

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 656 446**

51 Int. Cl.:

C07K 16/22 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

A61K 39/395 (2006.01)

C12N 15/13 (2006.01)

C12N 15/63 (2006.01)

A61P 37/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **17.06.2010 E 14197237 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **08.11.2017 EP 2894167**

54 Título: **Anticuerpos anti-VEGF y sus usos**

30 Prioridad:

17.06.2009 US 218005 P

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

27.02.2018

73 Titular/es:

**ABBVIE BIOTHERAPEUTICS INC. (100.0%)
1500 Seaport Boulevard
Redwood City, CA 94063, US**

72 Inventor/es:

**HARDING, FIONA;
DUBRIDGE, ROBERT B.;
AKAMATSU, YOSHIKO y
POWERS, DAVID B.**

74 Agente/Representante:

PONS ARIÑO, Ángel

ES 2 656 446 T3

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

DESCRIPCIÓN

Anticuerpos anti-VEGF y sus usos

5 **2. Campo de la invención**

La presente invención se refiere a anticuerpos anti-VEGF, composiciones farmacéuticas que comprenden anticuerpos anti-VEGF, y los usos terapéuticos de tales anticuerpos.

10 **3. Antecedentes**

La angiogénesis ha surgido como una diana terapéutica atractiva debido a su implicación en una variedad de afecciones patológicas, que incluyen el crecimiento tumoral, las retinopatías proliferativas, la degeneración macular relacionada con la edad, la artritis reumatoide (RA), y psoriasis (Folkman et al., 1992, J. Biol. Chem. 267:10931-10934). La primera indicación de factores angiogénicos moleculares específicos se basaba en la observación de la fuerte respuesta neovascular que inducían los tumores trasplantados. Se sabe ahora que la angiogénesis es esencial para el crecimiento de la mayoría de los tumores primarios y su metástasis posterior. Ya se han asociado numerosas moléculas con la regulación positiva de la angiogénesis, que incluyen al factor de crecimiento transformante (TGF)- α , TGF- β , factor de crecimiento del hepatocito (HGF), factor de necrosis tumoral- α , angiogenina, interleucina (IL)-8, y factor de crecimiento vascular endotelial (VEGF, también llamado VEGFA o factor de permeabilidad vascular (VPF)) (Ferrara et al., 2003, Nature Medicine 9:669-676).

Las proteínas VEGF son importantes proteínas de señalización implicadas tanto en la vasculogénesis embrionaria normal (la formación de novo del sistema circulatorio embrionario) como la angiogénesis anormal (el crecimiento de vasos sanguíneos a partir de un sistema vascular pre-existente) (Ferrara et al., 1996, Nature 380:439-442; Dvorak et al., 1995, Am. J. Pathol. 146:1029-1039). El VEGF se asocia con tumores sólidos y enfermedades malignas hematológicas, síndromes neovasculares intraoculares, inflamación y edema cerebral, y patologías del tracto reproductor femenino (Ferrara et al., 2003, Nature Medicine 9:669-676). El ARNm VEGF está sobre-expresado en muchos tumores humanos, incluyendo los de pulmón, mama, tracto gastrointestinal, riñón, páncreas y ovario (Berkman et al., 1993, J. Clin. Invest. 91:153-159). Los aumentos de VEGF en el humor acuoso y vítreo de los ojos se han asociado con varias retinopatías (Aiello et al., 1994, N. Engl. J. Med. 331:1480-1487). La degeneración macular relacionada con la edad (AMD), una de las principales causas de pérdida de visión en la vejez se debe a la neovascularización y permeabilidad vascular. Se ha demostrado la localización del VEGF en las membranas coroides neovasculares en pacientes afectados con AMD (López et al., 1996; Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. 37:855-868).

La familia del gen VEGF incluye el miembro VEGFA prototípico, así como VEGFB, VEGFC, VEGFD y el factor de crecimiento placentario (PLGF). El gen VEGFA humano se organiza como ocho exones separados por siete intrones. Al menos existen seis isoformas diferentes de VEGF, VEGF₁₂₁, VEGF₁₄₅, VEGF₁₆₂, VEGF₁₆₅, VEGF_{165b}, VEGF₁₈₃, VEGF₁₈₉, y VEGF₂₀₆, donde los subíndices se refieren al número de aminoácidos que permanecen tras la escisión de señal. El VEGF nativo es una glucoproteína homodimérica de unión a la heparina de 45 kDa (Ferrara et al., 2003, Nature Medicine 9:669-676). El VEGF (específicamente el VEGFA) se une a dos receptores de la tirosina quinasa relacionados, el VEGFR-1 (también llamado Flt-1) y VEGFR-2 (también llamado Flk-1 o región del dominio quinasa (KDR) o CD309). Cada receptor tiene siete regiones extracelulares y una transmembrana. El VEGF también se une a las neuropilinas NRP1 (también llamada receptor del factor de crecimiento celular vascular endotelial 165 (VEGF165R o CD304) y NRP2 también llamada receptor 2 del factor de crecimiento celular vascular endotelial 165 (VEGF165R2)).

Dado su papel central en la regulación de la angiogénesis, el VEGF proporciona una diana atractiva para la intervención terapéutica. Además, se están desarrollando actualmente una variedad de estrategias terapéuticas con el fin de bloquear al VEGF o su sistema de señalización del receptor, para el tratamiento de enfermedades neoplásicas. El anticuerpo anti-VEGF bevacizumab, también llamado rhuMab VEGF o Avastin®, es un anticuerpo monoclonal anti-VEGF recombinante humanizado creado y comercializado por Genentech (Presta et al., 1997, Cancer Res. 57:4593-4599). Con el fin de construir el bevacizumab las regiones determinante de complementariedad (CDR) del anticuerpo monoclonal anti-VEGF murino A.4.6. 1 se injerta en armazones humanos y una región constante de IgG. Se introdujeron entonces mutaciones adicionales fuera de las CDR en la molécula para mejorar la unión, consiguiendo un anticuerpo en el que ~ 93% de la secuencia de aminoácidos se deriva de la IgG1 humana y ~ 7% de la secuencia se deriva del anticuerpo murino A.4.6.1. El bevacizumab tiene una masa molecular de aproximadamente 149.000 Daltons y está glucosilado.

El Ranibizumab es un fragmento Fab madurado por afinidad derivado del bevacizumab. El ranibizumab tiene una mayor afinidad por VEGF y también es de menor tamaño, lo que le permite penetrar mejor en la retina, y por lo tanto tratar la neovascularización ocular asociada con la AMD (Lien y Lowman, en: Chernajovsky, 2008, Therapeutic Antibodies. Handbook de Experimental Pharmacology 181, Springer-Verlag, Berlin Heidelberg 131-150). El ranibizumab se desarrolló y comercializó por Genentech bajo la marca registrada Lucentis®.

El tratamiento de pacientes de cáncer con un régimen que incluye el Avastin® puede dar como resultado efectos secundarios que incluyen hipertensión, proteinuria, acontecimientos tromboembólicos, hemorragia y toxicidad cardíaca (Blowers & Hall, 2009, Br. J. Nurs. 18(6):351-6, 358). También, a pesar de ser un anticuerpo humanizado, el bevacizumab puede producir una respuesta inmunitaria cuando se administra a seres humanos. Tal respuesta

5 inmunitaria puede dar como resultado un aclaramiento mediado por complejos inmunitarios de los anticuerpos o fragmentos de la circulación, y hacer que su administración repetida sea inadecuada para la terapia, reduciendo de esta manera el beneficio terapéutico para el paciente y limitar la re-administración del anticuerpo.

En consecuencia, existe la necesidad de que se proporcionen anticuerpos anti-VEGF mejorados o fragmentos que superen uno o más de estos problemas, por ejemplo, generando variantes con una afinidad mayor que el bevacizumab que pueda administrarse a dosis reducidas, o variantes con inmunogenicidad y otros efectos secundarios reducidos en comparación con el bevacizumab.

10

La cita o identificación de cualquier referencia de la Sección 3 o de cualquier otra sección de esta solicitud no se debería tomar como una admisión de que tal referencia está disponible como técnica precedente a la presente divulgación. El documento US 2002/032315 describe anticuerpos anti-VEGF y formas variantes de los mismos.

15

4. Sumario

La presente divulgación se refiere a variantes del anticuerpo anti-VEGF bevacizumab con inmunogenicidad reducida y afinidad mejorada para el VEGF en comparación con bevacizumab o ranibizumab. El bevacizumab tiene tres CDR de cadena pesada, denominadas en el presente documento (ordenadas del extremo amino- carboxilo) CDR-H1, CDR-H2, y CDR-H3, y tres CDR de cadena ligera, denominadas en el presente documento (ordenadas del extremo amino-carboxilo) CDR-L1, CDR-L2, y CDR-L3. Las secuencias de las CDR del bevacizumab se muestran en las

20 Figuras 1A y 1B, y su numeración se expone en la Tabla 1 (para las CDR de la cadena pesada) y en la Tabla 2 (para las CDR de la cadena ligera). Se generó un anticuerpo relacionado, el ranibizumab, por maduración de afinidad del bevacizumab. El ranibizumab tiene secuencias CDR-L1, CDR-L2, CDR-L3 y CDR-H2 idénticas al bevacizumab, pero varía en sus secuencias CDR-H1 y CDR-H3 de las del bevacizumab. Las secuencias de cadena pesada y cadena ligera del ranibizumab se muestran en la Figura 1C, y las CDR se exponen en la Figura 1D.

25

Por tanto, de acuerdo con la presente invención, se proporciona un anticuerpo anti-VEGF o un fragmento de unión anti-VEGF de un anticuerpo que comprende seis CDR que tienen una o más sustituciones de aminoácidos o combinaciones de sustituciones de aminoácidos en comparación con un anticuerpo anti-VEGF de referencia o un fragmento de unión a antígeno anti-VEGF de referencia que tiene CDR que tienen secuencias de aminoácidos correspondientes a la SEQ ID NO: 3 (CDR-H1), la SEQ ID NO: 4 (CDR-H2), la SEQ ID NO: 5 (CDR-H3), la SEQ ID NO: 6 (CDR-L1), la SEQ ID NO: 7 (CDR-L2) y la SEQ ID NO: 8 (CDR L3), en el que dichas una o más sustituciones de aminoácidos o combinaciones de sustituciones de aminoácidos se seleccionan entre:

30

- (i) la sustitución de CDR-H2 K64S;
 - (ii) la sustitución de CDR-H2 K64Q;
 - (iii) las sustituciones de CDR-H2 Y53F y K64Q;
 - (iv) las sustituciones de CDR-H2 Y53F y K64S;
 - (v) la sustitución de CDR-H3 H97E;
 - (vi) la sustitución de CDR-H3 Y98F;
 - (vii) las sustituciones de CDR-H3 H97E y Y98F;
 - (viii) las sustituciones de CDR-H3 H97P y Y98F;
- 35

y opcionalmente la sustitución de CDR-L2 T51A,

en el que las sustituciones de aminoácidos se numeran de acuerdo con Kabat

40

Los anticuerpos de la divulgación generalmente tienen al menos una sustitución de aminoácidos en al menos una CDR de cadena pesada en comparación con el bevacizumab y ranibizumab.

45

En ciertos aspectos, los anticuerpos anti-VEGF incluyen al menos una sustitución en comparación con bevacizumab o ranibizumab que se selecciona de entre, N31F en CDR-H1; K64S en CDR-H2; K64Q en CDR-H2; Y53F en CDR-H2; H97E en CDR-H3; H97D en CDR-H3; H97P en CDR-H3; Y98F en CDR-H3; Y99E en CDR-H3; Y99D en CDR-H3; S100aG en CDR-H3, y T51A en CDR-L2. En otros aspectos, los anticuerpos anti-VEGF incluyen al menos una sustitución que se selecciona de las Tablas 8 y 9. Las mutaciones adicionales que se pueden incorporar en las variantes de anticuerpo con afinidad mejorada pueden ser candidatas a sustituciones desimmunizantes, tales como las que se describen en la Tabla 6, así como otras mutaciones, por ejemplo, sustituciones que no eliminan la capacidad de los anticuerpos para unirse a VEGF, incluyendo pero sin limitarse a las mutaciones descritas en las

50 Tablas 10 y 11, o mutaciones conocidas, tales como las mutaciones descritas en las Tablas 12-1 a 12-9 y 13. Se pueden incorporar más mutaciones aún que incluyen pero sin límite, las mutaciones descritas en las Tablas 14-16.

55

En realizaciones específicas, los anticuerpos anti-VEGF de la divulgación incluyen una combinación de sustituciones que se seleccionan de la Tabla 7, y opcionalmente una o más mutaciones adicionales, por ejemplo, sustituciones candidatas a desimmunizantes, tales como las que se describen en la Tabla 6, así como otras mutaciones, por ejemplo, sustituciones, que no eliminen la capacidad de los anticuerpos para unirse a VEGF, incluyendo pero sin

60

65

limitarse a las mutaciones descritas en las Tablas 10 y 11, o mutaciones conocidas tales como las mutaciones descritas en las Tablas 12-1 a 12-9 y 13. Aún más mutaciones que se pueden incorporar en los anticuerpos anti-VEGF de la divulgación incluyen pero no se limitan a las mutaciones descritas en las Tablas 14-16.

- 5 En otras realizaciones, los anticuerpos anti-VEGF de la divulgación incluyen una o más de las siguientes sustituciones de CDR: K64S (CDR-H2), K64Q (CDR-H2), Y53F y K64Q (CDR-H2), H97E y Y98F (CDR-H3), o T51A (CDRL2). Los anticuerpos anti-VEGF también pueden opcionalmente incluir una o más mutaciones adicionales o combinaciones de mutaciones seleccionadas de una o más de las Tablas 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12-1 a 12-9, o 13-16.
- 10 Más sustituciones de CDR pueden incluir N31F (CDR-H1), H97E (CDR-H3), H97D (CDR-H3), H97P (CDR-H3), Y99E (CDR-H3), Y99D (CDR-H3), S100aG (CDR-H3) donde la posición 3 en la CDR-H3 opcionalmente no es tirosina, T28P, N31F, N31G y N31M (CDR-H1), H97A, H97Q, H97S, H97T, S100aD, S100aE, y S100Av (CDR-H3), T30W, T30R o T30Q (CDR-H1), Y53F, T58F, A61G, A61K, A61R, A61H, A61Y, K64G, K64E, R65L, R65T, R65A, R65E, y R65D (CDR-H2), y Y98F y Y100eF (CDR-H3). Las CDR contienen opcionalmente una o más mutaciones
- 15 adicionales o combinaciones de mutaciones que se seleccionan de una o más de las tablas 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12-1 a 12-9 y 13.

- Aún más sustituciones pueden incluir sustituciones de CDR de cadena pesada que incluyen una combinación de sustituciones que se seleccionan de entre: (a) N31F en CDR-H1, H97D en CDR-H3, Y99D en CDR-H3, y S100aG
- 20 en CDR-H3; (b) N31F en CDRH1, H97P en CDR-H3, Y99D en CDR-H3, y S100aG en CDR-H3; (c) N31F en CDR-H1, H97P en CDR-H3, y Y99E en CDR-H3; (d) N31F en CDR-H1, H97E en CDR-H3, y Y99E en CDR-H3; (e) N31F en CDR-H1, H97D en CDR-H3, y Y99E en CDR-H3; (f) N31F en CDR-H1, H97E en CDR-H3, Y99D en CDR-H3, y S100aG en CDR-H3; (g) N31F en CDRH 1, Y99D en CDR-H3, y S100aG en CDR-H3; (h) N31F en CDR-H1, H97P en CDR-H3, y Y99D en CDR-H3; (i) N31F en CDR-H 1, H97D en CDR-H3, y S100aG en CDR-H3; (j) N31F en CDR-
- 25 H1 y S100aG en CDR-H3; o (k) N31F en CDR-H 1, H97P en CDR-H3, y S100aG en CDR-H3. Más sustituciones opcionales pueden incluir una o más mutaciones o combinaciones de mutaciones que se seleccionan de entre una o más de las tablas 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12-1 a 12-9 y 13.

- Aún más sustituciones de la cadena pesada pueden incluir al menos una sustitución que se selecciona de entre
- 30 A61F en CDR-H2, A61E en CDR-H2, A61D en CDR-H2, D62L en CDR-H2, D62G en CDR-H2, D62Q en CDR-H2, D62T en CDR-H2, D62K en CDR-H2, D62R en CDR-H2, D62E en CDR-H2, D62H en CDR-H2, K64S en CDR-H2, K64V en CDR-H2, K64Q en CDRH2, R65V en CDR-H2, R65F en CDR-H2, R65H en CDR-H2, R65N en CDR-H2, R65S en CDR-H2, R65Q en CDR-H2, R65K en CDR-H2, R65I en CDR-H2, y Y98H en CDR-H3. Opcionalmente se pueden incluir una o más mutaciones adicionales o combinaciones de mutaciones como las que se seleccionan de
- 35 entre una o más de las Tablas 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12-1 a 12-9 y 13.

- En ciertos aspectos, los anticuerpos de la divulgación tienen secuencias VH y VL que tienen al menos una identidad de secuencia del 80% (y en ciertas realizaciones, una identidad de secuencia de al menos el 85%, al menos el 90%,
- 40 al menos el 95%, al menos el 98%, o al menos el 99%) con las secuencias VH y VL del bevacizumab o ranibizumab, e incluyen al menos una sustitución de aminoácidos en al menos una CDR en comparación con el bevacizumab o el ranibizumab. En otros aspectos, los anticuerpos de la divulgación tienen secuencias VH y VL que tienen una identidad de secuencia de al menos el 80% (y en ciertas realizaciones, una identidad de secuencia de al menos el 85%, al menos el 90%, al menos el 95%, al menos el 98%, o al menos el 99%) con las secuencias de VH y VL del bevacizumab o ranibizumab, e incluyen al menos una sustitución de aminoácidos en al menos una región marco
- 45 conservada en comparación con el bevacizumab o el ranibizumab. En realizaciones específicas, el porcentaje de identidad de secuencia de la cadena pesada y la cadena ligera en comparación con las secuencias VH y VL del bevacizumab o ranibizumab se selecciona independientemente de una identidad de secuencia de al menos el 80% al menos el 85, al menos el 90%, al menos el 95%, al menos el 98%, o una identidad de secuencia de al menos el 99%. En ciertos aspectos, los anticuerpos de la divulgación tienen secuencias de VH y/o VL que tienen una
- 50 identidad de secuencia de al menos el 95%, al menos el 98%, o al menos el 99% con las secuencias VH y/o VL del bevacizumab o el ranibizumab.

- Los anticuerpos de la divulgación tienen hasta 17 sustituciones de aminoácidos en sus CDR en comparación con el bevacizumab o ranibizumab. Las variantes de anticuerpo con 17 sustituciones que mantienen su capacidad de unión
- 55 a la diana se han generado por Bostrom et al., 2009, Science 323:1610-14.

Un anticuerpo anti-VEGF de la divulgación tiene, independientemente:

- Hasta una, hasta dos, hasta tres, hasta cuatro, hasta cinco, hasta seis, hasta siete, hasta ocho, hasta nueve o

60 hasta diez sustituciones en CDR-H1 en comparación con la CDR correspondiente del bevacizumab o del ranibizumab;

- Hasta una, hasta dos, hasta tres, hasta cuatro, hasta cinco, hasta seis, hasta siete, hasta ocho, hasta nueve, hasta diez, hasta once, hasta doce, hasta trece, hasta catorce, hasta quince, hasta dieciséis, o hasta diecisiete sustituciones CDR-H2 en comparación con la CDR correspondiente del bevacizumab o del

65 ranibizumab;

- Hasta una, hasta dos, hasta tres, hasta cuatro, hasta cinco, hasta seis, hasta siete, hasta ocho, hasta nueve,

hasta diez, hasta once, hasta doce, hasta trece, o hasta catorce sustituciones de CDR-H3 en comparación con la CDR correspondiente del bevacizumab o del ranibizumab;

- Hasta una, hasta dos, hasta tres, hasta cuatro, hasta cinco, hasta seis, hasta siete, hasta ocho, hasta nueve, hasta diez o hasta once sustituciones en CDR-L1 en comparación con la CDR correspondiente del bevacizumab o del ranibizumab;
- Hasta una, hasta dos, hasta tres, hasta cuatro, hasta cinco, hasta seis o hasta siete sustituciones en CDR-L2 en comparación con la CDR correspondiente del bevacizumab o del ranibizumab; y
- Hasta una, hasta dos, hasta tres, hasta cuatro, hasta cinco, hasta seis, hasta siete, hasta ocho o hasta nueve sustituciones en CDR-L3 en comparación con la CDR correspondiente del bevacizumab o del ranibizumab.

La presente divulgación proporciona además composiciones farmacéuticas que comprenden anticuerpos anti-VEGF modificados. En algunos anticuerpos, las composiciones farmacéuticas tienen un aumento de afinidad por VEGF y/o una reducción de la inmunogenicidad al compararse con el bevacizumab o el ranibizumab.

Se proporcionan en el presente documento los ácidos nucleicos que comprenden secuencias de nucleótidos que codifican los anticuerpos anti-VEGF de la divulgación, así como los vectores que comprenden los ácidos nucleicos. Adicionalmente, se proporcionan en el presente documento las células huésped procariotas y eucariotas transformadas con un vector que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica un anticuerpo anti-VEGF, así como las células huésped eucariotas (tales como las de mamífero) modificadas para expresar las secuencias de nucleótidos. También se proporcionan los métodos para producir anticuerpos anti-VEGF cultivando las células huésped.

Los anticuerpos anti-VEGF de la divulgación son útiles para el tratamiento de cánceres (por ejemplo, carcinoma de colon, carcinoma rectal, cáncer de pulmón de células no pequeñas, y cáncer de mama), enfermedades retinianas (por ejemplo, degeneración macular relacionada con la edad ("AMD")), y trastornos inmunitarios (por ejemplo, artritis reumatoide).

En ciertos aspectos, los anticuerpos anti-VEGF de la divulgación se pueden utilizar en dosificaciones reducidas en comparación con el bevacizumab o ranibizumab, por ejemplo dosificaciones menores al menos un 10%, al menos un 20%, al menos un 30%, al menos un 40%, al menos un 50%, al menos un 60%, al menos un 70%, al menos un 80% o al menos un 90%.

Se debería señalar que los artículos indefinidos "un" y "una" y los artículos definidos "el/la" se utilizan en la presente solicitud, como es común en las solicitudes de patente, significan uno o más a menos de que el contexto dicte claramente otra cosa. Además, el término "o" que se utiliza en la presente solicitud, como es común en las solicitudes de patente, significa la conjunción disyuntiva "o" o la copulativa "y".

Cualquier exposición de documentos, actas, materiales, dispositivos, artículos y similares que se han incluido en la presente memoria descriptiva solamente tiene el propósito de proporcionar un contexto para la presente divulgación. No son para que se consideren como una admisión de que cualquiera o todas estas materias forman parte de la base técnica anterior o eran de conocimiento común general en el campo relevante de la presente divulgación como que existieran en algún sitio antes de la fecha de prioridad de esta solicitud.

Las características y ventajas de la divulgación serán más aparentes tras la siguiente descripción detallada de las realizaciones de la misma.

Breve descripción de las Tablas y Figuras

La **Tabla 1** muestra la numeración de los aminoácidos de las CDR de cadena pesada de bevacizumab. Las CDR 1-3 se desvelan como las SEC ID N^{os} 3-5, respectivamente.

La **Tabla 2** muestra la numeración de los aminoácidos de las CDR de cadena ligera de bevacizumab. Las CDR 1-3 se desvelan como las SEC ID N^{os} 6-8, respectivamente.

La **Tabla 3** muestra los péptidos VL del bevacizumab que se ensayaron en cuanto a inmunogenicidad.

La **Tabla 4** muestra los péptidos VH del bevacizumab que se ensayaron en cuanto a inmunogenicidad.

La **Tabla 5** muestra las regiones de epítipo de células T CD4⁺ en el bevacizumab. Las regiones CDR están subrayadas.

La **Tabla 6** muestra las mutaciones candidatas en CDR-H2 y CDR-H3 para disminuir la inmunogenicidad del bevacizumab. La numeración de los aminoácidos de la **Tabla 6** corresponden a la numeración de Kabat en la cadena pesada de bevacizumab.

- 5 La **Tabla 7** muestra las sustituciones de aminoácidos de CDR de la cadena pesada en el bevacizumab que dan como resultado una K_D mejorada según se analizó por resonancia de plasmones superficiales. ΔK_{on} se refiere a las veces de mejoría en k_{on} (mutante/TpoSil.). Δk_{off} se refiere a las veces de mejoría en k_{off} (TpoSil./mutante). ΔK_D se refiere a la mejoría en la K_D en el mutante con respecto al tipo silvestre. La numeración de los aminoácidos de la **Tabla 7** corresponden con la numeración de Kabat en la cadena pesada del bevacizumab.
- 10 La **Tabla 8** muestra mutaciones en las CDR de cadena pesada que los estudios de unión preliminares indicaban un aumento de la afinidad para VEGF (datos no mostrados). La numeración de los aminoácidos en la **Tabla 8** corresponde a la numeración de Kabat en la cadena pesada del bevacizumab.
- 15 La **Tabla 9** muestra las mutaciones en las CDR de cadena pesada del bevacizumab que los estudios preliminares indicaban un aumento de afinidad para VEGF (datos no mostrados). La numeración de los aminoácidos de la **Tabla 9** corresponden a la numeración de Kabat en la cadena pesada del bevacizumab.
- 20 La **Tabla 10** muestra las mutaciones en las CDR de cadena pesada del bevacizumab que no tienen un impacto en la unión y que se pueden incorporar a los anticuerpos de la divulgación. La numeración de los aminoácidos de la **Tabla 10** corresponde con la numeración de Kabat en la cadena pesada del bevacizumab.
- 25 La **Tabla 11** muestra mutaciones en las CDR de cadena ligera del bevacizumab que no tienen impacto en la unión y que se pueden incorporar a los anticuerpos de la divulgación. La numeración de los aminoácidos de la **Tabla 11** corresponde con la numeración de Kabat en la cadena ligera del bevacizumab.
- 30 Las **Tablas 12-1 a 12-9** muestran mutaciones conocidas de las CDR de cadena pesada del bevacizumab que se pueden incorporar a los anticuerpos de la divulgación. Cada fila de las Tablas 12-1 a 12-9 incluye una variante conocida distinta. Para cada variante, las secuencias CDR conocidas están sombreadas. Los identificadores de secuencia de cada variante identificada en las Tablas 12-1 a 12-9 se exponen en las Tablas 20-1 a 20-9, respectivamente. La columna CDR-H1 proporciona una secuencia parcial de la CDR-H1, la asparagina final de la CDR-H1 no se muestra. Esta secuencia parcial corresponde a la SEC ID N° 411. Aunque se muestran mutaciones conocidas en CDR-H1 en el contexto de esta secuencia parcial, se señala que las mutaciones existen en el contexto de la CDR de longitud completa.
- 35 La **Tabla 13** muestra mutaciones conocidas en las CDR de la cadena ligera del bevacizumab que se pueden incorporar en los anticuerpos de la divulgación. Cada fila de la **Tabla 13** incluye una variante conocida distinta. Para cada variante, las secuencias de CDR conocidas se somborean. Los identificadores de secuencia de cada variante identificada en la **Tabla 13** se expone en la **Tabla 20-10**.
- 40 La **Tabla 14** muestra péptidos de la CDR2 VH del bevacizumab que se ensayaron en cuanto a su inmunogenicidad, donde los restos sin cambios a partir de la SEC ID N° 62 se indican por un cuadrado en blanco. También se proporcionan los resultados del ensayo de células T CD4⁺.
- 45 La **Tabla 15** muestra péptidos de la CDR3 VH del bevacizumab que se ensayaron en cuanto a su inmunogenicidad, donde los restos sin cambios a partir de la SEC ID N° 74 se indican por un cuadrado en blanco. Se proporcionan también los resultados del ensayo de células T CD4⁺.
- 50 La **Tabla 16** muestra péptidos de CDR2 VL que se ensayaron en cuanto a la inmunogenicidad, donde los restos sin cambios a partir de la SEC ID N° 25 se indican con un cuadrado en blanco. También se proporcionan los resultados del ensayo de células T CD4⁺.
- 55 La **Tabla 17** muestra modificaciones del epítipo seleccionado para los tres epítipos de células T CD4⁺ del bevacizumab.
- 60 La **Tabla 18** muestra mutantes de una sola región variable y su puntuación media de la intensidad de fluorescencia (MFI) asociada.
- 65 La **Tabla 19** muestra mutantes de la región variable combinada y su CE₅₀ asociada.
- Las **Tablas 20-1 a 20-10** muestran las SEC ID N°s correspondientes, cuando se conocen, que corresponden a las CDR de las variantes del bevacizumab enumeradas en las Tablas 12-1 a 12-9 y la **Tabla 13**, respectivamente. N/A indica una secuencia CDR desconocida.
- Figuras 1A-1D.** La **Figura 1A** muestra las secuencias de aminoácidos de las regiones variables de la cadena pesada y cadena ligera del bevacizumab, SEC ID N° 1 y SEC ID N° 2, respectivamente, con las regiones CDR en negrita, con el texto subrayado. La **Figura 1B** muestra las secuencias CDR y los correspondientes identificadores de secuencia del bevacizumab. La **Figura 1C** muestra las secuencias de aminoácidos de las cadenas pesada y ligera del bevacizumab, SEC ID N° 9 y la SEC ID N° 10, respectivamente, con las regiones CDR en negrita, y el texto subrayado. La **Figura 1D** muestra las secuencias CDR y los correspondientes identificadores de secuencia del

ranibizumab.

Las **Figuras 2A-2B** muestran las respuestas de péptidos VL de bevacizumab. La Figura 2A muestra el porcentaje de respuestas donantes de cada péptido VL con un índice de estimulación de 2,95 o más. N = 99 donantes. La Figura 2B muestra el índice medio de estimulación para los 99 donantes para cada péptido más o menos el error estándar. Las **Figuras 3A-3B** muestran las respuestas de péptido VH del bevacizumab. La Figura 3A muestra el porcentaje de respuestas de donantes a cada péptido VH con un índice de estimulación de 2,95 o mayor. N = 99 donantes. La Figura 3B muestra el índice de estimulación medio para los 99 donantes para cada péptido más o menos el error estándar.

Las **Figuras 4A-4C** muestran las respuestas de células T CD4⁺ a los epítomos peptídicos mutantes del bevacizumab. Las respuestas medias a las secuencias de epítomo parental sin modificar se indican con marcas abiertas. Los círculos grandes indican cambios seleccionados a los que se refiere la Tabla 17. La **Figura 4A** se refiere a péptidos CDR2 VH; La **Figura 4B** se refiere a péptidos CDR3 VH; y

La **Figura 4C** se refiere a péptidos CDR2 VL.

6. Descripción detallada

6.1 Anticuerpos anti-VEGF

La presente divulgación proporciona anticuerpos anti-VEGF. A menos de que se indique otra cosa, el término "anticuerpo" (Ab) se refiere a una molécula de inmunoglobulina que se une específicamente a, o es inmunológicamente reactiva con, un antígeno particular, e incluye los policlonales, monoclonales, modificados genéticamente y formas de anticuerpos modificados de otra manera, que incluyen pero no se limitan a anticuerpos quiméricos, anticuerpos humanizados, anticuerpos heteroconjugados (por ejemplo, anticuerpos biespecíficos, diacuerpos, triacuerpos, y tetracuerpos), y fragmentos de unión de anticuerpos, incluyendo por ejemplo, Fab', F(ab')₂, Fab, Fv, rIgG, y fragmentos scFv. Además, a menos de que se indique otra cosa, la expresión "anticuerpo monoclonal" (mAb) significa que incluye ambas moléculas intactas, así como, fragmentos de anticuerpo (tal como, por ejemplo, fragmentos Fab y F(ab')₂ que son capaces de unirse específicamente a una proteína. Los fragmentos Fab y F(ab')₂ carecen del fragmento Fc del anticuerpo intacto, se aclaran más rápidamente de la circulación del animal, y pueden tener unión específica de tejidos menor que un anticuerpo intacto (Wahl et al., 1983, J. Nucl. Med. 24:316).

El término "scFv" se refiere a una cadena sencilla Fv de anticuerpo en el que los dominios variables de la cadena pesada y la cadena ligera de un anticuerpo se han unido para formar una cadena.

Las referencias a "VH" se refieren a la región variable de una cadena pesada de inmunoglobulina de un anticuerpo, que incluye la cadena pesada de un Fv, scFv, o Fab. Las referencias a "VL" se refieren a la región variable de una cadena ligera de inmunoglobulina, que incluye la cadena ligera de un Fv, scFv, dsFv o Fab. Los anticuerpos (Ab) e inmunoglobulinas (Ig) son glucoproteínas que tienen las mismas características estructurales. Aunque los anticuerpos muestran una especificidad de unión para una diana específica, las inmunoglobulinas incluyen tanto anticuerpos como otras moléculas tipo anticuerpo que carecen de la especificidad de diana. Los anticuerpos nativos e inmunoglobulinas son habitualmente glucoproteínas heterotetraméricas de aproximadamente 150.000 Daltons, que se componen de dos cadenas ligeras (L) idénticas y dos cadenas pesadas (H) idénticas. Cada cadena pesada tiene en el extremo amino un dominio variable (VH) seguido por varios dominios constantes. Cada cadena ligera tiene un dominio variable en el extremo amino (VL) y un dominio constante en el extremo carboxilo.

Los anticuerpos anti-VEGF de la divulgación se unen al VEGF humano e inhiben la actividad del receptor VEGF en una célula.

Los anticuerpos anti-VEGF de la divulgación contienen regiones determinantes de complementariedad (CDR) que están relacionadas con las secuencias de las CDR del anticuerpo bevacizumab (también conocido como Avastin®) y/o ranibizumab (también conocido como Lucentis®).

Las CDR se conocen también como regiones hipervariables tanto en los dominios variables de la cadena ligera como de la cadena pesada. Las partes más altamente conservadas de los dominios variables se llaman regiones marco (FR). Como se sabe en la técnica, la posición de aminoácidos en el límite que delimita una región hipervariable de un anticuerpo puede variar, dependiendo del contexto y de varias definiciones conocidas en la técnica. Algunas posiciones en un dominio variable se pueden considerar como posiciones hipervariables híbridas ya que estas posiciones se pueden considerar como que están en una región variable bajo un grupo de criterios mientras que se puede considerar que están fuera de una región hipervariable bajo un grupo de criterios diferente. Una o más de estas posiciones se pueden encontrar también en regiones hipervariables extendidas. La divulgación proporciona anticuerpos que comprenden modificaciones en estas posiciones hipervariables híbridas. Los dominios variables de las cadenas ligera y pesada nativas comprenden cada uno, cuatro regiones FR, en su mayor parte adoptando una configuración de hojas β, conectadas por tres CDR, que forman bucles de conexión, y en algunos

casos que forman parte de la estructura de hojas β . Las CDR de cada cadena se mantienen juntas en estrecha proximidad por las regiones FR en el orden FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4 y, con las CDR de la otra cadena, contribuyen a la formación del sitio de unión a la diana de los anticuerpos (véase Kabat et al., *Sequences de Proteins de Immunological Interest* (National Institute de Health, Bethesda, Md. 1987). Como se utiliza en el presente documento, la numeración de los restos de aminoácidos se produce de acuerdo con el sistema de numeración de restos de aminoácidos de inmunoglobulinas de Kabat y col., a menos de que se indique otra cosa.

Las secuencias de las regiones variables de la cadena pesada y la cadena ligera del bevacizumab están representadas por la SEC ID N° 1 y SEC ID N° 2, respectivamente. Las secuencias de las regiones variables de la cadena pesada y la cadena ligera también se presentan en la Figura 1A. Las secuencias de las CDR del bevacizumab, y sus correspondientes identificadores, se presentan en la Figura 1B. Cualquiera de las secuencias de nucleótidos que codifican la SEC ID N° 1 o la SEC ID N° 2 se pueden utilizar en las composiciones y métodos de la presente divulgación.

Las secuencias de las cadenas pesada y ligera del ranibizumab se representan por las SEC ID N° 9 y la SEC ID N° 10, respectivamente. Las secuencias de las cadenas pesada y ligera también se presentan en la Figura 1C. Las secuencias de las CDR del ranibizumab, y sus correspondientes identificadores, se presentan en la Figura 1D. Cualquiera de las secuencias de nucleótidos que codifican las SEC ID N° 9 y SEC ID N° 10 se puede utilizar en las composiciones y métodos de la presente divulgación.

La presente divulgación además proporciona fragmentos de anticuerpo anti-VEGF que comprenden secuencias CDR que se relacionan con las secuencias CDR del bevacizumab y ranibizumab. La expresión "fragmento de anticuerpo" se refiere a una parte de un anticuerpo de longitud completa, en general la región de unión a la diana o variable. Ejemplos de fragmentos de anticuerpo incluyen fragmentos Fab, Fab', F(ab')₂ y Fv. Un fragmento "Fv" es el mínimo fragmento de anticuerpo que contiene un sitio completo de reconocimiento y unión a la diana. Esta región consiste en un dímero de un dominio variable de cadena pesada y cadena ligera unidos en una asociación estrecha, no covalente (dímero VH-VL). En esta configuración las tres CDR de cada dominio variable interactúan para definir un sitio de unión a la diana en la superficie del dímero VH-VL. A menudo, las seis CDR confieren la especificidad de un sitio de unión a la diana al anticuerpo. Sin embargo en algunos casos incluso un dominio variable sencillo (o la mitad de un Fv que comprende solo tres CDR específicas para una diana) puede tener la capacidad de reconocer y unirse a la diana. Los fragmentos de anticuerpo "Fv de cadena sencilla" o "scFv" comprenden los dominios VH y VL de un anticuerpo en una cadena polipeptídica sencilla. En general, el polipéptido Fv comprende además un enlazador polipeptídico entre el dominio VH y VL que hace posible que el scFv forme la estructura deseada para la unión a la diana. Los "anticuerpos de dominio único" están compuestos por un único dominio VH o VL que muestran la afinidad suficiente hacia la diana. En una realización específica, el anticuerpo de un único dominio es un anticuerpo camélido (véase; por ejemplo, Riechmann, 1999, *Journal de Immunological Methods* 231:25-38).

El fragmento Fab contiene el dominio constante de la cadena ligera y el primer dominio constante (CH₁) de la cadena pesada. Los fragmentos Fab' se diferencian de los fragmentos Fab por la adición de unos cuantos restos en el extremo carboxilo del dominio CH₁ de la cadena pesada que incluyen una o más cisteínas que deriva de la región bisagra del anticuerpo. Los fragmentos F(ab') se producen por escisión del enlace disulfuro en las cisteínas de la bisagra del producto de digestión por pepsina de F(ab')₂. Los acoplamientos adicionales de fragmentos de anticuerpo son conocidos por los expertos habitados en la técnica.

En ciertas realizaciones, los anticuerpos anti-VEGF de la divulgación son anticuerpos monoclonales. La expresión "anticuerpo monoclonal" como se utiliza en el presente documento no se limita a anticuerpos producidos por tecnología de hibridoma. La expresión "anticuerpo monoclonal" se refiere a un anticuerpo que se deriva de un único clon, que incluye cualquier clon eucariota, procariota o fago, y no el método por el que se producen. Los anticuerpos monoclonales útiles en conexión con la presente divulgación se pueden preparar utilizando una amplia variedad de técnicas conocidas en la técnica que incluyen el uso de tecnologías de hibridoma, recombinantes, y fago de presentación, o una combinación de las mismas. Los anticuerpos anti-VEGF de la divulgación incluyen anticuerpos quiméricos, primatizados, humanizados o humanos.

Los anticuerpos anti-VEGF de la divulgación pueden ser anticuerpos quiméricos. El término anticuerpo "quimérico" como se utiliza en el presente documento se refiere a un anticuerpo que tiene secuencias variables derivadas de una inmunoglobulina no humana, tal como un anticuerpo de rata o ratón, y regiones constantes de inmunoglobulinas humanas, típicamente escogidas de una matriz de inmunoglobulina humana. Los métodos para producir anticuerpos quiméricos se conocen en la técnica. Véase, por ejemplo, Morrison, 1985, *Science* 229(4719):1202-7; Oi et al., 1986, *BioTechniques* 4:214-221; Gillies et al., 1985, *J. Immunol. Methods* 125:191-202; Patentes de EE. UU. N°s 5.807.715; 4.816.567; y 4.816.397.

Los anticuerpos anti-VEGF de la divulgación pueden estar humanizados. Las formas "humanizadas" de anticuerpos no humanos (por ejemplo, murinos) son inmunoglobulinas quiméricas, cadenas de inmunoglobulinas o fragmentos de las mismas (tales como Fv, Fab, Fab', F(ab')₂ u otros subdominios de unión a la diana de anticuerpos) que contienen secuencias mínimas derivadas de inmunoglobulina no humana. En general, el anticuerpo humanizado comprenderá sustancialmente al menos uno, y típicamente dos, dominios variables, en los que todas o

- sustancialmente todas las regiones CDR corresponden a la inmunoglobulina no humana y todas o sustancialmente todas las regiones FR son de una secuencia de inmunoglobulina humana. El anticuerpo humanizado puede comprender también al menos una parte de una región constante (Fc) de inmunoglobulina, típicamente la de una secuencia de consenso de inmunoglobulina humana. Los métodos de humanización de anticuerpos se conocen en la técnica. Véase, por ejemplo, Riechmann et al., 1988, Nature 332:323-7; Patentes de EE. UU. N^{os} 5.530.101; 5.585.089; 5.693.761; 5.693.762; y 6.180.370 de Queen et al.; EP239400; publicación PCT WO 91/09967; Patente de EE. UU. N^o 5.225.539; EP592106; EP519596; Padlan, 1991, Mol. Immunol., 28:489-498; Studnicka et al., 1994, Prot. Eng. 7:805-814; Roguska et al., 1994, Proc. Natl. Acad. Sci. 91:969-973; y Patente de EE. UU. N^o 5.565.332.
- 10 Los anticuerpos anti-VEGF de la divulgación pueden ser anticuerpos humanos. Los anticuerpos anti-VEGF completamente "humanos" pueden ser deseables para el tratamiento terapéutico de pacientes humanos. Como se utiliza en el presente documento "anticuerpos humanos" incluyen anticuerpos que tienen la secuencia de aminoácidos de una inmunoglobulina humana e incluye anticuerpos aislados de las bibliotecas de inmunoglobulinas humanas o de animales transgénicos para una o más inmunoglobulinas humanas y que no expresan
- 15 inmunoglobulinas endógenas. Los anticuerpos humanos se pueden producir por una variedad de métodos conocidos en la técnica, que incluyen fagos de presentación utilizando bibliotecas de anticuerpo derivadas de secuencias de inmunoglobulinas humanas. Véase las Patentes de EE. UU. N^{os} 4.444.887 y 4.716.111; y publicaciones PCT WO 98/46645; WO 98/50433; WO 98/24893; WO 98/16654; WO 96/34096; WO 96/33735; y WO 91/10741. Los anticuerpos humanos se pueden producir también utilizando ratones transgénicos que son incapaces de expresar
- 20 inmunoglobulinas endógenas funcionales, pero que pueden expresar genes de inmunoglobulinas humanas. Véase, por ejemplo, las publicaciones PCT WO 98/24893; WO 92/01047; WO 96/34096; WO 96/33735; Patentes de EE. UU. N^{os} 5.413.923; 5.625.126; 5.633.425; 5.569.825; 5.661.016; 5.545.806; 5.814.318; 5.885.793; 5.916.771; y 5.939.598. Además, las compañías tales como Medarex (Princeton, NJ), Astellas Pharma (Deerfield, IL), Amgen (Thousand Oaks, CA) y Regeneron (Tarrytown, NY) pueden dedicarse a proporcionar anticuerpos humanos que se dirigen contra antígenos seleccionados utilizando una tecnología similar a la que se ha descrito anteriormente. Los
- 25 anticuerpos completamente humanos que reconocen un epítipo seleccionado se pueden generar utilizando una técnica llamada "selección guiada". En esta estrategia un anticuerpo monoclonal no humano seleccionado, por ejemplo, un anticuerpo de ratón, se utiliza para guiar la selección de un anticuerpo completamente humano que reconoce el mismo epítipo (Jespers et al., 1988, Biotechnology 12:899-903).
- 30 Los anticuerpos anti-VEGF de la divulgación pueden estar primatizados. La expresión "anticuerpo primatizado" se refiere a un anticuerpo que comprende regiones variables de mono y regiones constantes humanas. Los métodos para producir anticuerpos primatizados se conocen en la técnica. Véase, por ejemplo, las Patentes de EE. UU. N^{os} 5.658.570; 5.681.722; y 5.693.780.
- 35 Los anticuerpos anti-VEGF de la divulgación pueden ser anticuerpos biespecíficos. Los anticuerpos biespecíficos son anticuerpos monoclonales, a menudo humanos o humanizados, que tienen especificidades de unión para al menos dos antígenos diferentes. En la presente divulgación, una de las especificidades de unión se puede dirigir hacia el VEGF, la otra puede ser para cualquier otro antígeno, por ejemplo, para una proteína de superficie celular, receptor, subunidad de receptor, antígeno específico de tejido, proteína derivada vírica, proteína de cápsula
- 40 codificada víricamente, proteína derivada de bacterias, o proteína de superficie bacteriana, etc. En una realización específica, un anticuerpo de la divulgación es un anticuerpo biespecífico con especificidades de unión tanto para VEGF como para CD3.
- 45 Los anticuerpos anti-VEGF de la divulgación incluyen anticuerpos derivados. Por ejemplo, pero no de manera limitante, los anticuerpos derivados que están modificados típicamente por glucosilación, acetilación, pegilación, fosforilación, amidación, derivación por grupos protectores/bloqueantes conocidos, escisión proteolítica, unión a un ligando celular u otra proteína (véase la Sección 6.6 para tratar los anticuerpos conjugados), etc. Se puede llevar a cabo cualquiera de las numerosas modificaciones químicas por técnicas conocidas, que incluyen, pero no se limitan a, escisión química específica, acetilación, formilación, síntesis metabólica de tunicamicina, etc. De manera
- 50 adicional, el derivado puede contener uno o más aminoácidos no naturales, por ejemplo utilizando la tecnología ambrx (véase, por ejemplo, Wolfson, 2006, Chem. Biol. 13(10):1011-2).
- 55 En otra realización más de la divulgación, los anticuerpos anti-VEGF o los fragmentos de los mismos pueden ser anticuerpos o fragmentos de anticuerpo cuyas secuencias se han modificado para alterar al menos una función efectora biológica mediada por la región constante con respecto a la secuencia correspondiente del tipo silvestre.
- 60 Por ejemplo, en algunas realizaciones, un anticuerpo anti-VEGF de la divulgación se puede modificar para reducir al menos una función efectora biológica mediada por la región constante con respecto a un anticuerpo sin modificar, por ejemplo, la unión reducida al receptor Fc (Fc γ R). La unión a Fc γ R puede reducirse mutando el segmento de región constante de inmunoglobulina del anticuerpo en regiones particulares necesarias para las interacciones con el Fc γ R (véase, por ejemplo, Canfield y Morrison, 1991, J. Exp. Med. 173:1483-1491; y Lund et al., 1991, J. Immunol. 147:2657-2662). La reducción de la capacidad de unión al Fc γ R del anticuerpo también puede reducir otras funciones efectoras que se basan en las interacciones con el Fc γ R, tales como opsonización, fagocitosis y
- 65 citotoxicidad celular dependiente de antígeno ("ADCC").

En otras realizaciones, se puede modificar un anticuerpo anti-VEGF de la divulgación para adquirir o mejorar al menos una función efectora biológica mediada por la región constante con respecto a un anticuerpo sin modificar, por ejemplo para aumentar las interacciones con el Fc γ R (véase por ejemplo, el documento US 2006/0134709). Por ejemplo, un anticuerpo anti-VEGF de la divulgación puede tener una región constante que se une a Fc γ RIIA, Fc γ RIIB
5 y/o Fc γ RIIIA con mayor afinidad que la región constante correspondiente del tipo silvestre.

Por lo tanto, los anticuerpos de la divulgación pueden tener alteraciones en la actividad biológica que dan como resultado el aumento o disminución de la osonización, fagocitosis, o ADCC. Tales alteraciones se conocen en la técnica. Por ejemplo, las modificaciones que reducen la actividad ADCC se describen en la Patente de EE. UU. N $^{\circ}$
10 5.834.597. Una variante ejemplar que disminuye la ADCC corresponde al "mutante 3" que se muestra en la Figura 4 de la Patente de EE. UU. N $^{\circ}$ 5.834.597, en la que se ha eliminado el resto 236 y se han sustituido los restos 234, 235 y 237 (utilizando la numeración EU) por alaninas.

En algunas realizaciones, los anticuerpos anti-VEGF de la divulgación tienen bajos niveles o carecen de fucosa. Los anticuerpos que carecen de fucosa se han relacionado con el aumento de la actividad ADCC, especialmente a bajas dosis de anticuerpo. Véase, Shields et al., 2002, J. Biol. Chem. 277:26733-26740; Shinkawa et al., 2003, J. Biol. Chem. 278:3466-73. Los métodos para preparar anticuerpos con menos fucosa incluyen el crecimiento en células YB2/0 de mieloma de rata (ATCC CRL 1662). Las células YB2/0 expresan bajos niveles de ARNm FUT8, que codifica α -1,6-fucosiltransferasa, una enzima necesaria para la fucosilación de polipéptidos.
15

En otro aspecto, los anticuerpos anti-VEGF o fragmentos de los mismos pueden ser anticuerpos o fragmentos de anticuerpo que se han modificado para aumentar o disminuir sus afinidades de unión por el receptor Fc fetal, FcRn, por ejemplo mutando el segmento de región constante de inmunoglobulina en las regiones particulares implicadas en las interacciones con FcRn (véase, por ejemplo, el documento WO 2005/123780). En realizaciones particulares, un anticuerpo anti-VEGF de la clase IgG ha mutado tal que al menos uno de los restos de aminoácidos 250, 314, y 428 de la región constante de la cadena pesada se ha sustituido, solo o en cualquiera de las combinaciones de los mismos, tal como en las posiciones 250 y 428, o en las posiciones 250 y 314, o en las posiciones 314 y 428, o en las posiciones 250, 314, y 428, siendo en las posiciones 250 y 428 una combinación específica. Para la posición 250, el resto de aminoácido sustituto puede ser cualquier resto de aminoácido distinto de treonina, incluyendo pero sin limitarse a alanina, cisteína, ácido aspártico, ácido glutámico, fenilalanina, glicina, histidina, isoleucina, lisina, leucina, metionina, asparagina, prolina, glutamina, arginina, serina, valina, triptófano, o tirosina. Para la posición 314, el resto de aminoácido sustituto puede ser cualquier resto de aminoácido distinto de leucina, incluyendo, pero sin limitarse a alanina, cisteína, ácido aspártico, ácido glutámico, fenilalanina, glicina, histidina, isoleucina, lisina, metionina, asparagina, prolina, glutamina, arginina, serina, treonina, valina, triptófano, o tirosina. Para la posición 428, los restos de aminoácido sustitutos pueden ser cualquier resto de aminoácido distinto de metionina, que incluyen pero no se limitan a alanina, cisteína, ácido aspártico, ácido glutámico, fenilalanina, glicina, histidina, isoleucina, lisina, leucina, asparagina, prolina, glutamina, arginina, serina, treonina, valina, triptófano, o tirosina. Las combinaciones específicas de sustituciones de aminoácidos adecuadas se identifican en la Tabla 1 de la Patente de EE. UU. N $^{\circ}$ 7.217.797. Tales mutaciones aumentan la unión del anticuerpo a FcRn, lo que protege al anticuerpo de la degradación y aumenta su semivida.
20
25
30
35
40

En otros aspectos más, el anticuerpo anti-VEGF tiene uno o más aminoácidos insertados en una o más de sus regiones hipervariables, por ejemplo como se describe en Jung and Plückthun, 1997, Protein Engineering 10(9):959-966; Yazaki et al., 2004, Protein Eng Des. Sel. 17(5):481-9. Epub 2004 Aug 17; y documento US 2007/0280931.
45

En varias realizaciones, los anticuerpos anti-VEGF o fragmentos de los mismos pueden ser anticuerpos o fragmentos de anticuerpos que han sido modificados para aumentar la expresión en huéspedes heterólogos. En ciertas realizaciones, los anticuerpos anti-VEGF o fragmentos de los mismos pueden ser anticuerpos o fragmentos de anticuerpo que se han modificado para aumentar la expresión y/o la secreción en células huésped heterólogas. En algunas realizaciones, los anticuerpos anti-VEGF o fragmentos de los mismos están modificados para aumentar la expresión en bacterias, tales como *E. coli*. En otras realizaciones, los anticuerpos anti-VEGF o fragmentos de los mismos están modificados para aumentar la expresión en levaduras (Kieke et al., 1999, Proc. Nat'l Acad. Sci. USA 96:5651-5656). En otras realizaciones más, los anticuerpos anti-VEGF o fragmentos de los mismos están modificados para aumentar la expresión en células de insecto. En realizaciones adicionales, los anticuerpos anti-VEGF o fragmentos de los mismos están modificados para aumentar la expresión en células de mamífero, tales como células CHO.
50
55

En ciertas realizaciones, los anticuerpos anti-VEGF o fragmentos de los mismos pueden ser anticuerpos o fragmentos de anticuerpo que se han modificado para aumentar la estabilidad de los anticuerpos durante la producción. En algunas realizaciones, los anticuerpos o fragmentos de los mismos se pueden modificar reemplazando uno o más aminoácidos tales como asparagina o glutamina que son susceptibles a la desamidación no enzimática por aminoácidos que no experimenten desamidación (Huang et al., 2005, Anal. Chem. 77:1432-1439). En otras realizaciones, los anticuerpos o fragmentos de los mismos se pueden modificar para reemplazar uno o más aminoácidos que son susceptibles a la oxidación, tales como la metionina, cisteína o triptófano, por un aminoácido que no experimente fácilmente la oxidación. En otras realizaciones más, los anticuerpos o fragmentos de los mismos se pueden modificar para reemplazar uno o más aminoácidos que son susceptibles a la ciclación, tales como la
60
65

asparagina o el ácido glutámico, por un aminoácido que no experimente fácilmente la ciclación.

6.2 Ácidos nucleicos y sistemas de expresión

- 5 La presente divulgación engloba moléculas de ácidos nucleicos y células huésped que codifican los anticuerpos anti-VEGF de la divulgación.

Un anticuerpo anti-VEGF de la divulgación se puede preparar por expresión recombinante de los genes de cadena pesada y ligera en una célula huésped. Para expresar un anticuerpo recombinantemente, se transfecta una célula huésped con uno o más vectores de expresión recombinante que tiene fragmentos de ADN que codifican las cadenas ligera y pesada de inmunoglobulina del anticuerpo tal que se expresen las cadenas ligera y pesada en la célula huésped y, opcionalmente, se segreguen en el medio en el que se cultivan las células huésped, se pueden recuperar los anticuerpos a partir de tal medio. Se utilizan metodologías de ADN recombinante de referencia para obtener genes de cadena pesada y ligera de anticuerpo, incorporar estos genes en vectores de expresión recombinante e introducir los vectores en células huésped, tal como las que se describen en *Molecular Cloning; A Laboratory Manual, Segunda Edición* (Sambrook, Fritsch and Maniatis (eds), Cold Spring Harbor, N. Y., 1989), *Current Protocols in Molecular Biology* (Ausubel, F.M. et al., eds., Greene Publishing Associates, 1989) y en la Patente de EE. UU. N° 4.816.397.

- 20 En una realización, los anticuerpos anti-VEGF son similares al bevacizumab o ranibizumab excepto por cambios en una o más CDR. Los anticuerpos anti-VEGF pueden ser similares al bevacizumab o ranibizumab excepto por cambios en una o más regiones marco conservadas. En otra realización más, los anticuerpos anti-VEGF son similares al bevacizumab o ranibizumab excepto por cambios en una o más CDR y una o más regiones marco conservadas. Tales anticuerpos se designan colectivamente en el presente documento como que tienen secuencias "relacionadas con el bevacizumab" o "relacionadas con el ranibizumab" y a veces se denominan simplemente anticuerpos anti-VEGF de la divulgación. Para generar los ácidos nucleicos que codifican anticuerpos anti-VEGF, se obtienen primero los fragmentos de ADN que codifican las regiones variables de cadena ligera y pesada. Estos ADN se pueden obtener por amplificación y modificación de la línea germinal de ADN o ADNc que codifican secuencias variables de cadena ligera y pesada, por ejemplo, utilizando la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Las secuencias de la línea germinal de ADN para los genes de las regiones variables de cadenas pesada y ligera humanas se conocen en la técnica (véase, por ejemplo, la base de datos de secuencia de la línea germinal humana "VBASE"; véase también Kabat, E. A. et al., 1991, *Sequences de Proteins de Immunological Interest*, Primera Edición, U.S. Department de Health and Human Services, NIH Publication N° 91-3242; Tomlinson et al., 1992, *J. Mol. Biol.* 22T:116-198; y Cox et al., 1994, *Eur. J. Immunol.* 24:827-836). Un fragmento de ADN que codifica la región variable de cadena pesada o ligera del bevacizumab o ranibizumab se pueden sintetizar y utilizar como una matriz de mutagénesis para generar una variante como la que se describe en el presente documento que utiliza técnicas de mutagénesis de rutina; de manera alternativa, un fragmento de ADN que codifica la variante puede sintetizarse directamente.

- 40 Una vez que se obtiene los fragmentos de ADN que codifican los segmentos VH y VL anti-VEGF, estos fragmentos de ADN se pueden modificar más por técnicas de ADN recombinante de referencia, por ejemplo, para convertir los genes de la región variable en genes de cadena de anticuerpo de longitud completa, en genes de fragmentos Fab o en un gen scFv. En estas modificaciones, un fragmento de ADN que codifica una VL o VH está unido operativamente a otro fragmento de ADN que codifica otra proteína, tal como una región constante de anticuerpo o a un enlazador flexible. La expresión "unido operativamente", como se utiliza en este contexto, pretende significar que los dos fragmentos de ADN están unidos tal que las secuencias de aminoácidos codificadas por los dos fragmentos de ADN permanecen en fase.

- 50 El ADN aislado que codifica la región VH se puede convertir en un gen de cadena pesada de longitud completa uniéndolo operativamente el ADN que codifica VH con otra molécula de ADN que codifica las regiones constantes de la cadena pesada (CH₁, CH₂, CH₃ y, opcionalmente CH₄). Las secuencias de los genes de la región constante de la cadena pesada humanos se conocen en la técnica (véase, por ejemplo, Kabat, E.A. et al., 1991, *Sequences de Proteins de Immunological Interest*, Quinta Edición, U.S. Department de Health and Human Services, NIH Publication N° 91-3242) y los fragmentos de ADN que engloban estas regiones se pueden obtener por amplificación PCR de referencia. La región constante de la cadena pesada puede ser una región constante de IgG₁, IgG₂, IgG₃, IgG₄, IgA, IgE, IgM o IgD, pero en ciertas realizaciones es una región constante de IgG₁ o IgG₄. Para un gen del fragmento Fab de cadena pesada, el ADN que codifica VH puede estar unido operativamente a otra molécula de ADN que codifica solo la región constante de cadena pesada CH₁.

- 60 El ADN aislado que codifica la región VL se puede convertir en un gen de cadena ligera de longitud completa (así como un gen Fab de cadena ligera) uniéndolo operativamente el ADN que codifica la VL con otra molécula de ADN que codifica la región constante de cadena ligera CL. Las secuencias de los genes de la región constante de cadena ligera humana se conocen en la técnica (véase, por ejemplo, Kabat, E. A. et al., 1991, *Sequences de Proteins de Immunological Interest*, Quinta Edición (U.S. Department de Health and Human Services, NIH Publication N° 91-3242)) y los fragmentos de ADN que engloban estas regiones se pueden obtener por amplificación PCR de referencia. La región constante de cadena ligera puede ser una región constante kappa o lambda, pero en ciertas

realizaciones es una región constante kappa. Para crear un gen scFv, los fragmentos de ADN que codifican VH y VL están unidos operativamente con otro fragmento que codifica un enlazador flexible, por ejemplo, que codifican la secuencia de aminoácidos (Gly₄~Ser)₃. Tal que las secuencias VH y VL se pueden expresar como una proteína de cadena sencilla contigua, con las regiones VL y VH unidas por el enlazador flexible (véase, por ejemplo, Bird et al., 1988, Science 242:423-426; Huston et al., 1988, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:5879-5883; McCafferty et al., 1990, Nature 348:552-554).

Para expresar los anticuerpos anti-VEGF de la divulgación, los ADN que codifican las cadenas pesada y ligera parciales o de longitud completa, que se obtienen como se ha descrito anteriormente, se insertan en vectores de expresión tal que los genes están unidos operativamente a las secuencias de control transcripcional y traduccional. En este contexto, la expresión "unido operativamente" pretende significar que un gen de anticuerpo está unido en un vector tal que las secuencias de control transcripcional y traduccional del vector sirven para la intención deseada de regulación de la transcripción y traducción del gen del anticuerpo. El vector de expresión y las secuencias de control de la expresión se eligen para que sean compatibles con la célula huésped de expresión que se utilice. El gen de cadena ligera de anticuerpo y el gen de cadena pesada de anticuerpo se pueden insertar en vectores separados o, más típicamente, ambos genes se insertan en el mismo vector de expresión.

Los genes de anticuerpos se insertan en el vector de expresión por métodos de referencia (por ejemplo, ligadura de sitios de restricción complementarios en el fragmento genético de anticuerpo y el vector, o ligadura de extremos romos si los sitios de restricción no están presentes). Antes de la inserción de las secuencias de cadena ligera y pesada de los anticuerpos anti-VEGF de la divulgación, el vector de expresión puede tener ya secuencias de la región constante de anticuerpo. Por ejemplo, una estrategia para convertir las secuencias VH y VL anti-VEGF en genes de anticuerpo de longitud completa es insertarlas en vectores de expresión que codifican ya regiones constantes de cadena pesada y constantes de cadena ligera, respectivamente, tal que el segmento VH está unido operativamente al segmento CH en el vector y el segmento VL está unido operativamente al segmento CL del vector. De manera adicional o alternativamente, el vector de expresión recombinante puede codificar un péptido de señal que facilite la secreción de la cadena de anticuerpo a partir de una célula huésped. El gen de la cadena de anticuerpo puede clonarse en el vector tal que el péptido de señal está ligado en fase al extremo amino del gen de cadena de anticuerpo. El péptido de señal puede ser un péptido de señal de inmunoglobulina o un péptido de señal heterólogo (es decir, un péptido de señal de una proteína no inmunoglobulina).

Además de los genes de cadena de anticuerpo, los vectores de expresión recombinante de la divulgación tienen secuencias reguladoras que controlan la expresión de los genes de cadena de anticuerpo en una célula huésped. La expresión "secuencia reguladora" pretende que incluya promotores, potenciadores y otros elementos de control de expresión (por ejemplo, señales de poliadenilación) que controlan la transcripción o traducción de los genes de cadena de anticuerpo. Tales secuencias reguladoras se describen, por ejemplo, en Goeddel, Gene Expression Technology: Methods in Enzymology 185 (Academic Press, San Diego, CA, 1990). Los expertos en la técnica apreciarán que el diseño del vector de expresión, incluyendo la selección de secuencias reguladoras puede depender de factores tales como la elección de la célula huésped que se va a transformar, el nivel de expresión de la proteína deseada, etc. Las secuencias reguladoras adecuadas para la expresión en células huésped de mamífero incluyen elementos víricos que dirigen altos niveles de expresión proteica en células de mamífero, tales como promotores y/o potenciadores derivados de citomegalovirus (CMV) (tales como el promotor/potenciador CMV), Virus de simio 40 (SV40) (tal como el promotor/potenciador SV40), adenovirus (por ejemplo el promotor tardío principal de adenovirus (AdMLP) y polioma. Para más descripciones de elementos víricos reguladores y secuencias de los mismos, véase, por ejemplo, la Patente de EE. UU. N° 5.168.062 por Stinski, Patente de EE. UU. N° 4.510.245 por Bell et al., y Patente de EE. UU. N° 4.968.615 por Schaffner et al.

Además de los genes de cadena de anticuerpo y secuencias reguladoras, los vectores de expresión recombinante de la divulgación pueden tener secuencias adicionales, tales como secuencias que regulan la replicación del vector en las células huésped (por ejemplo, orígenes de replicación) y marcadores genéticos. El marcador genético facilita la selección de células huésped en los que se ha introducido el vector (véase por ejemplo, las Patentes de EE. UU. N°s 4.399.216, 4.634.665 y 5.179.017, todas por Axel et al.). Por ejemplo, el marcador genético típicamente confiere resistencia a fármacos tales como G418, puromicina, blasticidina, higromicina o metotrexato, en una célula huésped en la que se ha introducido el vector. Los marcadores genéticos adecuados incluyen el gen de la dihidrofolato reductasa (DHFR) (para su uso en la selección/amplificación en células huésped DHFR con metotrexato) y el gen neo (para la selección G418). Para la expresión de cadenas ligera y pesada, el vector de expresión que codifica las cadenas pesada y ligera se transfecta en una células huésped por técnicas de referencia. Las distintas formas del término "transfección" pretenden englobar una amplia variedad de técnicas utilizadas comúnmente para la introducción de ADN exógeno en una células huésped procariotas o eucariotas, por ejemplo, electroporación, lipofección, precipitación en fosfato cálcico, transfección DEAE-dextrano.

Es posible expresar los anticuerpos de la divulgación en células huésped procariotas o eucariotas. En ciertas realizaciones, la expresión de anticuerpos se llevan a cabo en células eucariotas, por ejemplo, células huésped de mamífero, para la secreción óptima de un anticuerpo inmunológicamente activo plegado apropiadamente. Las células huésped de mamífero ejemplares para expresar los anticuerpos recombinantes de la divulgación incluyen las de Ovario de Hámster Chino (células CHO) (incluyendo las células CHO DHFR, descritas en Urlaub y Chasin, 1980,

Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77:4216-4220, que se utilizan con un marcador genético DHFR, por ejemplo como se describe en Kaufman y Sharp, 1982, Mol. Biol. 159:601-621), células de mieloma NS0, células COS, células 293 y células SP2/0. Cuando se introducen vectores de expresión recombinante que codifican los genes de anticuerpo en células huésped de mamífero, los anticuerpos se producen cultivando las células huésped durante un periodo de tiempo suficiente para permitir la expresión del anticuerpo en las células huésped o la secreción del anticuerpo en el medio de cultivo en el que se han cultivado las células huésped. Los anticuerpos se pueden recuperar del medio de cultivo utilizando métodos de purificación proteica de referencia. Las células huésped se pueden utilizar también para producir partes de anticuerpos intactos, tales como fragmentos Fab o moléculas scFv. Se entiende que están en el ámbito de la presente divulgación las variaciones del procedimiento anterior. Por ejemplo, puede ser deseable transfectar una célula huésped con un ADN que codifique o la cadena ligera o la cadena pesada (pero no ambas) de un anticuerpo anti-VEGF de la presente divulgación.

Se puede utilizar también tecnología de ADN recombinante para eliminar alguno o todos los ADN que codifican o una o ambas cadenas ligera y pesada que no sean necesarios para la unión al VEGF. Las moléculas que se expresan de tales moléculas de ADN truncado también se engloban en los anticuerpos de la divulgación.

Además, se pueden producir anticuerpos bifuncionales en las que una cadena pesada y una cadena ligera están en un anticuerpo de la divulgación y otra cadena pesada y ligera son específicas de otro antígeno distinto de VEGF por entrecruzamiento de un anticuerpo de la divulgación con un segundo anticuerpo por métodos de entrecruzamiento químico de referencia. Los anticuerpos bifuncionales también se pueden fabricar expresando un ácido nucleico modificado para codificar un anticuerpo bifuncional.

En ciertas realizaciones, se pueden producir anticuerpos duales específicos, es decir, anticuerpos que se unen a VEGF y a un antígeno no relacionado que utilizan el mismo sitio de unión, mutando los restos de aminoácidos de las CDR de la cadena ligera y/o la cadena pesada. En varias realizaciones, se pueden producir anticuerpos duales específicos que se pueden unir a dos antígenos, tales como HER2 y VEGF, mutando restos de aminoácidos en la periferia del sitio de unión al antígeno (Bostrom et al., 2009, Science 323:1610-1614). Los anticuerpos funcionales duales se pueden fabricar expresando un ácido nucleico modificado para codificar un anticuerpo dual específico.

Para la expresión recombinante de un anticuerpo anti-VEGF de la divulgación, la célula huésped se puede co-transfectar con dos vectores de expresión de la divulgación, el primer vector codifica un polipéptido derivado de la cadena pesada y el segundo vector codifica un polipéptido derivado de la cadena ligera. Típicamente, los dos vectores contienen cada uno un marcador genético separado. De manera alternativa se puede utilizar un único vector que codifica tanto los polipéptidos de cadena pesada como ligera.

Una vez que se genera un ácido nucleico que codifica una o más partes de un anticuerpo anti-VEGF, se pueden introducir más alteraciones o mutaciones en la secuencia codificante, por ejemplo, para generar ácidos nucleicos que codifiquen anticuerpos con diferentes secuencias CDR, anticuerpos con afinidad reducida para el receptor Fc, o anticuerpos de diferentes subclases.

Los anticuerpos anti-VEGF de la divulgación pueden producirse también por síntesis química (por ejemplo, por los métodos descritos en Solid Phase Peptide Synthesis, 2ª ed., 1984 The Pierce Chemical Co., Rockford, I11.). Se pueden generar también variantes de anticuerpos utilizando una plataforma libre de células (véase, por ejemplo, Chu et al., 2001, Biochemia N° 2 (Roche Molecular Biologicals)).

Una vez que se ha producido un anticuerpo anti-VEGF de la divulgación por expresión recombinante, se puede purificar por cualquier método conocido en la técnica para la purificación de una molécula de inmunoglobulina, por ejemplo, por cromatografía (por ejemplo, intercambio iónico, afinidad, particularmente por afinidad por el VEGF tras selección de Proteína A o Proteína G, y cromatografía en columna por tamaño), centrifugación, solubilidad diferencial, o por cualquier otra técnica de referencia para la purificación de proteínas. Además, los anticuerpos anti-VEGF de la presente divulgación o fragmentos de los mismos se pueden fusionar con secuencias de polipéptidos heterólogas descritas en el presente documento o conocidas por otra parte en la técnica para facilitar la purificación.

Una vez aislado, un anticuerpo anti-VEGF puede, si así se desea, purificarse más, por ejemplo, por cromatografía líquida de altas prestaciones (véase, por ejemplo, Fisher, Laboratory Techniques In Biochemistry And Molecular Biology (Work and Burdon, eds., Elsevier, 1980), o por cromatografía de filtración en gel en una columna Superdex™ 75 (Pharmacia Biotech AB, Uppsala, Suecia).

6.3 Actividades biológicas de los anticuerpos anti-VEGF

En ciertas realizaciones, los anticuerpos anti-VEGF de la divulgación tienen ciertas actividades biológicas, tales como la competición con el bevacizumab o ranibizumab por la unión al VEGF o la neutralización de la actividad del VEGF.

En consecuencia, en ciertas realizaciones los anticuerpos anti-VEGF de la divulgación compiten con el bevacizumab o ranibizumab por la unión al VEGF. La capacidad para competir por la unión con VEGF se puede ensayar utilizando

un ensayo de competición. En un ejemplo de ensayo de competición, el VEGF se adhiere a una superficie sólida, por ejemplo, una placa con micropocillos, poniendo en contacto la placa con una solución de VEGF (por ejemplo a una concentración de 1 µg/ml en PBS durante una noche a 4 °C). La placa se lava (por ejemplo con Tween 20 al 0,1% en PBS) y se bloquea (por ejemplo en Superblock, Thermo Scientific, Rockford, IL). Se añade a cada pocillo una mezcla de una cantidad de sub-saturación de bevacizumab biotinilado (80 ng/ml) o una cantidad equivalente de ranibizumab biotinilado y bevacizumab sin marcar (o ranibizumab según el caso) (el anticuerpo de "referencia") o el anticuerpo anti-VEGF de competencia (el anticuerpo de "ensayo") en una dilución en serie (por ejemplo, a una concentración de 2,8 µg/ml, 8,3 µg/ml, o 25 µg/ml) en tampón de ELISA (por ejemplo, un 1% de BSA y un 0,1% de Tween 20 en PBS) y se incuban las placas durante una hora con agitación suave. La placa se lava, se añade a cada pocillo 1 µg/ml de Estreptavidina conjugada con HRP diluida en tampón ELISA y se incuban las placas durante 1 hora. Se lavan las placas y se detectan los anticuerpos unidos por adición del sustrato (por ejemplo, TMB, Bidex Laboratories Inc. Owings Mills, MD). Se termina la reacción añadiendo un tampón de parada (por ejemplo, Bio FX Stop Reagents, Bidex Laboratories Inc., Owings Mills, MD) y se mide la absorbancia a 650 nm utilizando un lector de microplacas (por ejemplo, VERSAmax, Molecular Devices, Sunnyvale, CA). Se pueden utilizar también, variaciones de este ensayo de competición para ensayar la competición entre un anticuerpo anti-VEGF de la divulgación y el bevacizumab o el ranibizumab. Por ejemplo, en ciertos aspectos, el anticuerpo anti-VEGF se utiliza como anticuerpo de referencia y el bevacizumab o ranibizumab se utiliza como anticuerpo de ensayo. De manera adicional, en vez de VEGF soluble, se puede utilizar VEGF unido a la membrana que se expresa en las superficies de la célula (por ejemplo, células de mamífero) en un cultivo. Se conocen en la técnica otros formatos de ensayos de competición y se pueden emplear.

En varias realizaciones, el anticuerpo anti-VEGF de la divulgación reduce la unión de bevacizumab o ranibizumab marcados en al menos un 30%, en al menos un 40%, en al menos un 50%, en al menos un 60%, en al menos un 70%, en al menos un 80%, en al menos un 90%, en al menos un 95%, en al menos un 99% o en un porcentaje que varía entre cualquiera de los valores anteriores (por ejemplo, un anticuerpo anti-VEGF de la divulgación reduce la unión de bevacizumab o ranibizumab marcados en un 50% a 70%) cuando el anticuerpo anti-VEGF se utiliza a una concentración de 0,08 µg/ml, 0,4 µg/ml, 2 µg/ml, 10 µg/ml, 50 µg/ml, 100 µg/ml o a una concentración que varía entre cualquiera de los valores anteriores (por ejemplo, a una concentración que varía desde 2 µg/ml a 10 µg/ml).

En otras realizaciones, el bevacizumab o ranibizumab reduce la unión de un anticuerpo anti-VEGF marcado de la divulgación en al menos un 40%, en al menos un 50%, en al menos un 60%, en al menos un 70%, en al menos un 80%, en al menos un 90%, o en un porcentaje que varía entre cualquiera de los valores anteriores (por ejemplo, el bevacizumab o ranibizumab reducen la unión de un anticuerpo anti-VEGF marcado de la divulgación en un 50% a 70%) cuando se utiliza el bevacizumab o ranibizumab a una concentración de 0,4 µg/ml, 2 µg/ml, 10 µg/ml, 50 µg/ml, 250 µg/ml o a una concentración que varía entre cualquiera de los valores anteriores (por ejemplo, a una concentración que varía desde 2 µg/ml a 10 µg/ml).

En otros aspectos, el anticuerpo anti-VEGF de la divulgación inhibe (o neutraliza) la actividad de VEGF en una variedad de ensayos *in vitro*, tales como la proliferación celular o la migración celular. Por ejemplo, en una realización, la actividad VEGF ensayada es la inducción de la proliferación de células endoteliales ("EC") (véase, por ejemplo, el protocolo de Qin et al., 2006, J. Biol. Chem. 281:32550-32558). En otra realización, la actividad del VEGF que se ensaya es la inducción de la migración de EC (véase, por ejemplo, del ensayo de raspado *in vitro* descrito por Liang et al., 2007, Nat. Protoc. 2:329-333). En una realización específica, se ensaya un anticuerpo anti-VEGF en cuanto a su capacidad de invertir la proliferación y migración celular estimulada por el VEGF y la deslocalización de proteínas de unión estrecha inducida por el VEGF₁₆₅ en células endoteliales retinianas inmortalizadas bovinas (Deissler et al., 2008, British Journal of Ophthalmology 92:839-843). En otra realización más, se ensaya la actividad de neutralización del VEGF utilizando un ensayo de indicador (véase, por ejemplo, Yohn et al., 2003, Biological & Pharmaceutical Bulletin 26(4):417-20 y la Patente de EE. UU. N° 6.787.323).

Se conocen en la técnica otros formatos de ensayo de neutralización del VEGF y se pueden emplear.

En varias realizaciones, un anticuerpo anti-VEGF de la divulgación neutraliza el VEGF en al menos un 30%, en al menos un 40%, en al menos un 50%, en al menos un 60%, en al menos un 70%, en al menos un 80%, en al menos un 90%, o en un porcentaje que varía entre cualquiera de los valores anteriores (por ejemplo, un anticuerpo anti-VEGF de la divulgación neutraliza la actividad del VEGF en un 50% a 70%) cuando el anticuerpo anti-VEGF se utiliza a una concentración de 2 ng/ml, 5 ng/ml, 10 ng/ml, 20 ng/ml, 0,1 µg/ml, 0,2 µg/ml, 1 µg/ml, 2 µg/ml, 5 µg/ml, 10 µg/ml, 20 µg/ml, o a una concentración que varía entre cualquiera de los valores anteriores (por ejemplo, a una concentración que varía entre 1 µg/ml a 5 µg/ml).

En algunas realizaciones, un anticuerpo anti-VEGF de la divulgación tiene al menos 0,7 veces la eficacia, 0,8 veces la eficacia, al menos 0,9 veces la eficacia, al menos 1 vez la eficacia, al menos 1,1 veces la eficacia, al menos 1,25 veces la eficacia, al menos 1,5 veces la eficacia, al menos 2 veces la eficacia, al menos 5 veces la eficacia, al menos 10 veces la eficacia, al menos 20 veces la eficacia, al menos 50 veces la eficacia, al menos 100 veces la eficacia, al menos 200 veces la eficacia, al menos 500 veces la eficacia, al menos 1000 veces la eficacia del bevacizumab o ranibizumab en la neutralización del VEGF, o tiene una eficacia de neutralización del VEGF con

respecto al bevacizumab o ranibizumab que varía entre cualquier par de los valores anteriores (por ejemplo, de 0,9 veces a 5 veces la eficacia del bevacizumab o ranibizumab o 2 veces a 50 veces la eficacia del bevacizumab o ranibizumab en la neutralización del VEGF).

5 6.4 Propiedades cinéticas de los anticuerpos anti-VEGF

Los anticuerpos anti-VEGF de la divulgación tienen una alta afinidad por el VEGF. En realizaciones específicas, los anticuerpos anti-VEGF de la presente divulgación tienen una tasa específica de constantes de asociación (valores k_{on} o k_a), tasa de constantes de disociación (valores de k_{off} o k_d), constantes de afinidad (valores K_A), constantes de disociación (valores de K_D) y/o valores de la CI_{50} . En varias realizaciones, las constantes de unión para la interacción de los anticuerpos anti-VEGF con el receptor VEGF se pueden determinar utilizando resonancia de plasmones superficiales, por ejemplo, de acuerdo con el método desvelado en Karlsson et al., 1991, J. Immunol. Methods 145:229-240. En ciertos aspectos, tales valores se seleccionan de las siguientes realizaciones.

15 En una realización específica, un anticuerpo anti-VEGF de la divulgación se une al VEGF con una k_{on} de al menos $10^4 M^{-1}s^{-1}$, al menos $5 \times 10^4 M^{-1}s^{-1}$, al menos $10^5 M^{-1}s^{-1}$, al menos $5 \times 10^5 M^{-1}s^{-1}$, al menos $10^6 M^{-1}s^{-1}$, al menos $5 \times 10^6 M^{-1}s^{-1}$, al menos $10^7 M^{-1}s^{-1}$, al menos $5 \times 10^7 M^{-1}s^{-1}$, al menos $10^8 M^{-1}s^{-1}$, al menos $5 \times 10^8 M^{-1}s^{-1}$, al menos $10^9 M^{-1}s^{-1}$ o con una k_{on} en cualquier intervalo entre cualquier par de los valores anteriores (por ejemplo, 5×10^5 a $5 \times 10^6 M^{-1}s^{-1}$ o 10^7 a $10^8 M^{-1}s^{-1}$).

20 En otra realización un anticuerpo anti-VEGF de la divulgación se une al VEGF con una tasa k_{off} de $10^{-3}s^{-1}$ o menos, $5 \times 10^{-4}s^{-1}$ o menos, $10^{-4}s^{-1}$ o menos, $5 \times 10^{-5}s^{-1}$ o menos, $10^{-5}s^{-1}$ o menos, $5 \times 10^{-6}s^{-1}$ o menos, $10^{-6}s^{-1}$ o menos, $5 \times 10^{-7}s^{-1}$ o menos, $10^{-7}s^{-1}$ o menos, $5 \times 10^{-8}s^{-1}$ o menos, $10^{-8}s^{-1}$ o menos, o con una k_{off} en cualquier intervalo entre cualquier par de los valores anteriores (por ejemplo, 5×10^{-4} a $10^{-6}s^{-1}$, o 10^{-3} a $5 \times 10^{-5}s^{-1}$).

25 En otra realización, un anticuerpo anti-VEGF de la invención se une al VEGF con una K_A (k_{on}/k_{off}) de al menos $10^8 M^{-1}$, al menos $5 \times 10^9 M^{-1}$, al menos $10^{10} M^{-1}$, al menos $5 \times 10^{10} M^{-1}$, $10^{11} M^{-1}$, al menos $5 \times 10^{11} M^{-1}$, al menos $10^{12} M^{-1}$, al menos $5 \times 10^{12} M^{-1}$, al menos $10^{13} M^{-1}$, al menos $5 \times 10^{13} M^{-1}$, al menos $10^{14} M^{-1}$, al menos $5 \times 10^{14} M^{-1}$, al menos $10^{15} M^{-1}$ o con una K_A en cualquier intervalo entre cualquier par de los valores anteriores (por ejemplo, desde $5 \times 10^9 M^{-1}$ a $10^{11} M^{-1}$, o desde $10^{11} M^{-1}$ a $5 \times 10^{14} M^{-1}$).

30 En otras realizaciones, un anticuerpo anti-VEGF de la divulgación se une a VEGF con una K_D (k_{off}/k_{on}) de $10^8 M$ o menos, $5 \times 10^9 M$ o menos, $10^9 M$ o menos, $5 \times 10^{10} M$ o menos, $10^{10} M$ o menos, $5 \times 10^{11} M$ o menos, $10^{11} M$ o menos, $5 \times 10^{12} M$ o menos, $10^{12} M$ o menos, $5 \times 10^{13} M$ o menos, $10^{13} M$ o menos, $5 \times 10^{14} M$ o menos, $10^{14} M$ o menos, $5 \times 10^{15} M$ o menos, $10^{15} M$ o menos, o con una K_D en cualquier intervalo entre cualquier par de los valores anteriores (por ejemplo, 5×10^9 a $5 \times 10^{12} M$, o de $5 \times 10^{11} M$ a $5 \times 10^{13} M$).

35 En realizaciones específicas, el valor de K_D (k_{off}/k_{on}) se determina por ensayos bien conocidos en la técnica o que se describen en el presente documento, por ejemplo, ELISA, calorimetría de titulación térmica (ITC), ensayo de polarización fluorescente o cualquier otro biosensor tal como BIAcore.

40 En algunas realizaciones, un anticuerpo anti-VEGF de la divulgación se une a VEGF e inhibe la unión del VEGF a un receptor VEGF (Flt-1 o Flk-1) con un valor de CI_{50} menor de 5×10^7 nM, menor de 10^7 nM, menor de 5×10^6 nM, menor de 10^6 nM, menor de 5×10^5 nM, menor de 10^5 nM, menor de 5×10^4 nM, menor de 10^4 nM, menor de 5×10^3 nM, menor de 10^3 nM, menor de 5×10^2 nM, menor de 100 nM, menor de 90 nM, menor de 80 nM, menor de 70 nM, menor de 65 nM, menor de 60 nM, menor de 50 nM, menor de 40 nM, menor de 30 nM, menor de 25 nM, menor de 20 nM, menor de 15 nM, menor de 12 nM, menor de 10 nM, menor de 5 nM, menor de 1 nM, menor de 5×10^{-1} nM, menor de 10^{-1} nM, menor de 5×10^{-2} nM, menor de 10^{-2} nM, menor de 5×10^{-3} nM, menor de 10^{-3} nM, menor de 5×10^{-4} nM, o menor de 10^{-4} nM, o con una CI_{50} de cualquier intervalo entre cualquier par de los valores anteriores (por ejemplo, 5×10^7 a 50 nM, o 15 nM a 5×10^{-3} nM). La CI_{50} se puede medir de acuerdo con métodos bien conocidos en la técnica o descritos en el presente documento, por ejemplo, ELISA.

45 En otras realizaciones, un anticuerpo anti-VEGF de la divulgación se une a VEGF y neutraliza la actividad del VEGF en un bioensayo (por ejemplo, proliferación o migración de EC) con un valor de CI_{50} menor de 5×10^7 nM, menor de 10^7 nM, menor de 5×10^6 nM, menor de 10^6 nM, menor de 5×10^5 nM, menor de 10^5 nM, menor de 5×10^4 nM, menor de 10^4 nM, menor de 5×10^3 nM, menor de 10^3 nM, menor de 5×10^2 nM, menor de 100 nM, menor de 90 nM, menor de 80 nM, menor de 70 nM, menor de 65 nM, menor de 60 nM, menor de 50 nM, menor de 40 nM, menor de 30 nM, menor de 25 nM, menor de 20 nM, menor de 15 nM, menor de 12 nM, menor de 10 nM, menor de 5 nM, menor de 1 nM, menor de 5×10^{-1} nM, menor de 10^{-1} nM, menor de 5×10^{-2} nM, menor de 10^{-2} nM, menor de 5×10^{-3} nM, menor de 10^{-3} nM, menor de 5×10^{-4} nM, o menor de 10^{-4} nM, o con una CI_{50} en cualquier intervalo entre cualquier par de los valores anteriores (por ejemplo, 5×10^7 a 50 nM, o 15 nM a 5×10^{-3} nM). Un ensayo de neutralización ejemplar que se puede utilizar para medir la CI_{50} de un anticuerpo anti-VEGF se describe en la Sección 6.3 posteriormente.

60 En ciertas realizaciones, un anticuerpo anti-VEGF se une al VEGF e inhibe la unión del VEGF a Flt-1, Flk-1 o ambos, o inhiben la actividad de VEGF en un ensayo de neutralización de VEGF, con un valor de la CI_{50} de entre

aproximadamente 1 pM y aproximadamente 1 μ M. En realizaciones específicas, un anticuerpo anti-VEGF se une al VEGF e inhibe la unión de VEGF a Flt-1, Flk-1 o ambos, o inhibe la actividad de VEGF en un ensayo de neutralización de VEGF con un valor de CI_{50} de entre 10 pM y 100 nM, entre 100 pM y 10 nM, entre 200 pM y 5 nM, entre 300 pM y 4 nM, entre 500 pM y 3 nM, entre 750 pM y 2 nM, entre 1 nM y 20 nM, entre 500 pM y 40 nM, entre 50 pM y 50 nM, entre 250 pM y 100 nM, y entre 100 nM y 1 μ M, o con una CI_{50} en cualquier intervalo entre cualquier par de los valores anteriores (por ejemplo, 10 pM a 50 nM, o 750 pM a 2 nM).

En ciertos aspectos de las realizaciones anteriores, la CI_{50} se mide en presencia de VEGF a una concentración de 0,001 μ M, 0,005 μ M, 0,01 μ M, 0,05 μ M, 0,1 μ M, 0,5 μ M, 1 μ M, 10 μ M, 20 μ M, 30 μ M, 40 μ M, 50 μ M, 60 μ M, 70 μ M, 80 μ M, 90 μ M, 100 μ M, 200 μ M, 300 μ M, 400 μ M, 500 μ M, 600 μ M, 700 μ M, 800 μ M, 900 μ M, 1000 μ M o a una concentración en cualquier intervalo entre cualquier par de los valores anteriores (por ejemplo, 0,01 a 50 μ M, o 10 μ M a 100 μ M).

En ciertas realizaciones, las propiedades cinéticas de un anticuerpo de la divulgación son comparables a, o mejores con respecto al bevacizumab o ranibizumab en un ensayo comparable. Por ejemplo, en ciertas realizaciones un anticuerpo anti-VEGF de la divulgación se une a VEGF con una tasa de k_{on} de aproximadamente 0,5x a 1000x la k_{on} del bevacizumab o del ranibizumab, por ejemplo una k_{on} de 0,5x de la k_{on} del bevacizumab o del ranibizumab, una k_{on} de 0,75x de la k_{on} del bevacizumab o del ranibizumab, una k_{on} de 0,9x de la k_{on} del bevacizumab o del ranibizumab, una k_{on} de 1x de la k_{on} del bevacizumab o del ranibizumab, una k_{on} de 1,1x de la k_{on} del bevacizumab o del ranibizumab, una k_{on} de 1,2x de la k_{on} del bevacizumab o del ranibizumab, una k_{on} de 1,3x de la k_{on} del bevacizumab o del ranibizumab, una k_{on} de 1,4x de la k_{on} del bevacizumab o del ranibizumab, una k_{on} de 1,5x de la k_{on} del bevacizumab o del ranibizumab, una k_{on} de 1,75x de la k_{on} del bevacizumab o del ranibizumab, una k_{on} de 2x de la k_{on} del bevacizumab o del ranibizumab, una k_{on} de 2,25x de la k_{on} del bevacizumab o del ranibizumab, una k_{on} de 2,5x de la k_{on} del bevacizumab o del ranibizumab, una k_{on} de 3x de la k_{on} del bevacizumab o del ranibizumab, una k_{on} de 4x de la k_{on} del bevacizumab o del ranibizumab, una k_{on} de 5x de la k_{on} del bevacizumab o del ranibizumab, una k_{on} de 7,5x de la k_{on} del bevacizumab o del ranibizumab, una k_{on} de 10x de la k_{on} del bevacizumab o del ranibizumab, una k_{on} de 15x de la k_{on} del bevacizumab o del ranibizumab, una k_{on} de 20x de la k_{on} del bevacizumab o del ranibizumab, una k_{on} de 50x de la k_{on} del bevacizumab o del ranibizumab, una k_{on} de 75x de la k_{on} del bevacizumab o del ranibizumab, una k_{on} de 100x de la k_{on} del bevacizumab o del ranibizumab, una k_{on} de 150x de la k_{on} del bevacizumab o del ranibizumab, una k_{on} de 200x de la k_{on} del bevacizumab o del ranibizumab, una k_{on} de 200x de la k_{on} del bevacizumab o del ranibizumab, una k_{on} que varía entre cualquier par de los valores anteriores, por ejemplo, una k_{on} de 2x-75x de la k_{on} del bevacizumab o del ranibizumab, una k_{on} de 5x-100x de la k_{on} del bevacizumab o del ranibizumab, una k_{on} de 0,5x-1000x de la k_{on} del bevacizumab o del ranibizumab, una k_{on} de 0,75x-200x de la k_{on} del bevacizumab o del ranibizumab, etc.

En ciertas realizaciones, un anticuerpo anti-VEGF de la divulgación se une al VEGF con una tasa de k_{off} que varía de 0,001 x a 3x de la k_{off} del bevacizumab o del ranibizumab, por ejemplo una k_{off} de 0,002x de la k_{off} del bevacizumab o del ranibizumab, una k_{off} de 0,005x de la k_{off} del bevacizumab o del ranibizumab, una k_{off} de 0,0075x de la k_{off} del bevacizumab o del ranibizumab, una k_{off} de 0,01x de la k_{off} del bevacizumab o del ranibizumab, una k_{off} de 0,025x de la k_{off} del bevacizumab o del ranibizumab, una k_{off} de 0,05x de la k_{off} del bevacizumab o del ranibizumab, una k_{off} de 0,075x de la k_{off} del bevacizumab o del ranibizumab, una k_{off} de 0,1x de la k_{off} del bevacizumab o del ranibizumab, una k_{off} de 0,25x de la k_{off} del bevacizumab o del ranibizumab, una k_{off} de 0,5x de la k_{off} del bevacizumab o del ranibizumab, una k_{off} de 0,75x de la k_{off} del bevacizumab o del ranibizumab, una k_{off} de 0,9x de la k_{off} del bevacizumab o del ranibizumab, una k_{off} de 1x de la k_{off} del bevacizumab o del ranibizumab, una k_{off} de 1,1 x de la k_{off} del bevacizumab o del ranibizumab, una k_{off} de 1,25x de la k_{off} del bevacizumab o del ranibizumab, una k_{off} de 1,5x de la k_{off} del bevacizumab o del ranibizumab, una k_{off} de 1,75x de la k_{off} del bevacizumab o del ranibizumab, una k_{off} de 4x de la k_{off} del bevacizumab o del ranibizumab, una k_{off} de 3x de la k_{off} del bevacizumab o del ranibizumab, una k_{off} de 2x de la k_{off} del bevacizumab o del ranibizumab, una k_{off} de 3x de la k_{off} del bevacizumab o del ranibizumab, o una k_{off} que varía entre cualquier par de los valores anteriores, por ejemplo, una k_{off} de 0,01x a 1,1x de la k_{off} del bevacizumab o del ranibizumab, una k_{off} de 0,05x-1,25x de la k_{off} del bevacizumab o del ranibizumab, una k_{off} de 0,1x-0,9x de la k_{off} del bevacizumab o del ranibizumab, etc.

El anticuerpo anti-VEGF de la divulgación se une al VEGF con una K_A (k_{on}/k_{off}) que varía entre 0.25x a 1000x de la K_A del bevacizumab o del ranibizumab, por ejemplo una K_A de 0,5x de la K_A del bevacizumab o del ranibizumab, una K_A de 0,75x de la K_A del bevacizumab o del ranibizumab, una K_A de 1x de la K_A del bevacizumab o del ranibizumab, una K_A de 2x de la K_A del bevacizumab o del ranibizumab, una K_A de 4x de la K_A del bevacizumab o del ranibizumab, una K_A de 10x de la K_A del bevacizumab o del ranibizumab, una K_A de 15x de la K_A del bevacizumab o del ranibizumab, una K_A de 20x de la K_A del bevacizumab o del ranibizumab, una K_A de 30x de la K_A del bevacizumab o del ranibizumab, una K_A de 40x de la K_A del bevacizumab o del ranibizumab, una K_A de 50x de la K_A del bevacizumab o del ranibizumab, una K_A de 100x de la K_A del bevacizumab o del ranibizumab, una K_A de 250x de la K_A del bevacizumab o del ranibizumab, una K_A de 500x de la K_A del bevacizumab o del ranibizumab, una K_A de 750x de la K_A del bevacizumab o del ranibizumab, una K_A de 1000x de la K_A del bevacizumab o del ranibizumab o una K_A que varía entre cualquier par de los valores anteriores, por ejemplo, una K_A de 0,75x-10 5x de la K_A del bevacizumab o del ranibizumab, una K_A de 1x-100x de la K_A del bevacizumab o del ranibizumab, una K_A de 10x-20x de la K_A del bevacizumab o del ranibizumab, una K_A de 4x-50x de la K_A del bevacizumab o del

ranibizumab, una K_A de 2x-20x de la K_A del bevacizumab o del ranibizumab, o cualquier valor o intervalo que se puede calcular a partir de las tasas de k_{on} y k_{off} que se desvelan en el presente documento.

5 El anticuerpo anti-VEGF de la divulgación se une al VEGF con una K_D (k_{off}/k_{on}) que varía desde 0,001 x una 10x de la K_D del bevacizumab o del ranibizumab, por ejemplo una K_D de 0,001x de la K_D del bevacizumab o del ranibizumab, una K_D de 0,005x de la K_D del bevacizumab o del ranibizumab, una K_D de 0,01x de la K_D del bevacizumab o del ranibizumab, una K_D de 0,05x de la K_D del bevacizumab o del ranibizumab, una K_D de 0,075x de la K_D del bevacizumab o del ranibizumab, una K_D de 0,1x de la K_D del bevacizumab o del ranibizumab, una K_D de 0,2x de la K_D del bevacizumab o del ranibizumab, una K_D de 0,3x de la K_D del bevacizumab o del ranibizumab, una K_D de 0,4x de la K_D del bevacizumab o del ranibizumab, una K_D de 0,5x de la K_D del bevacizumab o del ranibizumab, una K_D de 0,6x de la K_D del bevacizumab o del ranibizumab, una K_D de 0,7x de la K_D del bevacizumab o del ranibizumab, una K_D de 0,8x de la K_D del bevacizumab o del ranibizumab, una K_D de 0,9x de la K_D del bevacizumab o del ranibizumab, una K_D de 1x de la K_D del bevacizumab o del ranibizumab, una K_D de 1,5x de la K_D del bevacizumab o del ranibizumab, una K_D de 2x de la K_D del bevacizumab o del ranibizumab, una K_D de 4x de la K_D del bevacizumab o del ranibizumab, una K_D de 7,5x de la K_D del bevacizumab o del ranibizumab, una K_D de 10x de la K_D del bevacizumab o del ranibizumab o una K_D que varía entre cualquier par de los valores anteriores, por ejemplo, una K_D de 0,01x-2x de la K_D del bevacizumab o del ranibizumab, una K_D de 0,1x-1,5x de la K_D del bevacizumab o del ranibizumab, una K_D de 0,7x-4x de la K_D del bevacizumab o del ranibizumab, una K_D de 0,2x-2x de la K_D del bevacizumab o del ranibizumab o cualquier valor o intervalo que se pueda calcular a partir de las tasas de k_{on} y k_{off} que se desvelan en el presente documento.

En algunas realizaciones, un anticuerpo anti-VEGF de la divulgación se une al VEGF e inhibe la unión del VEGF a Flt-1, Flk-1 o ambos, o neutraliza la actividad del VEGF con un valor de CI_{50} que varía desde 0,001x a 10x de la CI_{50} del bevacizumab o del ranibizumab, por ejemplo una CI_{50} de 0,001x de la CI_{50} del bevacizumab o del ranibizumab, una CI_{50} de 0,005x de la CI_{50} del bevacizumab o del ranibizumab, una CI_{50} de 0,01x de la CI_{50} del bevacizumab o del ranibizumab, una CI_{50} de 0,05x de la CI_{50} del bevacizumab o del ranibizumab, una CI_{50} de 0,075x de la CI_{50} del bevacizumab o del ranibizumab, una CI_{50} de 0,1x de la CI_{50} del bevacizumab o del ranibizumab, una CI_{50} de 0,2x de la CI_{50} del bevacizumab o del ranibizumab, una CI_{50} de 0,3x de la CI_{50} del bevacizumab o del ranibizumab, una CI_{50} de 0,4x de la CI_{50} del bevacizumab o del ranibizumab, una CI_{50} de 0,5x de la CI_{50} del bevacizumab o del ranibizumab, una CI_{50} de 0,6x de la CI_{50} del bevacizumab o del ranibizumab, una CI_{50} de 0,7x de la CI_{50} del bevacizumab o del ranibizumab, una CI_{50} de 0,8x de la CI_{50} del bevacizumab o del ranibizumab, una CI_{50} de 0,9x de la CI_{50} del bevacizumab o del ranibizumab, una CI_{50} de 1x de la CI_{50} del bevacizumab o del ranibizumab, una CI_{50} de 1,5x de la CI_{50} del bevacizumab o del ranibizumab, una CI_{50} de 2x de la CI_{50} del bevacizumab o del ranibizumab, una CI_{50} de 4x de la CI_{50} del bevacizumab o del ranibizumab, una CI_{50} de 7,5x de la CI_{50} del bevacizumab o del ranibizumab, una CI_{50} de 10x de la CI_{50} del bevacizumab o del ranibizumab o una CI_{50} que varía entre cualquier par de los valores anteriores, por ejemplo una CI_{50} de 0,01x-2x de la CI_{50} del bevacizumab o del ranibizumab, una CI_{50} de 0,1x-1,5x de la CI_{50} del bevacizumab o del ranibizumab, una CI_{50} de 0,7x-4x de la CI_{50} del bevacizumab o del ranibizumab, una CI_{50} de 0,2x-2x de la CI_{50} del bevacizumab o del ranibizumab.

40 6.5 Inmunogenicidad reducida de los anticuerpos anti-VEGF

En ciertos aspectos, la presente divulgación proporciona anticuerpos anti-VEGF que tienen una inmunogenicidad reducida en comparación con el bevacizumab o el ranibizumab. La presente divulgación proporciona anticuerpos anti-VEGF que tienen sustituciones de aminoácidos únicas o múltiples en sus CDR y/o regiones marco conservadas en comparación con las CDR del bevacizumab, donde al menos una sustitución reduce la inmunogenicidad del anticuerpo en comparación con el bevacizumab o el ranibizumab. En ciertas realizaciones, la inmunogenicidad reducida resulta de una o más sustituciones de aminoácidos que dan como resultado la eliminación o mitigación de uno o más epítomos de células T.

50 En ciertos aspectos, los anticuerpos anti-VEGF de la divulgación que tienen una inmunogenicidad reducida tienen una actividad biológica comparable o mejorada en comparación con el bevacizumab o ranibizumab, por ejemplo, la afinidad por el VEGF o la neutralización de la actividad del VEGF. Tales propiedades se pueden ensayar, por ejemplo, por los métodos descritos en la Sección 6.3 anterior.

55 En ciertas realizaciones, la inmunogenicidad de un anticuerpo anti-VEGF de la divulgación está reducida con respecto al anticuerpo bevacizumab o ranibizumab. Tales anticuerpos tienen en general variantes de secuencias con respecto a la región variable de la cadena pesada y/o ligera en regiones que corresponden a las SEC ID N° 25, SEC ID N° 62 y/o SEC ID N° 74. Los anticuerpos tendrán generalmente una, dos o tres sustituciones de aminoácidos en una, dos o las tres secuencias que corresponden a las SEC ID N° 25, SEC ID N° 62, y SEC ID N° 74, aunque se contemplan en el presente documento hasta cuatro o cinco sustituciones en una, dos o las tres regiones.

60 Como se utiliza en la presente divulgación, una variante con "inmunogenicidad reducida" se refiere a un anticuerpo anti-VEGF con una secuencia variante en una región que corresponde a las SEC ID N° 25, SEC ID N° 62, y/o SEC ID N° 74 que produce una respuesta proliferativa reducida en células mononucleares de sangre periférica en comparación con un péptido de la SEC ID N° 25, SEC ID N° 62, o SEC ID N° 74, respectivamente. Un ensayo de proliferación ejemplar que se puede utilizar para evaluar la respuesta proliferativa se expone en la Sección 7

posterior. La respuesta proliferativa reducida se puede reflejar en términos de porcentaje de respondedores, índice de estimulación, o ambos.

5 En otras realizaciones, al compararse con un péptido que tiene la SEC ID N° 25, SEC ID N° 62, o la SEC ID N° 74, la secuencia variante da como resultado al menos un 25% menos de respondedores, al menos un 30% menos de respondedores, al menos un 35% menos de respondedores, al menos un 40% menos de respondedores, al menos un 45% menos de respondedores, al menos un 50% menos de respondedores, al menos un 60% menos de respondedores, al menos un 65% menos de respondedores, al menos un 70% menos de respondedores, al menos un 75% menos de respondedores, al menos un 80% menos de respondedores, al menos un 85% menos de respondedores, al menos un 90% menos de respondedores, al menos un 95% menos de respondedores, un 100% menos de respondedores, o una reducción de respondedores en un intervalo entre cualquiera de los valores anteriores, por ejemplo un 25%-75% menos de respondedores, 50%-90% menos de respondedores, 60%-100% menos de respondedores; un 70%-90% menos de respondedores, o de manera similar.

15 En otras realizaciones, la secuencia variante da como resultado un índice de estimulación que es al menos un 5% menor, al menos un 10% menor, al menos un 15% menor, al menos un 20% menor, al menos un 25% menor, al menos un 30% menor, al menos un 35% menor, o al menos un 40% menor que el índice de estimulación producido por un péptido de la SEC ID N° 25, SEC ID N° 62, o la SEC ID N° 74, respectivamente, o da como resultado un índice de estimulación reducido en un intervalo entre cualquiera de los valores anteriores al compararse con un péptido de la SEC ID N° 25, SEC ID N° 62, o la SEC ID N° 74, por ejemplo, un 5%-20% menos, 10%-30% menos, 25%-35% menos, 30%-40% menos, o de manera similar.

25 Las realizaciones ejemplares de los anticuerpos anti-VEGF candidatos con inmunogenicidad reducida en comparación con bevacizumab o ranibizumab comprende una o más sustituciones o combinaciones de sustituciones en las CDR expuestas en la Tabla 6. Opcionalmente los anticuerpos anti-VEGF con inmunogenicidad reducida en comparación con bevacizumab o ranibizumab comprenden una o más sustituciones adicionales, tales como las mutaciones de CDR de cualquiera de las Tablas 7-13, únicas o en combinación.

30 Más realizaciones ejemplares de anticuerpos anti-VEGF candidatos con inmunogenicidad reducida en comparación con bevacizumab o ranibizumab comprenden una o más sustituciones o combinaciones de sustituciones en las CDR que se exponen en las Tablas 14-16. Algunas realizaciones preferidas de anticuerpos anti-VEGF con inmunogenicidad reducida en comparación con bevacizumab o ranibizumab se proporcionan en la Tabla 19.

35 6.6 Anticuerpos conjugados

Los anticuerpos anti-VEGF de la divulgación incluyen anticuerpos conjugados que se han modificado, por ejemplo, uniendo covalentemente cualquier tipo de molécula al anticuerpo, tal que la unión covalente no interfiera con la unión al VEGF.

40 En ciertos aspectos, el anticuerpo anti-VEGF de la divulgación puede conjugarse con un resto efector o un marcador. La expresión "resto efector" como se utiliza en el presente documento incluye, por ejemplo, agentes antineoplásicos, fármacos, toxinas, proteínas biológicamente activas, por ejemplo, enzimas, otros anticuerpos o fragmentos de anticuerpos, polímeros sintéticos o de origen natural, ácidos nucleicos (por ejemplo, ADN y ARN), radionúclidos, particularmente, yodo radioactivo, radioisótopos, metales quelados, nanopartículas, y grupos indicadores tales como compuestos fluorescentes o compuestos que se pueden detectar por espectroscopia NMR o ESR.

50 En un ejemplo, los anticuerpos anti-VEGF se pueden conjugar con un resto efector, tal como un agente citotóxico, un radionúclido o resto de fármaco para modificar una determinada respuesta biológica. El resto efector puede ser una proteína o polipéptido, tal como, por ejemplo y sin limitación, una toxina (tal como abrina, ricina A, exotoxina de *Pseudomonas*, o toxina diftérica), una molécula de señal (tal como interferón α , interferón β , factor de crecimiento de nervios, factor de crecimiento derivado de plaquetas o activador del plasminógeno tisular), un agente trombótico o un agente anti-angiogénico (por ejemplo, angiostatina o endostatina) o un modificador de la respuesta biológica tal como una citoquina o factor de crecimiento (por ejemplo, interleucina-1 (IL-1), interleucina-2 (IL-2), interleucina-6 (IL-6), factor estimulante del crecimiento de colonias de granulocitos macrófagos (GM-CSF), factor estimulante de colonias de granulocitos (G-CSF), o factor de crecimiento de nervios (NGF)).

60 En otro ejemplo, los restos efectores pueden ser citotoxinas o agentes citotóxicos. Ejemplos de citotoxinas y agentes citotóxicos incluyen taxol, citocalasina B, gramicidina D, bromuro de etidio, emetina, mitomicina, etopósido, tenipósido, vincristina, vinblastina, colchicina, doxorubicina, daunorrubicina, dihidroxi antracina diona, mitoxantrona, mitramicina, actinomicina D, 1-deshidrotestosterona, glucocorticoides, procaína, tetracaína, lidocaína, propanolol, y puromicina y análogos u homólogos de los mismos.

65 Los restos efectores incluyen también, pero no se limitan a estos, antimetabolitos (por ejemplo, metotrexato, 6-mercaptopurina, 6-tioguanina, citarabina, 5-fluorouracilo decarbacina), agentes alquilantes (por ejemplo, meclorestamina, tiotepa cloramucilo, melfalán, carmustina (BSNU) y lomustina (CCNU), ciclofosfamida, busulfán,

dibromomanitol, estreptozocina, mitomicina C5 y cis-diclorodiamina platino (II) (DDP) cisplatino), antraciclinas (por ejemplo daunorrubicina (antes daunomicina) y doxorrubicina), antibióticos (por ejemplo, dactinomicina (antes actinomicina), bleomicina, mitramicina, antramycin (AMC), caliqueamicinas o duocarmicinas), y agentes anti-mitóticos (por ejemplo, vincristina y vinblastina).

5 Otros restos efectores pueden incluir radionúclidos tales como, pero sin limitarse a, ^{111}In y ^{90}Y , Lu^{177} , Bismuto 213 , Californio 252 , Iridio 192 y Tungsteno 188 /Renio 188 y fármacos tales como, pero sin limitarse a alquilfosfolinas, inhibidores de la topoisomerasa I, taxoides y suramina.

10 Las técnicas para conjugar tales restos efectores con los anticuerpos se conocen bien en la técnica (véase, por ejemplo, Hellstrom et al., *Controlled Drug Delivery*, 2ª Ed., at pp. 623-53 (Robinson et al., eds., 1987)); Thorpe et al., 1982, *Immunol. Rev.* 62:119-58 y Dubowchik et al., 1999, *Pharmacology and Therapeutics* 83:67-123).

15 En un ejemplo, el anticuerpo anti-VEGF o un fragmento del mismo se fusiona por medio de un enlace covalente (por ejemplo, un enlace peptídico), a través del extremo N o el extremo C del anticuerpo o internamente, a una secuencia de aminoácidos de otra proteína (o una parte de la misma; por ejemplo, al menos a una parte de 10, 20 o 50 aminoácidos de la proteína). El anticuerpo, o fragmento del mismo, puede unirse a otra proteína en el extremo N del dominio constante del anticuerpo. Se pueden utilizar procedimientos de ADN recombinante para crear tales fusiones, por ejemplo como se describe en los documentos WO 86/01533 y EP0392745. En otro ejemplo la molécula efectora
20 puede aumentar la semivida *in vivo*, y/o aumentar el suministro de un anticuerpo a través de una barrera epitelial al sistema inmunitario. Ejemplos de moléculas efectoras adecuadas de este tipo incluyen polímeros, albúmina, proteínas que se unen a albúminas o compuestos que se unen a albúminas tales como se describen en el documento WO 2005/117984.

25 En ciertos aspectos, el anticuerpo anti-VEGF se conjuga con una toxina de molécula pequeña. En ciertas realizaciones ejemplares, el anticuerpo anti-VEGF de la divulgación se conjuga con dolastatina o análogos o derivados peptídicos de dolastatina, por ejemplo, una auristatina (Patentes de EE. UU. N^{os} 5.635.483 y 5.780.588). El resto farmacológico dolastatina o auristatina se puede unir al anticuerpo por medio de su extremo N (amino), carboxilo (C) o internamente (documento WO 02/088172). Las realizaciones ejemplares de auristatina incluyen
30 restos farmacológicos de monometilauristatina DE y DF, como se desvela en la Patente de EE. UU. N^o 7.498.298 (que desvela, por ejemplo, enlazadores y métodos para preparar compuestos de monometilauristatina tales como MMAE y MMAF conjugados con enlazadores).

35 En otras realizaciones ejemplares, las toxinas de molécula pequeña incluyen pero no se limitan a caliqueamicina, maitansina (Patente de EE. UU. N^o 5.208.020), tricoteno, y CC1065. En una realización de la divulgación, el anticuerpo se conjuga con una o más moléculas de maitansina (por ejemplo, aproximadamente 1 a aproximadamente 10 moléculas de maitansina por molécula de anticuerpo). La maitansina puede, por ejemplo, convertirse en May-SS-Me que se puede reducir en May-SH3 y reaccionar con un anticuerpo (Chari et al., 1992, *Cancer Research* 52: 127-131) para generar un conjugado de fusión anticuerpo-maitansinoide o Fc-maitansinoide.
40 Los análogos estructurales de la caliqueamicina que también se pueden utilizar incluyen pero no se limitan a γ_1^1 , γ_3^1 , PSAG, y θ_1^1 , (Hinman et al., 1993, *Cancer Research* 53:3336-3342; Lode et al., 1998, *Cancer Research* 58:2925-2928; Patente de EE. UU. N^o 5.714.586; Patente de EE. UU. N^o 5.712.374; Patente de EE. UU. N^o 5.264.586; Patente de EE. UU. N^o 5.773.001).

45 Los anticuerpos de la divulgación también se pueden conjugar con liposomas para un suministro dirigido (véase, por ejemplo, Park et al., 1997, *Adv. Pharmacol.* 40:399-435; Marty & Schwendener, 2004, *Methods in Molecular Medicine* 109:389-401).

50 En un ejemplo, los anticuerpos de la presente divulgación se pueden unir a restos de poli(etilenglicol) (PEG). En un ejemplo particular, el anticuerpo es un fragmento de anticuerpo y los restos PEG se pueden unir por medio de cualquier cadena lateral del aminoácido o grupo funcional de aminoácidos terminal que se localiza en el fragmento de anticuerpo, por ejemplo, cualquier grupo amino, tiol, hidroxilo o carboxilo libre. Tales aminoácidos del fragmento de anticuerpo pueden ser de origen natural o se pueden modificar en el fragmento utilizando métodos de ADN recombinante. Véase por ejemplo, la Patente de EE. UU. N^o 5.219.996. Se pueden utilizar múltiples sitios para unir
55 dos o más moléculas de PEG. Los restos de PEG se pueden unir covalentemente por medio de un grupo tiol de al menos un resto de cisteína localizado en el fragmento de anticuerpo. Cuando se utiliza un grupo tiol como el punto de unión, se pueden utilizar restos efectores activados apropiadamente, por ejemplo derivados selectivos del tiol tales como derivados de maleimidias y cisteína.

60 En un ejemplo específico, un anticuerpo anti-VEGF conjugado es un fragmento modificado Fab' que está PEGilado, es decir, que tiene PEG (poli(etilenglicol)) unido covalentemente, por ejemplo, según el método desvelado en el documento EP0948544. Véase también, *Poly(ethyleneglycol) Chemistry, Biotechnical and Biomedical Applications*, (J. Milton Harris (ed.), Plenum Press, New York, 1992); *Poly(ethyleneglycol) Chemistry and Biological Applications*, (J. Milton Harris and S. Zalipsky, eds., American Chemical Society, Washington D.C., 1997); y *Bioconjugation Protein Coupling Techniques for the Biomedical Sciences*, (M. Aslam y A. Dent, eds., Grove Publishers, New York, 1998); y
65 Chapman, 2002, *Advanced Drug Delivery Reviews* 54:531-545. El PEG se puede unir a una cisteína de la región

bisagra. En un ejemplo, un fragmento Fab' modificado con PEG tiene un grupo maleimida unido covalentemente a un único grupo tiol en una región bisagra modificada. Se puede unir covalentemente un resto de lisina al grupo maleimida y a cada uno de los grupos amina en el resto de lisina se puede unir a un polímero de metoxipoli(etilenglicol) que tiene un peso molecular de aproximadamente 20.000 Da. El peso molecular total del PEG unido al fragmento Fab' puede ser por lo tanto de aproximadamente 40.000 Da.

La palabra "marcador" cuando se utiliza en el presente documento se refiere a un compuesto o composición detectable que se puede conjugar directa o indirectamente a un anticuerpo anti-VEGF de la divulgación. El marcador puede ser detectable por sí mismo (por ejemplo, marcadores radioisótopos, o marcadores fluorescentes) o, en el caso de un marcador enzimático, puede catalizar una alteración química en un compuesto o composición de sustrato que es detectable. Los restos fluorescentes útiles incluyen, pero no se limitan a estos, fluoresceína, isotiocianato de fluoresceína, rodamina, 5-dimetilamina-1-naftalenosulfonilcloruro, ficoeritrina. Los marcadores enzimáticos útiles incluyen, pero no se limitan a estos, fosfatasa alcalina, peroxidasa de rábano rusticano, glucosa oxidasa.

Conjugados de anticuerpo anti-VEGF adicionales que son útiles, *inter alia*, para fines diagnósticos, se describen en la Sección 6.7 posterior.

6.7 Usos diagnósticos de los anticuerpos anti-VEGF

Los anticuerpos anti-VEGF de la divulgación, incluyendo los anticuerpos que se han modificado, por ejemplo, por biotinylación, peroxidasa de rábano rusticano, o cualquier otro resto detectable (incluyendo los descritos en la Sección 6.6), pueden utilizarse ventajosamente para fines diagnósticos.

En particular, los anticuerpos anti-VEGF se pueden utilizar, por ejemplo, pero sin limitación, para purificar o detectar VEGF, incluyendo métodos diagnósticos tanto *in vitro* como *in vivo*. Por ejemplo los anticuerpos son útiles en inmunoensayos para medir cualitativa y cuantitativamente los niveles de VEGF en muestras biológicas. Véase, por ejemplo, Harlow et al., *Antibodies: A Laboratory Manual*, Segunda Edición (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1988).

La presente divulgación engloba además anticuerpos o fragmentos de los mismos conjugados con un agente diagnóstico. Los anticuerpos se pueden utilizar diagnósticamente, por ejemplo, para detectar la expresión de una diana de interés en células, tejidos, o un suero específico; o para controlar el desarrollo o progresión de una respuesta inmunológica como parte del procedimiento de ensayo clínico para, por ejemplo, determinar la eficacia de un régimen de tratamiento determinado. La detección se puede facilitar acoplando el anticuerpo a una sustancia detectable. Ejemplos de sustancias detectables incluyen varias enzimas, grupos prostéticos, materiales fluorescentes, materiales luminiscentes, materiales bioluminiscentes, materiales radioactivos, metales emisores de positrones que se utilizan en varias tomografías de emisión de positrones, e iones metálicos paramagnéticos no radioactivos. La sustancia detectable se puede acoplar o conjugar o directamente al anticuerpo (o fragmento del mismo) o indirectamente por medio de un intermediario (tal como, por ejemplo, un enlazador conocido en la técnica) utilizando técnicas conocidas en la técnica. Ejemplos de marcadores enzimáticos incluyen luciferasas (por ejemplo, luciferasa de luciérnaga y luciferasa bacteriana; Patente de EE. UU. N° 4.737.456), luciferina, 2,3-dihidroftalazinadionas, malato deshidrogenasa, ureasa, peroxidasa tal como la peroxidasa de rábano rusticano (HRPO), fosfatasa alcalina, β -galactosidasa, acetilcolinesterasa, glucoamilasa, lisozima, oxidasas de sacáridos (por ejemplo, glucosa oxidasa, galactosa oxidasa, y glucosa-6-fosfato deshidrogenasa), oxidasas heterocíclicas (tales como uricasa y xantina oxidasa), lactoperoxidasa, microperoxidasa. Ejemplos de complejos de grupos prostéticos incluyen estreptavidina/biotina y avidina/biotina; ejemplos de materiales fluorescentes adecuados incluyen umbeliferona, fluoresceína, isotiocianato de fluoresceína, rodamina, diclorotriazinilamina de fluoresceína, cloruro de dansilo o ficoeritrina; un ejemplo de un material luminiscente incluye el luminol; ejemplos de materiales bioluminiscentes incluyen la luciferasa, luciferina, y aequorina; y ejemplos de materiales radioactivos adecuados incluyen ^{125}I , ^{131}I , ^{111}In o ^{99}Tc .

La divulgación proporciona la detección de la expresión de VEGF, que comprende poner en contacto una muestra biológica (células, tejidos, o fluidos corporales de un individuo) utilizando uno o más anticuerpos anti-VEGF de la divulgación (conjugados opcionalmente con un resto detectable), y detectar si la muestra es positiva a la expresión de VEGF o no, o si se ha alterado la expresión en la muestra (por ejemplo, ha aumentado o disminuido) en comparación con una muestra de control.

Las enfermedades que se pueden diagnosticar utilizando los presentes métodos incluyen, pero no se limitan a las enfermedades descritas en el presente documento. En ciertas realizaciones, el tejido o fluido corporal es sangre periférica, leucocitos de sangre periférica, tejidos de biopsia tales como biopsias pulmonares o de piel, y tejidos.

6.8 Métodos terapéuticos usando anticuerpos anti-VEGF

6.8.1 Beneficios clínicos

Los anticuerpos anti-VEGF de la divulgación se pueden utilizar para tratar varias neoplasias o afecciones no neoplásicas que se caracterizan por angiogénesis patológicas.

Los anticuerpos de la divulgación son útiles en el tratamiento de tumores en los que la angiogénesis tiene un papel importante en el crecimiento tumoral, que incluye cánceres y tumores benignos. Ejemplos del cáncer que se trata en el presente documento incluyen, pero no se limitan a, carcinoma, linfoma, blastoma, sarcoma, y leucemia. Ejemplos más particulares de tales cánceres incluyen cáncer de células escamosas, cáncer de pulmón (incluyendo cáncer de pulmón de células pequeñas, cáncer de pulmón de células no pequeñas, adenocarcinoma de pulmón y carcinoma de pulmón de células escamosas), cáncer de peritoneo, cáncer hepatocelular, cáncer gástrico o de estómago (incluyendo el cáncer gastrointestinal), cáncer pancreático, glioblastoma, cáncer de cuello uterino, cáncer ovárico, cáncer de hígado, cáncer de vejiga, hepatoma, cáncer de mama, cáncer de colon, cáncer colorrectal, carcinoma endometrial o uterino, carcinoma de glándula salivar, cáncer de riñón o renal, cáncer de hígado, cáncer de próstata, cáncer vulvar, cáncer de tiroides, carcinoma hepático y varios tipos de cáncer de cabeza y cuello, así como linfoma de linfocitos B (incluyendo linfoma no Hodgkin de bajo grado/folicular (NHL), NHL linfocítico de células pequeñas (SL); NHL de grado medio/folicular; NHL difuso de grado medio; NHL inmunoblástico de alto grado; NHL linfoblástico de alto grado; NHL de alto grado de células pequeñas no escindidas; NHL de enfermedad masiva; linfoma de células en mantel; linfoma relacionado con SIDA; y Macroglobulinemia de Waldenstrom); leucemia linfocítica crónica (CLL); leucemia linfoblástica aguda (ALL); leucemia de células pilosas; leucemia mieloblástica aguda; y trastorno linfoproliferativo pos-trasplante (PTLD), así como una proliferación vascular anormal asociada con facomatosis, edema (tal como el que se asocia con tumores cerebrales), y síndrome de Meigs. Más particularmente, los cánceres que son susceptibles de tratarse con los anticuerpos de la divulgación incluyen el cáncer de mama, cáncer colorrectal, cáncer rectal, cáncer de pulmón de células no pequeñas, linfoma no Hodgkin (NHL), cáncer de células renales, cáncer de próstata, cáncer de hígado, cáncer pancreático, sarcoma de tejidos blandos, sarcoma de Kaposi, carcinoma carcinoide, cáncer de cabeza y cuello, melanoma, cáncer ovárico, mesotelioma, y mieloma múltiple. En algunas realizaciones, los anticuerpos anti-VEGF de la divulgación se utilizan para tratar el cáncer colorrectal en un paciente humano.

La presente divulgación engloba toda la terapia angiogénica, una estrategia de tratamiento del cáncer que tiene el fin de inhibir el desarrollo de los vasos sanguíneos tumorales que se necesitan para el aporte de nutrientes y el soporte del crecimiento tumoral. Debido a que la angiogénesis está implicada tanto en el crecimiento del tumor primario como en la metástasis, el tratamiento antiangiogénico proporcionado por la divulgación es capaz de inhibir el crecimiento neoplásico o del tumor en el sitio primario así como para prevenir la metástasis de tumores en sitios secundarios.

Las afecciones no neoplásicas que son susceptibles de tratamiento con los anticuerpos de la divulgación incluyen las enfermedades retinianas (por ejemplo, la degeneración macular relacionada con la edad) y enfermedades inmunitarias e inflamatorias (por ejemplo, artritis reumatoide, psoriasis, aterosclerosis, retinopatías diabética y otras retinopatías proliferativas incluyendo la retinopatía del neonato prematuro, fibroplasia retrocristalina, glaucoma neovascular, degeneración macular relacionada con la edad, hiperplasia tiroidea (incluyendo la enfermedad de Grave), trasplante corneal y otros tejidos, inflamación crónica, inflamación pulmonar, síndrome nefrótico, pre-eclampsia, ascitis, derrame pericárdico (tal como el que se asocia con pericarditis), y derrame pleural.

En consecuencia, la presente divulgación proporciona métodos de tratamiento de cualquiera de las enfermedades anteriores en un paciente que tiene necesidad de los mismos, que comprenden: la administración al paciente de un anticuerpo anti-VEGF de la divulgación. Opcionalmente, dicha administración se repite, por ejemplo, después de un día, dos días, tres días, cinco días, una semana, dos semanas, tres semanas, un mes, cinco semanas, seis semanas, siete semanas, ocho semanas, dos meses, o tres meses. La administración repetida puede ser con la misma dosis o con una dosis diferente. La administración se puede repetir una vez, dos veces, tres veces, cuatro veces, cinco veces, seis veces, siete veces, ocho veces, nueve veces, diez veces o más. Por ejemplo, de acuerdo con ciertos regímenes de tratamiento un paciente recibe terapia anti-VEGF durante un periodo prolongado de tiempo, por ejemplo, 6 meses, 1 año o más. La cantidad del anticuerpo anti-VEGF que se administra al paciente es en ciertas realizaciones una cantidad terapéuticamente eficaz. Como se utiliza en el presente documento una cantidad "terapéuticamente eficaz" de anticuerpo VEGF se puede administrar como una dosis única o en el curso de un régimen terapéutico, por ejemplo, en el curso de una semana, dos semanas, tres semanas, un mes, tres meses, seis meses, un año, o más. Los regímenes terapéuticos ejemplares se describen en la Sección 6.11 posterior.

De acuerdo con la presente divulgación, el tratamiento de una enfermedad engloba el tratamiento de pacientes ya diagnosticados como que tienen cualquier forma de la enfermedad y en cualquier estadio o manifestación clínica; el retraso de la aparición o la evolución o agravamiento o deterioro de los síntomas o signos de la enfermedad; y/o la prevención y/o reducción de la gravedad de la enfermedad.

Un "sujeto" o "paciente" al que se administra el anticuerpo anti-VEGF de la divulgación es preferentemente un mamífero tal como uno no primate (por ejemplo, una vaca, cerdo, caballo, gato, perro, rata, etc.) o un primate (por ejemplo, un mono o un ser humano). En ciertas realizaciones, el sujeto o paciente es un ser humano. En ciertos aspectos, el ser humano es un paciente pediátrico. En otros aspectos, el ser humano es un paciente adulto.

6.9 Composiciones farmacéuticas y vías de administración

- Se proporcionan en el presente documento, composiciones que comprenden un anticuerpo anti-VEGF de la divulgación y, opcionalmente uno o más agentes terapéuticos, tales como los agentes terapéuticos de combinación descritos en la Sección 6.10 posterior. Las composiciones se suministrarán normalmente como parte de una composición farmacéutica estéril que incluirá normalmente un vehículo farmacéuticamente aceptable. Esta composición puede estar en cualquier forma adecuada (dependiendo del método deseado para su administración al paciente).
- Los anticuerpos anti-VEGF de la divulgación se pueden administrar a un paciente por una variedad de vías tales como vía oral, transdérmica, subcutánea, intranasal, intravenosa, intramuscular, intraocular, tópica, intratecal, e intracerebroventricular. La ruta más adecuada para la administración en un caso determinado dependerá del anticuerpo particular, el sujeto y la naturaleza y gravedad de la enfermedad y la condición física del sujeto.
- Para el tratamiento de indicaciones distintas de las enfermedades retinianas, la dosis eficaz de un anticuerpo anti-VEGF de la divulgación puede variar desde aproximadamente 0,1 a aproximadamente 75 mg/kg por administración única (por ejemplo, en embolada), administraciones múltiples o administración continua, o para conseguir una concentración sérica de 0,01-5000 µg/ml por administración única (por ejemplo, en embolada), administraciones múltiples o administración continua, o cualquier intervalo o valor eficaz en el mismo que depende de la afección que se va a tratar, la vía de la administración y la edad, peso y condición del sujeto. En ciertas realizaciones, por ejemplo, para el tratamiento del cáncer, cada dosis puede variar entre aproximadamente 0,1 mg a aproximadamente 50 mg por kilogramo de peso corporal, por ejemplo de aproximadamente 3 mg a aproximadamente 25 mg por kilogramo de peso corporal. El anticuerpo se puede formular como una solución acuosa y administrarse por inyección subcutánea.
- Para el tratamiento de enfermedades retinianas (por ejemplo, la degeneración macular relacionada con la edad (AMD), la dosificación da como resultado una concentración adecuada en el humor acuoso del anticuerpo anti-VEGF en el ojo inyectado de 1-50 µ/ml. Para el tratamiento de AMD, cada dosis puede ser desde 0,1 mg a aproximadamente 1 mg, por ejemplo, desde aproximadamente 0,25 a aproximadamente 0,5 mg. El anticuerpo se puede formular en una solución acuosa y administrarse por inyección intravítrea.
- Las composiciones farmacéuticas se pueden presentar convenientemente en forma de dosis unitaria que contengan una cantidad predeterminada de un anticuerpo anti-VEGF de la divulgación por dosis. Tal unidad puede contener por ejemplo pero sin limitación 0,1 mg a 5 g, por ejemplo 1 mg a 1g, o 10 a 50 mg. Los vehículos farmacéuticamente aceptables para su uso en la divulgación puede tener una amplia variedad de formas que dependen, por ejemplo, de la afección que se va a tratar o la vía de administración.
- Las formulaciones terapéuticas de los anticuerpos anti-VEGF de la divulgación se pueden preparar para su almacenamiento como formulaciones liofilizadas o soluciones acuosas mezclando el anticuerpo que tiene el grado de pureza deseado con vehículos, excipientes o estabilizantes farmacéuticamente aceptables que se emplean típicamente en la técnica (a todos los cuales se les denomina "vehículos" en el presente documento), es decir, agentes tamponantes, agentes estabilizantes, conservantes, isotonicadores, detergentes no iónicos, antioxidantes, y otra miscelánea de aditivos. Véase, Remington's Pharmaceutical Sciences, 16ª edición (Osol, ed. 1980). Tales aditivos no deben ser tóxicos para los receptores a las dosis y concentraciones empleadas.
- Los agentes tamponantes ayudan a mantener el pH en el intervalo que se aproxima a las condiciones fisiológicas. Pueden estar presentes en intervalos de concentración desde aproximadamente 2 mM a aproximadamente 50 mM. Los agentes tamponantes adecuados para su uso en la presente divulgación incluyen ácidos tanto orgánicos como inorgánicos y sales de los mismos tales como tampones de citrato (por ejemplo una mezcla de citrato monosódico – citrato disódico, mezcla de ácido cítrico – citrato trisódico, mezcla de ácido cítrico – citrato monosódico, etc.), tampones de succinato (por ejemplo, mezcla de ácido succínico – succinato monosódico, mezcla de ácido succínico – hidróxido sódico, mezcla de ácido succínico – succinato disódico, etc.), tampones de tartrato (por ejemplo, una mezcla de ácido tartárico – tartrato sódico, una mezcla de ácido tartárico – tartrato potásico, mezcla de ácido tartárico – hidróxido sódico, etc.), tampones de fumarato (por ejemplo, una mezcla de ácido fumárico – fumarato monosódico, una mezcla de ácido fumárico – fumarato disódico, una mezcla de fumarato monosódico - fumarato disódico, etc.), tampones de gluconato (por ejemplo, una mezcla de ácido glucónico – gluconato sódico, mezcla de ácido glucónico – hidróxido sódico, mezcla de ácido glucónico – gluconato potásico, etc.) tampones de oxalato (por ejemplo, mezcla de ácido oxálico – oxalato sódico, mezcla de ácido oxálico – hidróxido sódico, mezcla de ácido oxálico – oxalato potásico, etc.), tampones lactato (por ejemplo, mezcla de ácido láctico – lactato sódico, mezcla de ácido láctico – hidróxido sódico, mezcla de ácido láctico – lactato potásico, etc.) y tampones de acetato (por ejemplo, mezcla de ácido acético – acetato sódico, mezcla de ácido acético – hidróxido sódico, etc.). Adicionalmente, se pueden utilizar tampones de fosfato, tampones de histidina, y sales de trimetilamina tales como Tris.
- Los conservantes que se pueden añadir para retardar el crecimiento microbiano, y se pueden añadir en cantidades que varían desde 0,2% -1% (p/v). Los conservantes adecuados para su uso en la presente divulgación incluyen, fenol, alcohol bencilico, meta-cresol, Metilparabeno, propilparabeno, cloruro de octadecildimetilbencil amonio,

hálidos de benzalconio (por ejemplo, cloruro, bromuro, y yoduro), cloruro de hexametonio, y alquilparabenos tales como el metil o el propil parabeno, catecol, resorcinol, ciclohexanol, y 3-pentanol. Los isotonicadores a veces llamados "estabilizantes" se pueden añadir para asegurar la isotonicidad de las composiciones líquidas de la presente divulgación e incluyen alcoholes polihídricos de azúcares, por ejemplo, alcoholes de azúcares trihídricos o mayores, tales como glicerina, eritritol, arabitól, xilitol, sorbitol y manitol. Estabilizantes se refiere a una amplia categoría de excipientes que pueden variar de función desde un agente de volumen a un aditivo que solubiliza el agente terapéutico o ayuda a evitar la desnaturalización o la adherencia a las paredes del envase. Los estabilizantes típicos pueden ser alcoholes polihídricos de azúcares (enumerados anteriormente); aminoácidos tales como arginina, glicina, glutamina, asparagina, histidina, alanina, ornitina, L-leucina, 2-fenilalanina, ácido glutámico, treonina, etc., azúcares orgánicos o alcoholes de azúcares, tales como lactosa, trehalosa, estaquiosa, manitol, sorbitol, xilitol, ribitol, mionisitol, galactitol, glicerol, incluyendo ciclitóles tales como inositol; polietilenglicol; polímeros de aminoácidos; agentes reductores que contienen sulfuros, tales como urea, glutatión, ácido tióctico, tioglucolato de sodio, tioglicerol, α -monotioglicerol y sulfato tiosódico; polipéptidos de bajo peso molecular (por ejemplo, péptidos de 10 restos o menos); proteínas tales como la seroalbúmina humana, seroalbúmina bovina, gelatina o inmunoglobulinas; polímeros hidrófilos, tales como polivinilpirrolidona, monosacáridos tales como xilosa, manosa, fructosa, glucosa; disacáridos tales como lactosa, maltosa, sacarosa y trisacáridos tales como rafinosa; y polisacáridos tales como dextrano. Los estabilizantes pueden estar presentes en el intervalo desde 0,1 a 10.000 partes por peso de proteína activa.

Se pueden añadir tensioactivos no iónicos o detergentes (también conocidos como "agentes humectantes") para ayudar a solubilizar el agente terapéutico así como para proteger la proteína terapéutica contra la agregación inducida por agitación, lo que permite también a la formulación exponerse a tensiones superficiales de cizalladura sin que se produzca la desnaturalización de la proteína. Los tensioactivos no iónicos adecuados incluyen polisorbatos (20, 80, etc.), polioxámeros (184, 188, etc.), polioles pluriónicos, monoéteres de polietileno sorbitán (TWEEN®-20, TWEEN®-80, etc.). Los tensioactivos no iónicos pueden estar presentes en un intervalo de aproximadamente 0,05 mg/ml a aproximadamente 1,0 mg/ml, por ejemplo aproximadamente 0,07 mg/ml a aproximadamente 0,2 mg/ml.

Una miscelánea adicional de excipientes incluye agentes de volumen (por ejemplo, almidón), agentes quelantes (por ejemplo, EDTA), antioxidantes (por ejemplo, ácido ascórbico, metionina, vitamina E), y cosolventes.

La formulación del presente documento puede contener también un agente terapéutico de combinación además del anticuerpo anti-VEGF de la divulgación. Ejemplos de agentes terapéuticos de combinación adecuados se proporcionan en la Sección 6.10 posterior.

La programación de la dosificación para la administración subcutánea puede variar entre una vez cada seis meses a diariamente dependiendo de factores clínicos, que incluyen el tipo de enfermedad, gravedad de la enfermedad, y la sensibilidad del paciente al anticuerpo anti-VEGF.

La dosificación de un anticuerpo anti-VEGF de la divulgación que se va a administrar variará de acuerdo con el anticuerpo particular, el tipo de enfermedad (por ejemplo, cáncer, inflamatoria, etc.), el sujeto, la gravedad de la enfermedad, la condición física del sujeto, el régimen terapéutico (por ejemplo, si se utiliza un agente terapéutico de combinación), y la vía seleccionada para la administración; la dosificación apropiada la puede determinar fácilmente un experto en la técnica.

Un experto en la técnica reconocerá que la cantidad y espacio de dosificaciones individuales óptimas de un anticuerpo anti-VEGF de la divulgación, se determinará por la naturaleza y la extensión de la afección que se va a tratar, la forma, vía y sitio de administración, y la edad y condición del sujeto en particular que se va a tratar, y que un médico en último término determinará las dosificaciones adecuadas que se van a utilizar. Esta dosificación se puede repetir tan a menudo como sea apropiado. Si se desarrollan efectos secundarios la cantidad y/o frecuencia de la dosificación se puede alterar o reducir, de acuerdo con la práctica clínica normal.

6.10 Terapia de combinación

Se describe a continuación métodos de combinaciones en los que se pueden utilizar los anticuerpos anti-VEGF de la divulgación. Los métodos de combinaciones de la divulgación implican la administración de al menos dos agentes al paciente, el primero de los cuales es un anticuerpo anti-VEGF de la divulgación, y el segundo de los cuales es un agente terapéutico de combinación. El anticuerpo anti-VEGF y el agente terapéutico de combinación se pueden administrar simultáneamente, secuencialmente o por separado.

Los métodos de terapia combinada de la presente divulgación pueden dar como resultado un efecto mayor que el de la suma, proporcionando beneficios terapéuticos cuando ni el anticuerpo anti-VEGF ni el agente terapéutico de combinación se administran en una cantidad que es terapéuticamente eficaz por sí sola.

En los métodos presentes, el anticuerpo anti-VEGF de la divulgación y el agente terapéutico de combinación se pueden administrar concurrentemente, bien simultáneamente o sucesivamente. Como se utiliza en el presente

- documento, se dice que el anticuerpo anti-VEGF de la divulgación y el agente terapéutico de combinación se administran sucesivamente si se administran al paciente el mismo día, por ejemplo, durante la misma visita del paciente. La administración sucesiva puede producirse con 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 u 8 horas de separación. Por el contrario, se dice que el anticuerpo anti-VEGF de la divulgación y el agente terapéutico de combinación se administran por separado si se administran al paciente en días diferentes, por ejemplo el anticuerpo anti-VEGF y el agente terapéutico de combinación se pueden administrar con intervalos de 1 día, 2 días, o 3 días, una semana, 2 semanas o mensuales. En los métodos de la presente divulgación, la administración del anticuerpo anti-VEGF de la divulgación puede preceder o seguir a la administración del agente terapéutico de combinación.
- 5
- 10 Como ejemplo no limitante, el anticuerpo anti-VEGF de la divulgación y el agente terapéutico de combinación se pueden administrar concurrentemente durante un periodo de tiempo, seguido por un segundo periodo de tiempo en el que la administración del anticuerpo anti-VEGF de la divulgación y el agente terapéutico de combinación se alternan.
- 15 Debido a los efectos potencialmente sinérgicos de la administración de un anticuerpo anti-VEGF de la divulgación y un agente terapéutico de combinación, tales agentes se pueden administrar en cantidades que, si uno o ambos agentes se administraran solos, no serían terapéuticamente eficaces.
- 20 En ciertos aspectos, el agente terapéutico de combinación es un agente anti-angiogénico, un fármaco anti-reumático, un agente anti-inflamatorio, un agente quimioterápico, un radioterápico, un agente inmunosupresor, o un fármaco citotóxico.
- 25 Se contempla que cuando se utiliza para tratar varias enfermedades, los anticuerpos anti-VEGF de la divulgación se pueden combinar con otros agentes terapéuticos adecuados para la misma o enfermedades similares. Cuando se utilizan para tratar el cáncer, los anticuerpos de la presente divulgación se pueden utilizar en combinación con terapias convencionales contra el cáncer, tales como cirugía, radioterapia, quimioterapia o combinaciones de las mismas.
- 30 En algunos otros aspectos, otros agentes terapéuticos útiles para la terapia tumoral de combinación con el anticuerpo de la divulgación incluyen los antagonistas, por ejemplo, anticuerpos, de otros factores que están implicados en el crecimiento tumoral, tales como EGFR, ErbB2 (también conocido como Her2), ErbB3, ErbB4, o TNF- α .
- 35 A veces, para el tratamiento de cánceres y enfermedades inmunitarias, puede ser beneficioso administrar también una o más citoquinas al paciente. En una realización preferida el anticuerpo VEGF se co-administra con un agente inhibidor del crecimiento.
- 40 Las dosis adecuadas para el agente inhibidor del crecimiento son las que se utilizan actualmente y que se pueden disminuir debido a la acción combinada (sinergia) del agente inhibidor del crecimiento y el anticuerpo anti-VEGF.
- 45 Para el tratamiento de cánceres, enfermedades inmunitarias y enfermedades de retina, se pueden utilizar adecuadamente agentes anti-inflamatorios en combinación con los anticuerpos anti-VEGF de la divulgación. Los agentes anti-inflamatorios incluyen, pero no se limitan a, acetaminofeno, difenhidramina, meperidina, dexametasona, pentasa, mesalazina, asacol, fosfato de codeína, benorilato, fenbufeno, naprosin, diclofenaco, etodolaco e indometacina, aspirina e ibuprofeno.
- 50 Para el tratamiento de cánceres, se pueden utilizar adecuadamente agentes quimioterápicos en combinación con los anticuerpos anti-VEGF de la divulgación. Los agentes quimioterápicos incluyen, pero no se limitan a, moléculas radioactivas, toxinas, también denominadas citotoxinas o agentes citotóxicos, que incluyen cualquier agente que es perjudicial para la viabilidad de las células, agentes y liposomas y otras vesículas que contienen compuestos quimioterápicos. Ejemplos de agentes quimioterápicos adecuados incluyen pero no se limitan a 1-deshidrotestosterona, 5-fluorouracilo decarbazina, 6-mercaptapurina, 6-tioguanina, actinomicina D, adriamicina, aldesleucina, un anticuerpo anti- $\alpha 5\beta 1$ integrina, agentes alquilantes, alopurinol sódico, altretamina, amifostina, anastrozol, antramicina (AMC)), agentes antimetabólicos, cis-diclorodiamina platino (II) (DDP) cisplatino, diaminocloro platino, antraciclinas, antibióticos, antimetabólicos, asparaginasa, BCG vivo (intravesical), fosfato de betametasona sódica y acetato de betametasona, bicalutamida, sulfato de bleomicina, busulfan, leucovorín cálcico, claqueamicina, capecitabina, carboplatino, lomustina (CCNU), carmustina (BSNU), clorambucilo, cisplatino, cladribina, colchicina, estrógenos conjugados, ciclofosfamida, citarabina, citocalasina B, citoxan, dacarbazina, dactinomicina (llamada anteriormente actinomicina), daunorrubicina HCL, citrato de daunorrubicina, denileucina difitox, dextrazoxano, dibromomanitol, dihidroxiantracindiona, docetaxel, mesilato de dolasetron, HCL de doxorubicina, dronabinol, asparaginasa de E. coli, eoloxicimab, emetina, epoetina- α , asparaginasa de Erwinia, estrógenos esterificados, estradiol, fosfato de estramustina sodio, bromuro de etidio, etinil estradiol, etidronato, etopósido de factor citrororum, fosfato de etopósido, filgrastim, floxuridina, Fluconazol, fosfato de fludarabina, fluorouracilo, flutamida, ácido folínico, HCL de gemcitabina, glucocorticoides, acetato de goserelina, gramicidina D, HCL de granisetron, hidroxiurea, HCL de idarrubicina, ifosfamida, interferón α -2 β , HCL de irinotecan, letrozol, leucovorín calcio, acetato de leuprolida, HCL de levamisol, lidocaína, lomustina, maitansinoide, HCL de mecloretamina, acetato de medroxiprogesterona, acetato
- 65

de megestrol, HCL de melfalán, mercaptopurina, mesna, metotrexato, metiltestosterona, mitramicina, mitomicina C, mitotano, mitoxantrona, nilutamida, acetato de octreotida, CHL de ondansetron, paclitaxel, pamidronato disódico, pentostatina, HCL de pilocarpina, plimicina, polifeprosan 20 con implante de carmustina, porfimer sódico, procaína, HCL de procarbazona, propranolol, rituximab, sargamostim, estreptozocina, tamoxifeno, taxol, tenipósido, 5 testolactona, tetracaína, tiotepa clorambucilo, tioguanina, HCL de tiotepa topotecan, citrato de toremifeno, trastuzumab, tretinoína, valrubicina, sulfato de vinblastina, sulfato de vincristina, y tartrato de vinorelbina.

Se puede utilizar cualquier agente anti-angiogénico en conjunción con los anticuerpos anti-VEGF de la divulgación, incluyendo los enumerados por Carmeliet y Jain, 2000, Nature 407:249-257. En ciertas realizaciones, el agente anti-angiogénico es otro antagonista del VEGF o un antagonista del receptor del VEGF tales como variantes del VEGF, 10 fragmentos del receptor VEGF soluble, aptámeros capaces de bloquear el VEGF o VEGFR, anticuerpos neutralizantes VEGFR, inhibidores de bajo peso molecular o tirosina quinasas VEGFR y cualquier combinación de los mismos. Alternativamente, o además, se pueden administrar al paciente dos o más anticuerpos anti-VEGF.

En ciertas realizaciones, se puede utilizar una terapia hormonal en conjunción con los anticuerpos anti-VEGF de la divulgación. En algunas realizaciones, la terapia hormonal incluye uno o más agentes que inhiben estrógenos y/o 15 progesterona que promueven el crecimiento celular tumoral, por ejemplo, un modulador selectivo del receptor estrogénico tal como el tamoxifeno, un inhibidor de la aromatasa tal como exemestano (Aromasin®), o un agente que inhibe la producción de estrógenos tal como la goserelina (Zoladex). En otras realizaciones, la terapia hormonal es uno o más agentes que inhiben la producción de hormonas por los ovarios.

En algunos aspectos, el anticuerpo anti-VEGF se puede utilizar en conjunción con un inhibidor de molécula pequeña de la proteína tirosina quinasa (PTK). En algunas realizaciones, el inhibidor de PTK es específico para un receptor VEGF tirosina quinasa. En otras realizaciones el inhibidor de la PTK se une a más de uno de los receptores VEGF 25 de la familia de las tirosinas quinasas (por ejemplo, VEGFR-1, VEGFR-2). En otras realizaciones los inhibidores de la proteína tirosina quinasa útiles en la composición y métodos de la invención incluyen inhibidores de la PTK que no se unen selectivamente a la familia de receptores VEGF de tirosina quinasa, sino que también se unen a los dominios tirosina quinasa de otras familias de proteínas tales como HER2, HER3, HER4, PDGFR, y/o Raf.

En algunas realizaciones, la tirosina quinasa es un receptor de tirosina quinasa, es decir, es un dominio intra-celular de una proteína más grande que tiene un dominio de unión ligando extracelular y se activa por la unión de uno o 30 más ligandos. En ciertas realizaciones, la proteína tirosina quinasa no es un receptor tirosina quinasa. Los inhibidores de la PTK para su uso en los métodos de la presente divulgación incluyen, pero no se limitan a estos, gefitinib (ZD-1839, Iressa®), erlotinib (OSI-1774, Tarceva™), canertinib (CI-1033), vandetanib (ZD6474, Zactima®), tirfostina AG-825 (CAS 149092-50-2), lapatinib (GW-572016), sorafenib (BAY43-9006), AG-494 (CAS 133550-35-3), RG-13022 (CAS 149286-90-8), RG-14620 (CAS 136831-49-7), BIBW 2992 (Tovok), tirfostina 9 (CAS 136831-49-7), tirfostina 23 (CAS 118409-57-7), tirfostina 25 (CAS 118409-58-8), tirfostina 46 (CAS 122520-85-8), tirfostina 47 (CAS 122520-86-9), tirfostina 53 (CAS 122520-90-5), buteina (1-(2,4-dihidroxifenil)-3-(3,4-dihidroxifenil)-2-propen-1-ona 2',3,4,4'-Tetrahidroxichalcona; CAS 487-52-5), curcumina ((E,E)-1,7-bis(4-Hidroxi-3-metoxifenil)-1,6-heptadieno-3,5- 40 diona; CAS 458-37-7), N4-(1-Benzil-1H-indazol-5-il)-N6,N6-dimetil-pirido-[3,4-d]-pirimidine-4,6-diamine (202272-68-2), AG-1478, AG-879, ácido Ciclopropanocarboxílico-(3-(6-(3-trifluorometil-fenilamino)-pirimidin-4-il amino)-fenil)-amida (CAS 879127-07-8), N8-(3-Chloro-4-fluorofenil)-N2-(1-metilpiperidin-4-il)-pirimido[5,4-d]pirimidine-2,8-diamine, 2HCl (CAS 196612-93-8), 4-(4-Benziloxianilino)-6,7-dimetoxiquinazolina (CAS 179248-61-4), N-(4-((3-Cloro-4-fluorofenil) amino) pirido [3,4-d]pirimidin-6-il)2-butanamida (CAS 881001-19-0), EKB-569, HKI-272, y HKI-357.

En otra realización específica, el anticuerpo anti-VEGF de la divulgación se utiliza en combinación con quimioterapia intravenosa basada en 5-fluorouracilo. Esta combinación es adecuada, *inter alia*, para la primera o segunda línea de 45 tratamiento del carcinoma metastático del colon o el recto.

En otra realización específica, el anticuerpo anti-VEGF de la divulgación se utiliza en combinación con carboplatino y paclitaxel. Esta combinación es adecuada para, *inter alia*, el tratamiento de primera línea de pacientes con cáncer de pulmón no operable, avanzado localmente, recurrente o metastático no de células escamosas, no de células pequeñas.

En otra realización específica, el anticuerpo anti-VEGF de la divulgación se utiliza en combinación con paclitaxel. Esta combinación es adecuada para, *inter alia*, el tratamiento de pacientes que no han recibido quimioterapia para 50 cáncer de mama metastático negativo a HER-2.

Para el tratamiento de enfermedades retinianas, los anticuerpos anti-VEGF de la divulgación se pueden utilizar en la combinación con E10030, un aptámero pegilado anti factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), con ARC1905, un aptámero pegilado dirigido al componente C5 de la cascada de complemento; y volociximab, un anticuerpo monoclonal que se dirige al receptor transmembrana $\alpha 5\beta 1$ integrina; terapia fotodinámica con Visudyne® (PDT); o con Macugen®, un aptámero (pegatanib sódico).

6.11 Regímenes terapéuticos

5 La presente divulgación proporciona regímenes terapéuticos que implican la administración de los anticuerpos anti-VEGF de la divulgación. El régimen terapéutico variará dependiendo de la edad, peso y afección enfermedad del paciente. El régimen terapéutico puede continuar durante 2 semanas hasta indefinidamente. En realizaciones específicas, el régimen terapéutico se continúa durante 2 semanas hasta 6 meses, desde 3 meses a 5 años, desde 6 meses a 1 o 2 años, desde 8 meses a 18 meses, o de manera similar. El régimen terapéutico puede ser un régimen de dosis no variable o un régimen de dosis múltiple variable.

10 Para los regímenes de dosificación ejemplares descritos posteriormente, el anticuerpo anti-VEGF se puede administrar como una solución estéril libre de conservantes para administración subcutánea.

15 Para el tratamiento del cáncer colorrectal metastático, un anticuerpo anti-VEGF de la divulgación se administra intravenosamente a una dosis de 0,5-15 mg/kg cada 2 semanas con IFL (régimen de irinotecán, 5-fluorouracilo y leucovorín) en embolada. En realizaciones específicas, la dosis es de 1-4 mg/kg, 2-6 mg/kg, 0,5-3 mg/kg, 1-10 mg/kg, 3-4,8 mg/kg o 1-4,5 mg/kg cada dos semanas con IFL en embolada.

20 En otra realización para el tratamiento del cáncer colorrectal metastático, un anticuerpo anti-VEGF de la divulgación se administra por vía intravenosa a una dosis de 1-30 mg/kg cada dos semanas con FOLFOX4 (con un régimen de oxaliplatino, leucovorina, y fluorouracilo), En realizaciones específicas, la dosis es de 2-9 mg/kg, 3-12 mg/kg, 1-7,5 mg/kg, 2-20 mg/kg, 6-9,75 mg/kg o 4-9,5 mg/kg cada dos semanas con FOLFOX4.

25 Para el tratamiento del cáncer de pulmón de células no pequeñas no escamosas, un anticuerpo anti-VEGF de la divulgación se administra por vía intravenosa a una dosis de 2-40 mg/kg cada tres semanas con carboplatino/paclitaxel, En realizaciones específicas, la dosis es de 5-14 mg/kg, 4-20 mg/kg, 10-17,5 mg/kg, 7-14 mg/kg, 10-30 mg/kg o 3-30 mg/kg cada tres semanas con carboplatino/paclitaxel.

30 Para el tratamiento de cáncer de mama metastático, un anticuerpo anti-VEGF de la divulgación se administra por vía intravenosa a un dosis de 0,5-20 mg/kg cada dos semanas con paclitaxel, En realizaciones específicas, la dosis es de 1-4 mg/kg, 2-6 mg/kg, 0,5-3 mg/kg, 1-10 mg/kg, 3-4,8 mg/kg o 1-4,5 mg/kg cada dos semanas con paclitaxel.

35 Para el tratamiento de cáncer de mama metastático, se administra un anticuerpo anti-VEGF de la divulgación por vía intravenosa a una dosis de 0,5-20 mg/kg cada dos semanas como monoterapia. En realizaciones específicas, la dosis es de 1-4 mg/kg, 2-6 mg/kg, 0,5-3 mg/kg, 1-10 mg/kg, 3-4,8 mg/kg o 1-4,5 mg/kg cada dos semanas como monoterapia.

40 Para el tratamiento de la degeneración macular relacionada con la edad (AMD), se administra un anticuerpo anti-VEGF de la divulgación a una dosis de 0,1-1 mg por inyección intravítrea una vez al mes (aproximadamente 28 días). En realizaciones específicas, la dosis es de 0,1-0,4 mg, 0,2-0,6 mg, 0,1-0,25 mg, 0,25-0,5 mg, 0,25-0,75 mg, o 0,3-0,45 mg por inyección intravítrea una vez al mes (aproximadamente 28 días). En una realización específica, un paciente tratado con un anticuerpo anti-VEGF de la divulgación tiene AMD húmeda. En otra realización específica, un paciente tiene una AMD seca.

6.12 Kits de diagnóstico y farmacéuticos

45 Se engloban en la presente divulgación kits farmacéuticos que contienen los anticuerpos anti-VEGF (incluyendo anticuerpos conjugados) de la divulgación. El kit farmacéutico es un envase que comprende el anticuerpo anti-VEGF de la divulgación (por ejemplo, en forma liofilizada o como una solución acuosa) y uno o más de los siguientes:

- 50
- Un agente terapéutico de combinación, por ejemplo como los descritos en la Sección 6.10 anterior.
 - Un dispositivo para administrar el anticuerpo anti-VEGF, por ejemplo, un inyector de pluma, una aguja y/o una jeringa; y
 - Agua o tampón de calidad farmacéutica para resuspender el anticuerpo si el anticuerpo está en forma liofilizada.

55 En ciertos aspectos, cada dosis unitaria del anticuerpo anti-VEGF se envasa por separado, y un kit puede contener una o más dosis unitarias (por ejemplo, dos dosis unitarias, tres dosis unitarias, cuatro dosis unitarias, cinco dosis unitarias, ocho dosis unitaria, diez dosis unitarias, o más). En una realización específica, la una o más dosis unitarias se albergan cada una en una jeringa o inyección de pluma.

60 Los kits de diagnóstico que contienen los anticuerpos anti-VEGF (incluyendo los anticuerpos conjugados) de la divulgación también se engloban en el presente documento. El kit de diagnóstico es un envase que comprende el anticuerpo anti-VEGF de la divulgación (por ejemplo, o en forma liofilizada o como una solución acuosa) y uno o más reactivos útiles para llevar a cabo un ensayo diagnóstico. Cuando el anticuerpo anti-VEGF está marcado con una enzima, el kit puede incluir sustratos y cofactores necesarios para la enzima (por ejemplo, un sustrato precursor que proporciona el cromóforo o fluoróforo detectable). Además, se pueden incluir otros aditivos, tales como

65

estabilizantes, tampones (por ejemplo, un tampón de bloqueo o un tampón de lisis). En ciertas realizaciones el anticuerpo anti-VEGF incluido en un kit de diagnóstico está inmovilizado en una superficie sólida, o se incluye en el kit una superficie sólida (por ejemplo un portaobjetos) en el que se puede inmovilizar el anticuerpo. Las cantidades relativas de varios reactivos se pueden variar ampliamente para proporcionar concentraciones en solución de los reactivos que optimicen sustancialmente la sensibilidad del ensayo. En una realización específica, se pueden proporcionar el anticuerpo y uno o más reactivos (individualmente o combinados) como polvos secos, habitualmente liofilizados, incluyendo excipientes en los que cuando se disuelven proporcionarán una solución de reactivo que tiene la concentración apropiada.

7. Ejemplo 1: Identificación de los epítomos de células T del bevacizumab

7.1 Materiales y Métodos

7.1.1 Péptidos

Se sintetizaron los péptidos utilizando un formato multi-pin de Mimotopes (Adelaida, Australia). Las secuencias de las regiones V de cadena ligera y pesada del bevacizumab se sintetizaron como péptidos 15meros que se solapan en 12 aminoácidos (Tablas 3 y 4) para un total de 69 péptidos. Los péptidos se liofilizaron y se resuspendieron en DMSO (Sigma-Aldrich) a aproximadamente 1-2 mg/ml. Los péptidos de reserva se mantuvieron congelados a -20 °C.

7.1.2 Células mononucleares humanas de sangre periférica

La comunidad de donantes de productos de la capa leucocitaria se consiguió en el Stanford Blood Center, Palo Alto, CA. El material de la capa leucocitaria se diluyó 1:1 v:v con DPBS que no contenía ni calcio ni magnesio. El material de la capa leucocitaria diluido (25-35 ml) se precipitó en tubos de centrifuga cónicos de 50 ml (Sarsted o Costar) con 12,5 ml de FicollPlaque-PLUS (GE Healthcare). Las muestras se centrifugaron a 900 g durante 30 minutos a temperatura ambiente. Las células mononucleares de sangre periférica (PBMC) se recolectaron de la interfase. Se añadió DPBS para llegar a un volumen final de 50 ml y se centrifugaron las células a 350 g durante 5 minutos. Las células aglomeradas se resuspendieron en DPBS y se contaron.

7.1.3 Células dendríticas

Para aislar las células dendríticas, se sembraron en matraces de cultivo T75 (Costar) 10^8 PBMC recién aisladas con un volumen total de 30 ml de medio AIM V (Invitrogen). El exceso de PBMC se congeló a -80 °C en un 90% de suero bovino fetal (FCS), un 10% de DMSO a 5×10^7 células/ml. Se incubaron los matraces T75 a 37 °C en un 5% de CO₂ durante 2 horas. Las células no adheridas se retiraron, y la monocapa adherida se lavó con DPBS. Para diferenciar las células dendríticas de los monocitos, se añadieron 30 ml de medio AIM V que contenía 800 unidades/ml de GM-CSF (R & D Systems) y 500 unidades/ml de IL-4 (R & D Systems). Los matraces se incubaron durante 5 días. El día 5 se añadieron IL-1 α (Endogen) y TNF α (Endogen) a 50 pg/ml y 0,2 ng/ml. Los matraces se incubaron dos días más. El día 7, se recolectaron las células dendríticas por adición de 3 ml de 10 mM de EDTA que contenía 0,5 a 1,0 mg de Mitomicina C (Sigma-Aldrich) para una concentración final de 10 mM de EDTA y 16,5 a 33 μ g/ml de Mitomicina C. Los matraces se incubaron una hora adicional a 37 °C y un 5% de CO₂. Se recolectaron las células dendríticas y se lavaron en medio AIM V 2-3 veces.

7.1.4 Cultivo celular

El día 7, las PBMC autólogas previamente congeladas se descongelaron rápidamente en un baño de agua a 37 °C. Se diluyeron inmediatamente las células en DPBS o medio AIM V y se centrifugaron a 350 g durante 5 minutos. Se enriquecieron las células CD4⁺ por selección negativa utilizando perlas magnéticas (kit Easy-Sep CD4⁺, Stem-Cell Technologies). Las células T CD4⁺ autólogas y las células dendríticas se co-cultivaron a 2×10^5 células T CD4⁺ por 2×10^4 células dendríticas por pocillo en placas de fondo redondo de 96 pocillos (Costar 9077). Se añadieron los péptidos a aproximadamente 5 μ g/ml. Los pocillos de control contenían el vehículo DMSO (Sigma) solo a 0,25% v:v. Los pocillos de control positivo contenían DMSO al 0,25% y toxoide tetánico (List Biologicals o CalBioChem) a 1 μ g/ml. Los cultivos se cultivaron durante 5 días. El día 5, se añadieron 0,25 μ Ci de timidina tritiada por pocillo (Amersham o GE Healthcare). Los cultivos se recolectaron el día 6 de las mallas de filtro utilizando un recolector celular Packard Filtermate. Se llevó a cabo el recuento de centelleo utilizando un contador de centelleo Wallac MicroBeta 1450 (Perkin Elmer).

7.1.5 Análisis de datos

Los valores CPM medios de fondo se calcularon promediando los resultados individuales de 6 a 12 repeticiones. Los valores CPM de los cuatro pocillos de control positivo se promediaron. Se replicaron o triplicaron pocillos para cada péptido y se promediaron. Los valores del índice de estimulación de los pocillos del control positivo y los péptidos se calcularon dividiendo los valores de CPM medios experimentales por los valores de control medios. Con el fin de incluirse en el grupo de datos, era necesario un índice de estimulación superior a 3,0 en los pocillos de control positivo de toxoide tetánico. Se señalaba una respuesta para cualquier péptido que resultara en un índice de

estimulación de 2,95 o más. Los péptidos se ensayaron utilizando muestras de sangre periférica de un grupo de 99 donantes. Se recopilieron las respuestas de todos los péptidos. Para cada péptido que se ensayó, se calculó el porcentaje del grupo del donante que respondía con un índice de estimulación de 2,95 o mayor. Además, se calculó también el promedio del índice de estimulación de todos los donantes.

5

7.2 Resultados

7.2.1 Identificación de epítomos de células T CD4⁺ en las regiones VH y VL del bevacizumab

10 Los epítomos peptídicos de células T CD4⁺ se identificaron por un análisis del porcentaje de respuestas a los péptidos en el grupo de 99 donantes. El porcentaje medio de respuesta y la desviación estándar se calcularon para todos ensayos de los péptidos que describen las regiones V de la cadena pesada y ligera del bevacizumab. Una tasa de respuesta mayor o igual que la respuesta de fondo media más tres desviaciones estándar se consideraba un epítomo de células T CD4⁺ potencial. Para la región V de la cadena ligera del bevacizumab, se ensayaron 32 péptidos (Tabla 3) que daban un resultado de la media del porcentaje de la respuesta de fondo de $2,1 \pm 2,7\%$. Se determinó que tres desviaciones estándar por encima del fondo era un 10,2%. Un péptido en la posición 13 (Q40-T54) presentaba este nivel de respuesta en el grupo de datos de los péptidos de la cadena ligera del bevacizumab, con una tasa de respuesta del 15,2% (Figura 2A). Para la región V de la cadena pesada del bevacizumab, se ensayaron 37 péptidos (Tabla 4). El porcentaje medio de respuesta de fondo era de $2,8 \pm 3,1\%$. Tres desviaciones estándar por encima del fondo era un 12,1%. Un péptido en el grupo de datos la cadena pesada del bevacizumab, n° 18 (N52-R56), alcanzaba un porcentaje de respuesta del 16,2% (Figura 3A). Un segundo péptido en la posición n° 30 del grupo de datos de la cadena pesada alcanzaba una tasa de respuesta del 9,1% y se consideró un epítomo debido a un aumento del índice de estimulación (véase a continuación).

25 Se calculó el índice de estimulación medio para todos los péptidos del grupo de datos. El péptido 13 de cadena ligera tenía un alto índice de estimulación de $1,82 \pm 0,25$ e.e.m (Figura 2B). El péptido de cadena pesada n° 18 tenía un valor medio del índice de estimulación de $2,16 \pm 0,35$ e.e.m. (Figura 3B). El péptido en la posición n° 30 devolvía un índice de estimulación medio de $1,45 \pm 0,18$ e.e.m (Figura 3B) debido a un índice de estimulación medio elevado y una tasa de respuesta media superior. El péptido en la posición n° 30 se incluyó cuando se determinó el contenido de epítomo de células T CD4⁺ de esta región V de anticuerpo. Todos estos valores del índice de estimulación son significativamente más altos que el índice de estimulación medio de todos los péptidos en los dos grupos de datos ($1,14 \pm 0,07$ de los 69 péptidos de la cadena pesada y ligera).

35 Estos datos indican que hay tres regiones de epítomos de células T CD4⁺ en las regiones V del bevacizumab (Tabla 5). En la región VL, se encuentra un epítomo en el péptido de la posición 13 que engloba la región marco conservada 2 y dos aminoácidos de CDR2. La secuencia contiene una retromutación (V46) insertada en la secuencia durante la humanización. En la tabla 5, los aminoácidos derivados de la CDR están subrayados. En la cadena pesada, se identificaron dos regiones de epítomos peptídicos. El epítomo más fuerte en la posición n° 18 engloba toda la CDR2. La segunda región de epítomo peptídico contiene aminoácidos tanto de la región marco conservada 3 como de la CDR3.

40

7.2.2 Variantes de inmunogenicidad reducida de las variantes de anticuerpo Bevacizumab

45 El bevacizumab se sometió a análisis mutacional (véase el Ejemplo 2, posteriormente). Basándose en estudios de unión al antígeno que se llevaron a cabo en conjunción con el análisis mutacional, se identificó un grupo de sustituciones de aminoácidos candidatas en las regiones CDR-H2 y CDR-H3 que no tenían una afinidad significativamente reducida para el VEGF (Tabla 6). Se ensayaron estas sustituciones de aminoácidos individualmente y en combinación para identificar las variantes del bevacizumab con inmunogenicidad reducida en comparación con el anticuerpo de tipo silvestre.

50

8. Ejemplo 2: Identificación de variantes del bevacizumab con afinidad aumentada para el VEGF

55 Se sometió el anticuerpo bevacizumab a análisis mutacional completo para identificar mutantes que tenían un aumento de afinidad por el VEGF en comparación con el bevacizumab. El aumento de afinidad de los mutantes de alta afinidad candidatos para el VEGF en comparación con el bevacizumab se analizó por BIAcore para confirmar sus características de unión.

8.1 Materiales y Métodos

8.1.1 BIAcore

60

65 Se clonaron quince variantes de construcciones de la región VH del bevacizumab junto con la región VL sin modificar en un plásmido que contenía IgG₁ humana, que se expresaba en las líneas celulares 293T/17 por transfección transitoria, y anticuerpos purificados por afinidad con Proteína A o Proteína G. La afinidad de los anticuerpos para el VEGF (R&D systems, Minneapolis, MN) se determinó utilizando un sistema de resonancia de

plasmones superficiales BIAcore 2000 y 3000 (BIAcore, GE Healthcare, Piscataway, NJ). Primero se inmovilizó un anticuerpo policlonal Fc de cabra anti-humano (Jackson ImmunoResearch) en la superficie de un biosensor utilizando los reactivos BIAcore de acoplamiento amino de referencia (N-etil-N'-dimetilamino-propilcarbodiimida, EDC; N-hidroxisuccinimida, NHS; y HCL de etanolamina, pH 8,5), seguido por la captura de los anticuerpos anti-VEGF (bevacizumab y variantes de bevacizumab) en superficies paralelas con una tasa de flujo lenta de 5 $\mu\text{l}/\text{min}$. La TF se mantuvo baja para minimizar la avidéz debido a la naturaleza dimérica del VEGF. No se hizo la captura del anticuerpo en la superficie de referencia para que sirviera como control negativo. Posteriormente, se inyectó el VEGF a todas las celdas de flujo con una tasa de flujo de 50 $\mu\text{l}/\text{min}$ durante dos minutos para controlar la asociación seguida por un flujo de 25 minutos de tampón de ejecución HBS-P (10 mM de HEPES, 150 mM de cloruro sódico, 0,005% de P-20, pH 7,4) para controlar la fase de disociación. En cada ciclo, se inyectó la superficie, con 6 concentraciones diferentes de VEGF que variaban entre 0 nM y 512 nM y en incrementos de cuatro veces. Se regeneró la superficie con un 1,5% de H_3PO_4 con una tasa de flujo de 100 $\mu\text{l}/\text{min}$ en dos pulsos breves al final de cada ciclo. Los datos de unión se ajustaron al modelo de Langmuir 1:1 para extraer las constantes de unión a partir de un software BIAevaluate. Se aplicó una doble referencia en cada análisis para eliminar las respuestas de fondo del control de la superficie de referencia y solo tampón. Todos los datos de la cinética de unión se analizaron al menos por tres determinaciones por separado.

8.2 Resultados

Los resultados se presentan como números absolutos y como veces de mejora sobre el tipo silvestre. Casi todas las variantes enumeradas tienen tasas mejoradas de asociación (k_{on}) y disociación (k_{off}) en comparación con el bevacizumab tipo silvestre (Tabla 7). Los valores de afinidad finales de las variantes estaban en el intervalo de 0,1 nM y alcanzaba como mínimo 0,08 nM para la variante correspondiente con la SEC ID N° 82. Estos valores contrastan con el bevacizumab que tenía una afinidad medida en estos experimentos de 1,9 nM.

Las Tablas 8 y 9 muestran variantes adicionales de cadena pesada que los estudios de unión preliminares mostraban que tenían una afinidad mayor para el VEGF que el bevacizumab (datos no mostrados). La Tabla 10 muestra variantes de cadena pesada que los estudios preliminares indicaban que tenían una afinidad por el VEGF similar al bevacizumab (datos no mostrados).

9. Ejemplo 3: Selección de las variantes peptídicas desinmunizadas

Se generaron las variantes peptídicas que corresponden con las regiones inmunogénicas del bevacizumab (véase el Ejemplo 1) (Tablas 14-16). Las variantes peptídicas se seleccionaron basándose en el análisis mutacional completo descrito en el Ejemplo 2, en el que se identificó que las modificaciones no reducían sustancialmente la afinidad de unión del bevacizumab al VEGF.

Se sintetizaron y ensayaron un total de 77 péptidos basándose en los estudios de unión al antígeno, incluyendo dos síntesis de cada uno de los péptidos parentales 15méricos. Se ensayaron un total de 93 donantes con los péptidos parentales y variantes utilizando el método descrito en la Sección 7.1 y los resultados se muestran en las Figuras 4A-4C. En particular, las Figuras 4A-4C muestran las respuestas de las células T CD4⁺ a los epítomos peptídicos del bevacizumab mutante. Las respuestas medias de las secuencias del epítomo parental sin modificar se indican con marcas abiertas. Los círculos grandes indican péptidos seleccionados relacionados con la Tabla 17 (véase posteriormente). La Figura 4A muestra péptidos CDR2 VH; la Figura 4B muestra péptidos de CDR3 VH; y la Figura 4C muestra péptidos CDR2 VL. Los datos de inmunogenicidad para los péptidos seleccionados se muestran en la Tabla 17.

Para los péptidos de CDR2 de la región variable de la cadena pesada, el porcentaje de respuesta media a los péptidos parentales en este estudio era del 5,38% y 6,45%. Tres péptidos mutantes demostraron una tasa de respuesta total y un índice de estimulación medio reducidos en comparación con los péptidos parentales.

Las tasas de respuesta del péptido parental para los epítomos peptídicos CDR3 de la región variable de la cadena pesada en este estudio eran del 7,53% y 6,45%. Se encontró una secuencia peptídica mutante única que demostraba que reducía las respuestas totales en comparación con el péptido parental.

Finalmente, las tasas de respuesta del péptido parental de la CDR2 de la región variable de la cadena ligera en este estudio eran del 25,8% y 15%. Se identificó un péptido mutante que demostraba una inmunogenicidad total reducida en comparación con el péptido parental.

Para demostrar que las mutaciones desinmunizadas mantenían la afinidad por el VEGF en comparación con el bevacizumab, se utilizó la citometría de flujo para comparar las propiedades de unión de las variantes de anticuerpo incorporando mutaciones en los epítomos peptídicos modificados (sea como modificaciones de aminoácidos simples o dobles y bevacizumab). Varias mutaciones desinmunizadas tenían una afinidad comparable o aumentada por el VEGF en comparación con el bevacizumab.

5 En un estudio, se tiñeron células 293c18 transfectadas transitoriamente que expresan formas de unión a superficie de las variantes del bevacizumab, con VEGF rHu conjugado con Alexa647 (Invitrogen nº de Cat. PHG0143) a 3 nM y RPE kappa anti-humana de cabra (Southern Biotech nº de Cat. 2063-09) en una dilución de 1:400. Los datos se obtuvieron por medio de citometría de flujo utilizando un citómetro DakoCytomation CyAn ADP y se analizó utilizando un programa de análisis Treestar's FloJo. Las intensidades de fluorescencia medias (MFI) que se midieron en este trabajo se exponen en la Tabla 18.

10 En otro estudio, se midió la CE₅₀ del bevacizumab y variantes de anticuerpo que se unen al VEGF. Los puntos de titulación del anticuerpo se generaron utilizando el bevacizumab y sus variantes con VEGF rHu conjugado con Alexas647 como se ha descrito anteriormente, con el VEGF diluido en serie de dos veces desde 5 µM a 0,01 µM. Los valores de la CE₅₀ se muestran en la Tabla 19.

LISTADO DE SECUENCIAS

15 <110> AbbVie Biotherapeutics, Inc.
 <120> ANTICUERPOS ANTI-VEGF Y SUS USOS
 <130> P101835EP52
 20 <140>
 <141>
 <150> US 61/218.005
 25 <151> 17-06-2009
 <160> 412
 <170> Patent In versión 3.5
 30 <210> 1
 <211> 123
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 35 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota = "Descripción de la secuencia artificial: polipéptido sintético"
 40 <400> 1

ES 2 656 446 T3

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 Ser Ala Ser Gln Asp Ile Ser Asn Tyr
 20 25 30

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

Tyr Phe Thr Ser Ser Leu His 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 Tyr Ser Thr Val Pro Trp
 85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
 100 105

5 <210> 3
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota = "Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético"

<400> 3

Gly Tyr Thr Phe Thr Asn Tyr Gly Met Asn
 1 5 10

15 <210> 4
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota = "Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético"

25 <400> 4

Trp Ile Asn Thr Tyr Thr Gly Glu Pro Thr Tyr Ala Ala Asp Phe Lys
 1 5 10 15

Arg

30 <210> 5
 <211> 14

ES 2 656 446 T3

<212> PRT
<213> Secuencia artificial

5
<220>
<221> fuente
<223> /nota = "Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético"

<400> 5

Tyr Pro His Tyr Tyr Gly Ser Ser His Trp Tyr Phe Asp Val
1 5 10

10

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

15

<220>
<221> fuente
<223> /nota = "Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético"

20

<400> 6

Ser Ala Ser Gln Asp Ile Ser Asn Tyr Leu Asn
1 5 10

25

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

30

<220>
<221> fuente
<223> /nota = "Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético"

35

<400> 7

Phe Thr Ser Ser Leu His Ser
1 5

40

<210> 8
<211> 9
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

45

<220>
<221> fuente
<223> /nota = "Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético"

<400> 8

Gln Gln Tyr Ser Thr Val Pro Trp Thr
1 5

50

<210> 9
<211> 231
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

55

<220>
<221> fuente

<223> /nota = "Descripción de la secuencia artificial: polipéptido sintético"

<400> 9

ES 2 656 446 T3

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

<210> 10
<211> 214

ES 2 656 446 T3

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

5 <221> fuente

<223> /nota = "Descripción de la secuencia artificial: polipéptido sintético"

<400> 10

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 Ser Ala Ser Gln Asp Ile Ser Asn Tyr
20 25 30

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

Tyr Phe Thr Ser Ser Leu His 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 Tyr Ser Thr Val Pro Trp
85 90 95

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

Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
115 120 125

Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
130 135 140

Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
145 150 155 160

Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
165 170 175

Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
180 185 190

Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser

10

195

200

205

Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210

5 <210> 11
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota = "Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético"

<400> 11

Gly Tyr Asp Phe Thr His Tyr Gly Met Asn
1 5 10

15 <210> 12
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota = "Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético"

25 <400> 12

Tyr Pro Tyr Tyr Tyr Gly Thr Ser His Trp Tyr Phe Asp Val
1 5 10

30 <210> 13
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

35 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota = "Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético"

<400> 13

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

40 <210> 14
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

45 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota = "Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético"

50 <400> 14

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

ES 2 656 446 T3

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

5

<220>
 <221> fuente
 <223> /nota = "Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético"

10

<400> 15

Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile
1 5 10 15

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

15

<220>
 <221> fuente
 <223> /nota = "Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético"

20

<400> 16

Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Ser
1 5 10 15

25

<210> 17
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

30

<220>
 <221> fuente
 <223> /nota = "Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético"

35

<400> 17

Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Ser Ala Ser Gln
1 5 10 15

40

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

45

<220> <221> fuente
 <223> /nota = "Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético"

<400> 18

Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Ser Ala Ser Gln Asp Ile Ser
1 5 10 15

50

<210> 19
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

55

<220>

ES 2 656 446 T3

<221> fuente
 <223> /nota = "Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético"

<400> 19

5

Val Thr Ile Thr Cys Ser Ala Ser Gln Asp Ile Ser Asn Tyr Leu
1 5 10 15

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

10

<220>
 <221> fuente
 <223> /nota = "Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético"

15

<400> 20

Thr Cys Ser Ala Ser Gln Asp Ile Ser Asn Tyr Leu Asn Trp Tyr
1 5 10 15

20

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

25

<220>
 <221> fuente
 <223> /nota = "Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético"

30

<400> 21

Ala Ser Gln Asp Ile Ser Asn Tyr Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys
1 5 10 15

35

<210> 22
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <221> fuente
 <223> /nota = "Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético"

40

<400> 22

Asp Ile Ser Asn Tyr Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys
1 5 10 15

45

<210> 23
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

50

<220>
 <221> fuente
 <223> /nota = "Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético"

55

<400> 23

ES 2 656 446 T3

Asn Tyr Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys
1 5 10 15

5 <210> 24
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <221> fuente
 10 <223> /nota = "Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético"

<400> 24

Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Val Leu Ile
1 5 10 15

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

20 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota = "Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético"

25 <400> 25

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

30 <210> 26
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

35 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota = "Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético"

<400> 26

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

40 <210> 27
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

45 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota = "Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético"

50 <400> 27

Ala Pro Lys Val Leu Ile Tyr Phe Thr Ser Ser Leu His Ser Gly
1 5 10 15

ES 2 656 446 T3

<221> fuente
 <223> /nota = "Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético"

<400> 32

5

Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr
1 5 10 15

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

10

<220>
 <221> fuente
 <223> /nota = "Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético"

15

<400> 33

Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile
1 5 10 15

20

<210> 34
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

25

<220>
 <221> fuente
 <223> /nota = "Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético"

30

<400> 34

Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu
1 5 10 15

35

<210> 35
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

40

<220>
 <221> fuente
 <223> /nota = "Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético"

<400> 35

Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu
1 5 10 15

45

<210> 36
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

50

<220>
 <221> fuente
 <223> /nota = "Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético"

55

<400> 36

ES 2 656 446 T3

Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala
1 5 10 15

5 <210> 37
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota = "Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético"
 <400> 37

Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr
1 5 10 15

15 <210> 38
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota = "Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético"
 <400> 38

Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln
1 5 10 15

30 <210> 39
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

35 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota = "Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético"
 <400> 39

Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Ser Thr
1 5 10 15

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

45 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota = "Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético"
 <400> 40

Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Ser Thr Val Pro Trp
1 5 10 15

55 <210> 41
 <211> 15

ES 2 656 446 T3

<400> 45

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

5 <210> 46
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota = "Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético"

<400> 46

15

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

20 <210> 47
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

25 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota = "Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético"

<400> 47

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

30 <210> 48
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

35 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota = "Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético"

40 <400> 48

Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala
1 5 10 15

45 <210> 49
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

50 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota = "Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético"

<400> 49

Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Tyr
1 5 10 15

55

<210> 50

ES 2 656 446 T3

<211> 15
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

5 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota = "Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético"

10 <400> 50

Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr
1 5 10 15

15 <210> 51
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota = "Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético"

<400> 51

Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asn Tyr Gly
1 5 10 15

25 <210> 52
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

30 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota = "Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético"

35 <400> 52

Cys Ala Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asn Tyr Gly Met Asn Trp
1 5 10 15

40 <210> 53
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

45 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota = "Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético"

<400> 53

Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asn Tyr Gly Met Asn Trp Val Arg Gln
1 5 10 15

50 <210> 54
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

55 <220>
 <221> fuente

ES 2 656 446 T3

Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Gly Trp Ile Asn Thr Tyr
1 5 10 15

5 <210> 59
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota = "Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético"
 <400> 59

Lys Gly Leu Glu Trp Val Gly Trp Ile Asn Thr Tyr Thr Gly Glu
1 5 10 15

15 <210> 60
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota = "Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético"
 25 <400> 60

Glu Trp Val Gly Trp Ile Asn Thr Tyr Thr Gly Glu Pro Thr Tyr
1 5 10 15

30 <210> 61
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

35 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota = "Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético"
 <400> 61

Gly Trp Ile Asn Thr Tyr Thr Gly Glu Pro Thr Tyr Ala Ala Asp
1 5 10 15

40 <210> 62
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

45 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota = "Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético"
 50 <400> 62

Asn Thr Tyr Thr Gly Glu Pro Thr Tyr Ala Ala Asp Phe Lys Arg
1 5 10 15

55 <210> 63
 <211> 15

ES 2 656 446 T3

<212> PRT
<213> Secuencia artificial

5 <220>
<221> fuente
<223> /nota = "Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético"

<400> 63

10 **Thr Gly Glu Pro Thr Tyr Ala Ala Asp Phe Lys Arg Arg Phe Thr**
1 5 10 15

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

20 <220>
<221> fuente
<223> /nota = "Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético"

<400> 64

25 **Pro Thr Tyr Ala Ala Asp Phe Lys Arg Arg Phe Thr Phe Ser Leu**
1 5 10 15

30 <210> 65
<211> 15
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

35 <220>
<221> fuente
<223> /nota = "Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético"

<400> 65

40 **Ala Ala Asp Phe Lys Arg Arg Phe Thr Phe Ser Leu Asp Thr Ser**
1 5 10 15

45 <210> 66
<211> 15
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

50 <220>
<221> fuente
<223> /nota = "Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético"

<400> 66

55 **Phe Lys Arg Arg Phe Thr Phe Ser Leu Asp Thr Ser Lys Ser Thr**
1 5 10 15

60 <210> 67
<211> 15
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

65 <220>
<221> fuente

ES 2 656 446 T3

<210> 72
 <211> 15
 <212> PRT
 5 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota = "Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético"
 10
 <400> 72

	Gln	Met	Asn	Ser	Leu	Arg	Ala	Glu	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys
	1				5					10					15

 15 <210> 73
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

 20 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota = "Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético"

 25 <400> 73

	Ser	Leu	Arg	Ala	Glu	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	Ala	Lys	Tyr
	1				5					10					15

 30 <210> 74
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

 35 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota = "Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético"

 40 <400> 74

	Ala	Glu	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	Ala	Lys	Tyr	Pro	His	Tyr
	1				5					10					15

 45 <210> 75
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

 50 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota = "Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético"

 55 <400> 75

	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	Ala	Lys	Tyr	Pro	His	Tyr	Tyr	Gly	Ser
	1				5					10					15

 55 <210> 76
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

ES 2 656 446 T3

<220>
<221> fuente
<223> /nota = "Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético"
5
<400> 76
Tyr Tyr Cys Ala Lys Tyr Pro His Tyr Tyr Gly Ser Ser His Trp
1 5 10 15

10
<210> 77
<211> 15
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

15
<220>
<221> fuente
<223> /nota = "Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético"
20
<400> 77
Ala Lys Tyr Pro His Tyr Tyr Gly Ser Ser His Trp Tyr Phe Asp
1 5 10 15

25
<210> 78
<211> 15
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

30
<220>
<221> fuente
<223> /nota = "Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético"
35
<400> 78
Pro His Tyr Tyr Gly Ser Ser His Trp Tyr Phe Asp Val Trp Gly
1 5 10 15

40
<210> 79
<211> 15
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

45
<220>
<221> fuente
<223> /nota = "Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético"
50
<400> 79
Tyr Gly Ser Ser His Trp Tyr Phe Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr
1 5 10 15

55
<210> 80
<211> 15
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

60
<220>
<221> fuente
<223> /nota = "Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético"
65
<400> 80

Ser His Trp Tyr Phe Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr
1 5 10 15

5 <210> 81
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota = "Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético"

<400> 81

Tyr Phe Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
1 5 10 15

15 <210> 82
 <211> 123
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota = "Descripción de la secuencia artificial: polipéptido sintético"

25 <400> 82

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

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

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

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

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

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

Ala Lys Tyr Pro Asp Tyr Asp Gly Gly Ser His Trp Tyr Phe Asp Val
100 105 110

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

30 <210> 83
 <211> 123

ES 2 656 446 T3

<212> PRT
 <213> Secuencia artificial

5 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota = "Descripción de la secuencia artificial: polipéptido sintético"

<400> 83

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

10

<210> 84
 <211> 123
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

15

<220>
 <221> fuente
 <223> /nota = "Descripción de la secuencia artificial: polipéptido sintético"

20

<400> 84

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

ES 2 656 446 T3

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

5 <210> 85
 <211> 123
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota = "Descripción de la secuencia artificial: polipéptido sintético"

<400> 85

ES 2 656 446 T3

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

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

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

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

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

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

Ala Lys Tyr Pro Asp Tyr Glu Gly Ser Ser His Trp Tyr Phe Asp Val
 100 105 110

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

<210> 87

<211> 123

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<221> fuente

10 <223> /nota = "Descripción de la secuencia artificial: polipéptido sintético"

<400> 87

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

ES 2 656 446 T3

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

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

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

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

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

Ala Lys Tyr Pro Glu Tyr Asp Gly Gly Ser His Trp Tyr Phe Asp Val
 100 105 110

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

<210> 88
 <211> 123
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

5

<220>
 <221> fuente
 <223> /nota = "Descripción de la secuencia artificial: polipéptido sintético"

10

<400> 88

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

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

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

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

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

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

ES 2 656 446 T3

Ala Lys Tyr Pro His Tyr Asp Gly Gly Ser His Trp Tyr Phe Asp Val
 100 105 110

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

5 <210> 89
 <211> 123
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota = "Descripción de la secuencia artificial: polipéptido sintético"

<400> 89

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

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

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

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

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

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

Ala Lys Tyr Pro Pro Tyr Asp Gly Ser Ser His Trp Tyr Phe Asp Val
 100 105 110

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

15 <210> 90
 <211> 123
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota = "Descripción de la secuencia artificial: polipéptido sintético"

25 <400> 90

ES 2 656 446 T3

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

5 <210> 92
 <211> 123
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota = "Descripción de la secuencia artificial: polipéptido sintético"

<400> 92

ES 2 656 446 T3

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

<210> 93
 <211> 123
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

5

<220>
 <221> fuente
 <223> /nota = "Descripción de la secuencia artificial: polipéptido sintético"

10

<400> 93

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

ES 2 656 446 T3

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

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

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

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

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

Ala Lys Tyr Pro Glu Tyr Tyr Gly Ser Ser His Trp Tyr Phe Asp Val
 100 105 110

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

<210> 94
 <211> 123
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

5

<220>
 <221> fuente
 <223> /nota = "Descripción de la secuencia artificial: polipéptido sintético"

10

<400> 94

ES 2 656 446 T3

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

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

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

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

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

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

Ala Lys Tyr Pro His Tyr Tyr Gly Gly Ser His Trp Tyr Phe Asp Val
 100 105 110

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

<210> 95
 <211> 123
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

5

<220>
 <221> fuente
 <223> /nota = "Descripción de la secuencia artificial: polipéptido sintético"

10

<400> 95

ES 2 656 446 T3

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

<210> 96
 <211> 123
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

5

<220>
 <221> fuente
 <223> /nota = "Descripción de la secuencia artificial: polipéptido sintético"

10

<400> 96

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Phe Tyr

ES 2 656 446 T3

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

5 <210> 97
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota = "Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético"
 <400> 97

Asn Thr Phe Thr Gly Glu Pro Thr Tyr Ala Ala Asp Phe Lys Arg	1	5	10	15
---	---	---	----	----

15 <210> 98
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota = "Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético"
 25 <400> 98

Asn Thr Tyr Thr Gly Glu Pro Thr Tyr Ala Phe Asp Phe Lys Arg	1	5	10	15
---	---	---	----	----

30 <210> 99
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

35 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota = "Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético"

ES 2 656 446 T3

<400> 99

Asn Thr Tyr Thr Gly Glu Pro Thr Tyr Ala Glu Asp Phe Lys Arg
1 5 10 15

5

<210> 100
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

10

<220>
 <221> fuente
 <223> /nota = "Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético"

15

<400> 100

Asn Thr Tyr Thr Gly Glu Pro Thr Tyr Ala Asp Asp Phe Lys Arg
1 5 10 15

20

<210> 101
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

25

<220>
 <221> fuente
 <223> /nota = "Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético"

<400> 101

Asn Thr Tyr Thr Gly Glu Pro Thr Tyr Ala Ala Gly Phe Lys Arg
1 5 10 15

30

<210> 102
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

35

<220>
 <221> fuente
 <223> /nota = "Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético"

40

<400> 102

Asn Thr Tyr Thr Gly Glu Pro Thr Tyr Ala Ala Leu Phe Lys Arg
1 5 10 15

45

<210> 103
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

50

<220>
 <221> fuente
 <223> /nota = "Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético"

55

<400> 103

ES 2 656 446 T3

Asn Thr Tyr Thr Gly Glu Pro Thr Tyr Ala Ala Gln Phe Lys Arg
1 5 10 15

5 <210> 104
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota = "Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético"

<400> 104

Asn Thr Tyr Thr Gly Glu Pro Thr Tyr Ala Ala Thr Phe Lys Arg
1 5 10 15

15 <210> 105
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota = "Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético"

25 <400> 105

Asn Thr Tyr Thr Gly Glu Pro Thr Tyr Ala Ala Lys Phe Lys Arg
1 5 10 15

30 <210> 106
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

35 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota = "Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético"

<400> 106

Asn Thr Tyr Thr Gly Glu Pro Thr Tyr Ala Ala Arg Phe Lys Arg
1 5 10 15

40 <210> 107
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

45 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota = "Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético"

50 <400> 107

Asn Thr Tyr Thr Gly Glu Pro Thr Tyr Ala Ala Glu Phe Lys Arg
1 5 10 15

55 <210> 108
 <211> 15

ES 2 656 446 T3

<212> PRT
<213> Secuencia artificial

5 <220>
<221> fuente
<223> /nota = "Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético"

<400> 108

10 **Asn Thr Tyr Thr Gly Glu Pro Thr Tyr Ala Ala His Phe Lys Arg**
1 5 10 15

15 <210> 109
<211> 15
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

20 <220>
<221> fuente
<223> /nota = "Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético"

<400> 109

25 **Asn Thr Tyr Thr Gly Glu Pro Thr Tyr Ala Ala Asp Phe Ser Arg**
1 5 10 15

30 <210> 110
<211> 15
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

35 <220>
<221> fuente
<223> /nota = "Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético"

<400> 110

40 **Asn Thr Tyr Thr Gly Glu Pro Thr Tyr Ala Ala Asp Phe Val Arg**
1 5 10 15

45 <210> 111
<211> 15
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

50 <220>
<221> fuente
<223> /nota = "Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético"

<400> 111

55 **Asn Thr Tyr Thr Gly Glu Pro Thr Tyr Ala Ala Asp Phe Gln Arg**
1 5 10 15

60 <210> 112
<211> 15
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

65 <220>
<221> fuente
<223> /nota = "Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético"

ES 2 656 446 T3

<400> 112

Asn Thr Tyr Thr Gly Glu Pro Thr Tyr Ala Ala Asp Phe Lys Val
1 5 10 15

5

<210> 113
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

10

<220>
 <221> fuente
 <223> /nota = "Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético"

15

<400> 113

Asn Thr Tyr Thr Gly Glu Pro Thr Tyr Ala Ala Asp Phe Lys Phe
1 5 10 15

20

<210> 114
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

25

<220>
 <221> fuente
 <223> /nota = "Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético"

<400> 114

Asn Thr Tyr Thr Gly Glu Pro Thr Tyr Ala Ala Asp Phe Lys His
1 5 10 15

30

<210> 115
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

35

<220>
 <221> fuente
 <223> /nota = "Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético"

40

<400> 115

Asn Thr Tyr Thr Gly Glu Pro Thr Tyr Ala Ala Asp Phe Lys Asn
1 5 10 15

45

<210> 116
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

50

<220>
 <221> fuente
 <223> /nota = "Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético"

55

<400> 116

ES 2 656 446 T3

Asn Thr Tyr Thr Gly Glu Pro Thr Tyr Ala Ala Asp Phe Lys Ser
1 5 10 15

5 <210> 117
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <221> fuente
 10 <223> /nota = "Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético"
 <400> 117

Asn Thr Tyr Thr Gly Glu Pro Thr Tyr Ala Ala Asp Phe Lys Gln
1 5 10 15

15 <210> 118
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 20 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota = "Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético"
 25 <400> 118

Asn Thr Tyr Thr Gly Glu Pro Thr Tyr Ala Ala Asp Phe Lys Lys
1 5 10 15

30 <210> 119
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 35 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota = "Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético"
 <400> 119

Asn Thr Tyr Thr Gly Glu Pro Thr Tyr Ala Ala Asp Phe Lys Ile
1 5 10 15

40 <210> 120
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 45 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota = "Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético"
 50 <400> 120

Asn Thr Phe Thr Gly Glu Pro Thr Tyr Ala Phe Asp Phe Lys Arg
1 5 10 15

ES 2 656 446 T3

<210> 121
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 5
 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota = "Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético"
 10
 <400> 121

	Asn	Thr	Phe	Thr	Gly	Glu	Pro	Thr	Tyr	Ala	Glu	Asp	Phe	Lys	Arg
	1				5					10					15

 <210> 122
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 15
 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota = "Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético"
 20
 <400> 122

	Asn	Thr	Phe	Thr	Gly	Glu	Pro	Thr	Tyr	Ala	Asp	Asp	Phe	Lys	Arg
	1				5					10					15

 <210> 123
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 25
 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota = "Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético"
 30
 <400> 123

	Asn	Thr	Phe	Thr	Gly	Glu	Pro	Thr	Tyr	Ala	Ala	Gly	Phe	Lys	Arg
	1				5					10					15

 <210> 124
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 35
 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota = "Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético"
 40
 <400> 124

	Asn	Thr	Phe	Thr	Gly	Glu	Pro	Thr	Tyr	Ala	Ala	Leu	Phe	Lys	Arg
	1				5					10					15

 <210> 125
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 45
 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota = "Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético"
 50
 <400> 125

	Asn	Thr	Phe	Thr	Gly	Glu	Pro	Thr	Tyr	Ala	Ala	Leu	Phe	Lys	Arg
	1				5					10					15

 <210> 125
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 55
 <220>

ES 2 656 446 T3

<221> fuente
 <223> /nota = "Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético"

<400> 125

5

Asn Thr Phe Thr Gly Glu Pro Thr Tyr Ala Ala Gln Phe Lys Arg
1 5 10 15

<210> 126
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

10

<220>
 <221> fuente
 <223> /nota = "Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético"

15

<400> 126

Asn Thr Phe Thr Gly Glu Pro Thr Tyr Ala Ala Thr Phe Lys Arg
1 5 10 15

20

<210> 127
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

25

<220>
 <221> fuente
 <223> /nota = "Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético"

30

<400> 127

Asn Thr Phe Thr Gly Glu Pro Thr Tyr Ala Ala Lys Phe Lys Arg
1 5 10 15

35

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

40

<220>
 <221> fuente
 <223> /nota = "Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético"

<400> 128

Asn Thr Phe Thr Gly Glu Pro Thr Tyr Ala Ala Arg Phe Lys Arg
1 5 10 15

45

<210> 129
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

50

<220>
 <221> fuente
 <223> /nota = "Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético"

55

<400> 129

ES 2 656 446 T3

Asn Thr Phe Thr Gly Glu Pro Thr Tyr Ala Ala Glu Phe Lys Arg
1 5 10 15

5 <210> 130
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota = "Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético"

<400> 130

Asn Thr Phe Thr Gly Glu Pro Thr Tyr Ala Ala His Phe Lys Arg
1 5 10 15

15 <210> 131
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota = "Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético"

25 <400> 131

Asn Thr Phe Thr Gly Glu Pro Thr Tyr Ala Ala Asp Phe Ser Arg
1 5 10 15

30 <210> 132
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

35 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota = "Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético"

<400> 132

Asn Thr Phe Thr Gly Glu Pro Thr Tyr Ala Ala Asp Phe Val Arg
1 5 10 15

40 <210> 133
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

45 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota = "Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético"

50 <400> 133

Asn Thr Phe Thr Gly Glu Pro Thr Tyr Ala Ala Asp Phe Gln Arg
1 5 10 15

ES 2 656 446 T3

<210> 134
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 5
 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota = "Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético"
 10
 <400> 134

Asn	Thr	Phe	Thr	Gly	Glu	Pro	Thr	Tyr	Ala	Ala	Asp	Phe	Lys	Val
1				5					10					15

 <210> 135
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 15
 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota = "Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético"
 20
 <400> 135

Asn	Thr	Phe	Thr	Gly	Glu	Pro	Thr	Tyr	Ala	Ala	Asp	Phe	Lys	Phe
1				5					10					15

 <210> 136
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 25
 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota = "Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético"
 30
 <400> 136

Asn	Thr	Phe	Thr	Gly	Glu	Pro	Thr	Tyr	Ala	Ala	Asp	Phe	Lys	His
1				5					10					15

 <210> 137
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 35
 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota = "Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético"
 40
 <400> 137

Asn	Thr	Phe	Thr	Gly	Glu	Pro	Thr	Tyr	Ala	Ala	Asp	Phe	Lys	Asn
1				5					10					15

 <210> 138
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 45
 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota = "Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético"
 50
 <400> 137

Asn	Thr	Phe	Thr	Gly	Glu	Pro	Thr	Tyr	Ala	Ala	Asp	Phe	Lys	Asn
1				5					10					15

 <210> 138
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 55
 <220>

ES 2 656 446 T3

<221> fuente
 <223> /nota = "Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético"

<400> 138

5

Asn Thr Phe Thr Gly Glu Pro Thr Tyr Ala Ala Asp Phe Lys Ser
1 5 10 15

<210> 139
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

10

<220>
 <221> fuente
 <223> /nota = "Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético"

15

<400> 139

Asn Thr Phe Thr Gly Glu Pro Thr Tyr Ala Ala Asp Phe Lys Gln
1 5 10 15

20

<210> 140
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

25

<220>
 <221> fuente
 <223> /nota = "Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético"

30

<400> 140

Asn Thr Phe Thr Gly Glu Pro Thr Tyr Ala Ala Asp Phe Lys Lys
1 5 10 15

35

<210> 141
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

40

<220>
 <221> fuente
 <223> /nota = "Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético"

<400> 141

Asn Thr Phe Thr Gly Glu Pro Thr Tyr Ala Ala Asp Phe Lys Ile
1 5 10 15

45

<210> 142
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

50

<220>
 <221> fuente
 <223> /nota = "Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético"

55

<400> 142

ES 2 656 446 T3

Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Lys Tyr Pro Asp Tyr
1 5 10 15

5 <210> 143
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota = "Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético"
 <400> 143

Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Lys Tyr Pro Glu Tyr
1 5 10 15

15 <210> 144
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota = "Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético"
 25 <400> 144

Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Lys Tyr Pro Pro Tyr
1 5 10 15

30 <210> 145
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

35 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota = "Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético"
 <400> 145

Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Lys Tyr Pro His Phe
1 5 10 15

40 <210> 146
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

45 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota = "Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético"
 50 <400> 146

Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Lys Tyr Pro Asp Phe
1 5 10 15

55 <210> 147

ES 2 656 446 T3

<211> 15
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

5 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota = "Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético"

10 <400> 147

Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Lys Tyr Pro Glu Phe
1 5 10 15

15 <210> 148
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota = "Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético"

<400> 148

Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Lys Tyr Pro Pro Phe
1 5 10 15

25 <210> 149
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

30 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota = "Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético"

35 <400> 149

Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Phe Thr
1 5 10 15

40 <210> 150
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

45 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota = "Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético"

<400> 150

Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Val Leu Ile Tyr Asp Thr
1 5 10 15

50 <210> 151
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

55 <220>
 <221> fuente

ES 2 656 446 T3

Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Val Leu Ile Tyr Asp Ala
1 5 10 15

5 <210> 156
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota = "Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético"

<400> 156

Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Val Leu Ile Tyr Ser Ala
1 5 10 15

15 <210> 157
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota = "Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético"

25 <400> 157

Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Val Leu Ile Tyr Gly Ala
1 5 10 15

30 <210> 158
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

35 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota = "Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético"

<400> 158

Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Val Leu Ile Tyr Ala Ala
1 5 10 15

40 <210> 159
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

45 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota = "Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético"

50 <400> 159

Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Asp Thr
1 5 10 15

55 <210> 160

ES 2 656 446 T3

<211> 15
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

5 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota = "Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético"

<400> 160

10 **Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Ser Thr**
1 5 10 15

<210> 161
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

15 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota = "Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético"

<400> 161

Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Gly Thr
1 5 10 15

25 <210> 162
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

30 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota = "Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético"

<400> 162

Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Ala Thr
1 5 10 15

40 <210> 163
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

45 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota = "Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético"

<400> 163

Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Phe Ala
1 5 10 15

50 <210> 164
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

55 <220>
 <221> fuente

ES 2 656 446 T3

<223> /nota = "Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético"

<400> 164

Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Asp Ala
1 5 10 15

5

<210> 165

<211> 15

<212> PRT

10 <213> Secuencia artificial

<220>

<221> fuente

<223> /nota = "Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético"

15

<400> 165

Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Ser Ala
1 5 10 15

20

<210> 166

<211> 15

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

25

<220>

<221> fuente

<223> /nota = "Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético"

30

<400> 166

Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Gly Ala
1 5 10 15

35

<210> 167

<211> 15

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<221> fuente

<223> /nota = "Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético"

40

<400> 167

Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Ala Ala
1 5 10 15

45

<210> 168

<211> 9

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

50

<220>

<221> fuente

<223> /nota = "Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético"

55

<400> 168

ES 2 656 446 T3

Gly Tyr Asp Phe Thr Asn Tyr Gly Met
1 5

5 <210> 169
<211> 9
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

10 <220>
<221> fuente
<223> /nota = "Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético"

<400> 169

Gly Tyr Thr Phe Thr Asn Tyr Gly Ile
1 5

15 <210> 170
<211> 9
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

20 <220>
<221> fuente
<223> /nota = "Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético"

25 <400> 170

Gly Tyr Thr Phe Thr His Tyr Gly Met
1 5

30 <210> 171
<211> 9
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

35 <220>
<221> fuente
<223> /nota = "Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético"

<400> 171

Ala Tyr Thr Phe Thr Asn Tyr Gly Met
1 5

40 <210> 172
<211> 10
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

45 <220>
<221> fuente
<223> /nota = "Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético"

50 <400> 172

Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr Ala Met Ser
1 5 10

55 <210> 173
<211> 9
<212> PRT

ES 2 656 446 T3

<213> Secuencia artificial

<220>

<221> fuente

5 <223> /nota = "Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético"

<400> 173

Gly Tyr Asp Phe Thr His Tyr Gly Ile
1 5

10

<210> 174

<211> 9

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

15

<220>

<221> fuente

<223> /nota = "Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético"

20

<400> 174

Gly Tyr Thr Phe Thr Asn Tyr Gly Ala
1 5

25

<210> 175

<211> 9

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

30

<220>

<221> fuente

<223> /nota = "Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético"

<400> 175

Gly Tyr Asp Phe Gly His Tyr Gly Ile
1 5

35

<210> 176

<211> 9

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

40

<220>

<221> fuente

<223> /nota = "Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético"

45

<400> 176

Gly Tyr Glu Phe Gln His Tyr Gly Ile
1 5

50

<210> 177

<211> 9

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

55

<220>

<221> fuente

<223> /nota = "Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético"

<400> 177

Gly Tyr Asp Phe Ser His Tyr Gly Ile
1 5

5 <210> 178
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota = "Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético"
 <400> 178

Gly Tyr Glu Phe Ser His Tyr Gly Ile
1 5

15 <210> 179
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota = "Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético"
 25 <400> 179

Gly Tyr Glu Phe Thr His Tyr Gly Ile
1 5

30 <210> 180
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

35 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota = "Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético"
 40 <400> 180

Gly Tyr Thr Phe Thr His Tyr Gly Ile
1 5

45 <210> 181
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

50 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota = "Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético"
 <400> 181

Gly Tyr Asp Phe Thr Asn Tyr Gly Ile
1 5

55 <210> 182

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

5 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota = "Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético"

<400> 182

10

Gly Tyr Thr Phe Thr Asn Tyr Gly Met Ala
1 5 10

<210> 183
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

15

<220>
 <221> fuente
 <223> /nota = "Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético"

20

<400> 183

Gly Tyr Thr Phe Thr Asn Tyr Ala Met
1 5

25

<210> 184
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

30

<220>
 <221> fuente
 <223> /nota = "Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético"

35

<400> 184

Gly Tyr Thr Phe Thr Ala Tyr Gly Met
1 5

40

<210> 185
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

45

<220>
 <221> fuente
 <223> /nota = "Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético"

<400> 185

Gly Tyr Thr Phe Ala Asn Tyr Gly Met
1 5

50

<210> 186
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

55

<220>
 <221> fuente
 <223> /nota = "Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético"

ES 2 656 446 T3

<400> 186

Gly Tyr Thr Ala Thr Asn Tyr Gly Met
1 5

5

<210> 187
<211> 9
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

10

<220>
<221> fuente
<223> /nota = "Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético"

15

<400> 187

Gly Tyr Ala Phe Thr Asn Tyr Gly Met
1 5

20

<210> 188
<211> 9
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

25

<220>
<221> fuente
<223> /nota = "Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético"

<400> 188

Gly Ala Thr Phe Thr Asn Tyr Gly Met
1 5

30

<210> 189
<211> 9
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

35

<220>
<221> fuente
<223> /nota = "Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético"

40

<400> 189

Gly Tyr Thr Phe Thr Asn Ala Gly Met
1 5

45

<210> 190
<211> 17
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

50

<220>
<221> fuente
<223> /nota = "Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético"

55

<400> 190

ES 2 656 446 T3

Trp Ile Asn Thr Tyr Thr Gly Glu Pro Thr Tyr Ala Asp Glu Phe Thr
1 5 10 15

Arg

5 <210> 191
<211> 17
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

10 <220>
<221> fuente
<223> /nota = "Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético"

<400> 191

Trp Ile Asn Thr Tyr Thr Gly Glu Pro Thr Tyr Val Asp Glu Phe Lys
1 5 10 15

Arg

15 <210> 192
<211> 17
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

20 <220>
<221> fuente
<223> /nota = "Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético"

25 <400> 192

Trp Ile Asn Thr Tyr Thr Gly Glu Pro Thr Tyr Ala Glu Glu Phe Lys
1 5 10 15

Arg

30 <210> 193
<211> 17
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

35 <220>
<221> fuente
<223> /nota = "Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético"

<400> 193

Trp Ile Asn Thr Tyr Thr Gly Glu Pro Thr Tyr Ala Pro Glu Phe Lys
1 5 10 15

Arg

40 <210> 194
<211> 17
<212> PRT
45 <213> Secuencia artificial

ES 2 656 446 T3

<220>
 <221> fuente
 <223> /nota = "Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético"
 5
 <400> 194

Trp Ile Asn Thr Tyr Thr Gly Glu Pro Thr Tyr Ala Gln Glu Phe Lys
1 5 10 15

Arg
 10
 <210> 195
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 15
 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota = "Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético"
 20
 <400> 195

Trp Ile Asn Thr Tyr Thr Gly Glu Thr Thr Tyr Ala His Asp Phe Lys
1 5 10 15

Arg
 25
 <210> 196
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 30
 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota = "Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético"
 <400> 196

Trp Ile Asn Thr Tyr Asn Gly Glu Thr Thr Tyr Ala Pro Asp Phe Lys
1 5 10 15

Arg
 35
 <210> 197
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 40
 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota = "Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético"
 45
 <400> 197

ES 2 656 446 T3

Trp Ile Asn Thr Tyr Asn Gly Glu Pro Thr Tyr Ala Pro Asp Phe Lys
1 5 10 15

Arg

5 <210> 198
<211> 17
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

10 <220>
<221> fuente
<223> /nota = "Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético"
<400> 198

Trp Ile Asn Thr Tyr Thr Gly Glu Ser Thr Tyr Ala Gln Asp Phe Lys
1 5 10 15

Arg

15 <210> 199
<211> 17
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

20 <220>
<221> fuente
<223> /nota = "Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético"
25 <400> 199

Trp Ile Asn Thr Tyr Thr Asn Asn Pro Thr Tyr Ala Gln Asp Phe Lys
1 5 10 15

Arg

30 <210> 200
<211> 17
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

35 <220>
<221> fuente
<223> /nota = "Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético"
<400> 200

Trp Ile Asn Thr Tyr Thr Gly Glu Pro Thr Tyr Ala Asp Asp Phe Lys
1 5 10 15

Glu

40 <210> 201
<211> 17
<212> PRT

ES 2 656 446 T3

<213> Secuencia artificial

<220>

<221> fuente

5 <223> /nota = "Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético"

<400> 201

Trp Ile Asn Thr Tyr Thr Gly Glu Pro Thr Tyr Ala Glu Glu Phe Thr
1 5 10 15

Arg

10

<210> 202

<211> 17

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

15

<220>

<221> fuente

<223> /nota = "Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético"

20

<400> 202

Trp Ile Asn Thr Tyr Thr Gly Glu Pro Thr Tyr Ala His Glu Phe Thr
1 5 10 15

Arg

25

<210> 203

<211> 17

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

30

<220>

<221> fuente

<223> /nota = "Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético"

<400> 203

Trp Ile Asn Thr Tyr Thr Gly Glu Pro Thr Tyr Ala Pro Asp Phe Thr
1 5 10 15

Arg

35

<210> 204

<211> 17

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

40

<220>

<221> fuente

<223> /nota = "Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético"

45

<400> 204

ES 2 656 446 T3

Trp Ile Asn Thr Tyr Thr Gly Glu Pro Thr Tyr Ala His Glu Phe Lys
1 5 10 15

Arg

5 <210> 205
<211> 17
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

10 <220>
<221> fuente
<223> /nota = "Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético"

<400> 205

Trp Ile Asn Thr Tyr Thr Gly Glu Pro Thr Tyr Ala Pro Glu Phe Lys
1 5 10 15

Arg

15 <210> 206
<211> 17
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

20 <220>
<221> fuente
<223> /nota = "Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético"

25 <400> 206

Trp Ile Asn Thr Tyr Thr Gly Glu Pro Thr Tyr Ala Gln Glu Phe Lys
1 5 10 15

Arg

30 <210> 207
<211> 17
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

35 <220>
<221> fuente
<223> /nota = "Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético"

<400> 207

Trp Ile Asn Thr Tyr Thr Gly Glu Thr Thr Tyr Ala His Asp Phe Lys
1 5 10 15

Arg

40 <210> 208
<211> 17
<212> PRT
45 <213> Secuencia artificial

ES 2 656 446 T3

5 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota = "Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético"
 <400> 208

Trp Ile Asn Thr Tyr Asn Gly Glu Pro Thr Tyr Ala Pro Asp Phe Lys
1 5 10 15

Arg

10 <210> 209
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

15 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota = "Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético"
 <400> 209

20 **Trp Ile Asn Thr Tyr Thr Gly Glu Pro Thr Tyr Ala Pro Asp Phe Lys**
1 5 10 15

Arg

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

30 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota = "Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético"
 <400> 210

Trp Ile Asn Thr Tyr Thr Gly Glu Ser Thr Tyr Ala Gln Asp Phe Lys
1 5 10 15

Arg

35 <210> 211
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

40 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota = "Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético"

45 <400> 211

Trp Ile Asn Thr Asn Asn Gly Glu Pro Thr Tyr Ala Ala Asp Phe Lys
1 5 10 15

Arg

5 <210> 212
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota = "Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético"

15 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (5)..(5)
 <223> Cualquier aminoácido

<400> 212

Trp Ile Asn Thr Xaa Thr Gly Glu Pro Thr Tyr Ala Ala Asp Phe Lys
1 5 10 15

Arg

20 <210> 213
 <211> 19
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

25 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota = "Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético"

30 <400> 213

Trp Ile Asn Thr Tyr Thr Gly Glu Pro Thr Tyr Ala Ala Asp Lys Phe
1 5 10 15

Lys Asp Arg

35 <210> 214
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

40 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota = "Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético"

<400> 214

Val Ile Ser Gly Asp Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys
1 5 10 15

Gly

45

5 <210> 215
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <221> fuente
 <223> /nota = "Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético"

10 <400> 215

Trp Ile Asn Thr Trp Thr Gly Glu Pro Thr Tyr Ala Ala Asp Phe Lys
1 5 10 15

Arg

15 <210> 216
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <221> fuente
 <223> /nota = "Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético"

20 <400> 216

Trp Ile Asn Thr Tyr Thr Gly Glu Pro Thr Tyr Ala Ala Asp Phe Lys
1 5 10 15

Ala

25 <210> 217
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

30 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota = "Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético"

35 <400> 217

Trp Ile Asn Thr Tyr Thr Gly Glu Pro Thr Tyr Ala Ala Asp Phe Ala
1 5 10 15

Arg

40 <210> 218
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

45 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota = "Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético"

50 <400> 218

Trp Ile Asn Thr Tyr Thr Gly Glu Pro Thr Tyr Ala Ala Asp Ala Lys
1 5 10 15

Arg

5 <210> 219
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota = "Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético"

<400> 219

Trp Ile Asn Thr Tyr Thr Gly Glu Pro Thr Tyr Ala Ala Ala Phe Lys
1 5 10 15

Arg

15 <210> 220
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota = "Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético"

25 <400> 220

Trp Ile Asn Thr Tyr Thr Gly Glu Pro Thr Tyr Ala Ala Asp Phe Lys
1 5 10 15

Arg

30 <210> 221
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

35 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota = "Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético"

<400> 221

Trp Ile Asn Thr Tyr Thr Gly Glu Pro Thr Tyr Ala Ala Asp Phe Lys
1 5 10 15

Arg

40 <210> 222
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

45

ES 2 656 446 T3

Trp Ile Asn Thr Trp Thr Gly Gln Pro Thr Tyr Ala Ala Asp Phe Lys
1 5 10 15

Arg

5 <210> 226
<211> 17
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

10 <220>
<221> fuente
<223> /nota = "Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético"

<400> 226

Trp Ile Asn Thr Trp Thr Gly Thr Pro Thr Tyr Ala Ala Asp Phe Lys
1 5 10 15

Arg

15 <210> 227
<211> 17
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

20 <220>
<221> fuente
<223> /nota = "Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético"

25 <400> 227

Trp Ile Asn Thr Tyr Thr Ala Glu Pro Thr Tyr Ala Ala Asp Phe Lys
1 5 10 15

Arg

30 <210> 228
<211> 17
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

35 <220>
<221> fuente
<223> /nota = "Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético"

<400> 228

Trp Ile Asn Thr Tyr Ala Gly Glu Pro Thr Tyr Ala Ala Asp Phe Lys
1 5 10 15

Arg

40 <210> 229
<211> 17
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

45 <220>

ES 2 656 446 T3

<221> fuente
<223> /nota = "Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético"

<400> 229

5

Trp Ile Asn Thr Trp Asp Gly Glu Pro Thr Tyr Ala Ala Asp Phe Lys
1 5 10 15

Arg

<210> 230
<211> 17
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

10

<220>
<221> fuente
<223> /nota = "Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético"

15

<400> 230

Trp Ile Asn Thr Ala Thr Gly Glu Pro Thr Tyr Ala Ala Asp Phe Lys
1 5 10 15

Arg

20

<210> 231
<211> 17
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

25

<220>
<221> fuente
<223> /nota = "Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético"

30

<400> 231

Trp Ile Asn Thr Trp Thr Gly Glu Pro Thr Tyr Ala Ala Asp Phe Lys
1 5 10 15

Arg

35

<210> 232
<211> 17
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

40

<220>
<221> fuente
<223> /nota = "Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético"

<400> 232

Trp Ile Asn Ala Tyr Thr Gly Glu Pro Thr Tyr Ala Ala Asp Phe Lys
1 5 10 15

45

Arg

ES 2 656 446 T3

5 <210> 233
<211> 17
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota = "Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético"

10 <400> 233

Trp Ile Ala Thr Tyr Thr Gly Glu Pro Thr Tyr Ala Ala Asp Phe Lys
1 5 10 15

Arg

15 <210> 234
<211> 17
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota = "Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético"

20 <400> 234

Trp Ala Asn Thr Tyr Thr Gly Glu Pro Thr Tyr Ala Ala Asp Phe Lys
1 5 10 15

Arg

25 <210> 235
<211> 17
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota = "Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético"

30 <400> 235

Ala Ile Asn Thr Tyr Thr Gly Glu Pro Thr Tyr Ala Ala Asp Phe Lys
1 5 10 15

Arg

40 <210> 236
<211> 17
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota = "Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético"

45 <400> 236

50

ES 2 656 446 T3

Trp Ile Asn Thr Tyr Thr Gly Glu Pro Thr Ala Ala Ala Asp Phe Lys
1 5 10 15

Arg

5 <210> 237
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <221> fuente
 10 <223> /nota = "Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético"
 <400> 237

Tyr Pro Lys Tyr Tyr Gly Lys Ser His Trp Tyr Phe Asp Val
1 5 10

15 <210> 238
 <211> 14
 <212> PRT
 20 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota = "Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético"
 25 <400> 238

Tyr Pro Tyr Tyr Tyr Gly Arg Ser His Trp Tyr Phe Asp Val
1 5 10

30 <210> 239
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 35 <221> fuente
 <223> /nota = "Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético"
 <400> 239

Tyr Pro His Tyr Tyr Val Asn Glu Arg Lys Ser His Trp Tyr Phe Asp
1 5 10 15

Val

40 <210> 240
 <211> 14
 <212> PRT
 45 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota = "Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético"
 50 <400> 240

ES 2 656 446 T3

Tyr Pro Tyr Tyr Tyr Gly Thr Ser His Trp Tyr Phe Asp Val
1 5 10

5 <210> 241
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota = "Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético"

<400> 241

Tyr Pro His Tyr Tyr Gly Thr Ser His Trp Tyr Phe Asp Val
1 5 10

15 <210> 242
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota = "Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético"

25 <400> 242

Tyr Pro His Tyr Tyr Gly Ser Ser His Trp Tyr Phe Asp Leu
1 5 10

30 <210> 243
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

35 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota = "Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético"

40 <400> 243

Tyr Pro His Tyr Tyr Gly Arg Ser Gln Trp Tyr Phe Asp Val
1 5 10

45 <210> 244
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

50 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota = "Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético"

<400> 244

Tyr Pro His Tyr Tyr Gly Gly Cys His Trp Tyr Phe Asp Val
1 5 10

55 <210> 245

ES 2 656 446 T3

<211> 14
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

5 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota = "Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético"

<400> 245

10 **Tyr Pro His Tyr Tyr Gly Thr Thr His Trp Tyr Phe Asp Val**
1 5 10

<210> 246
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

15 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota = "Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético"

<400> 246

20 **Asp Pro His Tyr Tyr Gly Ser Tyr His Trp Tyr Phe Asp Val**
1 5 10

25 <210> 247
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

30 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota = "Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético"

35 <400> 247

Tyr Pro His Tyr Tyr Gly Ser Tyr His Trp Tyr Phe Asp Val
1 5 10

40 <210> 248
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

45 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota = "Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético"

<400> 248

50 **Arg Pro His Tyr Tyr Gly Ala Ser His Trp Tyr Phe Asp Val**
1 5 10

55 <210> 249
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <221> fuente

ES 2 656 446 T3

<212> PRT
<213> Secuencia artificial

5 <220>
<221> fuente
<223> /nota = "Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético"

<400> 253

10 Tyr Pro His Tyr Tyr Gly Gly Ser His Trp Tyr Phe Asp Val
1 5 10

<210> 254
<211> 17
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

15 <220>
<221> fuente
<223> /nota = "Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético"

<400> 254

Tyr Pro His Tyr Tyr Gln Ser Glu Gly Arg Ser His Trp Tyr Phe Asp
1 5 10 15

Val

25 <210> 255
<211> 18
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

30 <220>
<221> fuente
<223> /nota = "Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético"

<400> 255

35 Tyr Pro His Tyr Tyr His Thr Arg Gly Gly Ser Ser His Trp Tyr Phe
1 5 10 15

Asp Val

40 <210> 256
<211> 17
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

45 <220>
<221> fuente
<223> /nota = "Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético"

<400> 256

Tyr Pro His Tyr Tyr Leu Thr Asp His Lys Ser His Trp Tyr Phe Asp
1 5 10 15

Val

ES 2 656 446 T3

5 <210> 257
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota = "Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético"
 <400> 257

Tyr Pro His Tyr Tyr Arg Gly Asp Arg Lys Ser His Trp Tyr Phe Asp
1 5 10 15

Val

15 <210> 258
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota = "Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético"
 <400> 258

Tyr Pro His Tyr Tyr Glu Lys Gln Arg Lys Ser His Trp Tyr Phe Asp
1 5 10 15

Val

30 <210> 259
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

35 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota = "Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético"
 <400> 259

Tyr Pro His Tyr Tyr Ser Asp Glu Lys Lys Ser His Trp Tyr Phe Asp
1 5 10 15

Val

40 <210> 260
 <211> 18
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

45 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota = "Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético"
 50 <400> 260

Tyr Pro His Tyr Tyr Leu Lys Asp Gly Lys Lys Ser His Trp Tyr Phe
1 5 10 15

Asp Val

5 <210> 261
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota = "Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético"

<400> 261

Tyr Pro His Tyr Tyr Lys Glu Asp Lys Lys Ser His Trp Tyr Phe Asp
1 5 10 15

Val

15 <210> 262
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota = "Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético"

25 <400> 262

Tyr Pro His Tyr Tyr Leu Arg Asp Lys Lys Ser His Trp Tyr Phe Asp
1 5 10 15

Val

30 <210> 263
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

35 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota = "Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético"

40 <400> 263

Tyr Pro His Tyr Tyr Leu Ser Asp Lys Lys Ser His Trp Tyr Phe Asp
1 5 10 15

Val

45 <210> 264
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

Tyr Pro His Tyr Tyr Arg Gly Gln Arg Lys Ser Ser His Trp Tyr Phe
1 5 10 15

Asp Val

5 <210> 268
 <211> 18
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <221> fuente
 10 <223> /nota = "Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético"
 <400> 268

Tyr Pro His Tyr Tyr Glu Lys Glu Arg Lys Ser Ser His Trp Tyr Phe
1 5 10 15

Asp Val

15 <210> 269
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 20 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota = "Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético"
 25 <400> 269

Tyr Pro His Tyr Tyr Gln Asp Glu Lys Ser Ser His Trp Tyr Phe Asp
1 5 10 15

Val

30 <210> 270
 <211> 18
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 35 <221> fuente
 <223> /nota = "Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético"
 <400> 270

Tyr Pro His Tyr Tyr Glu Arg Asp Gly Lys Ser Ser His Trp Tyr Phe
1 5 10 15

Asp Val

40 <210> 271
 <211> 17
 <212> PRT
 45 <213> Secuencia artificial

ES 2 656 446 T3

<220>
<221> fuente
<223> /nota = "Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético"

5 <400> 271

Tyr Pro His Tyr Tyr Arg Asn Glu Lys Ser Ser His Trp Tyr Phe Asp
1 5 10 15

Val

10 <210> 272
<211> 18
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

15 <220>
<221> fuente
<223> /nota = "Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético"

<400> 272

Tyr Pro His Tyr Tyr Gln Arg Asn Gly Lys Ser Ser His Trp Tyr Phe
1 5 10 15

Asp Val

20 <210> 273
<211> 17
<212> PRT
25 <213> Secuencia artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota = "Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético"

30 <400> 273

Tyr Pro His Tyr Tyr Arg Thr Glu Lys Ser Ser His Trp Tyr Phe Asp
1 5 10 15

Val

35 <210> 274
<211> 17
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

40 <220>
<221> fuente
<223> /nota = "Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético"

45 <400> 274

Tyr Pro His Tyr Tyr Val Asn Asp Lys Thr Ser His Trp Tyr Phe Asp
1 5 10 15

Val

5 <210> 275
 <211> 18
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota = "Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético"

<400> 275

Tyr Pro His Tyr Tyr Leu Lys Asp Gly Met Ser Ser His Trp Tyr Phe
1 5 10 15

Asp Val

15 <210> 276
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota = "Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético"

25 <400> 276

Tyr Pro His Tyr Tyr Gly Asn Ser His Trp Tyr Phe Asp Val
1 5 10

30 <210> 277
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

35 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota = "Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético"

<400> 277

Tyr Pro His Tyr Tyr Pro Ser Pro Arg Gly Ser His Trp Tyr Phe Asp
1 5 10 15

Val

40 <210> 278
 <211> 18
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

45 <220>
 <221> fuente

ES 2 656 446 T3

<223> /nota = "Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético"

<400> 278

Tyr Pro His Tyr Tyr Gln Asn Glu Gly Pro Ser Ser His Trp Tyr Phe
1 5 10 15

5

Asp Val

<210> 279

<211> 14

<212> PRT

10 <213> Secuencia artificial

<220>

<221> fuente

<223> /nota = "Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético"

15

<400> 279

Tyr Pro Tyr Tyr Tyr Gly Arg Ser His Trp Tyr Phe Asp Val
1 5 10

20

<210> 280

<211> 14

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

25

<220>

<221> fuente

<223> /nota = "Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético"

30

<400> 280

Tyr Pro His Tyr Tyr Gly Arg Ser His Trp Tyr Phe Asp Val
1 5 10

35

<210> 281

<211> 17

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<221> fuente

<223> /nota = "Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético"

40

<400> 281

Tyr Pro His Tyr Tyr Arg Asp Glu Arg Glu Ser His Trp Tyr Phe Asp
1 5 10 15

Val

45

<210> 282

<211> 17

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

50

<220>

ES 2 656 446 T3

<221> fuente
 <223> /nota = "Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético"

<400> 282

5

Tyr Pro His Tyr Tyr Ser His Glu Arg Lys Ser His Trp Tyr Phe Asp
1 5 10 15

Val

<210> 283
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

10

<220>
 <221> fuente
 <223> /nota = "Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético"

15

<400> 283

Tyr Pro His Tyr Tyr Leu Lys Asp Arg Lys Ser His Trp Tyr Phe Asp
1 5 10 15

Val

<210> 284
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

20

<220>
 <221> fuente
 <223> /nota = "Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético"

25

<400> 284

30

Tyr Pro His Tyr Tyr Leu Asn Glu Arg Lys Ser His Trp Tyr Phe Asp
1 5 10 15

Val

<210> 285
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

35

<220>
 <221> fuente
 <223> /nota = "Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético"

40

<400> 285

Tyr Pro His Tyr Tyr Ser Asn Glu Arg Lys Ser His Trp Tyr Phe Asp
1 5 10 15

Val

45

Tyr Pro His Tyr Tyr Leu Lys Asp Gly Arg Ser Ser His Trp Tyr Phe
1 5 10 15

Asp Val

5 <210> 290
 <211> 18
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <221> fuente
 10 <223> /nota = "Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético"
 <400> 290

Tyr Pro His Tyr Tyr Leu Lys Asp Arg Arg Ser Ser His Trp Tyr Phe
1 5 10 15

Asp Val

15 <210> 291
 <211> 17
 <212> PRT
 20 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota = "Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético"
 25 <400> 291

Tyr Pro His Tyr Tyr Gln Arg Asp Arg Ser Ser His Trp Tyr Phe Asp
1 5 10 15

Val

30 <210> 292
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 35 <221> fuente
 <223> /nota = "Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético"
 <400> 292

Tyr Pro His Tyr Tyr Arg Asp Glu Arg Ser Ser His Trp Tyr Phe Asp
1 5 10 15

Val

40 <210> 293
 <211> 18
 <212> PRT
 45 <213> Secuencia artificial

ES 2 656 446 T3

<220>
<221> fuente
<223> /nota = "Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético"

5 <400> 293

Tyr Pro His Tyr Tyr Glu Arg Asp Gly Arg Ser Ser His Trp Tyr Phe
1 5 10 15

Asp Val

10 <210> 294
<211> 18
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

15 <220>
<221> fuente
<223> /nota = "Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético"

<400> 294

Tyr Pro His Tyr Tyr Leu Arg Asp Gly Arg Ser Ser His Trp Tyr Phe
1 5 10 15

Asp Val

20 <210> 295
<211> 17
<212> PRT
25 <213> Secuencia artificial

30 <220>
<221> fuente
<223> /nota = "Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético"

<400> 295

Tyr Pro His Tyr Tyr Arg Asn Glu Arg Ser Ser His Trp Tyr Phe Asp
1 5 10 15

Val

35 <210> 296
<211> 17
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

40 <220>
<221> fuente
<223> /nota = "Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético"

<400> 296

45 **Tyr Pro His Tyr Tyr Ser His Glu Arg Val Ser His Trp Tyr Phe Asp**
1 5 10 15

Val

ES 2 656 446 T3

5
 <210> 297
 <211> 18
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota = "Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético"
 10 <400> 297

Tyr Pro His Tyr Tyr Gln Lys Gln Ser Lys Ser Ser His Trp Tyr Phe
1 5 10 15

Asp Val

15 <210> 298
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota = "Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético"
 20 <400> 298

Tyr Pro Tyr Tyr Tyr Gly Thr Ser His Trp Tyr Phe Asp Val
1 5 10

25 <210> 299
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota = "Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético"
 30 <400> 299

Tyr Pro His Tyr Tyr Gly Thr Ser His Trp Tyr Phe Asp Val
1 5 10

35 <210> 300
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota = "Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético"
 40 <400> 300

Tyr Pro His Tyr Tyr Val Glu Glu Thr Glu Ser His Trp Tyr Phe Asp
1 5 10 15

Val

ES 2 656 446 T3

<220>
 <221> fuente
 <223> /nota = "Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético"

5 <400> 304

Tyr Pro His Tyr Tyr Val Gly Glu Gln Ser Ser His Trp Tyr Phe Asp
1 5 10 15

Val

10 <210> 305
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

15 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota = "Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético"

<400> 305

Tyr Pro His Tyr Tyr Val Gly Glu Thr Ser Ser His Trp Tyr Phe Asp
1 5 10 15

Val

20 <210> 306
 <211> 17
 <212> PRT
 25 <213> Secuencia artificial

<220>
 <221> fuente
 <223> /nota = "Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético"

30 <400> 306

Tyr Pro His Tyr Tyr Leu Lys Asp Lys Ser Ser His Trp Tyr Phe Asp
1 5 10 15

Val

35 <210> 307
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

40 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota = "Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético"

<400> 307

45 **Tyr Pro His Tyr Tyr Leu Lys Asp Arg Ser Ser His Trp Tyr Phe Asp**
1 5 10 15

Val

ES 2 656 446 T3

<210> 308
 <211> 17
 <212> PRT
 5 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota = "Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético"
 10
 <400> 308

Tyr Pro His Tyr Tyr Ala Lys Glu Arg Ser Ser His Trp Tyr Phe Asp
1 5 10 15

Val

 15 <210> 309
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

 20 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota = "Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético"

 <400> 309
 25

Tyr Pro His Tyr Tyr Leu Gly Ser Ser His Trp Tyr Phe Asp Val
1 5 10 15

 <210> 310
 <211> 17
 30 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <221> fuente
 35 <223> /nota = "Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético"

 <400> 310

Tyr Pro His Tyr Tyr Lys Asn Asp Lys Ser Ser His Trp Tyr Phe Asp
1 5 10 15

Val

 40 <210> 311
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

 45 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota = "Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético"

 50 <400> 311

Tyr Pro His Tyr Tyr Leu Asn Asp Lys Ser Ser His Trp Tyr Phe Asp
1 5 10 15

Val

5 <210> 312
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota = "Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético"

<400> 312

Tyr Pro His Tyr Tyr Val Asn Glu Arg Ser Ser His Trp Tyr Phe Asp
1 5 10 15

Val

15 <210> 313
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota = "Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético"

25 <400> 313

Tyr Pro His Tyr Tyr Ala Arg Asp Arg Ser Ser His Trp Tyr Phe Asp
1 5 10 15

Val

30 <210> 314
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

35 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota = "Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético"

<400> 314

Tyr Pro His Tyr Tyr Tyr Arg Asp Arg Ser Ser His Trp Tyr Phe Asp
1 5 10 15

Val

40 <210> 315
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

45

ES 2 656 446 T3

<220>
 <221> fuente
 <223> /nota = "Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético"

5 <400> 315

Tyr Pro Tyr Tyr Asn Gly Ser Ser His Trp Tyr Phe Asp Val
1 5 10

10 <210> 316
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

15 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota = "Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético"

<400> 316

Pro Pro Tyr Tyr Tyr Gly Ser Ser His Trp Tyr Phe Asp Val
1 5 10

20 <210> 317
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

25 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota = "Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético"

<400> 317

Tyr Pro Tyr Tyr Tyr Gly Ser Ser His Trp Tyr Phe Asp Val
1 5 10

30 <210> 318
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

35 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota = "Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético"

<400> 318

40 <210> 319
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

45 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota = "Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético"

<400> 319

50 <210> 319
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

55 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota = "Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético"

<400> 319

ES 2 656 446 T3

Tyr Tyr His Tyr Tyr Gly Ser Ser His Trp Tyr Phe Asp Val
1 5 10

5 <210> 320
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota = "Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético"

<400> 320

Thr Pro His Tyr Tyr Gly Ser Ser His Trp Tyr Phe Asp Val
1 5 10

15 <210> 321
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota = "Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético"

25 <400> 321

Tyr Pro Tyr Tyr Tyr Gly Ser Ser His Trp Tyr Phe Asp Val

1 5 10

30 <210> 322
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial,

35 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota = "Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético"

40 <400> 322

Tyr Pro His Tyr Tyr Gly Arg Ser His Trp Tyr Phe Asp Val
1 5 10

45 <210> 323
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

50 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota = "Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético"

<400> 323

Tyr Pro His Tyr Tyr Gly Arg Ser His Trp Tyr Phe Asp Val
1 5 10

5 <210> 324
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota = "Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético"

<400> 324

Tyr Pro His Tyr Tyr Val Asn Glu Arg Lys Ser His Trp Tyr Phe Asp
1 5 10 15

15 **Val**
 <210> 325
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota = "Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético"

25 <400> 325

Tyr Pro Tyr Tyr Tyr Gly Thr Ser His Trp Tyr Phe Asp Val
1 5 10

30 <210> 326
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

35 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota = "Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético"

<400> 326

Tyr Pro Tyr Tyr Tyr Gly Thr Ser His Trp Tyr Phe Asp Val
1 5 10

40 <210> 327
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

45 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota = "Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético"

50 <400> 327

Tyr Pro His Tyr Tyr Gly Ser Ser His Trp Tyr Phe Asp Ala
1 5 10

ES 2 656 446 T3

5 <210> 328
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota = "Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético"

<400> 328

Tyr Pro His Tyr Tyr Gly Ser Ser His Trp Tyr Phe Asp Tyr
1 5 10

15 <210> 329
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota = "Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético"

25 <400> 329

Tyr Pro His Tyr Tyr Gly Ser Ser His Trp Tyr Phe Ala Val
1 5 10

30 <210> 330
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

35 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota = "Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético"

<400> 330

Tyr Pro His Tyr Tyr Gly Ser Ser His Trp Tyr Ala Asp Val
1 5 10

40 <210> 331
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

45 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota = "Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético"

50 <400> 331

Tyr Pro His Tyr Tyr Gly Ser Ser His Trp Ala Phe Asp Val
1 5 10

55 <210> 332
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<400> 336

Tyr Pro Tyr Tyr Arg Gln Arg Gly His Trp Tyr Phe Asp Val
1 5 10

5 <210> 337
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota = "Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético"

15 <400> 337

Tyr Pro Tyr Tyr Arg Asp Ala Ser His Trp Tyr Phe Asp Val
1 5 10

20 <210> 338
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

25 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota = "Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético"

<400> 338

Tyr Pro Tyr Tyr Arg Asn Ala Ser His Trp Tyr Phe Asp Val
1 5 10

30 <210> 339
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

35 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota = "Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético"

40 <400> 339

Tyr Pro Tyr Tyr Tyr Gly Ala Ser His Trp Tyr Phe Asp Val
1 5 10

45 <210> 340
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

50 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota = "Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético"

<400> 340

Tyr Pro His Tyr Tyr Gly Ala Ser His Trp Tyr Phe Asp Val
1 5 10

55

ES 2 656 446 T3

5
 <210> 341
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <221> fuente
 <223> /nota = "Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético"

10
 <400> 341

Tyr Pro Tyr Tyr Arg Gly Glu Ser His Trp Tyr Phe Asp Val
1 5 10

15
 <210> 342
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

20
 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota = "Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético"

<400> 342

Tyr Pro Tyr Tyr Arg Lys Gly Ser His Trp Tyr Phe Asp Val
1 5 10

25
 <210> 343
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

30
 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota = "Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético"

35
 <400> 343

Tyr Pro Tyr Tyr Arg Ser Gly Ser His Trp Tyr Phe Asp Val
1 5 10

40
 <210> 344
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

45
 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota = "Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético"

50
 <400> 344

Tyr Pro Tyr Tyr Lys Gly Gly Ser His Trp Tyr Phe Asp Val
1 5 10

55
 <210> 345
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>

ES 2 656 446 T3

<221> fuente
 <223> /nota = "Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético"

<400> 345

5

Tyr Pro Tyr Tyr Ile Ala Lys Ser His Trp Tyr Phe Asp Val
1 5 10

<210> 346
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

10

<220>
 <221> fuente
 <223> /nota = "Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético"

15

<400> 346

Tyr Pro Tyr Tyr Ile Asn Lys Ser His Trp Tyr Phe Asp Val
1 5 10

20

<210> 347
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

25

<220>
 <221> fuente
 <223> /nota = "Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético"

30

<400> 347

Tyr Pro Tyr Tyr Arg Asp Asn Ser His Trp Tyr Phe Asp Val
1 5 10

35

<210> 348
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

40

<220>
 <221> fuente
 <223> /nota = "Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético"

<400> 348

Tyr Pro Tyr Tyr Arg Gln Asn Ser His Trp Tyr Phe Asp Val
1 5 10

45

<210> 349
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

50

<220>
 <221> fuente
 <223> /nota = "Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético"

55

<400> 349

ES 2 656 446 T3

Tyr Pro Tyr Tyr Tyr Asn Gln Ser His Trp Tyr Phe Asp Val
1 5 10

5 <210> 350
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota = "Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético"
 <400> 350

Tyr Pro Tyr Tyr Ile Glu Arg Ser His Trp Tyr Phe Asp Val
1 5 10

15 <210> 351
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota = "Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético"
 25 <400> 351

Tyr Pro Tyr Tyr Thr Asn Arg Ser His Trp Tyr Phe Asp Val
1 5 10

30 <210> 352
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

35 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota = "Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético"
 <400> 352

Tyr Pro Tyr Tyr Thr Thr Arg Ser His Trp Tyr Phe Asp Val
1 5 10

40 <210> 353
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

45 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota = "Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético"
 50 <400> 353

Tyr Pro Tyr Tyr Thr Gly Arg Ser His Trp Tyr Phe Asp Val
1 5 10

55 <210> 354
 <211> 14

ES 2 656 446 T3

<212> PRT
<213> Secuencia artificial

5 <220>
<221> fuente
<223> /nota = "Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético"

<400> 354

10 **Tyr Pro Tyr Tyr Lys Asn Thr Ser His Trp Tyr Phe Asp Val**
1 5 10

<210> 355
<211> 14
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

15 <220>
<221> fuente
<223> /nota = "Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético"

<400> 355

20 **Tyr Pro Tyr Tyr Arg Asn Thr Ser His Trp Tyr Phe Asp Val**
1 5 10

25 <210> 356
<211> 14
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

30 <220>
<221> fuente
<223> /nota = "Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético"

<400> 356

35 **Tyr Pro Tyr Tyr Thr Asn Thr Ser His Trp Tyr Phe Asp Val**
1 5 10

40 <210> 357
<211> 14
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

45 <220>
<221> fuente
<223> /nota = "Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético"

<400> 357

50 **Tyr Pro Tyr Tyr Arg Gly Thr Ser His Trp Tyr Phe Asp Val**
1 5 10

55 <210> 358
<211> 14
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota = "Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético"

<400> 358

Tyr Pro Tyr Tyr Trp Gly Thr Ser His Trp Tyr Phe Asp Val
1 5 10

5 <210> 359
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota = "Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético"

<400> 359

15 **Tyr Pro Tyr Tyr Tyr Gly Thr Ser His Trp Tyr Phe Asp Val**
1 5 10

20 <210> 360
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

25 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota = "Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético"

<400> 360

Tyr Pro His Tyr Tyr Ala Ser Ser His Trp Tyr Phe Asp Val
1 5 10

30 <210> 361
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

35 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota = "Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético"

40 <400> 361

Tyr Pro Tyr Tyr Lys Glu Ser Ser His Trp Tyr Phe Asp Val
1 5 10

45 <210> 362
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

50 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota = "Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético"

<400> 362

Tyr Pro Tyr Tyr Arg Asn Ser Ser His Trp Tyr Phe Asp Val
1 5 10

55

ES 2 656 446 T3

5 <210> 363
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota = "Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético"

<400> 363

Tyr Pro Tyr Tyr Arg Gln Ser Ser His Trp Tyr Phe Asp Val
1 5 10

15 <210> 364
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota = "Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético"

25 <400> 364

Tyr Pro His Tyr Ala Gly Ser Ser His Trp Tyr Phe Asp Val
1 5 10

30 <210> 365
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

35 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota = "Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético"

<400> 365

Tyr Pro Tyr Tyr Glu Gly Ser Ser His Trp Tyr Phe Asp Val
1 5 10

40 <210> 366
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

45 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota = "Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético"

50 <400> 366

Tyr Pro Tyr Tyr Thr Gly Ser Ser His Trp Tyr Phe Asp Val
1 5 10

55 <210> 367
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>

ES 2 656 446 T3

<221> fuente
 <223> /nota = "Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético"

<400> 367

5

Tyr Pro His Ala Tyr Gly Ser Ser His Trp Tyr Phe Asp Val
1 5 10

<210> 368
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

10

<220>
 <221> fuente
 <223> /nota = "Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético"

15

<400> 368

Tyr Pro Ala Tyr Tyr Gly Ser Ser His Trp Tyr Phe Asp Val
1 5 10

20

<210> 369
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

25

<220>
 <221> fuente
 <223> /nota = "Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético"

30

<400> 369

Tyr Pro Tyr Tyr Tyr Gly Ser Ser His Trp Tyr Phe Asp Val
1 5 10

35

<210> 370
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <221> fuente
 <223> /nota = "Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético"

40

<400> 370

Ala Ala His Tyr Tyr Gly Ser Ser His Trp Tyr Phe Asp Val
1 5 10

45

<210> 371
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

50

<220>
 <221> fuente
 <223> /nota = "Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético"

55

<400> 371

ES 2 656 446 T3

Ala Pro His Tyr Tyr Gly Ser Ser His Trp Tyr Phe Asp Val
1 5 10

5 <210> 372
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <221> fuente
 <223> /nota = "Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético"

10 <400> 372

Ala Ala Ser Gln Asp Ile Ser Asn Tyr Leu Asn
1 5 10

15 <210> 373
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota = "Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético"

25 <400> 373

Ser Ala Ser Gln Asp Ile Ser Asn Tyr Leu Asn
1 5 10

30 <210> 374
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

35 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota = "Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético"

<400> 374

Ser Ala Ala Gln Asp Ile Ser Asn Tyr Leu Asn
1 5 10

40 <210> 375
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

45 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota = "Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético"

50 <400> 375

Ser Ala Ser Ala Asp Ile Ser Asn Tyr Leu Asn
1 5 10

55 <210> 376
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

ES 2 656 446 T3

<220>
 <221> fuente
 <223> /nota = "Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético"
 5
 <400> 376

Ser	Ala	Ser	Gln	Ala	Ile	Ser	Asn	Tyr	Leu	Asn
1				5					10	

 10
 <210> 377
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

 15
 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota = "Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético"

 <400> 377
 20

Ser	Ala	Ser	Gln	Asp	Ala	Ser	Asn	Tyr	Leu	Asn
1				5					10	

 25
 <210> 378
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

 30
 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota = "Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético"

 <400> 378

Ser	Ala	Ser	Gln	Asp	Ile	Ala	Asn	Tyr	Leu	Asn
1				5					10	

 35
 <210> 379
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

 40
 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota = "Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético"

 45
 <400> 379

Ser	Ala	Ser	Gln	Asp	Ile	Ser	Ala	Tyr	Leu	Asn
1				5					10	

 50
 <210> 380
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

 55
 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota = "Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético"

 <400> 380

ES 2 656 446 T3

Ser Ala Ser Gln Asp Ile Ser Asn Ala Leu Asn
1 5 10

5 <210> 381
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <221> fuente
 <223> /nota = "Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético"

<400> 381

Ser Ala Ser Gln Asp Ile Ser Asn Tyr Ala Asn
1 5 10

15 <210> 382
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <221> fuente
 <223> /nota = "Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético"

25 <400> 382

Ser Ala Ser Gln Asp Ile Ser Asn Tyr Leu Ala
1 5 10

30 <210> 383
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <221> fuente
 <223> /nota = "Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético"

40 <400> 383

Arg Ala Asn Glu Gln Leu Ser Asn Tyr Leu Asn
1 5 10

45 <210> 384
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <221> fuente
 <223> /nota = "Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético"

50 <400> 384

Arg Ala Asn Glu Gln Ile Ser Asn Tyr Leu Asn
1 5 10

55 <210> 385

ES 2 656 446 T3

<211> 11
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

5 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota = "Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético"

<400> 385

10 **Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser Asn Tyr Leu Ala**
1 5 10

<210> 386
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

15 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota = "Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético"

<400> 386

Ala Thr Ser Ser Leu His Ser
1 5

25 <210> 387
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

30 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota = "Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético"

<400> 387

Phe Ala Ser Ser Leu His Ser
1 5

40 <210> 388
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

45 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota = "Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético"

<400> 388

Phe Thr Ala Ser Leu His Ser
1 5

50 <210> 389
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

55 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota = "Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético"

ES 2 656 446 T3

<400> 389

Phe Thr Ser Ala Leu His Ser
1 5

5

<210> 390
<211> 7
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

10

<220>
<221> fuente
<223> /nota = "Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético"

15

<400> 390

Phe Thr Ser Ser Ala His Ser
1 5

20

<210> 391
<211> 7
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

25

<220>
<221> fuente
<223> /nota = "Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético"

<400> 391

Phe Thr Ser Ser Leu Ala Ser
1 5

30

<210> 392
<211> 7
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

35

<220>
<221> fuente
<223> /nota = "Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético"

40

<400> 392

Phe Thr Ser Ser Leu His Ala
1 5

45

<210> 393
<211> 7
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

50

<220>
<221> fuente
<223> /nota = "Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético"

55

<400> 393

Ala Ala Ser Ser Leu Glu Ser
1 5

ES 2 656 446 T3

5 <210> 394
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <221> fuente
 <223> /nota = "Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético"
 10 <400> 394

Gln Gln Tyr Ser Thr Val Phe Trp Thr
1 5

15 <210> 395
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <221> fuente
 <223> /nota = "Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético"
 20 <400> 395

Gln Gln Tyr Asn Ser Thr Pro Trp Thr
1 5

25 <210> 396
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <221> fuente
 <223> /nota = "Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético"
 30 <400> 396

Gln Gln Tyr Tyr Ser Thr Pro Trp Thr
1 5

35 <210> 397
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <221> fuente
 <223> /nota = "Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético"
 40 <400> 397

Gln Gln Ser Tyr Ser Thr Pro Trp Thr
1 5

45 <210> 398
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

ES 2 656 446 T3

<220>
 <221> fuente
 <223> /nota = "Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético"

5 <400> 398

Gln Gln Tyr Ser Ala Val Pro Trp Thr
1 5

10 <210> 399
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

15 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota = "Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético"
 <400> 399

20 **Gln Gln Tyr Ser Asn Val Pro Trp Thr**
1 5

25 <210> 400
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

30 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota = "Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético"
 <400> 400

Gln Gln Tyr Ser Ser Val Pro Trp Thr
1 5

35 <210> 401
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

40 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota = "Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético"
 <400> 401

45 **Ala Gln Tyr Ser Thr Val Pro Trp Thr**
1 5

50 <210> 402
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

55 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota = "Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético"
 <400> 402

ES 2 656 446 T3

Gln Ala Tyr Ser Thr Val Pro Trp Thr
1 5

5 <210> 403
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota = "Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético"
 <400> 403

Gln Gln Ala Ser Thr Val Pro Trp Thr
1 5

15 <210> 404
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota = "Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético"
 25 <400> 404

Gln Gln Tyr Ala Thr Val Pro Trp Thr
1 5

30 <210> 405
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

35 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota = "Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético"
 <400> 405

Gln Gln Tyr Ser Ala Val Pro Trp Thr
1 5

40 <210> 406
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

45 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota = "Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético"
 50 <400> 406

Gln Gln Tyr Ser Thr Ala Pro Trp Thr
1 5

55 <210> 407
 <211> 9
 <212> PRT

ES 2 656 446 T3

<213> Secuencia artificial

<220>

<221> fuente

5 <223> /nota = "Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético"

<400> 407

Gln Gln Tyr Ser Thr Val Ala Trp Thr
1 5

10

<210> 408

<211> 9

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

15

<220>

<221> fuente

<223> /nota = "Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético"

20

<400> 408

Gln Gln Tyr Ser Thr Val Pro Ala Thr
1 5

25

<210> 409

<211> 9

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

30

<220>

<221> fuente

<223> /nota = "Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético"

<400> 409

Gln Gln Tyr Ser Thr Val Pro Trp Ala
1 5

35

<210> 410

<211> 9

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

40

<220>

<221> fuente

<223> /nota = "Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético"

45

<400> 410

Gln Gln Tyr Asn Ser Leu Pro Trp Thr
1 5

50

<210> 411

<211> 9

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

55

<220>

<221> fuente

<223> /nota = "Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético"

<400> 411

ES 2 656 446 T3

Gly Tyr Thr Phe Thr Asn Tyr Gly Met
1 5

5 <210> 412
<211> 15
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

10 <220>
<221> fuente
<223> /nota = "Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético"

<400> 412

15 **Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser**
1 5 10 15

REIVINDICACIONES

1. Un anticuerpo anti-VEGF o un fragmento de unión anti-VEGF de un anticuerpo que comprende seis CDR que tienen una o más sustituciones de aminoácidos o combinaciones de sustituciones de aminoácidos en comparación con un anticuerpo anti-VEGF de referencia o un fragmento de unión a antígeno anti-VEGF de referencia que tiene CDR que tienen secuencias de aminoácidos correspondientes a la SEQ ID NO: 3 (CDR-H1), la SEQ ID NO: 4 (CDR-H2), la SEQ ID NO: 5 (CDR-H3), la SEQ ID NO: 6 (CDR-L1), la SEQ ID NO: 7 (CDR-L2) y la SEQ ID NO: 8 (CDR L3), en el que dichas una o más sustituciones de aminoácidos o combinaciones de sustituciones de aminoácidos se seleccionan entre:
- (i) la sustitución de CDR-H2 K64S;
 - (ii) la sustitución de CDR-H2 K64Q;
 - (iii) las sustituciones de CDR-H2 Y53F y K64Q;
 - (iv) las sustituciones de CDR-H2 Y53F y K64S;
 - (v) la sustitución de CDR-H3 H97E;
 - (vi) la sustitución de CDR-H3 Y98F;
 - (vii) las sustituciones de CDR-H3 H97E y Y98F;
 - (viii) las sustituciones de CDR-H3 H97P y Y98F;
- y opcionalmente la sustitución de CDR-L2 T51A, en el que las sustituciones de aminoácidos se numeran de acuerdo con Kabat.
2. El anticuerpo anti-VEGF o fragmento de unión anti-VEGF de la reivindicación 1 que comprende las siguientes secuencias:
- una secuencia de aminoácidos CDR-H1 de G Y T F T N Y G M N (SEQ ID NO: 3);
 - una secuencia de aminoácidos CDR-H2 de W I N T Y T G E P T Y A A D F S R;
 - una secuencia de aminoácidos CDR-H3 de Y P H Y Y G S S H W Y F D V (SEQ ID NO: 5);
 - una secuencia de aminoácidos CDR-L1 de S A S Q D I S N Y L N (SEQ ID NO: 6);
 - una secuencia de aminoácidos CDR-L2 de F T S S L H S (SEQ ID NO: 7); y
 - una secuencia de aminoácidos CDR-L3 de Q Q Y S T V P W T (SEQ ID NO: 8).
3. El anticuerpo monoclonal anti-VEGF o fragmento de unión anti-VEGF de la reivindicación 1 que comprende las siguientes secuencias:
- una secuencia de aminoácidos CDR-H1 de G Y T F T N Y G M N (SEQ ID NO: 3);
 - una secuencia de aminoácidos CDR-H2 de W I N T Y T G E P T Y A A D F Q R;
 - una secuencia de aminoácidos CDR-H3 de Y P H Y Y G S S H W Y F D V (SEQ ID NO: 5);
 - una secuencia de aminoácidos CDR-L1 de S A S Q D I S N Y L N (SEQ ID NO: 6);
 - una secuencia de aminoácidos CDR-L2 de F T S S L H S (SEQ ID NO: 7); y
 - una secuencia de aminoácidos CDR-L3 de Q Q Y S T V P W T (SEQ ID NO: 8).
4. El anticuerpo anti-VEGF o fragmento de unión anti-VEGF de la reivindicación 1 que comprende las siguientes secuencias:
- una secuencia de aminoácidos CDR-H1 de G Y T F T N Y G M N (SEQ ID NO: 3);
 - una secuencia de aminoácidos CDR-H2 de W I N T F T G E P T Y A A D F Q R;
 - una secuencia de aminoácidos CDR-H3 de Y P H Y Y G S S H W Y F D V (SEQ ID NO: 5);
 - una secuencia de aminoácidos CDR-L1 de S A S Q D I S N Y L N (SEQ ID NO: 6);
 - una secuencia de aminoácidos CDR-L2 de F T S S L H S (SEQ ID NO: 7); y
 - una secuencia de aminoácidos CDR-L3 de Q Q Y S T V P W T (SEQ ID NO: 8).
5. El anticuerpo anti-VEGF o fragmento de unión anti-VEGF de la reivindicación 1 que comprende las siguientes secuencias:
- una secuencia de aminoácidos CDR-H1 de G Y T F T N Y G M N (SEQ ID NO: 3);
 - una secuencia de aminoácidos CDR-H2 de W I N T Y T G E P T Y A A D F K R (SEQ ID NO: 4);
 - una secuencia de aminoácidos CDR-H3 de Y P E Y Y G S S H W Y F D V;
 - una secuencia de aminoácidos CDR-L1 de S A S Q D I S N Y L N (SEQ ID NO: 6);
 - una secuencia de aminoácidos CDR-L2 de F T S S L H S (SEQ ID NO: 7); y
 - una secuencia de aminoácidos CDR-L3 de Q Q Y S T V P W T (SEQ ID NO: 8).
6. El anticuerpo anti-VEGF o fragmento de unión anti-VEGF de la reivindicación 1 que comprende las siguientes secuencias:
- una secuencia de aminoácidos CDR-H1 de G Y T F T N Y G M N (SEQ ID NO: 3);
 - una secuencia de aminoácidos CDR-H2 de W I N T Y T G E P T Y A A D F K R (SEQ ID NO: 4);
 - una secuencia de aminoácidos CDR-H3 de Y P P F Y G S S H W Y F D V;
 - una secuencia de aminoácidos CDR-L1 de S A S Q D I S N Y L N (SEQ ID NO: 6);
 - una secuencia de aminoácidos CDR-L2 de F T S S L H S (SEQ ID NO: 7); y
 - una secuencia de aminoácidos CDR-L3 de Q Q Y S T V P W T (SEQ ID NO: 8).

7. El anticuerpo anti-VEGF o fragmento de unión anti-VEGF de la reivindicación 1 que comprende las siguientes secuencias:
 una secuencia de aminoácidos CDR-H1 de G Y T F T N Y G M N (SEQ ID NO: 3);
 una secuencia de aminoácidos CDR-H2 de W I N T Y T G E P T Y A A D F K R (SEQ ID NO: 4);
 5 una secuencia de aminoácidos CDR-H3 de Y P E F Y G S S H W Y F D V;
 una secuencia de aminoácidos CDR-L1 de S A S Q D I S N Y L N (SEQ ID NO: 6);
 una secuencia de aminoácidos CDR-L2 de F T S S L H S (SEQ ID NO: 7); y
 una secuencia de aminoácidos CDR-L3 de Q Q Y S T V P W T (SEQ ID NO: 8).
- 10 8. El anticuerpo anti-VEGF o fragmento de unión anti-VEGF de la reivindicación 1 que comprende las siguientes secuencias:
 una secuencia de aminoácidos CDR-H1 de G Y T F T N Y G M N (SEQ ID NO: 3);
 una secuencia de aminoácidos CDR-H2 de W I N T Y T G E P T Y A A D F S R;
 una secuencia de aminoácidos CDR-H3 de Y P H Y Y G S S H W Y F D V (SEQ ID NO: 5);
 15 una secuencia de aminoácidos CDR-L1 de S A S Q D I S N Y L N (SEQ ID NO: 6);
 una secuencia de aminoácidos CDR-L2 de F A S S L H S (SEQ ID NO: 387); y
 una secuencia de aminoácidos CDR-L3 de Q Q Y S T V P W T (SEQ ID NO: 8).
- 20 9. El anticuerpo anti-VEGF o fragmento de unión anti-VEGF de la reivindicación 1 que comprende las siguientes secuencias:
 una secuencia de aminoácidos CDR-H1 de G Y T F T N Y G M N (SEQ ID NO: 3);
 una secuencia de aminoácidos CDR-H2 de W I N T Y T G E P T Y A A D F Q R;
 una secuencia de aminoácidos CDR-H3 de Y P H Y Y G S S H W Y F D V (SEQ ID NO: 5);
 una secuencia de aminoácidos CDR-L1 de S A S Q D I S N Y L N (SEQ ID NO: 6);
 25 una secuencia de aminoácidos CDR-L2 de F A S S L H S (SEQ ID NO: 387); y
 una secuencia de aminoácidos CDR-L3 de Q Q Y S T V P W T (SEQ ID NO: 8).
- 30 10. El anticuerpo anti-VEGF o fragmento de unión anti-VEGF de la reivindicación 1 que comprende las siguientes secuencias:
 una secuencia de aminoácidos CDR-H1 de G Y T F T N Y G M N (SEQ ID NO: 3);
 una secuencia de aminoácidos CDR-H2 de W I N T F T G E P T Y A A D F Q R;
 una secuencia de aminoácidos CDR-H3 de Y P H Y Y G S S H W Y F D V (SEQ ID NO: 5);
 una secuencia de aminoácidos CDR-L1 de S A S Q D I S N Y L N (SEQ ID NO: 6);
 una secuencia de aminoácidos CDR-L2 de F A S S L H S (SEQ ID NO: 387); y
 35 una secuencia de aminoácidos CDR-L3 de Q Q Y S T V P W T (SEQ ID NO: 8).
- 40 11. El anticuerpo anti-VEGF o fragmento de unión anti-VEGF de la reivindicación 1 que comprende las siguientes secuencias:
 una secuencia de aminoácidos CDR-H1 de G Y T F T N Y G M N (SEQ ID NO: 3);
 una secuencia de aminoácidos CDR-H2 de W I N T Y T G E P T Y A A D F K R (SEQ ID NO: 4);
 una secuencia de aminoácidos CDR-H3 de Y P E F Y G S S H W Y F D V;
 una secuencia de aminoácidos CDR-L1 de S A S Q D I S N Y L N (SEQ ID NO: 6);
 una secuencia de aminoácidos CDR-L2 de F A S S L H S (SEQ ID NO: 387); y
 45 una secuencia de aminoácidos CDR-L3 de Q Q Y S T V P W T (SEQ ID NO: 8).
- 50 12. El anticuerpo anti-VEGF o fragmento de unión anti-VEGF de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11 que es:
 (i) un anticuerpo monoclonal o fragmento de unión anti-VEGF de un anticuerpo monoclonal, respectivamente; y/o
 (ii) un anticuerpo humanizado o fragmento de unión anti-VEGF de un anticuerpo humanizado, respectivamente.
- 55 13. El anticuerpo anti-VEGF o fragmento de unión anti-VEGF de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12 que es una IgG, opcionalmente una IgG1 o una IgG2.
- 60 14. El anticuerpo anti-VEGF o fragmento de unión anti-VEGF de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13 que:
 (i) incluye una o más mutaciones en la región Fc que aumentan la actividad ADCC;
 (ii) no está fucosilado; y/o
 (iii) incluye una o más mutaciones en la región Fc que o aumentan la unión a FcγR o aumentan la unión a FcRn.
- 65 15. El anticuerpo anti-VEGF o fragmento de unión anti-VEGF de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 14 que tiene otras distintas de dichas una o más mutaciones, (i) una secuencia V_H que corresponde a la SEQ ID NO: 1 y una secuencia V_L que corresponde a la SEQ ID NO: 2; o (ii) una secuencia V_H que corresponde a la SEQ ID NO: 9 y una secuencia V_L que corresponde a la SEQ ID NO: 10.
16. Un conjugado anticuerpo-fármaco que comprende un anticuerpo anti-VEGF o fragmento de unión anti-VEGF de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 15.

17. Una composición farmacéutica que comprende un anticuerpo anti-VEGF o fragmento de unión anti-VEGF de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 15 o un conjugado anticuerpo-fármaco de acuerdo con la reivindicación 16 y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

5 18. Un anticuerpo anti-VEGF o fragmento de unión anti-VEGF de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 15, un conjugado anticuerpo-fármaco de acuerdo con la reivindicación 16 o una composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 17, para su uso en el tratamiento del cáncer en un paciente humano, opcionalmente en el que el cáncer es un carcinoma metastático del colon, un carcinoma metastático del recto, un cáncer de pulmón no microcítico de células no escamosas o un cáncer de mama metastático negativo para HER2, opcionalmente además
10 en el que el cáncer de pulmón no microcítico de células no escamosas es inoperable, avanzado localmente, recurrente o metastático.

19. Un anticuerpo anti-VEGF o fragmento de unión anti-VEGF de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 15, un conjugado anticuerpo-fármaco de acuerdo con la reivindicación 16 o una composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 17, para su uso en el tratamiento de la degeneración macular relacionada con la edad o un trastorno inmunitario en un paciente humano, opcionalmente en el que el trastorno inmunitario es la artritis reumatoide o la enfermedad de Grave.
15

Cadena de anticuerpo	Nº de CDR	Resto	Posición en la CDR	Nº de Kabat
Pesada	1	G	1	26
		Y	2	27
		T	3	28
		F	4	29
		T	5	30
		N	6	31
		Y	7	32
		G	8	33
		M	9	34
		N	10	35
Pesada	2	W	1	50
		I	2	51
		N	3	52
		T	4	52a
		Y	5	53
		T	6	54
		G	7	55
		E	8	56
		P	9	57
		T	10	58
		Y	11	59
		A	12	60
		A	13	61
		D	14	62
		F	15	63
		K	16	64
		R	17	65
Pesada	3	Y	1	95
		P	2	96
		H	3	97
		Y	4	98
		Y	5	99
		G	6	100
		S	7	100a
		S	8	100b
		H	9	100c
		W	10	100d
		Y	11	100e
		F	12	100f
		D	13	101
		V	14	102

TABLA 1

Cadena de anticuerpo	Nº de CDR	Resto	Posición en la CDR	Nº de Kabat
Ligera	1	S	1	24
		A	2	25
		S	3	26
		Q	4	27
		D	5	28
		I	6	29
		S	7	30
		N	8	31
		Y	9	32
		L	10	33
		N	11	34
Ligera	2	F	1	50
		T	2	51
		S	3	52
		S	4	53
		L	5	54
		H	6	55
		S	7	56
Ligera	3	Q	1	89
		Q	2	90
		Y	3	91
		S	4	92
		T	5	93
		V	6	94
		P	7	95
		W	8	96
		T	9	97

TABLA 2

SEC ID Nº	Péptido VL
13.	DIQMTQSPSSLSASV
14.	MTQSPSSLSASVGDR
15.	SPSSLSASVGDRVTI
16.	SLSASVGDRVTITCS
17.	ASVGDRVTITCSASQ
18.	GDRVTITCSASQDIS
19.	VTITCSASQDISNYL
20.	TCSASQDISNYLNWY
21.	ASQDISNYLNWYQQK
22.	DISNYLNWYQQKEGK
23.	NYLNWYQQKPGKAPK
24.	NWYQQKPGKAPKVL
25.	QQKPGKAPKVLIIYFT
26.	PGKAPKVLIIYFTSSL
27.	APKVLIIYFTSSLHSG
28.	VLIYFTSSLHSGVPS
29.	YFTSSLHSGVPSRFS
30.	SSLHSGVPSRFSGSG
31.	HSGVPSRFSGSGSGT
32.	VPSRFSGSGSGTDFT
33.	RFSGSGSGTDFTLTI
34.	GSGSGTDFTLTISSL
35.	SGTDFTLTISSLQPE
36.	DFTLTISSLQPEDFA
37.	LTISSLQPEDFATYY
38.	SSLQPEDFATYYCQQ
39.	QPEDFATYYCQQYST
40.	DFATYYCQQYSTVPW
41.	TYYCQQYSTVPWTFG
42.	CQQYSTVPWTFGQGT
43.	YSTVPWTFGQGTKVE
44.	VPWTFGQGTKVEIKR

TABLA 3

SEC ID Nº	Péptido VH
45.	EVQLVESGGGLVQPG
46.	LVESGGGLVQPGGSL
47.	SGGGLVQPGGSLRLS
48.	GLVQPGGSLRLSCAA
49.	QPGGSLRLSCAASGY
50.	GSLRLSCAASGYTFT
51.	RLSCAASGYTFTNYG
52.	CAASGYTFTNYGMNW
53.	SGYTFTNYGMNWVRQ
54.	T FTNYGMNWVRQAPG
55.	NYGMNWVRQAPGKGL
56.	MNWVRQAPGKGLEWV
57.	VRQAPGKGLEWVGWI.
58.	APGKGLEWVGWINTY
59.	KGLEWVGWINTYTGE
60.	EWVGWINTYTGEPTY
61.	GWINTYTGEPTYAAD
62.	NTYTGEPTYAADFKR
63.	TGEPTYAADFKRRFT
64.	PTYAADFKRRFTFSL
65.	AADFKRRFTFSLDTS
66.	FKRRFTFSLDTSKST
67.	RFTFSLDTSKSTAYL
68.	FSLDTSKSTAYLQMN
69.	DTSKSTAYLQMNSLR
70.	KSTAYLQMNSLRAED
71.	AYLQMNSLRAEDTAV
72.	QMNSLRAEDTAVYYC
73.	SLRAEDTAVYYCAKY
74.	AEDTAVYYCAKYPHY
75.	TAVYYCAKYPHYYS
76.	YYCAKYPHYYSYSHW
77.	AKYPHYYSYSHWYFD
78.	PHYYSYSHWYFDVWG
79.	YGSYSHWYFDVWQGT
80.	SHWYFDVWQGTLV
81.	YFDVWQGTLVTVSS

TABLA 4

SEC ID Nº	Secuencia	n	%	IE	e.e.m.
25	QQKPGKAPKVLIIYFI	15	15,15	1,82	0,24
62	NTYTGEPTYAADF K R	16	16,16	2,16	0,35-
74	AEDTAVYYCAKYPHY	9	9,09	1,45	0,18

TABLA 5

TpoSil.	Posición	Sustituciones desinmunizantes candidatas
CDR-H2		
A	61	F, E, D
D	62	G, L, Q, T, K, R, E, H
K	64	S, V, Q
R	65	V, F, H, N, S, Q, K, I
CDR-H3		
Y	98	H

TABLA 6

ES 2 656 446 T3

SEC ID N°	28	31	97	99	100a	k_{on} (1/Ms)	k_{off} (1/s)	K_D (M)	Δk_{on}	Δk_{off}	ΔK_D
82		F	D	D	G	2,08E+06	1,72E-04	8,27E-11	11,6	2,0	23,8
83		F	P	D	G	1,88E+06	1,94E-04	1,06E-10	10,4	1,8	18,6
84		F	P	E		1,60E+06	1,82E-04	1,28E-10	8,9	1,9	15,3
85		F	E	E		1,25E+06	1,75E-04	1,40E-10	6,9	2,0	14,1
86		F	D	E		1,33E+06	2,38E-04	1,79E-10	7,4	1,5	11,0
87		F	E	D	G	8,24E+05	1,60E-04	2,04E-10	4,6	2,2	9,6
88		F		D	G	9,68E+05	2,73E-04	2,82E-10	5,4	1,3	7,0
89		F	P	D		9,04E+05	2,49E-04	2,82E-10	5,0	1,4	7,0
90		F	D		G	6,45E+05	1,97E-04	3,11E-10	3,6	1,8	6,3
91		F				2,11E+05	1,21E-04	5,75E-10	1,2	2,9	3,4
92			P			3,67E+05	2,56E-04	7,08E-10	2,0	1,4	2,8
93			E			2,92E+05	2,25E-04	7,61E-10	1,6	1,6	2,6
94		F			G	2,58E+05	2,20E-04	8,57E-10	1,4	1,6	2,3
95			D			2,62E+05	3,96E-04	1,54E-09	1,5	0,9	1,3
96		F	P		G	2,25E+05	3,79E-04	1,75E-09	1,3	0,9	1,1
WT	T	N	H	Y	S	1,80E+05	3,52E-04	1,97E-09	1,0	1,0	1,0

TABLA 7

TpoSil.	Posición	Sustituciones en la cadena pesada que aumentan la afinidad
CDR-H1		
T	28	P
N	31	F, G, M
CDR-H3		
H	97	A, D, E, P, Q, S, T
Y	99	D, E.
S	100a	D, E, G, V

TABLA 8

TpoSil.	Posición	Sustituciones en la cadena pesada que aumentan la afinidad
CDR-H1		
T	30	W, R, Q
CDR-H2		
Y	53	F
T	58	F
A	61	G, K, R, H, Y
K	64	G, E
R	65	L, T, A, E, D
CDR-H3		
Y	98	F
Y	100e	F

TABLA 9

TpoSil.	Posición	Sustituciones neutras de cadena pesada
CDR-H1		
T	30	I, M, V
N	31	Y, S, A, Q
CDR-H2		
A	61	F, E, D
D	62	G, L, Q, T, K, R, E, H
K	64	S, V, Q
R	65	V, F, H, N, S, Q, K, I
CDR-H3		
Y	98	H

TABLA 10

TpoSil.	Posición	Sustituciones neutras de cadena ligera
CDR-L1		
S	24	R, W, G
S	26	V
S	30	G
N	31	L, S
CDR-L2		
L	54	M
H	55	R
S	56	G, R
CDR-L3		
T	93	D, E, S

TABLA 11

UR	CORH2										CORH3									
	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9
1																				
2																				
3																				
4																				
5																				
6																				
7																				
8																				
9																				
10																				
11																				
12																				
13																				
14																				
15																				
16																				
17																				
18																				
19																				
20																				
21																				
22																				
23																				
24																				
25																				
26																				
27																				
28																				

TABLA 12-1

V#	CDR-L1											CDR-L2					CDR-L3											
	S	A	S	Q	D	I	S	N	Y	L	N	F	T	S	S	L	H	S	Q	Q	Y	S	T	V	P	W	T	
206																										F		
207																						NS						
208																						YS						
209																						SY						
210																											A	
211																											N	
212																											S	
213	A																											
214		A																										
215			A																									
216				A																								
217					A																							
218						A																						
219							A																					
220								A																				
221									A																			
222										A																		
223											A																	
224												A																
225													A															
226														A														
227															A													
228																A												
229																	A											
230																		A										
231																			A									
232																				A								
233																					A							
234																						A						
235																							A					
236																								A				
237																									A			
238																										A		
239																											A	
240	R		N	E	Q	L																						
241	R		N	E	Q																							
242	R				S						A	A	A				E						N	S	L			

TABLA 13

ES 2 656 446 T3

SEC ID Nº	N	I	Y	I	G	E	P	I	Y	A	A	D	F	K	R	Nº respondedores*	% respondedores	IE Medio
62																5	5,38	1,67
97			F													9	9,68	1,59
98												F				6	6,45	1,51
99												E				5	5,38	1,82
100												D				7	7,53	1,39
101												G				6	6,45	1,45
102												L				8	8,60	1,44
103												Q				10	10,75	1,46
104												T				4	4,30	1,40
105												K				5	5,38	1,50
106												R				4	4,30	1,32
107												E				5	5,38	1,32
108												H				4	4,30	1,21
109													S			2	2,15	1,22
110													V			4	4,30	1,19
111													Q			2	2,15	1,13
112														V		10	10,75	1,59
113														F		13	13,98	1,82
114														H		9	9,68	1,55
115														N		7	7,53	1,41
116														S		4	4,30	1,24
117														Q		7	7,53	1,33
118														K		4	4,30	1,27
119														I		9	9,68	2,06
*n=93																		

TABLA 14

ES 2 656 446 T3

SEC ID N°	N	T	Y	T	G	E	P	T	Y	A	A	D	F	K	R	N° respondedores*	% respondedores	IE Medio
120			F								F					7	7,53	1,68
121			F								E					8	8,60	1,51
122			F								D					4	4,30	1,34
123			F									G				3	3,23	1,19
124			F									L				6	6,45	1,29
125			F									Q				6	6,45	1,34
126			F									T				6	6,45	1,34
127			F									K				9	9,68	1,48
128			F									R				8	8,60	1,67
129			F									E				10	10,75	1,61
130			F									H				8	8,60	1,64
131			F										S			4	4,30	1,21
132			F										V			3	3,23	1,12
133			F										Q			2	2,15	1,15
134			F											V		6	6,45	1,41
135			F											F		12	12,90	1,65
136			F											H		11	11,83	1,70
137			F											N		9	9,68	1,80
138			F											S		11	11,83	1,80
139			F											Q		7	7,53	1,34
140			F											K		4	4,30	1,17
141			F											I		5	5,38	1,36
62																6	6,45	1,33
			*n=93															

TABLA 14 (continuación)

ES 2 656 446 T3

SEC ID Nº	A	E	D	T	A	V	Y	Y	C	A	K	Y	P	H	Y	Nº respondedores*	% respondedores	IE Medio
74																7	7,53	1,45
142														D		11	11,83	1,62
143														E		6	6,45	1,43
144														P		10	10,75	1,97
145															F	4	4,30	1,26
146														D	F	5	5,38	1,22
147														E	F	1	1,08	1,09
148														P	F	5	5,38	1,22
74																6	6,45	1,34
*n=93																		

TABLA 15

ES 2 656 446 T3

SEC ID Nº	Q	Q	K	P	G	K	A	P	K	V	L	I	Y	F	T	Nº respondedores*	% respondedores	IE Medio
25																24	25,81	3,69
149										L						18	19,35	2,05
150														D		6	6,45	1,42
151														S		6	6,45	1,43
152														G		2	2,15	1,27
153														A		2	2,15	1,17
154															A	2	2,15	1,16
155														D	A	7	7,53	1,87
156														S	A	8	8,60	2,34
157														G	A	8	8,60	1,63
158														A	A	11	11,83	1,77
159										L				D		12	12,90	1,49
160										L				S		3	3,23	1,25
161										L				G		4	4,30	1,27
162										L				A		5	5,38	1,28
163										L					A	23	24,73	2,49
164										L				D	A	9	9,68	2,23
165										L				S	A	10	10,75	1,39
166										L				G	A	6	6,45	1,52
167										L				A	A	5	5,38	1,27
25																14	15,05	2,30
*n=93																		

TABLA 16

SEC ID N°				
VH	CDR2 16%/2,16 IE	Nº respondedores*	%	IE
62	NTYTGEPTYAADF <u>K</u> R	5	5,38	1,67
109	NTYTGEPTYAADF <u>S</u> R	2	2,15	1,22
111	NTYTGEPTYAADF <u>Q</u> R	2	2,15	1,13
133	NTFTGEPTYAADF <u>Q</u> R	2	2,15	1,15
62	NTYTGEPTYAADF <u>K</u> R	6	6,45	1,33
VH	CDR3 9%/1,45 IE			
74	AEDTAVYYCAKY <u>P</u> HY	7	7,53	1,45
143	AEDTAVYYCAKY <u>P</u> EF	1	1,08	1,09
74	AEDTAVYYCAKY <u>P</u> HY	6	6,45	1,34
VL	CDR2 15%/1,45 IE			
25	QQKPGKAPK <u>V</u> LIYFT	24	25,81	3,69
154	QQKPGKAPK <u>V</u> LIYFA	2	2,15	1,16
25	QQKPGKAPK <u>V</u> LIYFT	14	15,05	2,30
	*n=93			

TABLA 17

Mutantes Región Variable Sencilla	MFI
TpoSil.	194,78
VH K64Q	230,4
VH K64S	168,08
VH Y53F.K64Q	217,4
VH H97E.Y98F	310,32
VLT51A	295,93

TABLA 18

Mutantes Región Variable Combinada	CE₅₀
TpoSil.	152,4
VHK64Q/VLT51A	174,2
VHK64S/VLT51A	263,2
VH Y53F.K64Q/VL T51A	104
VH H97E.Y98F/VL T51A	26,22

TABLA 19

Variante Nº	SEC ID N ^{os}		
	CDR-H1	CDR-H2	CDR-H3
1	n/a	4	237
2	n/a	190	238
3	n/a	191	238
4	n/a	192	238
5	n/a	193	238
6	n/a	194	238
7	n/a	195	238
8	n/a	196	238
9	n/a	197	238
10	n/a	198	238
11	n/a	199	238
12	n/a	4	238
13	n/a	4	239
14	n/a	4	240
15	n/a	4	241
16	n/a	200	n/a
17	n/a	201	n/a
18	n/a	202	n/a
19	n/a	203	5
20	n/a	204	5
21	n/a	205	n/a
22	n/a	206	n/a
23	n/a	207	n/a
24	n/a	208	n/a
25	n/a	209	n/a
26	n/a	210	n/a
27	n/a	211	n/a
28	n/a	212	n/a

TABLA 20-1

Variante Nº	SEC ID Nºs		
	CDR-H1	CDR-H2	CDR-H3
29	n/a	n/a	242
30	n/a	n/a	243
31	n/a	n/a	244
32	n/a	n/a	245
33	n/a	n/a	246
34	n/a	n/a	247
35	n/a	n/a	248
36	n/a	n/a	249
37	n/a	n/a	250
38	n/a	n/a	251
39	n/a	n/a	252
40	n/a	n/a	253
41	n/a	n/a	254
42	n/a	n/a,	255
43	n/a	n/a	256
44	n/a	n/a	257
45	n/a	n/a	258
46	n/a	n/a	259
47	n/a	n/a	260
48	n/a	n/a	261
49	n/a	n/a	262
50	n/a	n/a	263

TABLA 20-2

Variante Nº	SEC ID N ^{os}		
	CDR-H1	CDR-H2	CDR-H3
51	n/a	n/a	264
52	n/a	n/a	265
53	n/a	n/a	266
54	n/a	n/a	267
55	n/a	n/a	268
56	n/a	n/a	269
57	n/a	n/a	270
58	n/a	n/a	271
59	n/a	n/a	272
60	n/a	n/a	273
61	n/a	n/a	274
62	n/a	n/a	275
63	n/a	n/a	276
64	n/a	n/a	277
65	n/a	n/a	278
66	n/a	n/a	279
67	n/a	n/a	280
68	n/a	n/a	281
69	n/a	n/a	282
70	n/a	n/a	283

TABLA 20-3

Variante Nº	SEC ID N ^{os}		
	CDR-H1	CDR-H2	CDR-H3
71	n/a	n/a	284
72	n/a	n/a	285
73	n/a	n/a	286
74	n/a	n/a	287
75	n/a	n/a	288
76	n/a	n/a	289
77	n/a	n/a	290
78	n/a	n/a	291
79	n/a	n/a	292
80	n/a	n/a	293
81	n/a	n/a	294
82	n/a	n/a	295
83	n/a	n/a	296
84	n/a	n/a	297
85	n/a	n/a	298
86	n/a	n/a	299
87	n/a	n/a	300
88	n/a	n/a	301
89	n/a	n/a	302
90	n/a	n/a	303
91	n/a	n/a	304
92	n/a	n/a	305
93	n/a	n/a	306

TABLA 20-4

Variante Nº	SEC ID N ^{os}		
	CDR-H1	CDR-H2	CDR-H3
94	n/a	n/a	307
95	n/a	n/a	308
96	n/a	n/a	309
97	n/a	n/a	310
98	n/a	n/a	311
99	n/a	n/a	312
100	n/a	n/a	313
101	n/a	n/a	314
102	n/a	n/a	315
103	n/a	n/a	316
104	n/a	n/a	317
105	n/a	n/a	318
106	n/a	n/a	319
107	n/a	n/a	320
108	411	4	321
109	168	4	322
110	411	4	323
111	168	4	324
112	169	4	325
113	411	4	326

TABLA 20-5

Variante Nº	SEC ID N ^{os}		
	CDR-H1	CDR-H2	CDR-H3
114	411	4	321
115	170	213	n/a
116	169	4	5
117	168	4	n/a
118	169	n/a	n/a
119	171	4	5
120	411	4	327
121	172	214	328
122	411	4	329
123	411	4	330
124	411	4	331
125	411	4	332
126	411	4	333
127	411	4	334
128	169	4	335
129	169	4	336
130	169	4	337
131	169	4	338
132	169	4	339
133	411	4	340
134	169	4	341

TABLA 20-6

Variante Nº	SEC ID N ^{os}		
	CDR-H1	CDR-H2	CDR-H3
135	169	4	342
136	169	4	343
137	169	4	344
138	169	4	345
139	169	4	346
140	169	4	347
141	169	4	348
142	169	4	349
143	169	4	350
144	169	4	351
145	169	4	352
146	169	4	353
147	169	4	354
148	169	4	355
149	169	4	356
150	169	4	357
151	169	4	358
152	173	215	359
153	173	4	359
154	169	4	359
155	169	4	241
156	411	4	360
157	169	4	361

TABLA 20-7

Variante Nº	SEC ID N ^{os}		
	CDR-H1	CDR-H2	CDR-H3
158	169	4	362
159	169	4	363
160	411	4	364
161	169	4	365
162	169	4	366
163	411	4	367
164	411	4	368
165	169	4	369
166	411	4	370
167	411	4	371
168	411	216	5
169	411	217	5
170	411	218	5
171	411	219	5
172	411	220	5
173	411	221	5
174	411	222	5
175	411	223	5
176	411	224	5
177	169	225	5
178	169	226	5
179	411	227	5
180	411	228	5
181	169	229	5

TABLA 20-8

Variante Nº	SEC ID N ^{os}		
	CDR-H1	CDR-H2	CDR-H3
182	411	230	5
183	169	231	5
184	411	232	5
185	411	233	5
186	411	234	5
187	411	235	5
188	174	4	5
189	175	4	5
190	176	4	5
191	177	4	5
192	178	4	5
193	173	4	5
194	179	4	5
195	180	4	5
196	181	4	5
197	182	4	5
198	183	4	5
199	184	4	5
200	185	4	5
201	186	4	5
202	187	4	5
203	188	4	5
204	189	4	5
205	411	236	5

TABLA 20-9

Variante Nº	SEC ID N ^{os}		
	CDR-H1	CDR-H2	CDR-H3
206	6	7	394
207	n/a	n/a	395
208	n/a	n/a	396
209	n/a	n/a	397
210	n/a	n/a	398
211	n/a	n/a	399
212	n/a	n/a	400
213	372	7	8
214	373	7	8
215	374	7	8
216	375	7	8
217	376	7	8
218	377	7	8
219	378	7	8
220	379	7	8
221	380	7	8
222	381	7	8
223	382	7	8
224	6	386	8
225	6	387	8
226	6	388	8
227	6	389	8
228	6	390	8
229	6	391	8
230	6	392	8
231	6	7	401
232	6	7	402
233	6	7	403
234	6	7	404
235	6	7	405
236	6	7	406
237	6	7	407
238	6	7	408
239	6	7	409
240	383	7	8
241	384	7	8
242	385	393	410

TABLA 20-10

Bevacizumab (Avastin®) VH (SEC ID N°1)

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYTFTNYGMNWVRQAPGKGLEWVGWINTYTGEPT
YAADFKRRFTFSLDTSKSTAYLQMNSLRAEDTAVYYCAKYPHYGSSHWYFDVWGQGL
 VTVSS

Bevacizumab (Avastin®) VL (SEC ID N°2)

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCSASQDISNYLNWYQQKPGKAPKVLIIYFTSSLHSGV
 SRFSGSGSGTDFLTITISLQPEDFATYYCQQYSTVPWTFGQGTKVEIKR

FIGURA 1A

Cadena de anticuerpo	CDR N°	Secuencia	SEC ID N°
Pesada	1	GYTFTNYGMN	3
Pesada	2	WINTYTGEPTYAADFKR	4
Pesada	3	YPHYGSSHWYFDV	5
Ligera	1	SASQDISNYLN	6
Ligera	2	FTSSLHS	7
Ligera	3	QQYSTVPWT	8

FIGURA 1B

Ranibizumab (Lucentis®) VH (SEC ID N° 9)

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYDFTHYGMNWVRQAPGKGLEWVGWINTYTGEPT
YAADFKRRFTFSLDTSKSTAYLQMNSLRAEDTAVYYCAKYPYYYGTSHWYFDVWGQGTL
 VTVSSAS . TKGESVFLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFP
 AVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHL

Ranibizumab (Lucentis®) VL (SEC ID N° 10)

DIQLTQSPSSLSASVGDRTITCSSASQDISNYLNNWYQQKPKGKAPKVLIIFTSSLHSGVP
 SRFSGSGSGTDFTLTITSSLPEDFATYYCQQYSTVPWTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIF
 PPSDEQLKSGTASVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQD . S . KDSTYLSLSS
 TLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

FIGURA 1C

Cadena de anticuerpo	CDR N°	Secuencia	SEC ID N°
Pesada	1	GYDFTHYGMN	11
Pesada	2	WINTYTGEPTYAADF	4
Pesada	3	YPYYYGTSHWYFDV	12
Ligera	1	SASQDISNYLN	6
Ligera	2	FTSSLHS	7
Ligera	3	QQYSTVPWT	8

FIGURA 1D

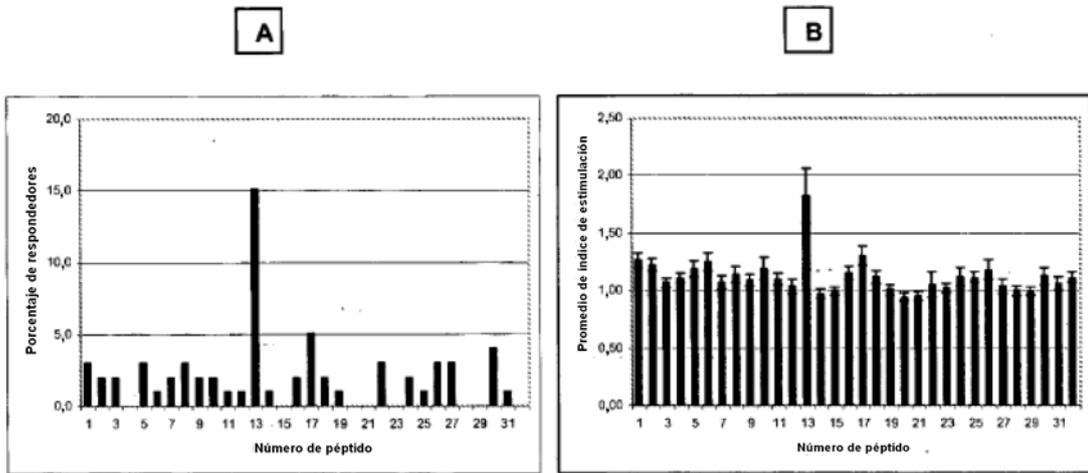


FIGURA 2A-2B

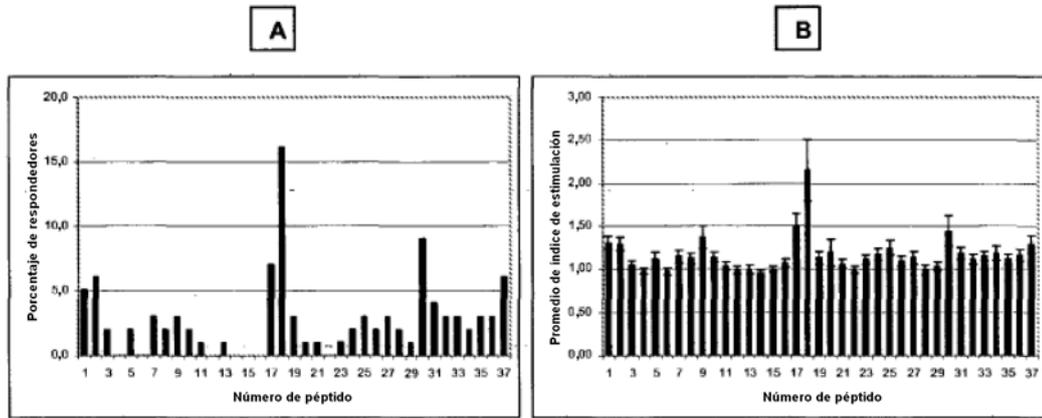


FIGURA 3A-3B

