcgtgggtgg ggacgtgagc cacgaagacc ctgaggtcaa gttcaactgg      900
tacgtggacg gcgtggaggt gcataatgcc aagacaaagc cgcgggagga gcagtacaac      960
agcacgtacc gtgtggtcag cgtcctcacc gtcctgcacc aggactggct gaatggcaag     1020
gagtacaagt gcaaggcttc caacaaagcc ctcccagccc ccacgcagaa aaccatctcc     1080
aaagccaaag ggcagccccg agaaccacag gtgtacaccc tgcccccatc ccgggatgag     1140

ctgaccaaga accaggtcag cctgacctgc ctggtcaaag gcttctatcc cagcgacatc     1200
gccgtggagt gggagagcaa tgggcagccg gagaacaact acaagaccac gcctcccggt     1260
ctggactccg acggctcctt cttcctctac agcaagctca ccgtggacaa gagcaggtgg     1320
cagcagggga acgtcttctc atgctccgtg atgcatgagg ctctgcacaa ccactacacg     1380
cagaagagcc tctccctgtc tccgggtaaa                                1410

```

10

<210> 616

<211> 470

<212> PRT

<213> Artificial

15

<220>

<223> IgG1 completa c600.1

<400> 616

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

Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr  
 180 185 190  
 Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val  
 195 200 205  
 Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn  
 210 215 220  
 Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro  
 225 230 235 240  
 Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu  
 245 250 255  
 Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp  
 260 265 270  
 Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp  
 275 280 285  
 Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly  
 290 295 300  
 Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn  
 305 310 315 320  
 Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp  
 325 330 335  
 Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro  
 340 345 350  
 Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu  
 355 360 365  
 Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn  
 370 375 380  
 Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile  
 385 390 395 400  
 Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr  
 405 410 415  
 Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys  
 420 425 430  
 Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys

# ES 2 456 296 T3

435

440

445

Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu  
450 455 460

Ser Leu Ser Pro Gly Lys  
465 470

<210> 617  
<211> 2310  
<212> ADN  
<213> Artificial

<220>  
<223> ADNc de Fc5 enlazador de 10 monómeros en bisc 6941.1-c868.1

<400> 617

atgggatgga gctggatott tctctttctt ctgtcaggaa ctgcaggtgt cctctctgaa	60
gttcaattgt tagagtctgg tggcggctct gttcagcctg gtggttcttt acgtctttct	120
tgcgctgctt ccggattcac tttctctaag tacaagatgc agtgggttcg ccaagctcct	180
ggtaaagggt tggagtgggt ttcttctatc tctccttctg gtggccttac tttttatgct	240
gactccgtta aaggtcgctt cactatctct agagacaact ctaagaatac tctctacttg	300
cagatgaaca gcttaagggc tgaggacacg gccgtgtatt actgtgcgaa agcccgtcgg	360
atgagaagcc tatgggaggc ttttgatata tggggccaag ggacaatggc caccgtctca	420
agcggtggtg gtggttctgg cggcggcggc tccggcgggg gtggaagtgg tggtggtggt	480
tctggtggtg gtggttctgc catccagttg acccagttct cagactccct ggctgtgtct	540
ctgggcgaga gggccaccat caactgcaag tccagccaga gtgttttata cagctccaac	600
aataagaact acttagcttg gtaccagcag aaaccaggac agcctcctaa gctgctcatt	660
taccgggcat ctaccggga atccggggtc cctgaccgat tcagtggcag cgggtctggg	720
acagatttca ctctcaccat cagcagcctg caggctgaag atgtggcagt ttattactgt	780
cagcaatatt atagtacccc gtggacgttc ggccaagggg ccaaggtgga aatcaaagag	840
ccaaaatctt cagacaaaac tcacacatgc ccaccgtgcc cagcacctga agccgagggg	900
gcaccgtcag tcttctctct cccccaaaa cccaaggaca cctcatgat ctcccgacc	960
cctgaggtca catgcgtggt ggtggacgtg agccacgaag accctgaggt caagttcaac	1020
tggtacgtgg acggcgtgga ggtgcataat gccaaagaaa agccgcggga ggagcagtac	1080
aacagcacgt accgtgtggt cagcgtcctc accgtcctgc accaggactg gctgaatggc	1140
aaggagtaca agtgcaaggt ctccaacaaa gccctcccat cctccatcga gaaaaccatc	1200
tccaaagcca aagggcagcc ccgagaacca cagggtgtaca ccctgcccc atcccggtat	1260
gagctgacca agaaccaggt cagcctgacc tgcctggtca aaggcttcta tccagcgac	1320
atcgcctggt agtgggagag caatgggcag ccggagaaca actacaagac caccctccc	1380



```

gtgctggact ccgacggctc cttcttcctc tacagcaagc tcaccgtgga caagagcagg      1440
tggcagcagg ggaacgtctt ctcatgctcc gtgatgcatg aggctctgca caaccactac      1500
acgcagaaga gcctctccct gtctccgggt ggtggcgggg gttcgggtgg aggaggttct      1560
gccatccaga tgacccagtc tccatcctcc ctgtctgcat ctgtaggaga cagagtcacc      1620
atcacttgcc gggcaagtca gaggcattagc agctatttaa attggtatca gcagaaacca      1680
gggaaagccc ctaaactcct gatccatgct gcatccaatt tgcagagtgg ggtcccatca      1740
aggttcagtg gcagtggatc tgggacagat ttactctca ccatcagcag tctgcaacct      1800
gaagattttg caacttacta ctgtcaacag agttacagta cccctctcac tttcggcgga      1860
gggaccaagg tggagatcaa gggtggtggt ggttctggcg gggcgggctc cggcgggggt      1920
ggaagtgggt gtggtggttc tggtggtggt ggttctgaag ttcaattgtt agagtctggt      1980
ggcggctctt ttcagcctgg tggttcttta cgtctttctt gcgctgcttc cggattcact      2040
ttctctcatt acgagatggg ttgggttcgc caagctcctg gtaaagggtt ggagtgggtt      2100
tcttatatct cttcttctgg tggctggact gcttatgctg actccgttaa aggtcgcttc      2160
actatctcta gagacaactc taagaatact ctctacttgc agatgaacag cttaaagggt      2220
gaggacacgg ccgtgtatta ctgtgcaagg attggctacg cagatgcttt tgatatctgg      2280
ggccaaggga ccacggtcac cgtctcaagc                                     2310

```

<210> 618  
 <211> 770  
 <212> PRT  
 <213> Artificial

<220>  
 <223> Fc5 enlazador de 10 monómeros en bisc c941.1-c868.1

<400> 618

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

Val Leu Ser Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln  
20 25 30

Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe  
35 40 45

Ser Lys Tyr Lys Met Gln Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu  
50 55 60

Glu Trp Val Ser Ser Ile Ser Pro Ser Gly Gly Leu Thr Phe Tyr Ala  
65 70 75 80

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

[illegible]

Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser  
355 360 365

Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys  
370 375 380

Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile  
385 390 395 400

Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro  
405 410 415

Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu  
420 425 430

Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn  
435 440 445

Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser  
450 455 460

Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg  
465 470 475 480

Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu  
485 490 495

His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Gly Gly  
500 505 510

Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Ala Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro  
515 520 525

Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg  
530 535 540

Ala Ser Gln Ser Ile Ser Ser Tyr Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro  
545 550 555 560

Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile His Ala Ala Ser Asn Leu Gln Ser  
565 570 575

Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr  
580 585 590

Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys  
595 600 605

Gln Gln Ser Tyr Ser Thr Pro Leu Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val  
610 615 620

Glu Ile Lys Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly  
625 630 635 640

Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Glu Val Gln Leu  
645 650 655

Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu  
660 665 670

Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser His Tyr Glu Met Gly Trp  
675 680 685

Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ser Tyr Ile Ser  
690 695 700

Ser Ser Gly Gly Trp Thr Ala Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe  
705 710 715 720

Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn  
725 730 735

Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Ile Gly  
740 745 750

Tyr Ala Asp Ala Phe Asp Ile Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val  
755 760 765

Ser Ser  
770

<210> 619  
<211> 2304  
<212> ADN  
<213> Artificial

<220>  
<223> ADNc de Fc5 enlazador de 10 monómeros en bisc c941.1-c870.1

<400> 619

# ES 2 456 296 T3

atgggatgga gctggatcct tctctttctt ctgtcaggaa ctgcaggtgt cctctctgaa	60
gttcaattgt tagagtctgg tggcggctct gticagcctg gtggttcttt acgtctttct	120
tgcgctgctt ccggattcac tttctctaag tacaagatgc agtgggttcg ccaagctcct	180
ggtaaagggt tggagtgggt ttcttctatc totccttctg gtggccttac tttttatgct	240
gactccgtta aaggtegctt cactatctct agagacaact ctaagaatac totctacttg	300
cagatgaaca gcttaagggc tgaggacacg gccgtgtatt actgtgcgaa agcccgtcgg	360

atgagaagcc tatgggaggg ttttgatata tggggccaag ggacaatggt caccgtctca	420
agcgggtggtg gtggttctgg cggcggcggc tccggcgggg gtggaagtgg tgggtggtggt	480
tctggtggtg gtggttctgc catccagttg acccagttct cagactccct ggctgtgtct	540
ctgggcgaga gggccaccat caactgcaag tccagccaga gtgttttata cagctcaaac	600
aataagaact acttagcttg gtaccagcag aaaccaggac agcctcctaa gctgctcatt	660
taccgggcat ctacccggga atccggggtc cctgaccgat tcagtggcag cgggtctggg	720
acagatttca ctctcaccat cagcagcctg caggctgaag atgtggcagt ttattactgt	780
cagcaatatt atagtacccc gtggacgttc ggccaaggga ccaagggtga aatcaaagag	840
cccaaattct cagacaaaac tcacacatgc ccaccgtgc cagcacctga agccgagggg	900
gcaccgtcag tcttctctct cccccaaaa cccaaggaca cctcatgat ctcccgacc	960
cctgaggtca catgcgtggt ggtggacgtg agccacgaag accctgaggt caagttcaac	1020
tggtacgtgg acggcgtgga ggtgcataat gccaagacaa agccgcggga ggagcagtac	1080
aacagcacgt accgtgtggt cagcgtcctc accgtcctgc accaggactg gctgaatggc	1140
aaggagtaca agtgcaagggt ctccaacaaa gccctcccat cctccatcga gaaaaccatc	1200
tccaaagcca aagggcagcc ccgagaacca caggtgtaca cctgcccc atcccggtat	1260
gagctgacca agaaccagggt cagcctgacc tgcttggtca aaggcttcta tccagcgac	1320
atcgccgtgg agtgggagag caatgggcag ccggagaaca actacaagac caogcctccc	1380
gtgctggact ccgacggctc cttcttcctc tacagcaagc tcaccgtgga caagagcagg	1440
tggcagcagg ggaacgtctt ctcatgctcc gtgatgcag aggctctgca caaccactac	1500
acgcagaaga gcctctccct gtctccgggt ggtggcgggg gtccgggtgg aggaggtct	1560
gaagttcaat tgtagagtc tgggtggcgt cttgttcagc ctggtggttc tttacgtctt	1620
tcttgcgctg ctcccgatt cactttctct gggtacatta tgtggtgggt tcgccaaagt	1680
cctggtaaaag gtttgagtg ggtttctgtt atctctcctt ctggtggcga tacttggtat	1740
gctgactccg ttaaaggctc cttcactatc tctagagaca actctaagaa tactctctac	1800
ttacagatga acagcttaag ggctgaggac acggccgtgt attactgtgc cacagcggga	1860
gactactggg gccagggcac cctggtcacc gtctcaagcg gtggtggtgg ttctggcggc	1920
ggcggtccg gcgggggtgg aagtgggtgg ggtggttctg gtggtggtgg ttctcagagc	1980
gaattgactc agccaccctc agcgtctggg acccccgggc agagggtcac catctcttgt	2040
tctggaagca gctccaacat cggaaggaa cctgtaaaact ggtaccagca cctcccagga	2100
acggccccc aactcctcat ctatggtgat aatcagcggc cctcaggggt cctgaccga	2160
ttctctgggt ccaggtctgg cacctcagcc tccctggcca tcagtgggt ccagctctgag	2220
gatgaggctg attattactg tgcagcatgg gatgacagcc tgaatggtgt ggtattcggc	2280

ggagggacca agctgaccgt ccta

2304

&lt;210&gt; 620

&lt;211&gt; 768

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Fc5 enlazador de 10 monómeros en bisc c941.1-c870.1

&lt;400&gt; 620

```

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

Val Leu Ser Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln
          20           25           30

Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe
          35           40           45

Ser Lys Tyr Lys Met Gln Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu
 50           55           60

Glu Trp Val Ser Ser Ile Ser Pro Ser Gly Gly Leu Thr Phe Tyr Ala
 65           70           75           80

Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn
          85           90           95

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

Tyr Tyr Cys Ala Lys Ala Arg Arg Met Arg Ser Leu Trp Glu Ala Phe
          115          120          125

Asp Ile Trp Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly
          130          135          140

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

Ser Gly Gly Gly Gly Ser Ala Ile Gln Leu Thr Gln Ser Pro Asp Ser
          165          170          175

Leu Ala Val Ser Leu Gly Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Lys Ser Ser
          180          185          190

Gln Ser Val Leu Tyr Ser Ser Asn Asn Lys Asn Tyr Leu Ala Trp Tyr
          195          200          205

```



Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Arg Ala Ser  
210 215 220

Thr Arg Glu Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly  
225 230 235 240

Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Ala Glu Asp Val Ala  
245 250 255

Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Tyr Ser Thr Pro Trp Thr Phe Gly Gln  
260 265 270

Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Glu Pro Lys Ser Ser Asp Lys Thr His  
275 280 285

Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Glu Gly Ala Pro Ser Val  
290 295 300

Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr  
305 310 315 320

Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu  
325 330 335

Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys  
340 345 350

Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser  
355 360 365

Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys  
370 375 380

Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile  
385 390 395 400

Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro  
405 410 415

Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu  
420 425 430

Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn  
435 440 445

Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser  
450 455 460

Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg

465                      470                      475                      480  
 Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu  
                                  485                      490                      495  
 His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Gly Gly  
                                  500                      505                      510  
 Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly  
                                  515                      520                      525  
 Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala  
                                  530                      535                      540  
 Ser Gly Phe Thr Phe Ser Gly Tyr Ile Met Trp Trp Val Arg Gln Ala  
                                  545                      550                      555                      560  
 Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ser Val Ile Ser Pro Ser Gly Gly  
                                  565                      570                      575  
 Asp Thr Trp Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg  
                                  580                      585                      590  
 Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala  
                                  595                      600                      605  
 Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Thr Ala Gly Asp Tyr Trp Gly  
                                  610                      615                      620  
 Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly  
                                  625                      630                      635                      640  
 Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly  
                                  645                      650                      655  
 Gly Ser Gln Ser Glu Leu Thr Gln Pro Pro Ser Ala Ser Gly Thr Pro  
                                  660                      665                      670  
 Gly Gln Arg Val Thr Ile Ser Cys Ser Gly Ser Ser Ser Asn Ile Gly  
                                  675                      680                      685  
 Arg Asn Pro Val Asn Trp Tyr Gln His Leu Pro Gly Thr Ala Pro Lys  
                                  690                      695                      700  
 Leu Leu Ile Tyr Gly Asp Asn Gln Arg Pro Ser Gly Val Pro Asp Arg  
                                  705                      710                      715                      720  
 Phe Ser Gly Ser Arg Ser Gly Thr Ser Ala Ser Leu Ala Ile Ser Gly  
                                  725                      730                      735

Leu Gln Ser Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ala Ala Trp Asp Asp  
740 745 750

Ser Leu Asn Gly Val Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu  
755 760 765

<210> 621  
<211> 2319  
<212> ADN  
<213> Artificial

<220>  
<223> ADNc de Fc5 enlazador de 10 monómeros en bisc c941.1-c1039.1

<400> 621

atgggatgga gctggatctt tctctttctt ctgtcaggaa ctgcagggtg cctctctgaa	60
gttcaattgt tagagtctgg tggcgggtctt gttcagcctg gtggttcttt acgtctttct	120
tgcgctgctt ccgattcac tttctctaag tacaagatgc agtgggttcg ccaagctcct	180
ggtaaagggt tggagtgggt ttctttctatc tctccttctg gtggccttac tttttatgct	240
gactccgtta aaggctcgctt cactatctct agagacaact ctaagaatac tctctacttg	300
cagatgaaca gcttaagggc tgaggacacg gccgtgtatt actgtgcgaa agcccgtcgg	360
atgagaagcc tatgggaggc ttttgatata tggggccaag ggacaatggg caccgtctca	420
agcgtgtgtg gtggttctgg cggcggcggc tccggcgggg gtggaagtgg tgggtgtgtg	480
tctggtgtgt gtggttctgc catccagttg acccagtctc cagactccct ggctgtgtct	540
ctgggcgaga gggccaccat caactgcaag tccagccaga gtgttttata cagctccaac	600
aataagaact acttagcttg gtaccagcag aaaccaggac agcctoctaa gctgctcatt	660
taccgggcat ctaccggga atccggggtc cctgaccgat tcagtggcag cgggtctggg	720
acagatttca ctctcaccat cagcagcctg caggctgaag atgtggcagt ttattactgt	780
cagcaatatt atagtacccc gtggacgttc ggccaaggga ccaaggtgga aatcaaagag	840
cccaaattct cagacaaaac tcacacatgc ccaccgtgcc cagcacctga agccgagggg	900
gcaccgtcag tcttctctct cccccaaaa cccaaggaca ccctcatgat ctccggacc	960
cctgaggtca catgctgtgt ggtggacgtg agccacgaag accctgaggt caagttcaac	1020
tggtagctgg acggcgtgga ggtgcataat gccaaagaaa agccgcggga ggagcagtac	1080
aacagcacgt accgtgtgtt cagcgtctct accgtctctg accaggactg gctgaatggc	1140
aaggagtaca agtgcaaggt ctccaacaaa gccctcccat cctccatcga gaaaaccatc	1200
tccaaagcca aagggcagcc ccgagaacca caggtgtaca ccctgcccc atcccgggat	1260
gagctgacca agaaccaggt cagcctgacc tgctgtgtca aaggcttcta tcccagcgac	1320
atcgccgtgg agtgggagag caatgggcag ccggagaaca actacaagac cagcctccc	1380

gtgctggact cgcacggctc cttcttctctc tacagcaagc tcaccgtgga caagagcagg 1440  
 tggcagcagg ggaacgtctt ctcatgctcc gtgatgcatg aggctctgca caaccactac 1500  
 acgcagaaga gcctctccct gtctccgggt ggtggcgggg gttcgggtgg aggaggttct 1560  
 gaagttcaat tgtagagtc tggtagcggt cttgttcagc ctggtggttc tttacgtctt 1620  
 tcttgogctg cttccggatt cactttctct tggtaogata tggtttgggt tcgccaagct 1680  
 cctggtaaag gtttgagtg ggtttctgtt atctctcctt ctggtggctg gacttcttat 1740  
 gctgactccg ttaaaggtcg cttcactatc tctagagaca actctaagaa tactctctac 1800  
 ttgcagatga acagcttaag ggctgaggac acggccgtgt attactgtgc gagagatcat 1860  
 agtggctacg attctgaata ctttgactac tggggccagg gcaccctggt caccgtctca 1920  
 agcgggtggtg gtggttctg cgccggcggc tccggcgggg gtggaagtgg tggtaggtgg 1980  
 tctggtggtg gtggttctaa catccagatg acccagtctc catcctccct gtctgcatct 2040  
 gtaggagaca gagtcccat cacttgccgg gcaagtcaga gcattagcag ctatttaaatt 2100  
 tggtagcagc agaaaccagg gaaagccctt aagctcctga tctatgctgc atccagtttg 2160  
 caaagtgggg tcccatcaag gttcagtggc agtggatctg ggacagattt cactctcacc 2220  
 atcagcagtc tgcaacctga agattttgca acttactact gtcaacagag ttacagtacc 2280  
 ccgtacactt ttggccaggg gaccaagctg gagatcaaa 2319

<210> 622  
 <211> 773  
 <212> PRT  
 <213> Artificial

<220>  
 <223> Fc5 enlazador de 10 monómeros en bisc c941.1-c1039.1

<400> 622

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

Val Leu Ser Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln  
20 25 30

Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe  
35 40 45

Ser Lys Tyr Lys Met Gln Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu  
50 55 60

Glu Trp Val Ser Ser Ile Ser Pro Ser Gly Gly Leu Thr Phe Tyr Ala  
65 70 75 80

Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn  
85 90 95

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

Tyr Tyr Cys Ala Lys Ala Arg Arg Met Arg Ser Leu Trp Glu Ala Phe  
115 120 125

Asp Ile Trp Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly  
130 135 140

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

Ser Gly Gly Gly Gly Ser Ala Ile Gln Leu Thr Gln Ser Pro Asp Ser  
165 170 175

Leu Ala Val Ser Leu Gly Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Lys Ser Ser  
180 185 190

Gln Ser Val Leu Tyr Ser Ser Asn Asn Lys Asn Tyr Leu Ala Trp Tyr  
195 200 205

Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Arg Ala Ser  
210 215 220

Thr Arg Glu Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly  
225 230 235 240

Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Ala Glu Asp Val Ala  
245 250 255

Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Tyr Ser Thr Pro Trp Thr Phe Gly Gln  
260 265 270

Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Glu Pro Lys Ser Ser Asp Lys Thr His  
275 280 285

Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Glu Gly Ala Pro Ser Val  
290 295 300

Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr  
305 310 315 320

Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu  
325 330 335

Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys  
340 345 350

Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser  
 355 360 365  
 Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys  
 370 375 380  
 Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile  
 385 390 395 400  
 Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro  
 405 410 415  
 Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu  
 420 425 430  
 Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn  
 435 440 445  
 Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser  
 450 455 460  
 Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg  
 465 470 475 480  
 Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu  
 485 490 495  
 His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Gly Gly  
 500 505 510  
 Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly  
 515 520 525  
 Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala  
 530 535 540  
 Ser Gly Phe Thr Phe Ser Trp Tyr Asp Met Val Trp Val Arg Gln Ala  
 545 550 555 560  
 Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ser Val Ile Ser Pro Ser Gly Gly  
 565 570 575  
 Trp Thr Ser Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg  
 580 585 590  
 Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala  
 595 600 605

Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Asp His Ser Gly Tyr Asp  
 610 615 620  
 Ser Glu Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser  
 625 630 635 640  
 Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser  
 645 650 655  
 Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asn Ile Gln Met Thr Gln  
 660 665 670  
 Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr  
 675 680 685  
 Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser Ser Tyr Leu Asn Trp Tyr Gln Gln  
 690 695 700  
 Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Ala Ala Ser Ser Leu  
 705 710 715 720  
 Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp  
 725 730 735  
 Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr  
 740 745 750  
 Tyr Cys Gln Gln Ser Tyr Ser Thr Pro Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr  
 755 760 765  
 Lys Leu Glu Ile Lys  
 770

<210> 623  
 <211> 2310  
 <212> ADN  
 <213> Artificial

<220>  
 <223> ADNc de Fc5 enlazador de 10 monómeros en bisc c1035.1-c868.1

<400> 623



atgggatgga gctggatcct tctcttctct ctgtcaggaa ctgcagggtgt cctctctgaa	60
gttcaattgt tagagtctgg tggcgggtctt gttcagcctg gtggttcttt acgtcttctt	120
tgcgctgctt ccggattcac tttctctatg tactttatgt cttgggttcg ccaagctcct	180
ggtaaagggt tggagtgggt ttctgggtatc tctccttctg gtggcatgac tttttatgct	240
gactccgtta aaggtcgctt cactatctct agagacaact ctaagaatac tctctacttg	300
cagatgaaca gcttaagggc tgaggacacg gccgtgtatt actgtgcaaa agatggcatc	360

ccoctatcta tagctgcgcc gattgactac tggggccagg ggaccctggt caccgtctca	420
agcgggtggtg gtggttcttg cggcggcggc tccggcgggg gtggaagtgg tgggtggtggt	480
tctggtggtg gtggttctgc catccagatg acccagctctc cagactccct ggctgtgtct	540
ctgggcgaga gggccaccat caactgcaag tccagccaga gtgttttata cagctccaac	600
aataagaact acttagcttg gtaccagcag aaaccaggac agcctcctaa gctgctcatt	660
tactgggcat ctaccggga atccggggtc cctgaccgat tcagtggcag cgggtctggg	720
acagatttca ctctcaccat cagcagcctg caggctgaag atgtggcagt ttattactgt	780
cagcaatatt atagtactcc catcaccttc ggccaaggga cagactgga gattaaagag	840
cccaaattctt cagacaaaac tcacacatgc ccaccgtgcc cagcacctga agccgagggg	900
gcaccgtcag tcttctctct cccccaaaa cccaaggaca cctcatgat ctcccgacc	960
cctgaggtca catgcgtggt ggtggacgtg agccacgaag accctgaggt caagttcaac	1020
tggtacgtgg acggcgtgga ggtgcataat gccaaagaca agccgcggga ggagcagtac	1080
aacagcacgt accgtgtggt cagcgtcctc accgtcctgc accaggactg gctgaatggc	1140
aaggagtaca agtgcaagggt ctccaacaaa gccctcccat cctccatcga gaaaaccatc	1200
tccaaagcca aagggcagcc ccgagaacca cagggtgtaca ccttgcccc atcccggtat	1260
gagctgacca agaaccagggt cagcctgacc tgctgtgtca aaggcttcta tcccagcgac	1320
atcgccgtgg agtgggagag caatgggcag ccggagaaca actacaagac cagcctccc	1380
gtgctggact ccgacggctc cttcttctc tacagcaagc tcaccgtgga caagagcagg	1440
tggcagcagg ggaacgtctt ctcatgtctc gtgatgcatg aggtctctga caaccactac	1500
acgcagaaga gcctctccct gtctccgggt ggtggcgggg gttcgggtgg aggaggttct	1560
gccatccaga tgaccagtc tccatcctcc ctgtctgcat ctgtaggaga cagagtcacc	1620
atcacttgcc gggcaagtca gagcattagc agctatttaa attggtatca gcagaaacca	1680
gggaaagccc ctaaactcct gatccatgct gcacccaatt tgcagagtgg ggtcccatca	1740
aggttcagtg gcagtggatc tgggacagat ttcactctca ccacagcag tctgcaacct	1800
gaagattttg caacttacta ctgtcaacag agttacagta cccctctcac tttcggcgga	1860
gggaccaagg tggagatcaa ggggtggtgt ggttctggcg gggcgggctc cggcggggt	1920
ggaagtgggt gtggtggttc tgggtggtgt ggttctgaag ttcaattgtt agagtctggt	1980
ggcgggtcttg ttcagcctgg tggttcttta cgtctttctt gcgctgcttc cggattcact	2040
ttctctcatt acgagatggg ttgggtctgc caagctcctg gtaaagggtt ggagtgggtt	2100
tcttatatct cttcttctgg tggctggact gcttatgctg actccgttaa aggtcgcttc	2160
actatctcta gagacaactc taagaatact ctctacttgc agatgaacag ctttaagggt	2220
gaggacacgg ccgtgtatta ctgtgcaagg attggctacg cagatgcttt tgatatctgg	2280
ggccaaggga ccacggtcac cgtctcaagc	2310

5	<210> 624
	<211> 770
	<212> PRT
	<213> Artificial
10	<220>
	<223> Fc5 enlazador de 10 monómeros en bisc c1035.1-c868.1
	<400> 624

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

210	215	220
Thr Arg Glu Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly		
225	230	235 240
Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Ala Glu Asp Val Ala		
	245 250	255
Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Tyr Ser Thr Pro Ile Thr Phe Gly Gln		
	260 265	270
Gly Thr Arg Leu Glu Ile Lys Glu Pro Lys Ser Ser Asp Lys Thr His		
	275 280	285
Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Glu Gly Ala Pro Ser Val		
	290 295	300
Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr		
305	310 315	320
Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu		
	325 330	335
Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys		
	340 345	350
Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser		
	355 360	365
Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys		
	370 375	380
Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile		
385	390 395	400
Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro		
	405 410	415
Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu		
	420 425	430
Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn		
	435 440	445
Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser		
	450 455	460
Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg		
465	470 475	480

Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu  
 485 490 495  
 His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Gly Gly  
 500 505 510  
 Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Ala Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro  
 515 520 525  
 Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg  
 530 535 540  
 Ala Ser Gln Ser Ile Ser Ser Tyr Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro  
 545 550 555 560  
 Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile His Ala Ala Ser Asn Leu Gln Ser  
 565 570 575  
 Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr  
 580 585 590  
 Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys  
 595 600 605  
 Gln Gln Ser Tyr Ser Thr Pro Leu Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val  
 610 615 620  
 Glu Ile Lys Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly  
 625 630 635 640  
 Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Glu Val Gln Leu  
 645 650 655  
 Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu  
 660 665 670  
 Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser His Tyr Glu Met Gly Trp  
 675 680 685  
 Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ser Tyr Ile Ser  
 690 695 700  
 Ser Ser Gly Gly Trp Thr Ala Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe  
 705 710 715 720  
 Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn  
 725 730 735

Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Ile Gly  
740 745 750

Tyr Ala Asp Ala Phe Asp Ile Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val  
755 760 765

Ser Ser  
770

<210> 625  
<211> 2304  
<212> ADN  
<213> Artificial

<220>  
<223> ADNc de Fc5 enlazador de 10 monómeros en bisc c1035.1-c870.1

<400> 625

atgggatgga gctggatctt tctctttctt ctgtcaggaa ctgcagggtg cctctctgaa	60
gttcaattgt tagagtctgg tggcgggtctt gttcagcctg gtgggttcttt acgtctttct	120
tgcgctgctt ccggattcac tttctctatg tactttatgt cttgggttcg ccaagctcct	180
ggtaaagggt tggagtgggt ttctgggtatc tctccttctg gtggcatgac tttttatgct	240
gactccgtta aaggctcgctt cactatctct agagacaact ctaagaatac tctctacttg	300
cagatgaaca gcttaagggc tgaggacacg gccgtgtatt actgtgcaaa agatggcatc	360
cccctatcta tagctgcgcc gattgactac tggggccagg ggaccctggt caccgtctca	420
agcgggtggtg gtggttctgg cggcggcgcc tccggcgggg gtggaagtgg tgggtggtggt	480
tctggtggtg gtggttctgc catccagatg acccagtcct cagactccct ggctgtgtct	540
ctgggcgaga gggccaccat caactgcaag tccagccaga gtgttttata cagctccaac	600
aataagaact acttagcttg gtaccagcag aaaccaggac agcctcctaa gctgctcatt	660
tactgggcat ctaccggga atccggggct cctgaccgat tcagtggcag cgggtctggg	720
acagatttca ctctcaccat cagcagcctg caggctgaag atgtggcagt ttattactgt	780
cagcaatatt atagtactcc catcaccttc ggccaaggga cagactgga gattaaagag	840
cccaaattctt cagacaaaac tcacacatgc ccaccgtgcc cagcacctga agccgagggg	900
gcaccgtcag tcttctctct cccccaaaa cccaaggaca cctcatgat ctccggacc	960
cctgagggtca catgctggtt ggtggacgtg agccacgaag accctgaggt caagttcaac	1020
tggtagctgg acggcgtgga ggtgcataat gccaaagaaa agccgcggga ggagcagtac	1080
aacagcacgt accgtgtggt cagcgtcctc accgtcctgc accaggactg gctgaatggc	1140
aaggagtaca agtgcaaggt ctccaacaaa gccctcccat cctccatcga gaaaaccatc	1200
tccaaagcca aagggcagcc ccgagaacca caggtgtaca cctgcccc atccgggat	1260
gagctgacca agaaccagggt cagcctgacc tgctgtgtca aaggcttcta tcccagcgac	1320

atcgccgtgg agtgggagag caatgggcag ccggagaaca actacaagac cacgcctccc 1380  
 gtgctggact ccgacggctc cttcttcctc tacagcaagc tcaccgtgga caagagcagg 1440  
 tggcagcagg ggaacgtctt ctcatgctcc gtgatgcatt aggctctgca caaccactac 1500  
 acgcagaaga gcctctccct gtctccgggt ggtggcgggg gttcgggtgg aggaggttct 1560  
 gaagttcaat tgtagagtc tgggggcgggt cttgttcagc ctggtggttc ttacgtctt 1620  
 tottgcgctg cttccggatt cactttctct ggttacatta tgggtgggt tcgccaagct 1680  
 cctggtaaag gtttgagtg ggtttctgtt atctctcctt ctggtggcga tacttggtat 1740  
 gctgactccg ttaaaggctg cttcactatc tctagagaca actctaagaa tactctctac 1800  
 ttacagatga acagcttaag ggctgaggac acggccgtgt attactgtgc cacagcggga 1860  
 gactactggg gccagggcac cctggtcacc gtctcaagcg gtggtggtgg ttctggcggc 1920  
 ggcggctccg gcgggggtgg aagtgggtgt ggtggttctg gtggtggtgg ttctcagagc 1980  
 gaattgactc agccaccctc agcgtctggg acccccgggc agagggtcac catctcttgt 2040  
 tctggaagca gctccaacat cggaaggaat cctgtaaact ggtaccagca cctcccagga 2100  
 acggccccc aactcctcat ctatggtgat aatcagcggc cctcaggggt cctgaccga 2160  
 ttctctggct ccaggtctgg cacctcagcc tccctggcca tcagtgggt ccagtctgag 2220  
 gatgaggctg attattactg tgcagcatgg gatgacagcc tgaatggtgt ggtattcggc 2280  
 ggagggacca agctgaccgt ccta 2304

<210> 626  
 <211> 768  
 <212> PRT  
 <213> Artificial

<220>  
 <223> Fc5 enlazador de 10 monómeros en bisc c1035.1-c870.1

<400> 626

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

Val Leu Ser Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln  
 20 25 30

Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe  
 35 40 45

Ser Met Tyr Phe Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu  
 50 55 60

Glu Trp Val Ser Gly Ile Ser Pro Ser Gly Gly Met Thr Phe Tyr Ala  
 65 70 75 80



Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn  
 85 90 95  
 Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val  
 100 105 110  
 Tyr Tyr Cys Ala Lys Asp Gly Ile Pro Leu Ser Ile Ala Ala Pro Ile  
 115 120 125  
 Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly  
 130 135 140  
 Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly  
 145 150 155 160  
 Ser Gly Gly Gly Gly Ser Ala Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Asp Ser  
 165 170 175  
 Leu Ala Val Ser Leu Gly Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Lys Ser Ser  
 180 185 190  
 Gln Ser Val Leu Tyr Ser Ser Asn Asn Lys Asn Tyr Leu Ala Trp Tyr  
 195 200 205  
 Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser  
 210 215 220  
 Thr Arg Glu Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly  
 225 230 235 240  
 Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Ala Glu Asp Val Ala  
 245 250 255  
 Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Tyr Ser Thr Pro Ile Thr Phe Gly Gln  
 260 265 270  
 Gly Thr Arg Leu Glu Ile Lys Glu Pro Lys Ser Ser Asp Lys Thr His  
 275 280 285  
 Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Glu Gly Ala Pro Ser Val  
 290 295 300  
 Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr  
 305 310 315 320  
 Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu  
 325 330 335

Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys  
 340 345 350  
 Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser  
 355 360 365  
 Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys  
 370 375 380  
 Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile  
 385 390 395 400  
 Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro  
 405 410 415  
 Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu  
 420 425 430  
 Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn  
 435 440 445  
 Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser  
 450 455 460  
 Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg  
 465 470 475 480  
 Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu  
 485 490 495  
 His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Gly Gly  
 500 505 510  
 Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly  
 515 520 525  
 Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala  
 530 535 540  
 Ser Gly Phe Thr Phe Ser Gly Tyr Ile Met Trp Trp Val Arg Gln Ala  
 545 550 555 560  
 Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ser Val Ile Ser Pro Ser Gly Gly  
 565 570 575  
 Asp Thr Trp Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg  
 580 585 590  
 Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala

595	600	605
Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Thr Ala Gly Asp Tyr Trp Gly		
610	615	620
Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly		
625	630	635
Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly		
645	650	655
Gly Ser Gln Ser Glu Leu Thr Gln Pro Pro Ser Ala Ser Gly Thr Pro		
660	665	670
Gly Gln Arg Val Thr Ile Ser Cys Ser Gly Ser Ser Ser Asn Ile Gly		
675	680	685
Arg Asn Pro Val Asn Trp Tyr Gln His Leu Pro Gly Thr Ala Pro Lys		
690	695	700
Leu Leu Ile Tyr Gly Asp Asn Gln Arg Pro Ser Gly Val Pro Asp Arg		
705	710	715
Phe Ser Gly Ser Arg Ser Gly Thr Ser Ala Ser Leu Ala Ile Ser Gly		
725	730	735
Leu Gln Ser Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ala Ala Trp Asp Asp		
740	745	750
Ser Leu Asn Gly Val Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu		
755	760	765

<210> 627  
 <211> 2319  
 <212> ADN  
 <213> Artificial

<220>  
 <223> ADNc de Fc5 enlazador de 10 monómeros en bisc c1035.1-c1039.1

<400> 627

atgggatgga gctggatcct tctctttctt ctgtcaggaa ctgcaggtgt cctctctgaa	60
gttcaattgt tagagtctgg tggcggctct gtccagcctg gtggttcttt acgtctttct	120
tgcgctgctt ccggattcac tttctctatg tactttatgt cttgggttcg ccaagctcct	180
ggtaaagggt tggagtgggt ttctggatc tctccttctg gtggcatgac tttttatgct	240
gactccgtta aaggtcgtt cactatctct agagacaact ctaagaatac tctctacttg	300
cagatgaaca gcttaagggc tgaggacacg gccgtgtatt actgtgcaaa agatggcatc	360
cccctatcta tagctgcgcc gattgactac tggggccagg ggaccctggt caccgtctca	420

agcgggtggtg gtggttctgg cggcgccggc tccggcgggg gtggaagtgg tgggtggtggt	480
tctggtggtg gtggttctgc catccagatg acccagtctc cagactccct ggctgtgtct	540
ctgggcgaga gggccaccat caactgcaag tccagccaga gtgttttata cagctccaac	600
aataagaact acttagcttg gtaccagcag aaaccaggac agcctcctaa gctgctcatt	660
tactgggcac ctacccggga atccggggtc cctgaccgat tcagtggcag cgggtctggg	720
acagatttca ctctcaccat cagcagcctg caggctgaag atgtggcagt ttattactgt	780
cagcaatatt atagtactcc catcaccttc ggccaaggga cagactgga gattaaagag	840
ccaaatctt cagacaaaac tcacacatgc ccaccgtgcc cagcacctga agccgagggg	900
gcaccgtcag tcttctctt cccccaaaa cccaaggaca cctcatgat ctcccgacc	960
cctgaggtca catgcgtggt ggtggacgtg agccacgaag accctgaggt caagttcaac	1020
tggtagctgg acggcgtgga ggtgcataat gccaaagaca agccgcggga ggagcagtac	1080
aacagcacgt accgtgtggt cagcgtcctc accgtcctgc accaggactg gctgaatggc	1140
aaggagtaca agtgcaaggc ctccaacaaa gccctcccat cctccatcga gaaaaccatc	1200
tccaaagcca aagggcagcc ccgagaacca caggtgtaca ccttgcccc atcccgggat	1260
gagctgacca agaaccaggc cagcctgacc tgctgtgtca aaggcttcta tccagcgac	1320
atcgccgtgg agtgggagag caatgggcag ccggagaaca actacaagac cagcctccc	1380
gtgctggact ccgacggctc cttcttctc tacagcaagc tcaccgtgga caagagcagg	1440
tggcagcagg ggaacgtctt ctcatgctcc gtgatgcatg aggctctgca caaccactac	1500
acgcagaaga gcctctccct gtctccgggt ggtggcgggg gttcgggtgg aggaggtctt	1560
gaagttcaat tgtagagtc tggtaggggt cttgttcagc ctggtggttc tttacgtctt	1620
tcttgcgctg cttccggatt cactttctct tggtagata tggtttgggt tcgccaagct	1680
cctggtaaag gtttgagtg ggtttctgtt atctctcctt ctggtggctg gacttcttat	1740
gctgactccg ttaaaggctg cttcactatc tctagagaca actctaagaa tactctctac	1800
ttgcagatga acagcttaag ggctgaggac acggccgtgt attactgtgc gagagatcat	1860
agtggctacg attctgaata ctttgactac tggggccagg gcaccctggt caccgtctca	1920
agcgggtggtg gtggttctgg cggcgccggc tccggcgggg gtggaagtgg tgggtggtggt	1980
tctggtggtg gtggttctaa catccagatg acccagtctc catcctccct gtctgcatct	2040
gtaggagaca gagtcccat cacttgccgg gcaagtcaga gcattagcag ctatttaa	2100
tggtagcagc agaaaccagg gaaagccct aagctcctga tctatgctgc atccagttg	2160
caaagtgggg tcccatcaag gttcagtgcc agtggtctg ggacagattt cactctcacc	2220
atcagcagtc tgcaacctga agattttgca acttactact gtcaacagag ttacagtacc	2280
ccgtacactt ttggccaggg gaccaagctg gagatcaaa	2319

5	<210> 628
	<211> 773
	<212> PRT
	<213> Artificial
10	<220>
	<223> Fc5 enlazador de 10 monómeros en bisc c1035.1-c1039.1
	<400> 628

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

Thr Arg Glu Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly  
 225 230 235 240  
 Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Ala Glu Asp Val Ala  
 245 250 255  
 Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Tyr Ser Thr Pro Ile Thr Phe Gly Gln  
 260 265 270  
 Gly Thr Arg Leu Glu Ile Lys Glu Pro Lys Ser Ser Asp Lys Thr His  
 275 280 285  
 Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Glu Gly Ala Pro Ser Val  
 290 295 300  
 Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr  
 305 310 315 320  
 Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu  
 325 330 335  
 Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys  
 340 345 350  
 Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser  
 355 360 365  
 Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys  
 370 375 380  
 Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile  
 385 390 395 400  
 Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro  
 405 410 415  
 Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu  
 420 425 430  
 Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn  
 435 440 445  
 Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser  
 450 455 460  
 Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg  
 465 470 475 480



Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu  
485 490 495

His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Gly Gly  
500 505 510

Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly  
515 520 525

Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala  
530 535 540

Ser Gly Phe Thr Phe Ser Trp Tyr Asp Met Val Trp Val Arg Gln Ala  
545 550 555 560

Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ser Val Ile Ser Pro Ser Gly Gly  
565 570 575

Trp Thr Ser Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg  
580 585 590

Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala  
595 600 605

Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Asp His Ser Gly Tyr Asp  
610 615 620

Ser Glu Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser  
625 630 635 640

Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser  
645 650 655

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asn Ile Gln Met Thr Gln  
660 665 670

Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr  
675 680 685

Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser Ser Tyr Leu Asn Trp Tyr Gln Gln  
690 695 700

Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Ala Ala Ser Ser Leu  
705 710 715 720

Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp  
725 730 735

Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr  
740 745 750

Tyr Cys Gln Gln Ser Tyr Ser Thr Pro Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr  
755 760 765

Lys Leu Glu Ile Lys  
770

<210> 629  
<211> 2187  
<212> ADN  
<213> Artificial

<220>  
<223> ADNc de IgG1.1 enlazadora de 10 monómeros en biAb c597.1-c868.1

<400> 629

atgggatgga gctgtatcat cctcttcttg gtagcaacag ctacaggcgc gcactccgaa	60
gttcaattgt tagagtctgg tggcgggtctt gttcagcctg gtgggttcttt acgtctttct	120
tgcgctgctt ccggattcac tttctctaag tacaagatgc tttgggttcg ccaagctcct	180
ggtaaagggt tggagtgggt ttcttctatc tatccttctg gtggcgttac tttttatgct	240
gactcogtta aaggtcgctt cactatctct agagacaact ctaagaatac tctctacttg	300
cagatgaaca gcttaagggc tgaggacacg gccgtgtatt actgtgcaag agatggggag	360
atgatttcgg gtagtttctt tgactcctgg ggccaggga ccttggtcac cgtctcaagc	420
gcctccacca agggcccatc ggtcttcccg ctagcacctt cctccaagag cacctctggg	480
ggcacagcag ccctgggctg cctgggtcaag gactacttcc ccgaaccggt gacgggtgtc	540
tggaaactcag gcgccctgac cagcggcgtg cacaccttcc cggctgtcct acagtcctca	600
ggactctact ccctcagcag cgtggtgacc gtgccctcca gcagcttggg caccagacc	660
tacatctgca acgtgaatca caagcccagc aacaccaagg tggacaagaa agttgagccc	720
aaatcttgtg acaaaaactca cacatgccca ccgtgccag cacctgaagc cgagggggca	780
ccgtcagctt tcctcttccc cccaaaaccc aaggacaccc tcatgatctc ccggaccctt	840
gaggtcacat gcgtgggtgt ggacgtgagc cacgaagacc ctgaggtcaa gttcaactgg	900
tacgtggacg gcgtggaggt gcataatgcc aagacaaagc cgcgggagga gcagtacaac	960
agcacgtacc gtgtggtcag cgtcctcacc gtcctgcacc aggactggct gaatggcaag	1020
gagtacaagt gcaaggctct caacaaagcc ctcccatcct ccatcgagaa aaccatctcc	1080
aaagccaaag ggcagccccg agaaccacag gtgtacaccc tgccccatc ccgggatgag	1140
ctgaccaaga accaggtcag cctgacctgc ctggtcaaag gcttctatcc cagcgacatc	1200
gccgtggagt gggagagcaa tgggcagccg gagaacaact acaagaccac gcctcccggt	1260
ctggactccg acggctcctt ctctctctac agcaagctca ccgtggacaa gagcaggtgg	1320

cagcagggga acgtcttctc atgctccgtg atgcatgagg ctctgcacaa ccactacacg 1380  
cagaagagcc tctccctgtc tccgggtggt ggcgggggtt cgggtggagg aggttctgcc 1440  
atccagatga ccagctctcc atcctccctg tctgcatctg taggagacag agtcaccatc 1500  
acttgccggg caagtcagag cattagcagc tatttaaatt ggtatcagca gaaaccaggg 1560  
aaagccccta aactcctgat ccatgctgca tccaatttgc agagtggggt cccatcaagg 1620  
ttcagtggca gtggatctgg gacagatttc actctcacca tcagcagtct gcaacctgaa 1680  
gattttgcaa cttactactg tcaacagagt tacagtaccc ctctcacttt cggcggaggg 1740  
accaaggtgg agatcaaggg tgggtggtgt tctggcggcg gcggctccgg cgggggtgga 1800  
agtgggtggt gtggttctgg tgggtggtgt tctgaagttc aattgttaga gtctggtggc 1860  
ggtcttgttc agcctggtgg ttctttacgt cttctctgcg ctgcttccgg attcactttc 1920  
tctcattacg agatgggttg ggttcgcca gctcctggtt aagggttgga gtgggtttct 1980  
tatatctctt cttctggtgg ctggactgct tatgctgact ccgttaaagg tcgcttcaact 2040  
atctctagag acaactctaa gaatactctc tacttgacaga tgaacagctt aagggtgag 2100  
gacacggccg tgtattactg tgcaaggatt ggctacgcag atgcttttga tatctggggc 2160  
caagggacca cggtcaccgt ctcaagc 2187

<210> 630  
<211> 729  
<212> PRT  
<213> Artificial

<220>  
<223> IgG1.1 enlazadora de 10 monómeros en biAb c597.1-c868.1

<400> 630

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

Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val  
 100 105 110  
 Tyr Tyr Cys Ala Arg Asp Gly Glu Met Ile Ser Gly Ser Phe Phe Asp  
 115 120 125  
 Ser Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys  
 130 135 140  
 Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly  
 145 150 155 160  
 Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro  
 165 170 175  
 Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr  
 180 185 190  
 Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val  
 195 200 205  
 Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn  
 210 215 220  
 Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro  
 225 230 235 240  
 Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu  
 245 250 255  
 Ala Glu Gly Ala Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp  
 260 265 270  
 Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp  
 275 280 285  
 Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly  
 290 295 300  
 Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn  
 305 310 315 320  
 Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp  
 325 330 335  
 Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro  
 340 345 350  
 Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu

355		360		365
Pro Gln Val Tyr Thr Leu	Pro Pro Ser Arg Asp Glu	Leu Thr Lys Asn		
370	375	380		
Gln Val Ser Leu Thr Cys	Leu Val Lys Gly Phe Tyr	Pro Ser Asp Ile		
385	390	395	400	
Ala Val Glu Trp Glu Ser	Asn Gly Gln Pro Glu	Asn Asn Tyr Lys Thr		
	405	410	415	
Thr Pro Pro Val Leu Asp	Ser Asp Gly Ser Phe Phe	Leu Tyr Ser Lys		
	420	425	430	
Leu Thr Val Asp Lys Ser	Arg Trp Gln Gln Gly	Asn Val Phe Ser Cys		
	435	440	445	
Ser Val Met His Glu Ala	Leu His Asn His Tyr Thr	Gln Lys Ser Leu		
	450	455	460	
Ser Leu Ser Pro Gly Gly	Gly Gly Gly Ser Gly	Gly Gly Gly Ser Ala		
	465	470	475	480
Ile Gln Met Thr Gln Ser	Pro Ser Ser Leu Ser	Ala Ser Val Gly Asp		
	485	490	495	
Arg Val Thr Ile Thr Cys	Arg Ala Ser Gln Ser	Ile Ser Ser Tyr Leu		
	500	505	510	
Asn Trp Tyr Gln Gln Lys	Pro Gly Lys Ala Pro	Lys Leu Leu Ile His		
	515	520	525	
Ala Ala Ser Asn Leu Gln	Ser Gly Val Pro Ser	Arg Phe Ser Gly Ser		
	530	535	540	
Gly Ser Gly Thr Asp Phe	Thr Leu Thr Ile Ser	Ser Ser Leu Gln Pro Glu		
	545	550	555	560
Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr	Cys Gln Gln Ser Tyr	Ser Thr Pro Leu Thr		
	565	570	575	
Phe Gly Gly Gly Thr Lys	Val Glu Ile Lys Gly	Gly Gly Gly Ser Gly		
	580	585	590	
Gly Gly Gly Ser Gly Gly	Gly Gly Ser Gly Gly	Gly Gly Ser Gly Gly		
	595	600	605	
Gly Gly Ser Glu Val Gln	Leu Leu Glu Ser Gly	Gly Gly Leu Val Gln		
	610	615	620	

Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe  
625 630 635 640

Ser His Tyr Glu Met Gly Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu  
645 650 655

Glu Trp Val Ser Tyr Ile Ser Ser Ser Gly Gly Trp Thr Ala Tyr Ala  
660 665 670

Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn  
675 680 685

Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val  
690 695 700

Tyr Tyr Cys Ala Arg Ile Gly Tyr Ala Asp Ala Phe Asp Ile Trp Gly  
705 710 715 720

Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser  
725

<210> 631  
<211> 2181  
<212> ADN  
<213> Artificial

<220>  
<223> ADNc de IgG1.1 enlazadora de 10 monómeros en biAb c597.1-c870.1

<400> 631

atgggatgga gctgtatcat cctcttcttg gtagcaacag ctacaggcgc gcaactccgaa	60
gttcaattgt tagagtctgg tggcgggtctt gttagcctg gtggttcttt acgtctttct	120
tgcgctgctt ccggattcac tttctctaag tacaagatgc tttgggttcg ccaagctcct	180
ggtaaagggt tggagtgggt ttcttctatc tatccttctg gtggcggtac tttttatgct	240
gactccgtta aaggctcgctt cactatctct agagacaact ctaagaatac tctctacttg	300
cagatgaaca gcttaagggc tgaggacacg gccgtgtatt actgtgcaag agatggggag	360
atgatttcgg gtagtttctt tgactcctgg ggccagggaa ccctgggtcac cgtctcaagc	420
gcctccacca agggcccatc ggtcttcccg cttagcaccct cctccaagag cacctctggg	480
ggcacagcag ccctgggctg cctgggtcaag gactacttcc ccgaaccggt gacgggtgctg	540
tggaaactcag ggcgccctgac cagcggcgtg cacaccttcc cggtgtctct acagtctca	600
ggactctact ccctcagcag cgtgggtgacc gtgccttcca gcagcttggg caccagacc	660
tacatctgca acgtgaatca caagcccagc aacaccaagg tggacaagaa agttgagccc	720
aaatcttggtg acaaaactca cacatgccca ccgtgccag cacctgaagc cgagggggca	780

```

ccgtcagtcct tcctcttccc cccaaaaccc aaggacaccc tcatgatctc ccggaccctt      840
gaggtcacat gcgtgggtgt ggacgtgagc cacgaagacc ctgaggtcaa gttcaactgg      900
tacgtggacg gcgtggaggt gcataatgcc aagacaaagc cgcgggagga gcagtacaac      960
agcacgtacc gtgtggtcag cgtcctcacc gtcctgcacc aggactggct gaatggcaag     1020
gagtacaagt gcaaggtctc caacaaagcc ctcccatcct ccatcgagaa aaccatctcc     1080
aaagccaaag ggcagccccc agaaccacag gtgtacaccc tgcccccatc ccgggatgag     1140
ctgaccaaga accaggtcag cctgacctgc ctgggtcaaag gcttctatcc cagcgacatc     1200
gccgtggagt gggagagcaa tgggcagccg gagaacaact acaagaccac gcctcccggtg     1260
ctggactccg acggctcctt cttcctctac agcaagctca ccgtggacaa gacgaggtgg     1320
cagcagggga acgtcttctc atgctccgtg atgcatgagg ctctgcacaa ccactacacg     1380
cagaagagcc tctccctgtc tccgggtggt ggcggggggt cgggtggagg aggttctgaa     1440
gttcaattgt tagagtctgg tggcgtctt gttcagcctg gtggttcttt acgtctttct     1500
tgcgctgctt ccggattcac tttctctggt tacattatgt ggtgggttcg ccaagctcct     1560
ggtaaaggtt tggagtgggt ttctgttatc tctcctcttg gtggcgatac ttggtatgct     1620
gactccgtta aaggtcgctt cactatctct agagacaact ctaagaatac tctctactta     1680
cagatgaaca gcttaagggc tgaggacacg gccgtgtatt actgtgccac agcgggagac     1740
tactggggcc agggcaccct ggtcaccgtc tcaagcgggt gtggtggttc tggcggcggc     1800
ggctccggcg ggggtggaag tgggtggtgt ggttctggtg gtggtggttc tcagagcgaa     1860
ttgactcagc caccctcagc gtctgggacc ccggggcaga gggtcaccat ctcttggtct     1920
ggaagcagct ccaacatcgg aaggaatcct gtaaactggt accagcacct ccaggaacg     1980
gcccccaaac tcctcatcta tggtgataat cagcggccct caggggtccc tgaccgattc     2040
tctggtcca ggtctggcac ctgacctcc ctggccatca gtgggctcca gtctgaggat     2100
gaggctgatt attactgtgc agcatgggat gacagcctga atggtgtggt attcggcgga     2160
gggaccaagc tgaccgtcct a                                     2181

```

<210> 632

<211> 727

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> IgG1.1 enlazadora de 10 monómeros en biAb c597.1-c870.1

<400> 632



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

Ala His Ser Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln  
 20 25 30

Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe  
           35                          40                          45

Ser Lys Tyr Lys Met Leu Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu  
       50                          55                          60

Glu Trp Val Ser Ser Ile Tyr Pro Ser Gly Gly Val Thr Phe Tyr Ala  
   65                          70                          75                          80

Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn  
                           85                          90                          95

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

Tyr Tyr Cys Ala Arg Asp Gly Glu Met Ile Ser Gly Ser Phe Phe Asp  
           115                          120                          125

Ser Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys  
       130                          135                          140

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

Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro  
                           165                          170                          175

Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr  
                           180                          185                          190

Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val  
           195                          200                          205

Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn  
       210                          215                          220

Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro  
   225                          230                          235                          240

Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu  
                           245                          250                          255

Ala Glu Gly Ala Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp  
           260                          265                          270

Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp  
       275                          280                          285

Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly  
 290 295 300

Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn  
 305 310 315 320

Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp  
 325 330 335

Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro  
 340 345 350

Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu  
 355 360 365

Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn  
 370 375 380

Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile  
 385 390 395 400

Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr  
 405 410 415

Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys  
 420 425 430

Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys  
 435 440 445

Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu  
 450 455 460

Ser Leu Ser Pro Gly Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Glu  
 465 470 475 480

Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser  
 485 490 495

Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Gly Tyr Ile  
 500 505 510

Met Trp Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ser  
 515 520 525

Val Ile Ser Pro Ser Gly Gly Asp Thr Trp Tyr Ala Asp Ser Val Lys  
 530 535 540

Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu  
545 550 555 560

Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala  
565 570 575

Thr Ala Gly Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser  
580 585 590

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly  
595 600 605

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gln Ser Glu Leu Thr Gln Pro  
610 615 620

Pro Ser Ala Ser Gly Thr Pro Gly Gln Arg Val Thr Ile Ser Cys Ser  
625 630 635 640

Gly Ser Ser Ser Asn Ile Gly Arg Asn Pro Val Asn Trp Tyr Gln His  
645 650 655

Leu Pro Gly Thr Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Gly Asp Asn Gln Arg  
660 665 670

Pro Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Arg Ser Gly Thr Ser  
675 680 685

Ala Ser Leu Ala Ile Ser Gly Leu Gln Ser Glu Asp Glu Ala Asp Tyr  
690 695 700

Tyr Cys Ala Ala Trp Asp Asp Ser Leu Asn Gly Val Val Phe Gly Gly  
705 710 715 720

Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu  
725

<210> 633  
<211> 2196  
<212> ADN  
<213> Artificial

<220>  
<223> ADNc de IgG1.1 enlazadora de 10 monómeros en biAb c597.1-c1039.1

<400> 633

# ES 2 456 296 T3

atgggatgga gctgtatcat cctcttcttg gtagcaacag ctacaggcgc gcactccgaa	60
gttcaattgt tagagtctgg tggcgggtctt gttcagcctg gtggttcttt acgtctttct	120
tgcgctgctt ccggattcac tttctctaag tacaagatgc tttgggttcg ccaagctcct	180
ggtaaagggt tggagtgggt ttcttctatc tatccttctg gtggcgttac tttttatgct	240

gactcogtta aaggtcgctt cactatctct agagacaact ctaagaatac tctctacttg	300
cagatgaaca gcttaagggc tgaggacacg gccgtgtatt actgtgcaag agatggggag	360
atgatttcgg gtagtttctt tgactcctgg gcccaggga ccttggtcac cgtctcaagc	420
gcctccacca agggcccatc ggtcttcccg ctacacccct cctccaagag cacctctggg	480
ggcacagcag ccctgggctg cctgggtcaag gactacttcc ccgaaccggt gacgggtgctg	540
tggaactcag gcgcctgac cagcggcgtg cacaccttcc cggctgtcct acagtccctca	600
ggactctact ccctcagcag cgtgggtgacc gtgccctcca gcagcttggg caccagacc	660
tacatctgca acgtgaatca caagcccagc aacaccaagg tggacaagaa agttgagccc	720
aaatcttggtg acaaaaactca cacatgccca ccgtgccag cacctgaagc cgagggggca	780
ccgtcagttt tctcttccc cccaaaaccc aaggacaccc tcatgatctc cgggacctct	840
gaggtcacat gcgtgggtgt ggacgtgagc cacgaagacc ctgaggtcaa gttcaactgg	900
tacgtggacg gcgtggaggt gcataatgcc aagacaaagc cgcgggagga gcagtacaac	960
agcacgtacc gtgtgggtcag cgtcctcacc gtccctgcacc aggactggct gaatggcaag	1020
gagtacaagt gcaaggtctc caaocaaagcc ctcccatcct ccacogagaa aacctctcc	1080
aaagccaaag ggcagccccc agaaccacag gtgtacaccc tgcccccatc ccgggatgag	1140
ctgaccaaga accaggtcag cctgacctgc ctgggtcaaag gcttctatcc cagcgacatc	1200
gccgtggagt gggagagcaa tgggcagcgg gagaacaact acaagaccac gcctcccggtg	1260
ctggactccg acggctcctt ctccctctac agcaagctca ccgtggacaa gagcaggtgg	1320
cagcagggga acgtcttctc atgctccgtg atgcatgagg ctctgcacaa ccactacacg	1380
cagaagagcc tctccctgtc tccgggtgtt ggcgggggtt cgggtggagg aggttctgaa	1440
gttcaattgt tagagtctgg tggcggctct gttcagcctg gtggttcttt acgtcttct	1500
tgcgctgctt ccggattcac tttctcttgg tacgatatgg tttgggttcg ccaagctcct	1560
ggtaaaaggt tggagtgggt ttctgttatc tctccttctg gtggctggac ttcttatgct	1620
gactcogtta aaggtcgctt cactatctct agagacaact ctaagaatac tctctacttg	1680
cagatgaaca gcttaagggc tgaggacacg gccgtgtatt actgtgcgag agatcatagt	1740
ggctacgatt ctgaatactt tgactactgg gcccagggca ccctgggtcac cgtctcaagc	1800
ggtggtggtg gttctggcgg cggcggctcc ggcgggggtg gaagtgggtg tgggtgttct	1860
ggtggtggtg gttctaacat ccagatgacc cagtctccat cctccctgtc tgcattctga	1920
ggagacagag tcaccatcac ttgccgggca agtcagagca ttagcagcta tttaaattgg	1980
tatcagcaga aaccagggaa agcccctaag ctccctgatct atgctgcac cagtttgcaa	2040
agtggggctc catcaaggtt cagtggcagt ggatctggga cagatttcac tctcaccatc	2100
agcagtctgc aacctgaaga ttttgcaact tactactgtc aacagagtta cagtaccccg	2160
tacacttttg gccaggggac caagctggag atcaaa	2196

5	<210> 634 <211> 732 <212> PRT <213> Artificial
10	<220> <223> IgG1.1 enlazadora de 10 monómeros en biAb c597.1-c1039.1  <400> 634

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



210	215	220
Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro		
225	230	235 240
Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu		
	245	250 255
Ala Glu Gly Ala Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp		
	260	265 270
Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp		
	275	280 285
Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly		
	290	295 300
Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn		
305	310	315 320
Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp		
	325	330 335
Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro		
	340	345 350
Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu		
	355	360 365
Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn		
	370	375 380
Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile		
385	390	395 400
Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr		
	405	410 415
Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys		
	420	425 430
Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys		
	435	440 445
Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu		
	450	455 460
Ser Leu Ser Pro Gly Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Glu		
465	470	475 480

Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser  
 485 490 495  
 Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Trp Tyr Asp  
 500 505 510  
 Met Val Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ser  
 515 520 525  
 Val Ile Ser Pro Ser Gly Gly Trp Thr Ser Tyr Ala Asp Ser Val Lys  
 530 535 540  
 Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu  
 545 550 555 560  
 Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala  
 565 570 575  
 Arg Asp His Ser Gly Tyr Asp Ser Glu Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln  
 580 585 590  
 Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly  
 595 600 605  
 Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly  
 610 615 620  
 Ser Asn Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val  
 625 630 635 640  
 Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser Ser  
 645 650 655  
 Tyr Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu  
 660 665 670  
 Ile Tyr Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser  
 675 680 685  
 Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln  
 690 695 700  
 Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Tyr Ser Thr Pro  
 705 710 715 720  
 Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys  
 725 730

<210> 635  
 <211> 2187  
 <212> ADN  
 <213> Artificial

<220>  
 <223> ADNc de IgG1.1 enlazadora de 10 monómeros en biAb c600.1-c868.1

<400> 635

```

atgggatgga gctgtatcat cctcttcttg gtagcaacag ctacaggcgc gcactccgaa      60
gttcaattgt tagagtctgg tggcgggtctt gttcagcctg gtgggtcttt acgtctttct      120
tgcgctgctt ccggattcac tttctctcag tacatgatgc tttgggttcg ccaagctcct      180
ggtaaagggt tggagtgggt ttctgggtatc tctccttctg gtggcattac tacttatgct      240
gactccgtta aaggctcgctt cactatctct agagacaact ctaagaatac tctctacttg      300
cagatgaaca gcttaagggc tgaggacacg gccgtgtatt actgtgcgag agcttatagc      360
agtggctggt ccttaccctt tgactactgg ggccagggaa ccctggtcac cgtctcaagc      420
gcctccacca agggcccacg ggtcttcccg ctagcaccct cctccaagag cacctctggg      480
ggcacagcag ccctgggctg cctgggtcaag gactacttcc ccgaaccggt gacggtgtcg      540
tggaactcag gcgccctgac cagcggcgtg cacaccttcc cggctgtcct acagtccctca      600
ggactctact ccctcagcag cgtgggtgacc gtgccctcca gcagcttggg caccagacc      660
tacatctgca acgtgaatca caagcccagc aacaccaagg tggacaagaa agttgagccc      720
aaatcttgtg acaaaactca cacatgcccc ccgtgcccag cacctgaagc cgagggggca      780
ccgtcagctc tctcttccc cccaaaaccc aaggacacc tcctgatctc ccggaccct      840
gaggtcacat gcgtgggtgt ggacgtgagc cacgaagacc ctgaggtcaa gttcaactgg      900
tacgtggacg gcgtggaggt gcataatgcc aagacaaagc cgcgggagga gcagtacaac      960
agcacgtacc gtgtggtcag cgtctcacc gtccctgcacc aggactggct gaatggcaag     1020
gagtacaagt gcaaggctct caacaaagcc ctcccatcct ccatcgagaa aaccatctcc     1080
aaagccaaag ggcagccccg agaaccacag gtgtacaccc tgccccatc ccgggatgag     1140
ctgaccaaga accaggtcag cctgacctgc ctggtcaaag gcttctatcc cagcgacatc     1200
gccgtggagt gggagagcaa tgggcagccg gagaacaact acaagaccac gcctcccgtg     1260
ctggactccg acggctcctt cttcctctac agcaagctca ccgtggacaa gagcaggtgg     1320
cagcagggga acgtcttctc atgctccgtg atgcatgagg ctctgcacaa ccactacacg     1380
cagaagagcc tctccctgtc tccgggtggt ggcgggggtt cgggtggagg aggttctgcc     1440
atccagatga ccagctctcc atcctccctg tctgcatctg taggagacag agtcaaccatc     1500
acttgccggg caagtcagag cattagcagc tatttaaatt ggtatcagca gaaaccaggg     1560
aaagcccta aactcctgat ccatgctgca tccaatttgc agagtggggt cccatcaagg     1620
ttcagtgcca gtggatctgg gacagatttc actctacca tcagcagctc gcaacctgaa     1680
    
```

gattttgcaa cttactactg tcaadagagt tacagtaccc ctctcacttt cggcggaggg 1740  
 accaagggtg agatcaaggg tgggtggtgg tctggcggcg gcggctccgg cgggggtgga 1800  
 agtgggtggtg gtggttctgg tgggtggtgg tctgaagttc aattgttaga gtctggtggc 1860  
 ggtcttggtc agcctggtgg ttctttacgt ctttcttgcg ctgcttccgg attcactttc 1920  
 tctcattacg agatggggtg ggttcgcaa gctcctggta aaggtttgga gtgggtttct 1980  
 tatatctctt cttctggtgg ctggactgct tatgctgact ccgttaaagg tcgcttcaact 2040  
 atctctagag acaactctaa gaatactctc tacttgcaga tgaacagctt aagggtgag 2100  
 gacacggccg tgtattactg tgcaaggatt ggctacgcag atgcttttga tatctggggc 2160  
 caagggacca cggtcaccgt ctcaagc 2187

<210> 636  
 <211> 729  
 <212> PRT  
 <213> Artificial

<220>  
 <223> IgG1.1 enlazadora de 10 monómeros en biAb c600.1-c868.1

<400> 636

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

Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly  
 145 150 155 160  
 Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro  
 165 170 175  
 Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr  
 180 185 190  
 Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val  
 195 200 205  
 Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn  
 210 215 220  
 Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro  
 225 230 235 240  
 Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu  
 245 250 255  
 Ala Glu Gly Ala Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp  
 260 265 270  
 Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp  
 275 280 285  
 Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly  
 290 295 300  
 Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn  
 305 310 315 320  
 Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp  
 325 330 335  
 Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro  
 340 345 350  
 Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu  
 355 360 365  
 Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn  
 370 375 380  
 Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile  
 385 390 395 400

Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr  
 405 410 415  
 Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys  
 420 425 430  
 Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys  
 435 440 445  
 Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu  
 450 455 460  
 Ser Leu Ser Pro Gly Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Ala  
 465 470 475 480  
 Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly Asp  
 485 490 495  
 Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser Ser Tyr Leu  
 500 505 510  
 Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile His  
 515 520 525  
 Ala Ala Ser Asn Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser  
 530 535 540  
 Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu  
 545 550 555 560  
 Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Tyr Ser Thr Pro Leu Thr  
 565 570 575  
 Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Gly Gly Gly Gly Ser Gly  
 580 585 590  
 Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly  
 595 600 605  
 Gly Gly Ser Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln  
 610 615 620  
 Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe  
 625 630 635 640  
 Ser His Tyr Glu Met Gly Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu  
 645 650 655  
 Glu Trp Val Ser Tyr Ile Ser Ser Ser Gly Gly Trp Thr Ala Tyr Ala

660

665

670

Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn  
675 680 685

Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val  
690 695 700

Tyr Tyr Cys Ala Arg Ile Gly Tyr Ala Asp Ala Phe Asp Ile Trp Gly  
705 710 715 720

Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser  
725

<210> 637  
<211> 2181  
<212> ADN  
<213> Artificial

<220>  
<223> ADNc de IgG1.1 enlazadora de 10 monómeros en biAb c600.1-c870.1

<400> 637

atgggatgga gctgtatcat cctcttcttg gtagcaacag ctacaggcgc gcactccgaa	60
gttcaattgt tagagtctgg tggcggctct gttcagcctg gtgggtcttt acgtctttct	120
tgcgctgctt ccggattcac tttctctcag tacatgatgc tttgggttcg ccaagctcct	180
ggtaaagggt tggagtgggt ttctgggtat tctccttctg gtggcattac tacttatgct	240
gactccgtta aaggtcgctt cactatctct agagacaact ctaagaatac tctctacttg	300
cagatgaaca gcttaagggc tgaggacacg gccgtgtatt actgtgcgag agcttatagc	360
agtggctggg ccttaccctt tgactactgg ggccaggga cctgggtcac cgtctcaagc	420
gcctccacca agggcccatc ggtcttcccg ctagcacctt cctccaagag cacctctggg	480
ggcacagcag ccctgggctg cctgggtcaag gactacttcc ccgaaccggt gacggtgtcg	540
tggaactcag gcgccctgac cagcggcgtg cacaccttcc cggctgtcct acagtcctca	600
ggactctact ccctcagcag cgtggtgacc gtgccctcca gcagcttggg caccagacc	660
tacatctgca acgtgaatca caagcccagc aacaccaagg tggacaagaa agttgagccc	720
aaatcttgtg acaaaactca cacatgcca ccgtgccag cacctgaagc cgagggggca	780
ccgtcagtct tctcttccc ccaaaaacc aaggacacc tcattgatct ccggaccct	840
gaggtcacat gcgtgggtgg ggacgtgagc cacgaagacc ctgaggtcaa gttcaactgg	900
tacgtggacg gcgtggaggt gcataatgcc aagacaaagc cgcgggagga gcagtacaac	960
agcacgtacc gtgtggtcag cgtcctcacc gtccctgcacc aggactggct gaatggcaag	1020
gagtacaagt gcaaggctc caacaaagcc ctcccatcct ccattgagaa aaccatctcc	1080
aaagccaaag ggcagccccg agaaccacag gtgtacaccc tgccccatc ccgggatgag	1140



```

ctgaccaaga accaggtcag cctgacctgc ctggtcaaag gcttctatcc cagcgacatc 1200
gccgtggagt gggagagcaa tgggcagccg gagaacaact acaagaccac gcctcccgtg 1260
ctggactccg acggctcctt ctctctctac agcaagctca cgtgggacaa gagcaggtgg 1320
cagcagggga acgtcttctc atgctccgtg atgcatgagg ctctgcacaa ccactacacg 1380
cagaagagcc tctccctgtc tccgggtggt ggcgggggtt cgggtggagg aggttctgaa 1440
gttcaattgt tagagtctgg tggcgggtctt gttcagcctg gtggttcttt acgtctttct 1500
tgcgctgctt ccggattcac tttctctggt tacattatgt ggtgggttcg ccaagctcct 1560
ggtaaagggt tggagtgggt ttctgttctc tctccttctg gtggcgatac ttggtatgct 1620
gactccgtta aaggctcgtt cactatctct agagacaact ctaagaatac tctctactta 1680
cagatgaaca gcttaagggc tgaggacacg gccgtgtatt actgtgccac agcgggagac 1740
tactggggcc agggcaccct ggtcaccgtc tcaagcgggtg gtggtggttc tggcggcggc 1800
ggctccggcg ggggtggaag tgggtggtggt ggttctggtg gtggtggttc tcagagcgaa 1860
ttgactcagc caccctcagc gtctgggacc cccgggcaga gggtcaccat ctcttgttct 1920
ggaagcagct ccaacatcgg aaggaatcct gtaaactggt accagcacct cccaggaacg 1980
gcccccaaac tctcatcta tggtgataat cagcgccct caggggtccc tgaccgattc 2040
tctggctcca ggtctggcac ctccagctcc ctggccatca gtgggctcca gtctgaggat 2100
gaggctgatt attactgtgc agcatgggat gacagcctga atggtgtggt attcggcgga 2160
gggaccaagc tgaccgtcct a 2181

```

<210> 638

<211> 727

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> IgG1.1 enlazadora de 10 monómeros en biAb c600.1-c870.1

<400> 638

```

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

```

```

Ala His Ser Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln
20           25           30

```

```

Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe
35           40           45

```

```

Ser Gln Tyr Met Met Leu Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu
50           55           60

```

```

Glu Trp Val Ser Gly Ile Ser Pro Ser Gly Gly Ile Thr Thr Tyr Ala

```

65		70		75		80									
Asp	Ser	Val	Lys	Gly	Arg	Phe	Thr	Ile	Ser	Arg	Asp	Asn	Ser	Lys	Asn
			85						90					95	
Thr	Leu	Tyr	Leu	Gln	Met	Asn	Ser	Leu	Arg	Ala	Glu	Asp	Thr	Ala	Val
			100					105					110		
Tyr	Tyr	Cys	Ala	Arg	Ala	Tyr	Ser	Ser	Gly	Trp	Ser	Leu	Pro	Phe	Asp
		115					120					125			
Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Ala	Ser	Thr	Lys
	130					135						140			
Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Pro	Leu	Ala	Pro	Ser	Ser	Lys	Ser	Thr	Ser	Gly
145					150					155					160
Gly	Thr	Ala	Ala	Leu	Gly	Cys	Leu	Val	Lys	Asp	Tyr	Phe	Pro	Glu	Pro
				165					170					175	
Val	Thr	Val	Ser	Trp	Asn	Ser	Gly	Ala	Leu	Thr	Ser	Gly	Val	His	Thr
			180					185					190		
Phe	Pro	Ala	Val	Leu	Gln	Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Val
		195					200					205			
Val	Thr	Val	Pro	Ser	Ser	Ser	Leu	Gly	Thr	Gln	Thr	Tyr	Ile	Cys	Asn
	210					215					220				
Val	Asn	His	Lys	Pro	Ser	Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys	Lys	Val	Glu	Pro
225					230					235					240
Lys	Ser	Cys	Asp	Lys	Thr	His	Thr	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu
				245					250					255	
Ala	Glu	Gly	Ala	Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp
			260					265					270		
Thr	Leu	Met	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp
		275					280					285			
Val	Ser	His	Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Lys	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly
	290					295					300				
Val	Glu	Val	His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Tyr	Asn
305					310					315					320
Ser	Thr	Tyr	Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu	His	Gln	Asp	Trp
				325					330					335	

Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro  
 340 345 350

Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu  
 355 360 365

Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn  
 370 375 380

Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile  
 385 390 395 400

Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr  
 405 410 415

Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys  
 420 425 430

Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys  
 435 440 445

Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu  
 450 455 460

Ser Leu Ser Pro Gly Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Glu  
 465 470 475 480

Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser  
 485 490 495

Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Gly Tyr Ile  
 500 505 510

Met Trp Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ser  
 515 520 525

Val Ile Ser Pro Ser Gly Gly Asp Thr Trp Tyr Ala Asp Ser Val Lys  
 530 535 540

Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu  
 545 550 555 560

Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala  
 565 570 575

Thr Ala Gly Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser  
 580 585 590

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly  
595 600 605

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gln Ser Glu Leu Thr Gln Pro  
610 615 620

Pro Ser Ala Ser Gly Thr Pro Gly Gln Arg Val Thr Ile Ser Cys Ser  
625 630 635 640

Gly Ser Ser Ser Asn Ile Gly Arg Asn Pro Val Asn Trp Tyr Gln His  
645 650 655

Leu Pro Gly Thr Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Gly Asp Asn Gln Arg  
660 665 670

Pro Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Arg Ser Gly Thr Ser  
675 680 685

Ala Ser Leu Ala Ile Ser Gly Leu Gln Ser Glu Asp Glu Ala Asp Tyr  
690 695 700

Tyr Cys Ala Ala Trp Asp Asp Ser Leu Asn Gly Val Val Phe Gly Gly  
705 710 715 720

Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu  
725

<210> 639  
<211> 2196  
<212> ADN  
<213> Artificial

<220>  
<223> ADNc de IgG1.1 enlazadora de 10 monómeros en biAb c600.1-c1039.1

<400> 639

atgggatgga gctgtatcat cctcttcttg gtagcaacag ctacaggcgc gcactccgaa	60
gttcaattgt tagagtctgg tggcggctct gttcagcctg gtggttcttt acgtctttct	120
tgcgctgctt cgggattcac tttctctcag tacatgatgc tttgggttcg ccaagctcct	180
ggtaaagggt tggagtgggt ttctggtatc tctccttctg gtggcattac tacttatgct	240
gactccgtta aaggtcgctt cactatctct agagacaact ctaagaatac tctctacttg	300
cagatgaaca gcttaagggc tgaggacacg gccgtgtatt actgtgcgag agcttatagc	360
agtggctggg ccttaccctt tgactactgg ggccaggga ccctggtcac cgtctcaagc	420
gcctccacca agggcccatc ggtcttcccg ctaccacct cctccaagag cacctctggg	480
ggcacagcag ccctgggctg cctggtcaag gactacttcc ccgaaccggt gacggtgtcg	540
tggaactcag gcgccctgac cagcggcgtg cacaccttcc cggctgtcct acagtcctca	600

```

ggactctact ccctcagcag cgtggtgacc gtgcctcca gcagcttggg cacccagacc      660
tacatctgca acgtgaatca caagcccagc aacaccaagg tggacaagaa agttgagccc      720
aaatcttgtg acaaaactca cacatgccca ccgtgcccag cacctgaagc cgaggggggca      780
ccgtcagttc tctcttccc cccaaaacc aaggacacc tcctgatctc ccggaccct      840
gaggtcacat gcgtggtggt ggacgtgagc cacgaagacc ctgaggtcaa gttcaactgg      900
tacgtggacg gcgtggaggt gcataatgcc aagacaaagc cgcgggagga gcagtacaac      960
agcacgtacc gtgtggtcag cgtcctcacc gtctgcacc aggactggct gaatggcaag     1020
gagtacaagt gcaaggtctc caacaaagcc ctccatcct ccatcgagaa aaccatctcc     1080
aaagccaaag ggcagccccg agaaccacag gtgtacacc tgcccccac cgggatgag      1140
ctgaccaaga accaggtcag cctgacctgc ctggtcaaag gcttctatcc cagcgacac      1200
gccgtggagt gggagagcaa tgggcagccg gagaacaact acaagaccac gcctcccg      1260
ctggactccg acggctcctt ctctctctac agcaagctca ccgtggacaa gagcaggtgg      1320
cagcagggga acgtcttctc atgctccgtg atgcatgagg ctctgcacaa ccactacacg      1380
cagaagagcc totccctgtc tccgggtggt ggcgggggtt cgggtggagg aggttctgaa      1440
gttcaattgt tagagtctgg tggcgtctt gttcagcctg gtggttctt acgtcttct      1500
tgcgctgctt ccggattcac tttctcttgg tacgatatgg tttgggttcg ccaagctct      1560
ggtaaagggt tggagtggtt ttctgttacc tctcttctg gtggtggac ttcttatgct      1620
gactccgtta aaggtcgctt cactatctct agagacaact ctaagaatac tctctacttg      1680
cagatgaaca gcttaagggc tgaggacacg gccgtgtatt actgtgcgag agatcatagt      1740
ggctacgatt ctgaatactt tgactactgg ggccagggca ccctggtcac cgtctcaagc      1800
ggtggtggtg gttctggcgg cggcggctcc ggcgggggtg gaagtgggtg tgggtggttct      1860
ggtggtggtg gttctaact ccagatgacc cagtctccat cctccctgtc tgcatctgta      1920
ggagacagag tcaccatcac ttgccgggca agtcagagca ttagcagcta tttaaattgg      1980
tatcagcaga aaccaggga agcccctaag ctctgatct atgctgcac cagtttgcaa      2040
agtggggtcc catcaagggt cagtggcagt ggatctggga cagatttcac tctcaccac      2100
agcagttctg aacctgaaga ttttgcaact tactactgtc aacagagtta cagtaccccg      2160
tacacttttg gccaggggac caagctggag atcaaa      2196

```

<210> 640  
 <211> 732  
 <212> PRT  
 <213> Artificial

<220>  
 <223> IgG1.1 enlazadora de 10 monómeros en biAb c600.1-c1039.1

<400> 640

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

Ala Glu Gly Ala Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp  
 260 265 270  
 Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp  
 275 280 285  
 Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly  
 290 295 300  
 Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn  
 305 310 315 320  
 Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp  
 325 330 335  
 Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro  
 340 345 350  
 Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu  
 355 360 365  
 Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn  
 370 375 380  
 Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile  
 385 390 395 400  
 Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr  
 405 410 415  
 Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys  
 420 425 430  
 Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys  
 435 440 445  
 Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu  
 450 455 460  
 Ser Leu Ser Pro Gly Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Glu  
 465 470 475 480  
 Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser  
 485 490 495  
 Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Trp Tyr Asp  
 500 505 510  
 Met Val Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ser



515					520					525					
Val	Ile	Ser	Pro	Ser	Gly	Gly	Trp	Thr	Ser	Tyr	Ala	Asp	Ser	Val	Lys
530						535					540				
Gly	Arg	Phe	Thr	Ile	Ser	Arg	Asp	Asn	Ser	Lys	Asn	Thr	Leu	Tyr	Leu
545					550					555					560
Gln	Met	Asn	Ser	Leu	Arg	Ala	Glu	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	Ala
				565					570					575	
Arg	Asp	His	Ser	Gly	Tyr	Asp	Ser	Glu	Tyr	Phe	Asp	Tyr	Trp	Gly	Gln
			580					585					590		
Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly
	595						600					605			
Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly
	610					615					620				
Ser	Asn	Ile	Gln	Met	Thr	Gln	Ser	Pro	Ser	Ser	Leu	Ser	Ala	Ser	Val
625					630					635					640
Gly	Asp	Arg	Val	Thr	Ile	Thr	Cys	Arg	Ala	Ser	Gln	Ser	Ile	Ser	Ser
				645					650					655	
Tyr	Leu	Asn	Trp	Tyr	Gln	Gln	Lys	Pro	Gly	Lys	Ala	Pro	Lys	Leu	Leu
			660					665					670		
Ile	Tyr	Ala	Ala	Ser	Ser	Leu	Gln	Ser	Gly	Val	Pro	Ser	Arg	Phe	Ser
		675					680					685			
Gly	Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Asp	Phe	Thr	Leu	Thr	Ile	Ser	Ser	Leu	Gln
	690					695					700				
Pro	Glu	Asp	Phe	Ala	Thr	Tyr	Tyr	Cys	Gln	Gln	Ser	Tyr	Ser	Thr	Pro
705					710					715					720
Tyr	Thr	Phe	Gly	Gln	Gly	Thr	Lys	Leu	Glu	Ile	Lys				
				725					730						

<210> 641  
 <211> 990  
 <212> ADN  
 <213> Artificial

<220>  
 <223> ADNc de IgG1.1

<400> 641

gcctccacca agggcccatc ggtcttcccg ctagcaccct cctccaagag cacctctggg 60

ggcacagcag ccctgggctg cctgggtcaag gactacttcc ccgaaccggt gacggtgtcg 120

tggaaactcag gcgccctgac caggggcgtg cacaccttcc cggctgtcct acagtccctca 180

ggactctact ccctcagcag cgtgggtgacc gtgccctcca gcagcttggg caccagacc 240

tacatctgca acgtgaatca caagcccagc aacaccaagg tggacaagaa agttgagccc 300

aaatcttgtg acaaaactca cacatgccca ccgtgccag cacctgaagc cgagggggca 360

ccgtcagtc tctcttccc cccaaaaccc aaggacaccc tcatgatctc ccggaccct 420

gaggtcacat gcgtgggtgt ggacgtgagc cacgaagacc ctgaggtcaa gttcaactgg 480

tacgtggacg gcgtggaggt gcataatgcc aagacaaagc cgcgggagga gcagtacaac 540

agcacgtacc gtgtggtcag cgtcctcacc gtcctgcacc aggactggct gaatggcaag 600

gagtacaagt gcaaggtctc caacaaagcc ctcccatcct ccatcgagaa aaccatctcc 660

aaagccaaag ggcagccccc agaaccacag gtgtacaccc tgcccccatc ccgggatgag 720

ctgaccaaga accaggtcag cctgacctgc ctgggtcaaag gcttctatcc cagcgacatc 780

gcogtggagt gggagagcaa tgggcagccg gagaacaact acaagaccac gcctcccggtg 840

ctggactccg acggctcctt ctccctctac agcaagctca ccgtggacaa gagcaggtgg 900

cagcagggga acgtcttctc atgctccgtg atgcatgagg ctctgcaaaa ccactacacg 960

cagaagagcc tctccctgtc tccgggtaaa 990

<210> 642  
 <211> 330  
 <212> PRT  
 <213> Artificial

<220>  
 <223> IgG1.1

<400> 642

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

Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr  
20 25 30

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser  
35 40 45

Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser  
50 55 60

Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr  
65 70 75 80

Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys

85								90				95			
Lys	Val	Glu	Pro	Lys	Ser	Cys	Asp	Lys	Thr	His	Thr	Cys	Pro	Pro	Cys
100								105				110			
Pro	Ala	Pro	Glu	Ala	Glu	Gly	Ala	Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro
115								120				125			
Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys
130								135				140			
Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	His	Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Lys	Phe	Asn	Trp
145								150				155			
Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu
165								170				175			
Glu	Gln	Tyr	Asn	Ser	Thr	Tyr	Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu
180								185				190			
His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn
195								200				205			
Lys	Ala	Leu	Pro	Ser	Ser	Ile	Glu	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly
210								215				220			
Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro	Ser	Arg	Asp	Glu
225								230				235			
Leu	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser	Leu	Thr	Cys	Leu	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr
245								250				255			
Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	Val	Glu	Trp	Glu	Ser	Asn	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn
260								265				270			
Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro	Pro	Val	Leu	Asp	Ser	Asp	Gly	Ser	Phe	Phe
275								280				285			
Leu	Tyr	Ser	Lys	Leu	Thr	Val	Asp	Lys	Ser	Arg	Trp	Gln	Gln	Gly	Asn
290								295				300			
Val	Phe	Ser	Cys	Ser	Val	Met	His	Glu	Ala	Leu	His	Asn	His	Tyr	Thr
305								310				315			
Gln	Lys	Ser	Leu	Ser	Leu	Ser	Pro	Gly	Lys						
325								330							

<211> 696  
<212> ADN  
<213> Artificial

5

<220>  
<223> ADNc de Fc5

<400> 643

```

gagcccaaat cttcagacaa aactcacaca tgcccaccgt gcccagcacc tgaagccgag      60
ggggcaccgt cagtcttcct cttcccccca aaaccceaagg acaccctcat gatctcccgg      120
acccttgagg tcacatgcgt ggtggtggac gtgagccacg aagaccctga ggtcaagtcc      180
aactggtacg tggacggcgt ggaggtgcat aatgccaaaga caaagccgcg ggaggagcag      240
tacaacagca cgtaccgtgt ggtcagcgtc ctccaccgtcc tgcaccagga ctggtctgaat      300
ggcaaggagt acaagtgcaa ggtctccaac aaagccctcc catcctccat cgagaaaacc      360
atctccaaag ccaaagggca gccccgagaa ccacaggtgt acaccctgcc cccatcccgg      420
gatgagctga ccaagaacca ggtcagcctg acctgcctgg tcaaaggctt ctatcccagc      480
gacatcgccg tggagtggga gagcaatggg cagccggaga acaactacaa gaccacgcct      540
cccgtgctgg actccgacgg ctctctcttc ctctacagca agtcaccgt ggacaagagc      600
aggtggcagc aggggaacgt cttctcatgc tccgtgatgc atgaggctct gcacaaccac      660
tacacgcaga agagcctctc cctgtctccg ggtaaa      696

```

10

<210> 644  
<211> 409  
<212> PRT  
<213> Artificial

15

<220>  
<223> FcRn de cadena sencilla (scFcRn)

20

<400> 644

```
Met Ser Arg Ser Val Ala Leu Ala Val Leu Ala Leu Leu Ser Leu Ser
1          5          10          15
```

Gly Leu Glu Ala Ile Gln Arg Thr Pro Lys Ile Gln Val Tyr Ser Arg  
20 25 30

His Pro Ala Glu Asn Gly Lys Ser Asn Phe Leu Asn Cys Tyr Val Ser  
35 40 45

Gly Phe His Pro Ser Asp Ile Glu Val Asp Leu Leu Lys Asn Gly Glu  
50 55 60

Arg Ile Glu Lys Val Glu His Ser Asp Leu Ser Phe Ser Lys Asp Trp  
65 70 75 80

Ser Phe Tyr Leu Leu Tyr Tyr Thr Glu Phe Thr Pro Thr Glu Lys Asp  
85 90 95

Glu Tyr Ala Cys Arg Val Asn His Val Thr Leu Ser Gln Pro Lys Ile  
 100 105 110

Val Lys Trp Asp Arg Asp Met Gly Gly Ser Gly Ser Gly Ser Gly Gly  
 115 120 125

Ser Gly Ser Gly Gly Ser Ala Glu Ser His Leu Ser Leu Leu Tyr His  
 130 135 140

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

Ser Gly Trp Leu Gly Pro Gln Gln Tyr Leu Ser Tyr Asn Ser Leu Arg  
 165 170 175

Gly Glu Ala Glu Pro Cys Gly Ala Trp Val Trp Glu Asn Gln Val Ser  
 180 185 190

Trp Tyr Trp Glu Lys Glu Thr Thr Asp Leu Arg Ile Lys Glu Lys Leu  
 195 200 205

Phe Leu Glu Ala Phe Lys Ala Leu Gly Gly Lys Gly Pro Tyr Thr Leu  
 210 215 220

Gln Gly Leu Leu Gly Cys Glu Leu Gly Pro Asp Asn Thr Ser Val Pro  
 225 230 235 240

Thr Ala Lys Phe Ala Leu Asn Gly Glu Glu Phe Met Asn Phe Asp Leu  
 245 250 255

Lys Gln Gly Thr Trp Gly Gly Asp Trp Pro Glu Ala Leu Ala Ile Ser  
 260 265 270

Gln Arg Trp Gln Gln Gln Asp Lys Ala Ala Asn Lys Glu Leu Thr Phe  
 275 280 285

Leu Leu Phe Ser Cys Pro His Arg Leu Arg Glu His Leu Glu Arg Gly  
 290 295 300

Arg Gly Asn Leu Glu Trp Lys Glu Pro Pro Ser Met Arg Leu Lys Ala  
 305 310 315 320

Arg Pro Ser Ser Pro Gly Phe Ser Val Leu Thr Cys Ser Ala Phe Ser  
 325 330 335

Phe Tyr Pro Pro Glu Leu Gln Leu Arg Phe Leu Arg Asn Gly Leu Ala  
 340 345 350

# ES 2 456 296 T3

Ala Gly Thr Gly Gln Gly Asp Phe Gly Pro Asn Ser Asp Gly Ser Phe  
355 360 365

His Ala Ser Ser Ser Leu Thr Val Lys Ser Gly Asp Glu His His Tyr  
370 375 380

Cys Cys Ile Val Gln His Ala Gly Leu Ala Gln Pro Leu Arg Val Glu  
385 390 395 400

Leu Gly Ser His His His His His His  
405

5 <210> 645  
<211> 35  
<212> ADN  
<213> Artificial

10 <220>  
<223> Cebador oligonucleotídico zc60375

<400> 645  
atatatgtgc actctgacat ccagatgacc cagtc 35

15 <210> 646  
<211> 23  
<212> ADN  
<213> Artificial

20 <220>  
<223> Cebador oligonucleotídico zc60376

<400> 646  
ggagggtgct agcgggaaga ccg 23

25 <210> 647  
<211> 7479  
<212> ADN  
<213> Artificial

30 <220>  
<223> pZMP31

<400> 647

cagtcacgac gttgtaaaac gacggccagt gagtgcggtt gcattagtta ttaatagtaa 60

tcaattacgg ggtcattagt tcatagocca tatatggagt tccgcgttac ataacttacg 120

gtaaatggcc cgcttggtg accgcccaac gaccccgcc cattgacgtc aataatgacg 180

tatgttccca tagtaacgcc aatagggact ttccattgac gtcaatgggt ggagtattta 240

cggtaaactg cccacttggt agtacatcaa gtgtatcata tgccaagtac gcccctatt 300

gacgtcaatg acggtaaatg gcccgctgg cattatgccc agtacatgac cttatgggac 360

tttctactt ggcagtacat ctacgtatta gtcacgcta ttaccatggt gatgcgggtt 420

tggcagtaca tcaatgggcg tggatagcgg ttgactcac ggggatttcc aagtcctccac 480

35



cccattgacg tcaatgggag tttgttttgc aatgaaagac cccacctgta ggtttggcaa	540
gctagcttaa gtaacgccat ttgcaaggca tggaaaaata cataactgag aatagagaag	600
ttcagatcaa ggtcaggaac agagaaacag gagaatatgg gccaaacagg atatctgtgg	660
taagcagttc ctgccccgct cagggccaag aacagttgga acaggagaat atgggccaaa	720
caggatatct gtggttaagca gttcctgccc cgctcagggc caagaacaga tgggtcccag	780
atcgggtccc ccctcagcag tttctagaga accatcagat gtttcagggy tgccccaagg	840
acctgaaatg accctgtgcc ttatttgaac taaccaatca gttcgcttct cgcttctgtt	900
cgcgcgcttc tgctcccga gctcaataaa agagcccaca acccctcact cgcgcgcca	960
gtcctccgat agactgcgtc gcccggggct agoggcctcgt ggatctcagc tacaggtaag	1020
gggctcacag tagcaggctt gaggtctggc catatacatc ggtgacattg acatccactt	1080
tgcttttctc tccacagggtg tccagggaat tcatataggo cggccaccat ggatgcaatg	1140
aagagagggc tctgctgtgt gctgctgctg tgtggcgccg tcttcgtttc gctcagccag	1200
gaaatccatg ccgagttgag acgcttccgt agatcttaat ctagaggcgc gccttaaac	1260
agctctgggy ttgtaccac cccagaggcc cacgtggcgg ctagtactcc ggtattgcgg	1320
tacccttgta cgctgtttt atactccctt ccgtaactt agacgcacaa aaccaagttc	1380
aatagaaggg ggtacaaaacc agtaccacca cgaacaagca cttctgtttc ccgggtgatg	1440
tcgatatagac tgcttgctg gttgaaagcg gcggatccgt tatccgctta tgtacttoga	1500
gaagcccagt accacctcgg aatcttcgat gcgttgccgt cagcaotcaa cccagagtg	1560
tagcttaggc tgatgagctt ggacatccct caccggtgac ggtggtccag gctgcgttg	1620
cggcctacct atggctaacg ccatgggacg ctagttgtga acaagggtgtg aagagcctat	1680
tgagctacat aagaatcctc cggcccctga atgcggctaa tcccaacctc ggagcaggtg	1740
gtcacaaaacc agtgattggc ctgtcgtaac gcgcaagtc gtggcggaac cgactacttt	1800
gggtgtccgt gtttcctttt attttattgt ggtgcttat ggtgacaatc acagattgtt	1860
atcataaagc gaattggatt gcatggttcg accattgaac tgcctcgtcg ccgtgtccca	1920
aaatatgggg attggcaaga acggagacct accctggcot ccgctcagga acgagttcaa	1980
gtacttccaa agaatgacca caacctcttc agtggaaggt aaacagaatc tgggtgattat	2040
gggtaggaaa acctggttct ccattcctga gaagaatoga cctttaaagg acagaattaa	2100
tatagttctc agtagagaac tcaagaacc accacgagga gctcattttc ttgccaaaag	2160
tttgatgat gccttaagac ttattgaaca accggaattg gcaagtaaag tagacatggt	2220
ttggatagtc ggaggcagtt ctgtttacca ggaagccatg aatcaaccag gccacctcag	2280
actctttgtg acaaggatca tgcaggaatt tgaagtgac acgtttttcc cagaaattga	2340
tttggggaaa tataaacttc tcccagaata cccaggcgct ctctctgagg tocaggagga	2400
aaaaggcatc aagtataagt ttgaagtcta cgagaagaaa gactaacagg aagatgcttt	2460

caagttctct gctccccctcc taaagctatg cattttttata agaccatggg acttttgctg	2520
gcttttagatc ataatcagcc ataccacatt tgtagaggtt ttacttgott taaaaaacct	2580
cccacacctc cccctgaacc tgaaacataa aatgaatgca attgttggtg ttaacttggt	2640
tattgcagct tataatgggtt acaataaag caatagcatc acaaatttca caaataaagc	2700
atTTTTTTca ctgcattcta gttgtgggtt gtccaaaetc atcaatgtat cttatcatgt	2760
ctggagagag actagtagag agtatcgata gagagcgatc gaattaattc gtaatcatgt	2820
catagctgtt tctgtgtga aattgttata cgctcacaat tccacacaac atacgagccg	2880
gaagcataaa gtgtaaagcc tgggggtgctt aatgagttag ctaactcaca ttaattgogt	2940
tgcgctcact gcccgctttc cagtcgggaa acctgtcgtg ccagctgcat taatgaatcg	3000
gccaacgcgc ggggagaggc gggttgcgta ttggggcgctc ttccgcttcc tcgctcactg	3060
actcgctgcg ctcggtcggt cggtcgcggc gagcggtatc agctcactca aaggcggtaa	3120
tacggttatc cacagaatca ggggataacg caggaaagaa catgtgagca aaaggccagc	3180
aaaaggccag gaaccgtaaa aaggccgcgt tgctggcggtt ttcccatagg ctccgcccc	3240
ctgacgagca tcacaaaaat cgacgctcaa gtcagaggtg gcgaaacccg acaggactat	3300
aaagatacca ggcgtttccc cctggaagct cctcgtgog ctctcctgtt ccgaccctgc	3360
cgcttaccgg atacctgtcc gcctttctcc ctccgggaag cgtggcgctt tctcatagct	3420
cacgctgtag gtatctcagt tcgggtgtagg tcgttcgctc caagctgggc tgtgtgcacg	3480
aacccccctg tcagcccgac cgctgogcct tatccggtaa ctatcgtctt gagtccaacc	3540
cggtaagaca cgacttatcg ccactggcag cagccactgg taacaggatt agcagagcga	3600
ggtatgtagg cgtgtctaca gagttcttga agtggtggcc taactacggc tacactagaa	3660
gaacagtatt tggatatctgc gctctgctga agccagttac ctccggaaaa agagttggta	3720
gctcttgatc cggcaaacaa accaccgctg gtagcggtag tttttttgtt tgcaagcagc	3780
agattacgcg cagaaaaaaa ggatctcaag aagatccttt gatcttttct acgggggtctg	3840
acgctcagtg gaacgaaaac tcacgttaag ggattttggt catgagatta tcaaaaagga	3900
tcttcaccta gatcctttta aattaaaaat gaagttttta atcaatctaa agtatatatg	3960
agtaaaactg gtctgacagt taccaatgct taatcagtga ggcacctatc tcagcgatct	4020
gtctattttg ttcatccata gttgcctgac tccccgtcgt gtagataact acgatacggg	4080
agggcttacc atctggcccc agtgctgcaa tgataccgog agaccacgc tcaccggctc	4140
cagatttatc agcaataaac cagccagccg gaagggcga ggcagaaagt ggtcctgcaa	4200
ctttatccgc ctccatccag tctattaatt gttgccggga agctagagta agtagttcgc	4260
cagttaatag tttgcgcaac gttgttgcca ttgctacagg catcgtggtg tcacgctcgt	4320
cgtttggtat ggcttcattc agctccggtt cccaacgata aaggcgagtt acatgatccc	4380

ccatgttggtg	caaaaaagcg	gttagctcct	tcggtcctcc	gatcgttggtc	agaagtaagt	4440
tggccgcaggt	gttatcactc	atggttatgg	cagcaactgca	taattctctt	actgtcatgc	4500
catccgtaag	atgcttttct	gtgactgggt	agtactcaac	caagtcattc	tgagaatagt	4560
gtatgogggc	accgagttgc	tcttgcccg	cgtcaatacg	ggataatacc	gogccacata	4620
gcagaacttt	aaaagtgtc	atcattggaa	aacgttcttc	ggggcgaaaa	ctctcaagga	4680
tcttacccgt	gttgagatcc	agttcgatgt	aacccactcg	tgcacccaac	tgatcttcag	4740
catcttttac	tttcaccagc	gtttctgggt	gagcaaaaac	aggaaggcaa	aatgcgcgaa	4800
aaaagggaat	aaggcgaca	oggaaatgtt	gaatactcat	actcttctt	tttcaatatt	4860
attgaagcat	ttatcaggg	tattgtctca	tgagcggata	catatttgaa	tgtatttaga	4920
aaaataaaca	aataggggtt	ccgcgcacat	ttccccgaaa	agtgccacct	gggtcctttt	4980
catcacgtgc	tataaaaaata	attataattt	aaatttttta	atataaatat	ataaattaaa	5040
aatagaaagt	aaaaaaagaa	attaaagaaa	aaatagtttt	tgttttccga	agatgtaaaa	5100
gactctaggg	ggatcgccaa	caaatactac	cttttatctt	gctcttcttg	ctctcaggt	5160
ttaatgccga	attgtttcat	cttgtctgtg	tagaagacca	cacacgaaaa	tctgtgatt	5220
ttacatttta	cttatcgta	atcgaatgta	tatctattta	atctgctttt	cttgtctaat	5280
aaatatatat	gtaaagtacg	ctttttgttg	aaatttttta	aacctttgtt	tatttttttt	5340
tcttcattcc	gtaactcttc	tacottcttt	atttactttc	taaaatccaa	atacaaaaca	5400
taaaaataaa	taaacacaga	gtaaattccc	aaattattcc	atcattaaaa	gatacgaggc	5460
gogtgtaagt	tacaggcaag	cgatccgtct	aagaaacct	tattatcatg	acattaacct	5520
ataaaaatag	gogtatcacg	aggccctttc	gtctcgcgcg	ttcgggtgat	gacggtgaaa	5580
acctctgaca	catgcagctc	ccggagacgg	tcacagcttg	tctgtaagcg	gatgccggga	5640
gcagacaagc	ccgtcagggc	gcgtcagcgg	gtgttgggcg	gtgtcggggc	tggcttaact	5700
atgcggcatc	agagcagatt	gtactgagag	tgcaccatac	caccttttca	attcatcatt	5760
ttttttttat	tctttttttt	gatttcgggt	tccttgaaat	ttttttgatt	cggtaatctc	5820
cgaacagaag	gaagaacgaa	ggaaggagca	cagacttaga	ttggtatata	tacgcatatg	5880
tagtggtgaa	gaaacatgaa	attgccaggt	attottaacc	caactgcaca	gaacaaaaac	5940
ctgcaggaaa	cgaagataaa	tcatgtcgaa	agctacatat	aaggaacgtg	ctgctactca	6000
tcctagtctt	gttgctgcca	agctatttaa	tatcatgcac	gaaaagcaaa	caaacttggt	6060
tgcttcattg	gatgttcgta	ccaccaagga	attactggag	ttagttgaag	cattaggtcc	6120
caaaatttgt	ttactaaaaa	cacatgtgga	tatcttgact	gattttttcca	tggagggcac	6180
agttaagcog	ctaaaggcat	tatccgccaa	gtacaatttt	ttactcttcg	aagacagaaa	6240
atttgctgac	attggttaata	cagtcaaatt	gcagtactct	gcgggtgtat	acagaatagc	6300
agaatgggca	gacattacga	atgcacacgg	tgtggtgggc	ccaggtattg	ttagcggttt	6360

gaagcaggcg gcagaagaag taacaaagga acctagaggc cttttgatgt tagcagaatt 6420  
 gtcattgcaag ggctccctat ctactggaga atataactaag ggtactgttg acattgcaaa 6480  
 gagcgacaaa gattttgtta tcggctttat tgctcaaaga gacatgggtg gaagagatga 6540  
 aggttacgat tggttgatta tgacaccggg tgtgggttta gatgacaagg gagacgcatt 6600  
 gggtaaacag tatagaaccg tggatgatgt ggtctctaca ggatctgaca ttattattgt 6660  
 tggaagagga ctatttgcaa aggggaagga tgctaaggta gagggtgaac gttacagaaa 6720  
 agcaggctgg gaagcatatt tgagaagatg cggccagcaa aactaaaaaa ctgtattata 6780  
 agtaaatgca tgtatactaa actcacaat tagagcttca atttaattat atcagttatt 6840  
 accctatgcg gtgtgaaata ccgcacagat gcgtaaggag aaaataccgc atcaggaaat 6900  
 tgtaagcgtt aatattttgt taaaattcgc gttaaatttt tgttaaatca gtcatttttt 6960  
 taaccaatag gccgaaatcg gcaaaatccc ttataaatca aaagaataga ccgagatagg 7020  
 gttgagtgtt gttccagttt ggaacaagag tccactatta aagaacgtgg actccaacgt 7080  
 caaagggcga aaaaccgtct atcagggcga tggccacta cgtgaaccat caccctaata 7140  
 aagttttttg gggtcgaggt gccgtaaagc actaaatcgg aaccctaaag ggagcccccg 7200  
 atttagagct tgacggggaa agccggcgaa cgtggcgaga aaggaaggga agaaagcgaa 7260  
 aggagcgggc gctagggcgc tggcaagtgt agcggtcacg ctgcgcgtaa ccaccacacc 7320  
 cgccgcgctt aatgcgccgc tacagggcgc gtccattcgc cattcaggct gcgcaactgt 7380  
 tgggaagggc gatcgggtcg ggccctctcg ctattacgcc agctggcgaa agggggatgt 7440  
 gctgcaaggc gattaagttg ggtaacgccg gggttttcc 7479

<210> 648  
 <211> 8133  
 <212> ADN  
 <213> Artificial

<220>  
 <223> pZMP31-ms 26-10VH-Fc5

<400> 648

cagtcacgac gttgtaaaac gacggccagt gagtgcggtt gcattagtta ttaatagtaa 60  
 tcaattacgg ggtcattagt tcatagccca tatatggagt tccgcgttac ataacttacg 120  
 gtaaatggcc cgcctggctg accgcccaac gacccccgcc cattgacgtc aataatgacg 180  
 tatgttccca tagtaacgcc aatagggact ttccattgac gtcaatgggt ggagtattta 240  
 cggtaaaactg cccacttggc agtacatcaa gtgtatcata tgccaagtac gccccctatt 300  
 gacgtcaatg acggtaaatg gccgcgctgg cattatgccc agtacatgac cttatgggac 360  
 tttccctactt ggcagtacat ctacgtatta gtcacgcta ttaccatggt gatgcggttt 420  
 tggcagtaca tcaatgggcg tggatagcgg tttgactcac ggggatttcc aagtctccac 480

cccattgacg tcaatgggag tttgttttgc aatgaaagac cccacctgta ggtttggcaa	540
gctagcttaa gtaacgccat ttgcaaggca tggaaaaata cataactgag aatagagaag	600
ttcagatcaa ggtcaggaac agagaaacag gagaatatgg gccaaacagg atatctgtgg	660
taagcagttc ctgccccgct cagggccaag aacagttgga acaggagaat atgggcaaaa	720
caggatatct gtggtaaagca gttcctgccc cgctcagggc caagaacaga tgggtccccag	780
atcgggtcccg ccctcagcag tttctagaga accatcagat gtttccaggg tgccccaaag	840
acctgaaatg accctgtgcc ttatttgaac taaccaatca gttcgtttct cgcttctgtt	900
cgcgcgcttc tgcctccoga gctcaataaa agagcccaca acccctcact cggcgcgcca	960
gtcctccgat agactgcgtc gcccggggct agcggctcgt ggatctcagc tacaggtaag	1020
gggtcacag tagcaggctt gaggtctggc catatacatc ggtgacattg acatccactt	1080
tgcctttctc tccacaggtg tccagggaat tcatataggc cggccaccat gaagttgcct	1140
gttaggctgt tgggtgctgat gttctggatt cctgcttcca gcagtgcggc cgcgagccca	1200
aatcttcaga caaaactcac acatgcccac cgtgccagc acctgaagcc gagggggcac	1260
cgtcagttct cctcttcccc ccaaaaccca aggacacct catgatctcc cggacccctg	1320
aggtcacatg cgtgggtggtg gacgtgagcc acgaagaccc tgagggtcaag ttcaactggt	1380
acgtggacgg cgtggagggtg cataatgcc aagacaaagcc gcgggaggag cagtacaaca	1440
gcacgtaccg tgtggtcagc gtcctcaccg tctgcacca ggactggctg aatggcaagg	1500
agtacaagtg caaggtctcc aacaaagccc tcccatctc catcgagaaa accatctcca	1560
aagccaaagg gcagccccga gaaccacagg tgtacacct gcccccatcc cgggatgagc	1620
tgaccaagaa ccaggtcagc ctgacctgcc tgggtcaaagg cttctatccc agcgacatcg	1680
cogtggagtg ggagagcaat gggcagccgg agaacaacta caagaccacg cctcccgtc	1740
tggactccga cggctccttc ttctctaca gcaagctcac cgtggacaag agcaggtggc	1800
agcaggggaa cgtcttctca tgcctcgtga tgcattgaggc tctgcacaac cactacacgc	1860
agaagagcct ctccctgtct ccgggtaaat aaatctagag gcgcgcctta aaacagctct	1920
ggggttgtag ccaccccaga ggcccacgtg gcggctagta ctccggtatt gcggtacct	1980
tgtacgcctg ttttatactc ccttcccgtg acttagacgc aaaaaaccaa gttcaataga	2040
agggggtaca aaccagtacc accacgaaca agcacttctg tttccccggt gatgtcgtat	2100
agactgottg cgtggttgaa agcggcggat cgttatccg cttatgtact tgcagaagcc	2160
cagtaccacc tcggaatctt cgatgcgttg cgctcagcac tcaaccccag agtgtagctt	2220
aggctgatga gtctggacat ccctcacggg tgaagggtgt ccagggtgag ttggcggcct	2280
acctatggct aacgccatgg gacgctagtt gtgaacaagg tgtgaagagc ctattgagct	2340
acataagaat cctccggccc ctgaatgcgg ctaatcccaa cctcggagca ggtggtcaca	2400
aaccagtgat tggcctgtcg taacgcgcaa gtccgtggcg gaaccgacta ctttgggtgt	2460

cogtgtttcc	ttttatttta	ttgtggctgc	ttatggtgac	aatcacagat	tgttatcata	2520
aagogaattg	gattgcatgg	ttcgaccatt	gaactgcac	gtcgccgtgt	cccaaatat	2580
ggggattggc	aagaacggag	acctaccctg	gcctccgctc	aggaacgagt	tcaagtactt	2640
ccaaagaatg	accacaacct	cttcagtggg	aggtaaacag	aatctggtga	ttatgggtag	2700
gaaaacctgg	ttctccattc	ctgagaagaa	tcgaccttta	aaggacagaa	ttaatatagt	2760
tctcagtaga	gaactcaaag	aaccaccacg	aggagctcat	tttcttgcca	aaagtttgga	2820
tgatgcctta	agacttattg	aacaaccgga	attggcaagt	aaagtagaca	tggtttggat	2880
agtcggaggc	agttctgttt	accaggaagc	catgaatcaa	ccaggccacc	tcagactcct	2940
tgtgacaagg	atcatgcagg	aatttgaaag	tgacacgttt	ttcccagaaa	ttgatttggg	3000
gaaatataaa	cttctccag	aatacccagg	cgctctctct	gaggtccagg	aggaaaaagg	3060
catcaagtat	aagtttgaag	totacgagaa	gaaagactaa	caggaagatg	ctttcaagtt	3120
ctctgctccc	ctcctaaagc	tatgcatttt	tataagacca	tgggactttt	gctggcttta	3180
gatcataatc	agccatacca	catttgtaga	ggttttactt	gctttaaaaa	acctcccaca	3240
cctccccctg	aacctgaaac	ataaaatgaa	tgcaattggt	gttgtttaact	tgttttattgc	3300
agcttataat	ggttacaaat	aaagcaatag	catcacaaat	ttcacaaata	aagcattttt	3360
ttcactgcat	tctagttgtg	gtttgtccaa	actcatcaat	gtatcttata	atgtctggag	3420
agagactagt	agagagtata	gatagagagc	gatcgaatta	attcgtaata	atgtcatagc	3480
tgtttctctg	gtgaaattgt	tatccgctca	caattccaca	caacatacga	gcgggaagca	3540
taaagtgtaa	agcctggggg	gcctaattgag	tgagctaact	cacattaatt	gcgttgcgct	3600
cactgcccgc	tttccagtcg	ggaaacctgt	cgtgccagct	gcattaatga	atcggccaac	3660
gcgcggggag	aggcggtttg	cgtattgggc	gctcttcgcg	ttcctcgctc	actgactcgc	3720
tgcgctcggt	cggtcggtcg	cggcgagcgg	tatcagctca	ctcaaaggcg	gtaatacggg	3780
tatccacaga	atcaggggat	aacgcaggaa	agaacatgtg	agcaaaaggc	cagcaaaagg	3840
ccaggaaccg	taaaaaggcc	gcgttgctgg	cgtttttcca	taggctccgc	ccccctgacg	3900
agcatcacaa	aaatcgacgc	tcaagtcaga	ggtggcgaaa	cccgacagga	ctataaagat	3960
accaggcggt	tccccctgga	agctccctcg	tgcgctctcc	tgttccgacc	ctgcgcgtta	4020
ccggatacct	gtccgccttt	ctcccttcgg	gaagcgtggc	gctttctcat	agctcacgct	4080
gtaggtatct	cagttcggtg	taggtcgctc	gctccaagct	gggctgtgtg	cacgaacccc	4140
ccgttcagcc	cgaccgctgc	gccttatccg	gtaactatcg	tcttgagtcc	aacccggtaa	4200
gacacgactt	atcgccactg	gcagcagcca	ctggtaaacg	gattagcaga	gcgaggtatg	4260
tagggcgtgc	tacagagttc	ttgaagtggg	ggcctaacta	cggctacact	agaagaacag	4320
tatttggtat	ctgcgctctg	ctgaagccag	ttaccttcgg	aaaaagagtt	ggtagctctt	4380

gateccggcaa	acaaaccacc	gotggtagcg	gtggtttttt	tgtttgcaag	cagcagatta	4440
cgcgagaaaa	aaaaggatct	caagaagatc	ctttgatctt	ttctacgggg	tctgacgctc	4500
agtggaaacga	aaactcacgt	taagggaattt	tggtcatgag	attatcaaaa	aggatcttca	4560
cctagatcct	tttaaattaa	aatgaagtt	ttaaatcaat	ctaaagtata	tatgagtaaa	4620
cttggctctga	cagttaccaa	tgcttaatca	gtgaggcacc	tatctcagcg	atctgtctat	4680
ttcggttcac	catagttgcc	tgactccccc	tcgtgtagat	aactacgata	cgggagggct	4740
taccatctgg	cccagtgct	gcaatgatac	cgcgagaccc	acgctcaccg	gctccagatt	4800
tatcagcaat	aaaccagcca	gcgggaaggg	ccgagcgag	aagtggtoct	gcaactttat	4860
ccgcctccat	ccagtcatt	aattggtgcc	gggaagctag	agtaagtagt	tcgccagtta	4920
atagtttgcg	caacgttggt	gccattgcta	caggcatcgt	ggtgtcacgc	tcgtcgtttg	4980
gtatggcttc	attcagctcc	ggttcccaac	gatcaaggcg	agttacatga	tcccccatgt	5040
tgtgcaaaaa	agcggttagc	tccttcgggc	ctccgatcgt	tgtcagaagt	aagttggccg	5100
cagtgttatc	actcatggtt	atggcagcac	tgcataattc	tcttactgtc	atgccatccg	5160
taagatgctt	ttctgtgact	ggtgagtact	caaccaagtc	attctgagaa	tagtgtatgc	5220
ggcgaccgag	ttgctcttgc	ccggcgtcaa	tacgggataa	taccgcgcca	catagcagaa	5280
ctttaaaagt	gctcatcatt	ggaaaacgtt	cttcggggcg	aaaactctca	aggatcttac	5340
cgtgtttgag	atccagttcg	atgtaaccca	ctcgtgcacc	caactgatct	tcagcatctt	5400
ttactttcac	cagcgtttct	gggtgagcaa	aaacaggaag	gcaaaatgcc	gcaaaaaagg	5460
gaataagggc	gacacggaaa	tggtgaatac	tcatactctt	cctttttcaa	tattattgaa	5520
gcatttatca	gggttattgt	ctcatgagcg	gatacatatt	tgaatgtatt	tagaaaaata	5580
aacaaatagg	ggttccgcgc	acatttcccc	gaaaagtgcc	acctgggtcc	ttttcatcac	5640
gtgctataaa	aataattata	atttaaattt	tttaataata	atatataaat	taaaaataga	5700
aagtaaaaaa	agaaattaaa	gaaaaaatag	tttttgtttt	ccgaagatgt	aaaagactct	5760
aggggggatcg	ccaacaaata	ctacctttta	tcttgctctt	cctgctctca	ggtattaatg	5820
ccgaattggt	tcatcttgtc	tgtgtagaag	accacacacg	aaaatcctgt	gattttacat	5880
tttacttatc	gttaatcgaa	tgtatatcta	tttaactctgc	ttttcttgtc	taataaatat	5940
atatgtaaag	taagcttttt	gttgaaattt	tttaaacctt	tgtttatatt	ttttcttca	6000
ttccgtaact	cttctacctt	ctttattttac	tttctaaaat	ccaaatataa	aacataaaaa	6060
taaataaaca	cagagtaaat	tcccaaatta	ttccatcatt	aaaagatacg	aggcgcgtgt	6120
aagttacag	caagcgatcc	gtctaagaaa	ccattattat	catgacatta	acctataaaa	6180
ataggcgtat	cacgaggccc	tttcgtctcg	cgcgtttcgg	tgatgacggt	gaaaacctct	6240
gacacatgca	gctcccgag	acggtcacag	cttgtctgta	agcggatgcc	gggagcagac	6300
aagcccgta	gggcgcgtca	gcgggtgttg	gcgggtgtcg	gggctggctt	aactatgcgg	6360

catcagagca gattgtactg agagtgcacc ataccacott ttcaattcat catttttttt	6420
ttattctttt ttttgatttc ggtttccttg aaattttttt gattcggtta tctccgaaca	6480
gaaggaagaa cgaaggaagg agcacagact tagattggta tatatacgca tatgtagtgt	6540
tgaagaaaca tgaattgcc cagtattctt aacccaactg cacagaacaa aaacctgcag	6600
gaaacgaaga taaatcatgt cgaagctac atataaggaa cgtgctgcta ctcatcctag	6660
tcctgttgct gccaaactat ttaatatcat gcacgaaaag caaacaact tgtgtgcttc	6720
attggatgtt cgtaccacca aggaattact ggagttagtt gaagcattag gtcccaaat	6780
ttgtttacta aaaacacatg tggatatctt gactgatttt tccatggagg gcacagttaa	6840
gccgctaaag gcattatcog ccaagtacaa ttttttactc ttogaagaca gaaaatttgc	6900
tgacattggt aatacagtca aattgcagta ctctgcgggt gtatacagaa tagcagaatg	6960
ggcagacatt acgaatgcac acggtgtggt gggcccaggt attgttagcg gtttgaagca	7020
ggcggcagaa gaagtaacaa aggaacctag aggccttttg atgttagcag aattgtcatg	7080
caagggctcc ctatctactg gagaatatac taagggtact gttgacattg cgaagagcga	7140
caaagatttt gttatcggtt ttattgctca aagagacatg ggtggaagag atgaaggtta	7200
cgattgggtg attatgacac ccggtgtggg tttagatgac aaggagagcg cattgggtca	7260
acagtataga accgtggatg atgtggtctc tacaggatct gacattatta ttgttgaag	7320
aggactatth gcaaagggaa gggatgctaa ggtagagggt gaacgttaca gaaaagcagg	7380
ctgggaagca tatttgagaa gatgcggcca gcaaaactaa aaaactgtat tataagtaaa	7440
tgcattgata ctaaaactcac aaattagagc ttcaatttaa ttatatcagt tattacccta	7500
tgcgggtgtga aataccgcac agatgcgtaa ggagaaaata ccgcatcagg aaattgtaag	7560
cgttaatat tttgtaaaat tcgcgttaa tttttgttaa atcagctcat tttttaacca	7620
ataggccgaa atcggcaaaa tccottataa atcaaaagaa tagaccgaga taggggtgag	7680
tggtgttcca gtttgaaca agagtccact attaaagaac gtggactcca acgtcaaagg	7740
gcgaaaaacc gtctatcagg gcgatggccc actacgtgaa ccaccacct aatcaagttt	7800
tttggggctg aggtgccgta aagcactaaa tcggaaccct aaaggagacc cccgatttag	7860
agcttgacgg ggaagccgg cgaacgtggc gagaaaggaa ggaagaaaag cgaagggagc	7920
gggcgctagg gcgctggcaa gtgtagcggc cacgctgcgc gtaaccacca caccgcgcgc	7980
gottaatgcg ccgctacagg gcgcgtccat tcgccattca ggctgcgcaa ctgttgggaa	8040
gggcgatcgg tgcgggcctc ttcgctatta cgcagctgg cgaaggggg atgtgctgca	8100
aggcgattaa gttgggtaac gccagggttt tcc	8133

<210> 649  
 <211> 20  
 <212> PRT  
 <213> Artificial



<220>

<223> Péptido PDGFRbeta

<400> 649

5

**Leu Val Val Thr Leu His Glu Lys Lys Gly Asp Val Ala Leu Pro Val**  
**1 5 10 15**

**Pro Tyr Asp His**  
**20**

<210> 650

<211> 20

10

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Péptido PDGFRbeta

15

<400> 650

**Ile Thr Leu Met Cys Ile Val Ile Gly Asn Glu Val Val Asn Phe Glu**  
**1 5 10 15**

**Trp Thr Tyr Pro**  
**20**

20

## REIVINDICACIONES

1. Un anticuerpo biespecífico que neutraliza tanto PDGFR $\beta$  como VEGF-A, comprendiendo dicho anticuerpo biespecífico:

(I) una primera región de unión a antígeno que se une específicamente al dominio extracelular de PDGFR $\beta$  y neutraliza la actividad PDGFR $\beta$ , en donde dicha región de unión a PDGFR $\beta$  comprende un dominio V<sub>L</sub> (V<sub>L</sub>-PDGFR) que comprende las CDR LCDR1<sub>PDGFR</sub>, LCDR2<sub>PDGFR</sub> y LCDR3<sub>PDGFR</sub> y un dominio V<sub>H</sub> (V<sub>H</sub>-PDGFR) que comprende las CDR HCDR1<sub>PDGFR</sub>, HCDR2<sub>PDGFR</sub> y HCDR3<sub>PDGFR</sub>, en donde:

LCDR1<sub>PDGFR</sub>, LCDR2<sub>PDGFR</sub> y LCDR3<sub>PDGFR</sub> tienen las secuencias de aminoácidos mostradas, respectivamente, en los restos 24-40, los restos 56-62 y los restos 95-103 de la SEC ID N° 46; y

HCDR1<sub>PDGFR</sub>, HCDR2<sub>PDGFR</sub> y HCDR3<sub>PDGFR</sub> tienen las secuencias de aminoácidos mostradas, respectivamente, en los restos 31-35, los restos 50-66, y los restos 99-111 de la SEC ID N° 48; y

(II) una segunda región de unión a antígeno que se une específicamente a VEGF-A y neutraliza la actividad VEGF-A, en donde dicha región de unión a VEGF-A comprende un dominio V<sub>L</sub> (V<sub>L</sub>-VEGF) que comprende las CDR LCDR1<sub>VEGF</sub>, LCDR2<sub>VEGF</sub> y LCDR3<sub>VEGF</sub> y un dominio V<sub>H</sub> (V<sub>H</sub>-VEGF) que comprende las CDR HCDR1<sub>VEGF</sub>, HCDR2<sub>VEGF</sub> y HCDR3<sub>VEGF</sub>, en donde:

LCDR1<sub>VEGF</sub>, LCDR2<sub>VEGF</sub> y LCDR3<sub>VEGF</sub> tienen las secuencias de aminoácidos mostradas, respectivamente, en los restos 24-34, los restos 50-56 y los restos 89-97 de la SEC ID N° 278; y

HCDR1<sub>VEGF</sub>, HCDR2<sub>VEGF</sub> y HCDR3<sub>VEGF</sub> tienen las secuencias de aminoácidos mostradas, respectivamente, en los restos 31-35, los restos 50-66 y los restos 99-110 de la SEC ID N° 280;

en donde dicha primera región de unión a antígeno y dicha segunda región de unión a antígeno muestran, cada una, una afinidad de unión (K<sub>a</sub>) de 10<sup>8</sup> M<sup>-1</sup> o mayor.

2. El anticuerpo biespecífico de acuerdo con la reivindicación 1, en el que los dominios V<sub>L</sub>-PDGFR y V<sub>H</sub>-PDGFR comprenden las secuencias de aminoácidos mostradas en las SEC ID N° 46 y 48, respectivamente.

3. El anticuerpo biespecífico de acuerdo con la reivindicación 1, en el que los dominios V<sub>L</sub>-VEGF y V<sub>H</sub>-VEGF comprenden las secuencias de aminoácidos mostradas en las SEC ID N° 278 y 280, respectivamente.

4. Un anticuerpo biespecífico de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en el que V<sub>L</sub>-PDGFR, U<sub>H</sub>-PDGFR, V<sub>L</sub>-VEGF y V<sub>H</sub>-VEGF comprenden las secuencias de aminoácidos mostradas, respectivamente, en las SEC ID N° 46, 48, 278 y 280.

5. Un anticuerpo biespecífico de acuerdo con cualquier reivindicación anterior, en donde dicho anticuerpo biespecífico opcionalmente comprende una región constante de cadena pesada de inmunoglobulina, tal como un fragmento Fc.

6. El anticuerpo biespecífico de la reivindicación 5, en el que el fragmento Fc comprende una región Fc modificada para reducir o eliminar una o más funciones efectoras.

7. El anticuerpo biespecífico de la reivindicación 5, en donde dicho anticuerpo es un tascFv, un biscFv o un biAb.

8. El anticuerpo biespecífico de cualquier reivindicación anterior, en donde dicho anticuerpo biespecífico es un bi-Fv de cadena sencilla (biscFv).

9. El anticuerpo biespecífico de la reivindicación 8, en donde dicho biscFv comprende los restos aminoacídicos 20-773 de la SEC ID N° 628.

10. Una composición farmacéutica que comprende un anticuerpo biespecífico de acuerdo con cualquier reivindicación anterior; y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

11. Un polinucleótido aislado que codifica un anticuerpo biespecífico de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-9.

12. Un polinucleótido aislado de acuerdo con la reivindicación 11, en donde el polinucleótido comprende las secuencias de ácido nucleico de las SEC ID N° 45 y 47.

13. Un polinucleótido aislado de acuerdo con las reivindicaciones 11 ó 12, en donde el polinucleótido comprende las secuencias de ácido nucleico de las SEC ID N° 277 y 279.

14. Un vector de expresión que comprende el polinucleótido de cualquiera de las reivindicaciones 11-13.

15. Una célula huésped que comprende el vector de expresión de la reivindicación 14.

16. Un procedimiento para producir un anticuerpo biespecífico de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-

9, comprendiendo el procedimiento cultivar la célula huésped de la reivindicación 15 en condiciones en que se exprese el anticuerpo biespecífico; y aislar el anticuerpo biespecífico de la célula huésped.

17. Un anticuerpo biespecífico de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-9 para su uso como medicamento.

5 18. Uso de un anticuerpo biespecífico de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-9, para la fabricación de un medicamento para tratar un trastorno neovascular.

19. Un anticuerpo biespecífico de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-9, para uso en el tratamiento de un trastorno neovascular.

10 20. Uso de acuerdo con la reivindicación 18, o un anticuerpo biespecífico de la reivindicación 19 para su uso de acuerdo con la reivindicación 19, en el que el trastorno neovascular es:

(a) un cáncer **caracterizado por** crecimiento de tumores sólidos, tal como un cáncer seleccionado entre el grupo que consiste en cáncer pancreático, carcinoma de células renales (RCC), cáncer colorrectal, cáncer pulmonar no microcítico (NSCLC), tumor estromático gastrointestinal (GIST) y glioblastoma; o

15 (b) un trastorno ocular neovascular, tal como un trastorno ocular neovascular seleccionado entre el grupo que consiste en degeneración macular relacionada con la edad, retinopatía diabética, neovascularización del iris, glaucoma neovascular y vitrorretinopatía proliferativa.

						LC																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																															</
--	--	--	--	--	--	----	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	----

Fig. 1A

[illegible][illegible]

wt	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val	Tyr	Thr
Fc-488	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
Fc4	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
Fc5	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
Fc6	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
Fc7	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.

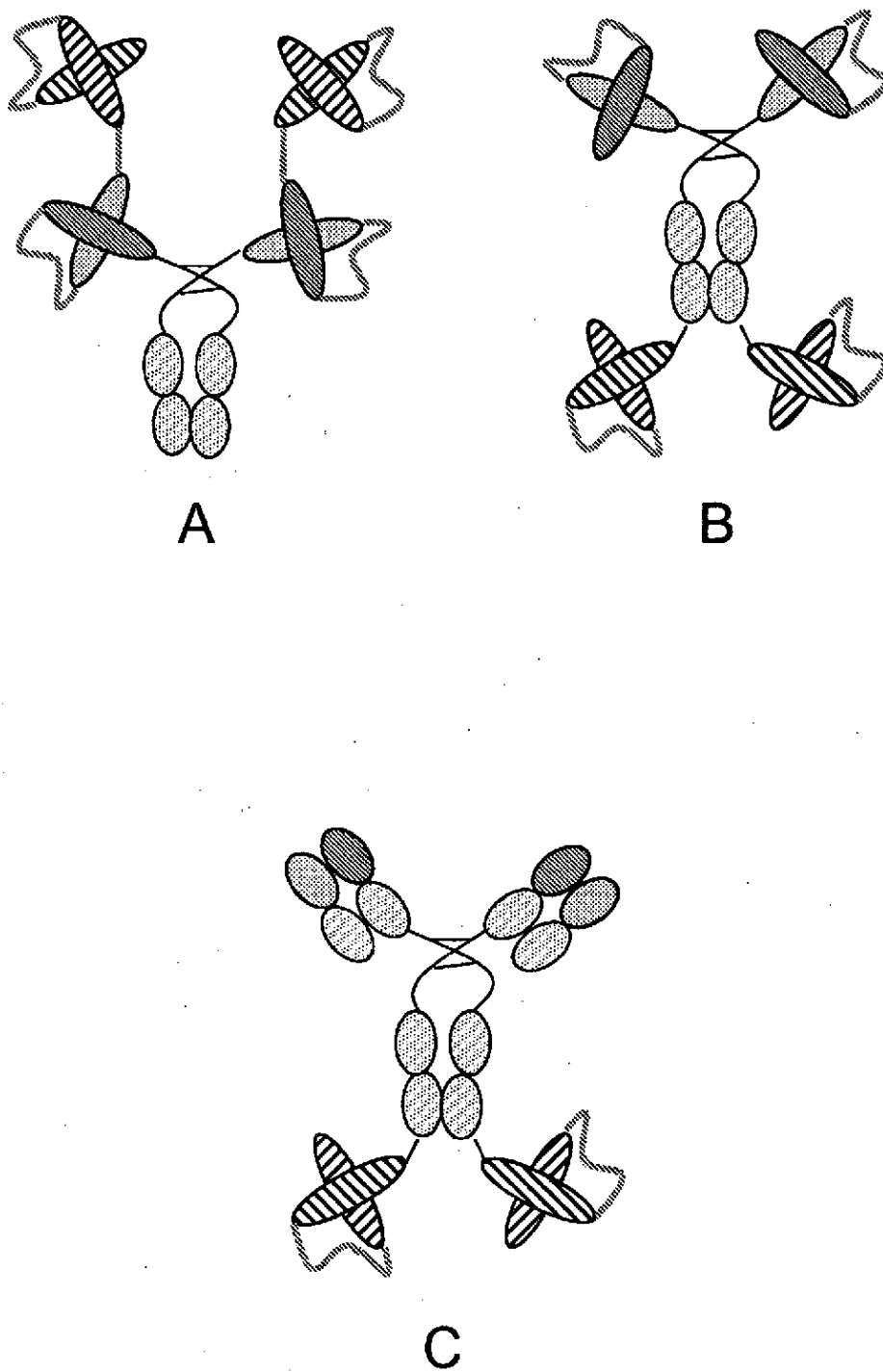
<- CH2 | CH3 ->

[illegible][illegible][illegible]

**Fig. 1B**

																	<b>410</b>
wt	Pro	Val	Leu	Asp	Ser	Asp	Gly	Ser	Phe	Phe	Leu	Tyr	Ser	Lys	Leu		
Fc-488	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
Fc4	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
Fc5	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
Fc6	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
Fc7	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
																	<b>425</b>
wt	Thr	Val	Asp	Lys	Ser	Arg	Trp	Gln	Gln	Gly	Asn	Val	Phe	Ser	Cys		
Fc-488	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
Fc4	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
Fc5	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
Fc6	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
Fc7	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
																	<b>431</b>
wt	Ser	Val	Met	His	Glu	Ala	Leu	His	Asn	His	Tyr	Thr	Gln	Lys	Ser		<b>440</b>
Fc-488	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
Fc4	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
Fc5	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
Fc6	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
Fc7	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
																	<b>446</b>
wt	Leu	Ser	Leu	Ser	Pro	Gly	Lys	***									
Fc-488	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
Fc4	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
Fc5	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
Fc6	.	.	.	.	.	.	.	***									
Fc7	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.

Fig. 1C



Figs. 2A-2C

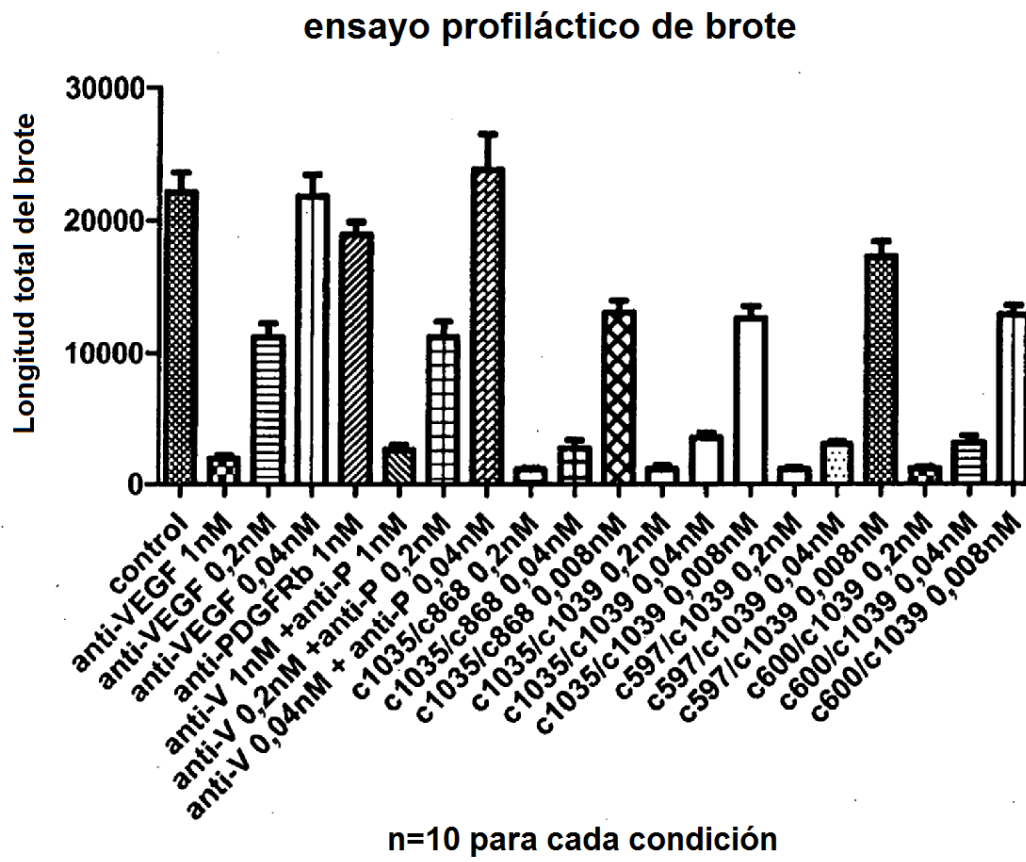


Fig. 3



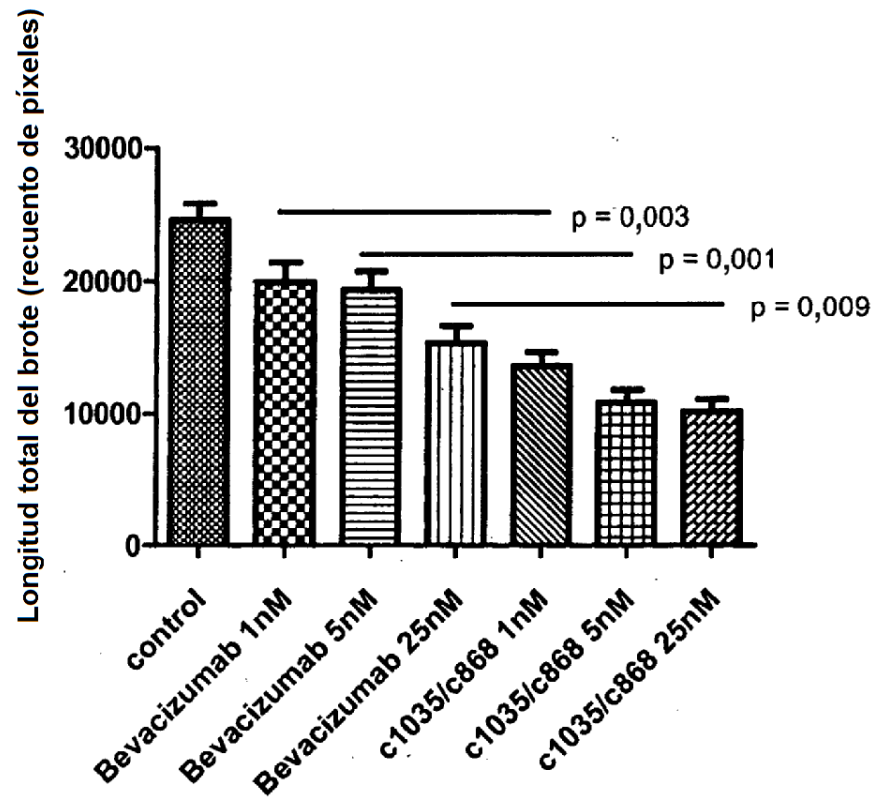


Fig. 4A

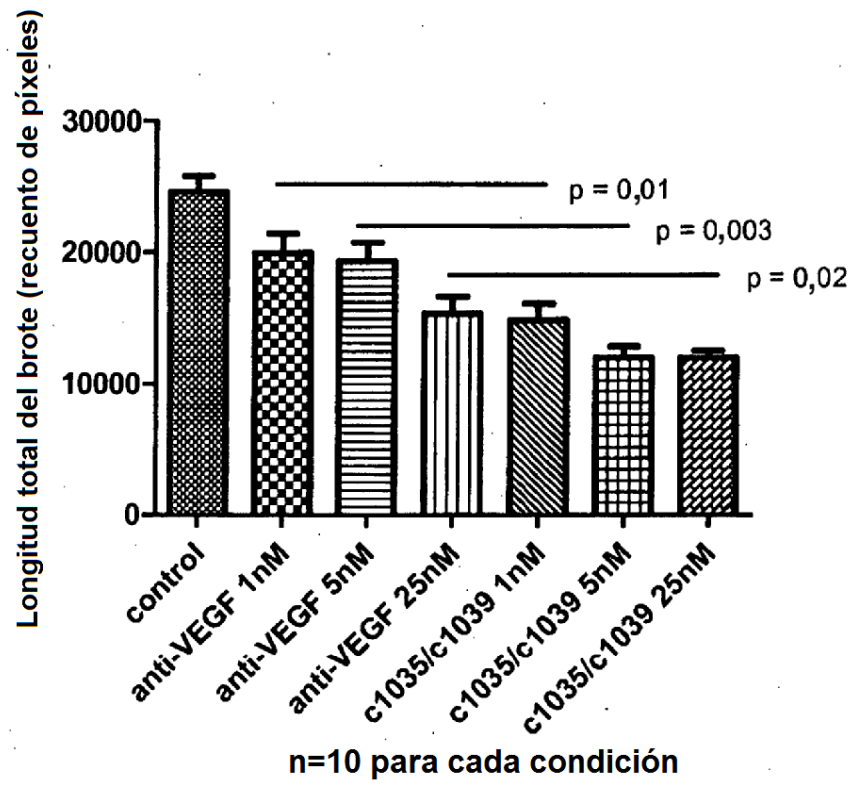


Fig. 4B

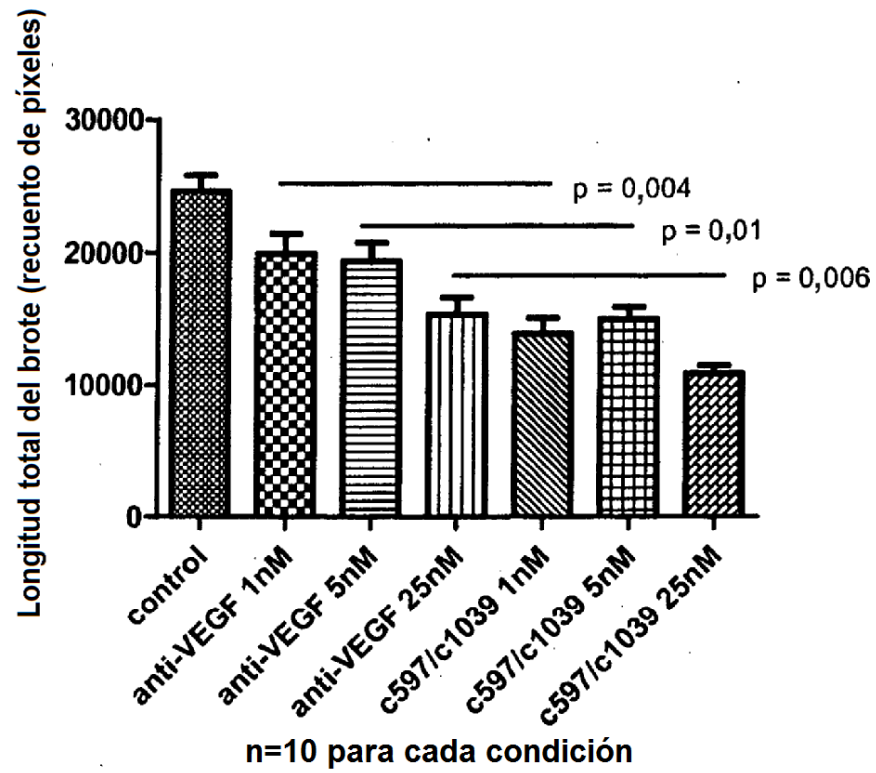


Fig. 4C

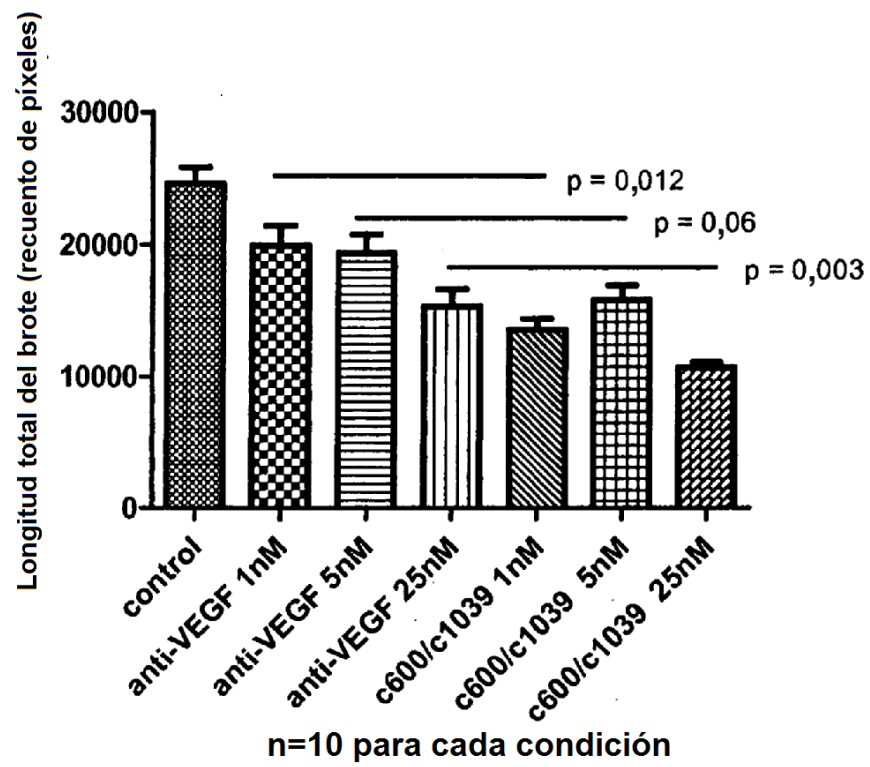


Fig. 4D