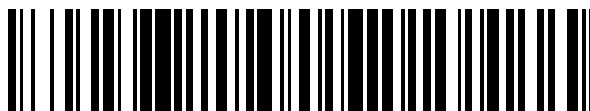


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 687 259**

51 Int. Cl.:

C07K 16/24 (2006.01)

A61K 39/395 (2006.01)

C12N 15/13 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **25.06.2009 PCT/CH2009/000219**

87 Fecha y número de publicación internacional: **30.12.2009 WO09155723**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **25.06.2009 E 09768692 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **13.06.2018 EP 2307457**

54 Título: **Anticuerpos estables y solubles que inhiben el TNF**

30 Prioridad:

25.06.2008 US 75640 P
25.06.2008 US 75697 P
25.06.2008 US 75692 P
26.06.2008 US 75956 P
24.02.2009 US 155041 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
24.10.2018

73 Titular/es:

**ESBATECH, AN ALCON BIOMEDICAL
RESEARCH UNIT LLC (100.0%)**
Wagistrasse 21
8952 Schlieren, CH

72 Inventor/es:

BORRAS, LEONARDO;
GUNDE, TEA y
URECH, DAVID

74 Agente/Representante:

CARVAJAL Y URQUIJO, Isabel

ES 2 687 259 T3

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

DESCRIPCIÓN

Anticuerpos estables y solubles que inhiben el TNF

Antecedentes de la invención

5 El factor de necrosis tumoral alfa (TNF α , también conocido como caquectina) es una citoquina natural de mamífero producida por numerosos tipos de células, que incluyen monocitos y macrófagos en respuesta a endotoxinas u otros estímulos. El TNF α es un importante mediador de reacciones inflamatorias, inmunológicas y fisiopatológicas (Grell, M., y col., (1995) Cell, 83: 793-802).

10 El TNF α soluble se forma mediante la escisión de una proteína transmembrana precursora (Kriegler, y col., (1988) Cell 53: 45-53), y los polipéptidos de 17 kDa secretados se ensamblan a complejos de homotrimeros solubles (Smith, y col. 1987), J. Biol. Chem. 262: 6951-6954; para revisiones del TNFA, véase Butler, y col. (1986), Nature 320: 584; Old (1986), Science 230: 630). Estos complejos luego se unen a los receptores que se encuentran en una variedad de células. La unión produce una serie de efectos proinflamatorios, que incluyen (i) la liberación de otras citoquinas proinflamatorias tales como IL-6, IL-8 e IL-1, (ii) la liberación de metaloproteinasas de la matriz y (iii) la
15 sobrerregulación de la expresión de moléculas de adhesión endotelial, amplificando aún más la cascada inflamatoria e inmune atrayendo leucocitos a los tejidos extravasculares.

20 Un gran número de trastornos están asociados con niveles elevados del TNF α , muchos de ellos de importancia médica significativa. Se ha demostrado que el TNF α está sobrerregulado en una serie de enfermedades humanas, que incluyen enfermedades crónicas tales como artritis reumatoide (AR), trastornos inflamatorios del intestino que incluyen enfermedad de Crohn y colitis ulcerosa, sepsis, insuficiencia cardíaca congestiva, asma bronquial y esclerosis múltiple. Los ratones transgénicos para el TNF α humano producen altos niveles del TNF α constitutivamente y desarrollan una poliartritis destructiva espontánea que se parece a la AR (Keffer y col., 1991, EMBO J., 10, 4025-4031). Por lo tanto, el TNF α se denomina citoquina proinflamatoria.

25 El TNF α está ahora bien establecido como clave en la patogénesis de la AR, que es una enfermedad crónica, progresiva y debilitante caracterizada por inflamación y destrucción de la articulación poliarticular, con síntomas sistémicos de fiebre y malestar y fatiga. La AR también conduce a inflamación sinovial crónica, con progresión frecuente al cartílago articular y destrucción ósea. Se encuentran niveles aumentados del TNF α tanto en el fluido sinovial como en la sangre periférica de pacientes que padecen AR. Cuando se administran agentes bloqueadores del TNF α a pacientes que padecen AR, reducen la inflamación, mejoran los síntomas y retardan el daño articular (McKown y col. (1999), Arthritis Rheum., 42: 1204-1208).

30 Fisiológicamente, el TNF α también está asociado con la protección de infecciones particulares (Cerami y col. (1988), Immunol. Today 9: 28). El TNF α es liberado por macrófagos que han sido activados por lipopolisacáridos de bacterias Gram negativas. Como tal, el TNF α parece ser un mediador endógeno de importancia central implicado en el desarrollo y la patogénesis del choque endotóxico asociado con la sepsis bacteriana (Michie, y col. (1989), Br. J. Surg. 76: 670-671; Debets y col. (1989), Second Vienna Shock Forum, páginas 463-466; Simpson, y col. (1989) Crit. Care Clin. 5: 27-47; Waage y col. (1987), Lancet 1: 355 -357; Hammerle y col. (1989) Second Vienna Shock Forum, páginas 715-718; Debets y col., (1989), Crit. Care Med. 17: 489-497; Calandra y col. (1990), J. Infect. Dis. 161: 982-987; Revhaug y col. (1988), Arch. Surg. 123: 162-170).

40 Como con otros sistemas de órganos, también se ha demostrado que el TNF α desempeña un papel clave en el sistema nervioso central, en particular en trastornos inflamatorios y autoinmunes del sistema nervioso, que incluyen la esclerosis múltiple, el síndrome de Guillain-Barre y la miastenia grave, y en trastornos degenerativos del sistema nervioso, incluida la enfermedad de Alzheimer, la enfermedad de Parkinson y la enfermedad de Huntington. El TNF α también está involucrado en trastornos de los sistemas relacionados de la retina y del músculo, incluida la neuritis óptica, la degeneración macular, la retinopatía diabética, la dermatomiositis, la esclerosis lateral amiotrófica y la distrofia muscular, así como en lesiones del sistema nervioso, incluida la lesión cerebral traumática, lesión aguda de
45 la médula espinal y accidente cerebrovascular.

La hepatitis es otro trastorno inflamatorio relacionado con el TNF α que, entre otros factores desencadenantes, puede ser causado por infecciones virales, que incluyen virus de Epstein-Barr, citomegalovirus y hepatitis A-E. La hepatitis causa inflamación hepática aguda en la región portal y lobular, seguida de fibrosis y progresión tumoral. El TNF α también puede mediar la caquexia en el cáncer, que causa la mayor morbilidad y mortalidad del cáncer (Tisdale M.J. (2004), Langenbecks Arch Surg. 389: 299-305).

55 El papel clave desempeñado por el TNF α en la inflamación, las respuestas inmunitarias celulares y la patología de muchas enfermedades ha conducido a la búsqueda de antagonistas del TNF α . Una clase de antagonistas del TNF α diseñados para el tratamiento de enfermedades mediadas por el TNF α son anticuerpos o fragmentos de anticuerpos que se unen específicamente al TNF α y bloquean de ese modo su función. El documento US2006/0216293 divulga anticuerpos neutralizantes del TNF α procedentes de conejos. El uso de anticuerpos anti-TNF α ha demostrado que un bloqueo del TNF α puede revertir los efectos atribuidos al TNF α , incluyendo disminuciones en IL-1, GM-CSF, IL-6, IL-8, moléculas de adhesión y destrucción tisular (Feldmann y col. 1997), Adv. Immunol. 1997: 283-350). Entre los inhibidores específicos del TNF α que se han hecho comercialmente disponibles recientemente se incluye un

anticuerpo monoclonal quimérico de ratón dirigido contra TNF α (infliximab, Remicade^{MR}; Centocor Corporation/Johnson & Johnson) que ha demostrado eficacia clínica en el tratamiento de la AR y la enfermedad de Crohn. Todos los inhibidores comercializados del TNF α se administran por vía intravenosa o subcutánea en intervalos semanales o más largos como inyecciones en bolo, dando como resultado concentraciones iniciales elevadas que disminuyen constantemente hasta la siguiente inyección. Su volumen de distribución es limitado.

A pesar de estos avances, sigue existiendo la necesidad de formas nuevas y eficaces de anticuerpos u otros inmunoenlazadores para el tratamiento de trastornos asociados con TNF α tales como AR. En particular, existe una necesidad urgente de inmunoenlazadores con propiedades funcionales óptimas para el tratamiento efectivo y continuo de artritis y otros trastornos mediados por el TNF α que permiten una administración y formulación más flexible y tienen una penetración de tejido mejorada y por lo tanto un mayor volumen de distribución.

Sumario de la invención

Por lo tanto, es un objetivo general de la invención proporcionar un anticuerpo estable u soluble u otro inmunoenlazador, que se une específicamente al TNF α *in vitro* e *in vivo*. La presente invención proporciona un inmunoenlazador que se une específicamente al TNF α humano, comprendiendo el inmunoenlazador: (i) una secuencia marco variable de la cadena pesada humana y secuencias CDR H1, CDR H2 y CDR 113 procedentes de un inmunoenlazador de conejo, en donde el marco de la región variable de la cadena pesada humana tiene al menos un 90% de identidad con la SEQ ID NO: 1; y (ii) una secuencia marco variable de la cadena ligera humana y secuencias de CDR L1, CDR L2 y CDR L3 procedentes de un inmunoenlazador de conejo, en donde la secuencia marco de la región variable de la cadena ligera humana tiene al menos un 85% de identidad con la SEQ ID NO: 2. La invención está definida por las reivindicaciones.

En una realización preferida, dicho inmunoenlazador es un anticuerpo scFv o fragmento Fab.

La presente invención proporciona anticuerpos scFv estables y solubles y fragmentos Fab específicos para TNF α , que comprenden secuencias de cadena ligera y cadena pesada específicas que están optimizadas para la estabilidad, solubilidad, unión *in vitro* e *in vivo* del TNF α , y baja inmunogenicidad. Dichos anticuerpos están diseñados para el diagnóstico y/o tratamiento de trastornos mediados por el TNF α . También se divulgan los ácidos nucleicos, vectores y células huésped para la expresión de los anticuerpos recombinantes de la invención, los métodos para aislarlos y el uso de dichos anticuerpos en medicina.

Breve descripción de los dibujos

La Figura 1 representa la capacidad relativa de los sobrenadantes de 44 hibridomas RabMab anti-TNF en la unión del TNF α (ensayo Biacore) y la neutralización de su actividad (ensayo en L929).

La Figura 2 representa la capacidad de 20 anticuerpos de cadena sencilla RabMab anti-TNF y 7 anticuerpos humanizados de cadena sencilla anti-TNF en unión selectiva del TNF α (ensayo de secreción ELISA, tenga en cuenta que para este ensayo se usó sobrenadante de cultivo bacteriano, que no se normalizó para el contenido de anticuerpos de cadena sencilla).

La Figura 3 representa la cinética de unión (Figura 3A) de EP43max y la cinética de unión (Figura 3B) de EP34max al TNF alfa humano.

La Figura 4 representa la potencia de EP43max (cuadrados sin relleno), la potencia (círculos rellenos) de ESBA105. La CE50 de EP43max es 1 ng/mL y la CE50 de ESBA105 es de 6,5 ng/mL.

La Figura 5 representa el rendimiento de EP43max, EP6max y EP19max en un ensayo de despliegue térmico (FTIR).

La Figura 6 representa las curvas de desnaturalización térmica de EP43max y sus derivados en comparación con el análisis FTIR.

La Figura 7 representa la comparación de EP43max (Figura 7A) y su variante EP43minmax (Figura 7B) en una prueba de estrés térmico.

La Figura 8 representa la definición de CDR H1 usada en este documento para injertar sitios de unión a antígeno a partir de anticuerpos monoclonales de conejo en los marcos de anticuerpos humanos altamente solubles y estables.

La Figura 9a ilustra la potencia de Epi34max y Adalimumab para bloquear la actividad citotóxica de 1.000 pg/mL del TNF alfa recombinante humano (células murinas L929). Se determinó que la CI₅₀ para Ep34max y Adalimumab era de 1,03 ng/mL y 8,46 ng/mL, respectivamente. La Figura 9b ilustra la potencia de Adalimumab y Ep34max para bloquear la actividad citotóxica de 10 pg/mL del TNF alfa recombinante humano (células Kym-1 humanas). Se determinó que la CI₅₀ para Infliximab y Ep34max (791) era 66,2 ng/mL y 0,69 ng/mL, respectivamente.

La Figura 10a ilustra la potencia de Epi34max e Infliximab para bloquear la actividad citotóxica de 1.000 pg/mL del TNF alfa recombinante humano (células L929 de murino). Se determinó que la CI₅₀ para Ep34max e Infliximab era

de 1,04 ng/mL y 13,9 ng/m, respectivamente. La Figura 10b ilustra la potencia de Infliximab y Ep34max (791) para bloquear la actividad citotóxica de 10 pg/mL del TNF alfa recombinante humano (células Kym-1 humanas). Se determinó que la Cl_{50} para Infliximab y Ep34max era 14,8 ng/mL y 0,63 ng/mL respectivamente.

5 La Figura 11 ilustra el perfil de desnaturalización térmica por FT-IR de BioATR ajustado a partir de los espectros infrarrojos por transformada de Fourier en la región de banda de amida I de Ep34max en comparación con ESBA903. V_{50} para ESBA903 fue 71,12 y para EP34max 71,50; la pendiente o ESBA903 2.481 y 2.540 para EP34max.

La Figura 12 ilustra las curvas de desplegamiento térmico de DSC de los anticuerpos scFv Ep34max y ESBA903. La T_m de EP34max es 78,11°C y la T_m para ESBA903 es 76,19°C.

10 Descripción detallada de la invención

Es un objetivo general de la invención proporcionar un inmunoenlazador estable y soluble que se une específicamente al TNF α *in vitro* e *in vivo*. En una realización preferida, dicho derivado de anticuerpo es un anticuerpo scFv o fragmento Fab. Los inmunoenlazadores de la invención comprenden preferiblemente una cadena ligera y/o pesada.

15 Definiciones

Para que la presente invención pueda entenderse más fácilmente, ciertos términos se definirán de la siguiente manera. Se establecen definiciones adicionales a lo largo de la descripción detallada.

20 El término "anticuerpo" como se usa en este documento es un sinónimo de "inmunoglobulina". Los anticuerpos de acuerdo con la presente invención pueden ser inmunoglobulinas completas o fragmentos de las mismas, que comprenden al menos un dominio variable de una inmunoglobulina, tales como dominios variables individuales, Fv (Skerra A. y Pluckthun, A. (1988) Science 240: 1038-41), scFv (Bird, RE y col. (1988) Science 242: 423-26; Huston, JS y col. (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85: 5879-83), Fab, (Fab')₂ u otros fragmentos bien conocidos por una persona experta en la técnica.

25 El término "CDR" se refiere a una de las seis regiones hipervariables dentro de los dominios variables de un anticuerpo que contribuyen principalmente a la unión al antígeno. Una de las definiciones más comúnmente utilizadas para las seis CDR fue proporcionada por Kabat E.A. y col., (1991) Sequences of proteins of immunological interest. Publicación del NIH 91-3242). Como se usa en el presente documento, la definición de CDR de Kabat solo se aplica a CDR1, CDR2 y CDR3 del dominio variable de la cadena ligera (CDR L1, CDR L2, CDR L3 o L1, L2, L3), así como para CDR2 y CDR3 del dominio variable de la cadena pesada (CDR H2, CDR H3 o H2, H3). CDR1 del dominio variable de la cadena pesada (CDR H1 o H1), sin embargo, como se usa en la presente memoria está definido por los siguientes residuos (numeración de Kabat): comienza con la posición 26 y termina antes de la posición 36. Esto es básicamente una fusión de CDR H1 como se define de manera diferente por Kabat y Chothia (véase también la Figura 8 para la ilustración).

30 El término "marco de anticuerpo" como se usa en el presente documento se refiere a la parte del dominio variable, VL o VH, que sirve como andamio para los bucles de unión a antígeno (CDR) de este dominio variable. En esencia, es el dominio variable sin las CDR.

35 El término "anticuerpo de cadena sencilla", "Fv de cadena sencilla" o "scFv" pretende referirse a una molécula que comprende un dominio variable de la cadena pesada de anticuerpo (o región; V_H) y un dominio variable de la cadena ligera de anticuerpo (o región; V_L) conectado por un enlazador. Dichas moléculas de scFv pueden tener las estructuras generales: NH_2 - V_L -enlazador- V_H -COOH o NH_2 - V_H -enlazador- V_L -COOH.

40 El término "inmunoenlazador" se refiere a una molécula que contiene todo o parte del sitio de unión a antígeno de un anticuerpo, por ejemplo, todo o parte del dominio variable de la cadena pesada y/o ligera, de modo que el inmunoenlazador reconoce específicamente un antígeno objetivo. Los ejemplos no limitantes de inmunoenlazadores incluyen moléculas de inmunoglobulina de longitud completa y scFv, así como fragmentos de anticuerpos, que incluyen, pero sin limitarse a, (i) un fragmento Fab, un fragmento monovalente que consiste en los dominios V_L , V_H , C_L y C_H1 ; (ii) un fragmento F (ab')₂, un fragmento bivalente que comprende dos fragmentos Fab unidos por un puente disulfuro en la región bisagra; (iii) un fragmento Fab'; (iv) un fragmento Fd que consiste en los dominios V_H y C_H1 ; (v) un fragmento Fv que consiste en los dominios V_L y V_H de un único brazo de un anticuerpo, (vi) un anticuerpo de dominio único tal como un fragmento Dab que consiste en un dominio V_H o V_L , un anticuerpo de camélido o de tiburón (por ejemplo, Nanobodies® Ig-NAR de tiburón); y (vii) un nanocuerpo, una región de cadena pesada que contiene el dominio variable y dos dominios constantes.

45 Los sistemas de numeración, como se usan en el presente documento para identificar las posiciones de los residuos de aminoácidos en las regiones variables de la cadena pesada y ligera del anticuerpo, corresponden al definido por A. Honegger, J. Mol. Biol. 309 (2001) 657-670 (el sistema AHo). Tablas de conversión entre el sistema AHo y el sistema más comúnmente utilizado según lo definido por Kabat y col. (Kabat, EA, y col. (1991) Sequences of

Proteins of Immunological Interest, quinta edición, Departamento de Salud y Servicios Humanos de EE. UU., Publicación del NIH No. 91-3242) se proporcionan en A. Honegger, J. Mol. Biol. 309 (2001) 657-670.

El término "epítipo" o "determinante antigénico" se refiere a un sitio en un antígeno al que se une específicamente una inmunoglobulina o anticuerpo (por ejemplo, TNF). Un epítipo típicamente incluye al menos 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 o 15 aminoácidos en una conformación espacial única. Véase, por ejemplo, Epitope Mapping Protocols in Methods in Molecular Biology, vol. 66, G. E. Morris, Ed. (1996).

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

El término " K_D " se refiere a la constante del equilibrio de disociación de una interacción anticuerpo-antígeno particular. Típicamente, los anticuerpos de la invención se unen a TNF con una constante de equilibrio de disociación (K_D) de menos de aproximadamente 10^{-7} M, tal como menos de aproximadamente 10^{-8} M, 10^{-9} M o 10^{-10} M o incluso menor, por ejemplo, como se determina usando la tecnología de resonancia de plasmón superficial (SPR) en un instrumento BIACORE.

Como se usa en el presente documento, "identidad" se refiere a la coincidencia de secuencias entre dos polipéptidos, moléculas o entre dos ácidos nucleicos. Cuando una posición en ambas secuencias comparadas está ocupada por la misma base o subunidad monomérica de aminoácido (por ejemplo, si una posición en cada una de las dos moléculas de ADN está ocupada por adenina, o una posición en cada uno de los dos polipéptidos está ocupada por una lisina), entonces las moléculas respectivas son idénticas en esa posición. El "porcentaje de identidad" entre dos secuencias es una función del número de posiciones de coincidencia compartidas por las dos secuencias dividido por el número de posiciones en comparación x 100. Por ejemplo, si 6 de 10 de las posiciones en dos secuencias coinciden, entonces las dos secuencias tienen 60% de identidad. A modo de ejemplo, las secuencias de ADN CTGACT y CAGGTT comparten una identidad del 50% (3 de las 6 posiciones totales se corresponden). Generalmente, se hace una comparación cuando dos secuencias se alinean para dar la identidad máxima. Dicha alineación puede realizarse usando, por ejemplo, el método de Needleman y col. (1970) J. Mol. Biol. 48: 443-453, implementada convenientemente por programas de ordenador tales como el programa Align (DNASTar, Inc.). El porcentaje de identidad entre dos secuencias de aminoácidos también se puede determinar usando el algoritmo de E. Meyers y W. Miller (Comput. Appl. Biosci., 4: 11-17 (1988)) que se ha incorporado al programa ALIGN (versión 2.0), usando una tabla de residuos de peso PAM120, una penalización de longitud de hueco de 12 y una penalización de hueco de 4. Además, el porcentaje de identidad entre dos secuencias de aminoácidos puede determinarse usando el algoritmo de Needleman y Wunsch (J. Mol. Biol. 48: 444-453 (1970)) que se ha incorporado en el programa GAP en el paquete de software GCG (disponible en www.gcg.com), utilizando una matriz Blossum 62 o una matriz PAM250, y un peso de hueco de 16, 14, 12, 10, 8, 6 o 4 y un peso de longitud de 1, 2, 3, 4, 5 o 6.

Las secuencias "similares" son aquellas que, cuando están alineadas, comparten residuos de aminoácidos idénticos y similares, donde los residuos similares son sustituciones conservadoras de los residuos de aminoácidos correspondientes en una secuencia de referencia alineada. A este respecto, una "sustitución conservadora" de una unidad estructural en una secuencia de referencia es una sustitución por una unidad estructural que es física o funcionalmente similar al residuo de referencia correspondiente, por ejemplo, que tiene un tamaño, forma, carga eléctrica, propiedades químicas similares, incluyendo la capacidad de formar enlaces covalentes o de hidrógeno, o similares. Por lo tanto, una secuencia "modificada de sustitución conservadora" es una que difiere de una secuencia de referencia o una secuencia de tipo silvestre en que están presentes una o más sustituciones conservadoras. La "similitud porcentual" entre dos secuencias es una función del número de posiciones que contienen residuos coincidentes o sustituciones conservadoras compartidas por las dos secuencias dividido por el número de posiciones en comparación x 100. Por ejemplo, si 6 de 10 de las posiciones en dos las secuencias se corresponden y 2 de 10 posiciones contienen sustituciones conservadoras, luego las dos secuencias tienen un 80% de similitud positiva.

Como se usa en el presente documento, la expresión "modificaciones de secuencia conservadoras" pretende referirse a modificaciones de aminoácidos que no afectan ni alteran negativamente las características de unión del anticuerpo que contiene la secuencia de aminoácidos. Dichas modificaciones de secuencia conservadoras incluyen sustituciones, adiciones y supresiones de nucleótidos y aminoácidos. Por ejemplo, pueden introducirse modificaciones mediante técnicas estándar conocidas en la técnica, tales como mutagénesis dirigida al sitio y mutagénesis mediada por PCR. Las sustituciones de aminoácidos conservadoras incluyen aquellas en las que el residuo de aminoácido se reemplaza por una unidad estructural de aminoácido que tiene una cadena lateral similar. Las familias de residuos de aminoácidos que tienen cadenas laterales similares se han definido en la técnica. Estas familias incluyen aminoácidos con cadenas laterales básicas (por ejemplo, lisina, arginina, histidina), cadenas laterales ácidas (por ejemplo, ácido aspártico, ácido glutámico), cadenas laterales polares no cargadas (por ejemplo, glicina, asparagina, glutamina, serina, treonina, tirosina, cisteína, triptófano), cadenas laterales no polares (por ejemplo, alanina, valina, leucina, isoleucina, prolina, fenilalanina, metionina), cadenas laterales beta-ramificadas (por ejemplo, treonina, valina, isoleucina) y cadenas laterales aromáticas (por ejemplo, tirosina, fenilalanina, triptófano, histidina). Por lo tanto, una unidad estructural de aminoácido no esencial predicho en un anticuerpo anti-VEGF

humano se reemplaza preferiblemente con otro residuo de aminoácido de la misma familia de cadena lateral. Los métodos para identificar sustituciones conservadoras de nucleótidos y aminoácidos que no eliminan la unión al antígeno son bien conocidos en la técnica (véase, por ejemplo, Brummell y col., *Biochem.*, 32: 1180-1187 (1993); Kobayashi y col., *Protein Eng.* 12 (10): 879-884 (1999) y Burks y col., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94: 412-417 (1997)).

"Secuencia de consenso de aminoácidos" como se usa en el presente documento se refiere a una secuencia de aminoácidos que se puede generar usando una matriz de al menos dos, y preferiblemente más, secuencias de aminoácidos alineadas, y que permite lagunas en la alineación, de manera que es posible determinar el residuo de aminoácido más frecuente en cada posición. La secuencia consenso es aquella secuencia que comprende los aminoácidos que se representan con mayor frecuencia en cada posición. En el caso de que dos o más aminoácidos estén representados por igual en una sola posición, la secuencia consenso incluye ambos o todos esos aminoácidos.

La secuencia de aminoácidos de una proteína puede analizarse a diversos niveles. Por ejemplo, la conservación o variabilidad se puede exhibir a nivel de un único residuo, a nivel de residuos múltiples, residuos múltiples con huecos, etc. Los residuos pueden mostrar conservación del residuo idéntico o pueden conservarse a nivel de clase. Los ejemplos de clases de aminoácidos incluyen grupos R polares pero no cargados (serina, treonina, asparagina y glutamina); grupos R cargados positivamente (lisina, arginina e histidina); grupos R cargados negativamente (ácido glutámico y ácido aspártico); grupos R hidrófobos (alanina, isoleucina, leucina, metionina, fenilalanina, triptófano, valina y tirosina); y aminoácidos especiales (cisteína, glicina y prolina). El experto en la técnica conoce otras clases y pueden definirse usando determinaciones estructurales u otros datos para evaluar la posibilidad de sustitución. En ese sentido, un aminoácido sustituible puede referirse a cualquier aminoácido que pueda ser sustituido y mantener la conservación funcional en esa posición.

Se reconocerá, sin embargo, que los aminoácidos de la misma clase pueden variar en grado por sus propiedades biofísicas. Por ejemplo, se reconocerá que ciertos grupos R hidrófobos (por ejemplo, alanina, serina o treonina) son más hidrofílicos (es decir, de mayor hidrofiliidad o menor hidrofobicidad) que otros grupos R hidrófobos (por ejemplo, valina o leucina). La hidrofiliidad o hidrofobicidad relativa se puede determinar usando métodos reconocidos en la técnica (véase, por ejemplo, Rose y col., *Science*, 229: 834-838 (1985) y Cornette y col., *J. Mol. Biol.*, 195: 659-685 (1987)).

Como se usa en el presente documento, cuando una secuencia de aminoácidos (por ejemplo, una primera secuencia de V_H o V_L) está alineada con una o más secuencias de aminoácidos adicionales (por ejemplo, una o más secuencias de V_H o V_L en una base de datos), una posición del aminoácido en una secuencia (por ejemplo, la primera secuencia de V_H o V_L) puede compararse con una "posición correspondiente" en la una o más secuencias adicionales de aminoácidos. Como se usa en el presente documento, la "posición correspondiente" representa la posición equivalente en la secuencia o secuencias que se comparan cuando las secuencias están alineadas óptimamente, es decir, cuando las secuencias están alineadas para alcanzar el mayor porcentaje de identidad o porcentaje de similitud.

Los inmunoenlazadores "quiméricos", como se usan en la presente memoria, tienen una porción de la cadena pesada y/o ligera idéntica u homóloga a las secuencias correspondientes en anticuerpos derivados de una especie particular o que pertenecen a una clase o subclase de anticuerpo particular, mientras que el residuo de la cadena o cadenas es idéntica u homóloga a las secuencias correspondientes en anticuerpos derivados de otra especie o que pertenecen a otra clase o subclase de anticuerpos, así como a fragmentos de tales anticuerpos. Anticuerpo humanizado como se usa en este documento es un subconjunto de anticuerpos quiméricos.

Los "anticuerpos humanizados" tal como se usan en la presente memoria son inmunoenlazadores que se han sintetizado usando tecnología de ADN recombinante para eludir la respuesta inmune a antígenos foráneos. La humanización es una técnica bien establecida para reducir la inmunogenicidad de anticuerpos monoclonales de fuentes xenogénicas. Un anticuerpo humanizado consiste en una región variable de la cadena pesada humanizada, una región variable de la cadena ligera humanizada y dominios constantes completamente humanos. La humanización de una región variable implica la elección de un marco aceptor, típicamente un marco aceptor humano, la extensión de las CDR del inmunoenlazador donante para insertarse en el marco aceptor de dominio variable y la sustitución de residuos del marco donador en el marco aceptor. Un método general para injertar CDR en marcos aceptores humanos ha sido divulgado por Winter en la patente de Estados Unidos No. 5.225.539. La patente de Estados Unidos No. 6.407.213 divulga una serie de posiciones de aminoácidos del marco donde se prefiere una sustitución del inmunoenlazador donador.

Como se usa en el presente documento, el término "propiedad funcional" es una propiedad de un polipéptido (por ejemplo, un inmunoenlazador) para el que es deseable y/o ventajoso una mejora por un experto en la materia (por ejemplo, en relación con un polipéptido convencional), por ejemplo, para mejorar las propiedades de fabricación o la eficacia terapéutica del polipéptido. En una realización, la propiedad funcional es estabilidad mejorada (por ejemplo, estabilidad térmica). En otra realización, la propiedad funcional es una solubilidad mejorada (por ejemplo, bajo condiciones celulares). En otra realización más, la propiedad funcional es no agregación. En otra realización más, la propiedad funcional es una mejora en la expresión (por ejemplo, en una célula procarionota). En otra realización más,

la propiedad funcional es una mejora en el rendimiento de replegamiento después de un proceso de purificación del cuerpo de inclusión. En ciertas realizaciones, la propiedad funcional no es una mejora en la afinidad de unión al antígeno.

5 El término "molécula de ácido nucleico" se refiere a moléculas de ADN y moléculas de ARN. Una molécula de ácido nucleico puede ser de cadena sencilla o de cadena doble, pero preferiblemente es ADN de cadena doble. Un ácido nucleico está "operativamente unido" cuando se coloca en una relación funcional con otra secuencia de ácido nucleico. Por ejemplo, un promotor o potenciador está operativamente unido a una secuencia de codificación si afecta a la transcripción de la secuencia.

10 El término "vector" se refiere a una molécula de ácido nucleico capaz de transportar otro ácido nucleico al que se ha unido. Un tipo de vector es un "plásmido", que se refiere a un bucle circular de ADN de cadena doble en el que se pueden ligar segmentos de ADN adicionales. Otro tipo de vector es un vector viral, en el que se pueden ligar segmentos de ADN adicionales en el genoma viral. Ciertos vectores son capaces de replicación autónoma en una célula huésped en la que se introducen (por ejemplo, vectores bacterianos que tienen un origen bacteriano de replicación y vectores episomales de mamífero). Otros vectores (por ejemplo, vectores de mamífero no episomales) se pueden integrar en el genoma de una célula huésped tras la introducción en la célula huésped, y de ese modo se replican junto con el genoma del huésped.

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

20 Los términos "tratar", "que trata" y "tratamiento" se refieren a medidas terapéuticas o preventivas descritas en este documento. Los métodos de "tratamiento" emplean la administración a un sujeto, en necesidad de tal tratamiento, de un anticuerpo de la presente invención, por ejemplo, un sujeto que tiene un trastorno mediado por el TNF α o un sujeto que finalmente puede adquirir tal trastorno, con el fin de prevenir, curar, retrasar, reducir la gravedad, o mejorar uno o más síntomas del trastorno o trastorno recurrente, o con el fin de prolongar la supervivencia de un sujeto más allá de lo esperado en ausencia de dicho tratamiento.

25 El término "trastorno mediado por el TNF" o "enfermedad mediada por el TNF" se refiere a cualquier trastorno, el inicio, la progresión o la persistencia de los síntomas o estados de enfermedad que requieren la participación del TNF. Los ejemplos de trastornos mediados por el TNF incluyen, pero sin limitarse a, estados crónicos y/o autoinmunes de inflamación en general, trastornos inflamatorios en general mediados por inmunidad, enfermedad inflamatoria del SNC, enfermedades inflamatorias que afectan el ojo, articulaciones, piel, membranas mucosas, sistema nervioso central, tracto gastrointestinal, tracto urinario o pulmón, estados de uveítis en general, retinitis, 30 uveítis HLA-B27+, enfermedad de Behçet, síndrome del ojo seco, glaucoma, síndrome de Sjogren, diabetes mellitus (incluida la neuropatía diabética), resistencia a la insulina, estados de artritis en general, artritis reumatoide, osteoartritis, artritis reactiva y síndrome de Reiter, artritis juvenil, espondilitis anquilosante, esclerosis múltiple, síndrome de Guillain-Barre, miastenia grave, esclerosis lateral amiotrófica, sarcoidosis, glomerulonefritis, nefropatía crónica, cistitis, psoriasis (incluida artritis psoriática), hidradenitis supurativa, paniculitis, pioderma gangrenoso, 35 síndrome SAPHO (sinovitis, acné, pustulosis, hiperostosis y osteítis), acné, síndrome de Sweet, pénfigo, enfermedad de Crohn (incluidas manifestaciones extraintestinales), colitis ulcerosa, asma bronquial, neumonitis por hipersensibilidad, alergias generales, rinitis alérgica, sinusitis alérgica, enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC), fibrosis pulmonar, granulomatosis de Wegener, síndrome de Kawasaki, arteritis de células gigantes, vasculitis de Churg-Strauss, poliarteritis nodosa, quemaduras, enfermedad de injerto contra huésped, reacciones de huésped frente a injerto, episodios de rechazo tras un trasplante de médula ósea u órgano, estados sistémicos y locales de vasculitis en general, lupus eritematoso sistémico y discoideo, polimiositis y dermatomiositis, 40 esclerodermia, preeclampsia, pancreatitis aguda y crónica, hepatitis viral, hepatitis alcohólica, inflamación posquirúrgica tal como después de una cirugía ocular (por ejemplo, catarata (reemplazo de lente ocular) o cirugía de glaucoma), cirugía articular (incluida cirugía artroscópica), cirugía en estructuras articulares (por ejemplo, ligamentos), cirugía oral y/o dental, procedimientos cardiovasculares mínimamente invasivos (por ejemplo, PTCA, aterectomía) y, colocación de cánula intraluminal), procedimientos intraabdominales y ginecológicos laparoscópicos y/o endoscópicos, procedimientos urológicos endoscópicos (por ejemplo, cirugía de próstata, ureteroscopia, cistoscopia, cistitis intersticial), o inflamación perioperatoria (prevención) en general, enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Parkinson, enfermedad de Huntington, parálisis de Bell, enfermedad de Creutzfeldt-Jakob. Osteólisis 45 relacionada con el cáncer, inflamación relacionada con el cáncer, dolor relacionado con el cáncer, caquexia relacionada con el cáncer, metástasis óseas, formas agudas y crónicas de dolor, independientemente de si estos son causados por efectos centrales o periféricos del TNF α y si se clasifican como inflamatorios, formas nociceptivas o neuropáticas de dolor, ciática, lumbalgia, síndrome del túnel carpiano, síndrome de dolor regional complejo (SDRC), gota, neuralgia postherpética, fibromialgia, estados de dolor local, síndromes de dolor crónico por tumor metastásico, dismenorrea. Sepsis bacteriana, viral o fúngica, tuberculosis, SIDA, aterosclerosis, enfermedad coronaria, hipertensión, dislipidemia, insuficiencia cardíaca e insuficiencia cardíaca crónica. El término "dosis efectiva" o "dosificación efectiva" se refiere a una cantidad suficiente para lograr o al menos lograr parcialmente el 50

efecto deseado. El término "dosis terapéuticamente efectiva" se define como una cantidad suficiente para curar o al menos detener parcialmente la enfermedad y sus complicaciones en un paciente que ya padece la enfermedad. Las cantidades efectivas para este uso dependerán de la gravedad del trastorno que está siendo tratado y del estado general del propio sistema inmunitario del paciente.

5 El término "sujeto" se refiere a cualquier animal humano o no humano. Por ejemplo, los métodos y composiciones de la presente invención se pueden usar para tratar un sujeto con un trastorno mediado por el TNF.

El término "lagomorfos" se refiere a miembros del orden taxonómico Lagomorpha, que comprende las familias Leporidae (por ejemplo, liebres y conejos) y Ochotonidae (pikas). En una realización más preferida, los lagomorfos son un conejo. El término "conejo", como se usa en el presente documento, se refiere a un animal que pertenece a la familia de los leporidos.

10 Se usaron diferentes nomenclaturas para los inmunoenlazadores generados. Estos se identifican típicamente por un número (por ejemplo, # 34). En aquellos casos en los que se usó un prefijo tal como EP o Epi (por ejemplo, EP 34 que es idéntico a Epi 34 o a # 34), se indica con ello el mismo inmunoenlazador.

15 A menos que se defina lo contrario, todos los términos técnicos y científicos usados en la presente memoria tienen el mismo significado que entiende comúnmente un experto habitual en la técnica a la que pertenece esta invención. Aunque pueden usarse métodos y materiales similares o equivalentes a los descritos en este documento en la práctica o prueba de la presente invención, los métodos y materiales adecuados se describen a continuación. En caso de conflicto, predominará la presente especificación, incluidas las definiciones. Además, los materiales, métodos y ejemplos son solo ilustrativos y no pretenden ser limitantes.

20 Varios aspectos de la invención se describen con más detalle en las siguientes subsecciones. Se entiende que las diversas realizaciones, preferencias e intervalos se pueden combinar a voluntad. Además, dependiendo de la realización específica, pueden no aplicar las definiciones, realizaciones o intervalos seleccionados.

Anticuerpos anti-TNF α

25 En un aspecto, la presente invención proporciona inmunoenlazadores que se unen al TNF α y, por lo tanto, son adecuados para bloquear la función del TNF α *in vivo*. Las CDR de estos inmunoenlazadores se derivan de anticuerpos monoclonales anti-TNF α de conejo como se divulga en la patente de Estados Unidos No. 7.431.927. Se sabe que los anticuerpos de conejo tienen afinidades particularmente altas. Además, las secuencias de CDR divulgadas en este documento son secuencias naturales, lo que significa que no se necesita realizar una maduración de afinidad de los inmunoenlazadores resultantes. En una realización preferida, el inmunoenlazador neutraliza al TNF α *in vivo*.

30 El inmunoenlazador de la presente invención, que se une específicamente al TNF α , comprende una secuencia de aminoácidos de CDRH1, CDRH2, CDRH3, CDRL1, CDRL2 y CDRL3. Ejemplos de secuencias de aminoácidos de CDR para uso en los inmunoenlazadores de la invención se exponen en las SEQ ID Nos: 3-50 (Tabla 1). Las CDR expuestas en las SEQ ID Nos: 3-50 pueden injertarse en cualquier andamiaje de unión adecuado usando cualquier método reconocido en la técnica (véase, por ejemplo, Riechmann, L. y col. (1998) Nature 332: 323-327; Jones, P y col. (1986) Nature 321: 522-525; Queen, C. y col. (1989) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86: 10029-10033; la patente de Estados Unidos No. 5.225.539 de Winter y las patentes de Estados Unidos Nos. 5.530.101, 5.585.089, 5.693.762 y 6.180.370 de Queen y col.). Las CDR de diferentes anticuerpos parentales se pueden combinar en un anticuerpo para generar especies de anticuerpos adicionales. Sin embargo, se prefiere que los inmunoenlazadores divulgados en la presente memoria estén humanizados, por lo que son adecuados para aplicaciones terapéuticas.

40 Por lo tanto, en una realización, la invención proporciona un inmunoenlazador que se une específicamente al TNF α humano, comprendiendo el inmunoenlazador:

(i) una región variable de la cadena pesada humanizada (VH), comprendiendo la región variable de la cadena pesada una secuencia marco variable de la cadena pesada humana y secuencias de CDR H1, CDR H2 y CDR H3 procedentes de un inmunoenlazador de conejo, en la que el marco de región variable de la cadena pesada humana tiene al menos un 90% de identidad con la SEQ ID NO: 1; y

(ii) una región variable de la cadena ligera humanizada (VL), comprendiendo la región variable de la cadena ligera una secuencia marco variable de la cadena ligera humana y secuencias de CDR L1, CDR L2 y CDR L3 procedentes de un inmunoenlazador de conejo, en el que la secuencia marco de región variable de la cadena ligera humana tiene al menos un 85% de identidad con la SEQ ID NO: 2.

55 Como se conoce en la técnica, muchas cadenas de VH de conejo tienen cisteínas emparejadas adicionales con respecto a las equivalentes murinas y humanas. Además del puente disulfuro conservado formado entre cys22 y cys92, también hay un puente cys21-cys79 así como un puente S-S interCDR formado entre el último residuo de CDRH1 y el primer residuo de CDR H2 en algunas cadenas de conejo. Además, a menudo se encuentran pares de residuos de cisteína en la CDR-L3. Además, muchas CDR de anticuerpos de conejo no pertenecen a ninguna

estructura canónica previamente conocida. En particular, la CDR-L3 es a menudo mucho más larga que la CDR-L3 de una contraparte humana o murina.

Además de los conejos, la invención se puede usar para injertar CDR de cualquier lagomorfo.

5 En el caso de anticuerpos, las CDR de conejo expuestas en las SEQ ID Nos: 3-50 pueden injertarse en las regiones marco de cualquier anticuerpo de cualquier especie. Sin embargo, se ha descubierto previamente que los anticuerpos o derivados de anticuerpos que comprenden las estructuras identificadas en la denominada criba de "control de calidad" (documento WO0148017) se caracterizan por una estabilidad y/o solubilidad generalmente altas y, por lo tanto, también pueden ser útiles en el contexto de aplicaciones extracelulares tales como la neutralización del TNF α humano. Además, se ha descubierto también que una combinación particular de estos marcos solubles y estables VL (cadena ligera variable) y VH (cadena pesada variable) es particularmente adecuada para acomodar CDR de conejo. Sorprendentemente, se descubrió que tras el injerto en dicho marco o sus derivados, la conformación de bucle de una gran variedad de CDR de conejo podría mantenerse completamente, en gran parte independiente de la secuencia del marco donador. Además, dicho marco o sus derivados que contienen diferentes CDR de conejo están bien expresados y bien producidos al contrario que las cadenas sencillas de tipo silvestre de conejo y aún retienen casi por completo la afinidad de los anticuerpos de conejo donantes originales. Por consiguiente, en una realización, las CDR expuestas en las SEQ ID Nos: 3-50 se injertan en los marcos de anticuerpos humanos derivadas mediante el cribado de "control de calidad" descrito en el documento EP1479694. Las secuencias de aminoácidos de los ejemplos de marcos para uso en la invención se exponen en las SEQ ID Nos: 1 y 2 a continuación.

SEQ ID No 1

Cadena ligera variable de FW1.4

EIVMTQSPSTLSASVGRVITC (X)_{n=3-50}WYQQKPGKAPKLLIY (X)_{n=3-50}

VPSRFGSGSGAEFTLTISLQPDFFATYYC (X)_{n=3-50}FGQGTKLTVLG

SEQ ID No 2

Cadena pesada variable de FW1.4

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS (X)_{n=3-50}WVRQAPGKGLEWVS (X)_{n=3-50}

20 RFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAK (X)_{n=3-50}WGQGTLLVTVSS

X puede ser cualquier aminoácido de origen natural. Pueden estar presentes al menos tres y hasta 50 aminoácidos. Las CDR generalmente se insertan en los sitios donde X está presente.

25 En otras realizaciones, la invención proporciona un inmunoenlazador, que se une específicamente al TNF α , que comprende al menos una de una secuencia de aminoácidos de VH o VL. Ejemplos de secuencias de aminoácidos de VH o VL para usar en los inmunoenlazadores de la invención se exponen en las SEQ ID Nos: 51-111.

30 En ciertas realizaciones, la invención proporciona además un inmunoenlazador, que se une específicamente al TNF α , que comprende una secuencia de aminoácidos con similitud sustancial con una secuencia de aminoácidos expuesta en las SEQ ID Nos: 51-111, y en la que el inmunoenlazador conserva o mejora las propiedades funcionales deseadas del inmunoenlazador anti-TNF α de la invención. Los ejemplos de similitudes porcentuales incluyen, pero no se limitan a, aproximadamente 50%, 60%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90% o 95% de identidad.

35 En ciertas realizaciones, la invención proporciona además un inmunoenlazador, que se une específicamente al TNF α , que comprende una secuencia de aminoácidos con identidad sustancial con una secuencia de aminoácidos expuesta en las SEQ ID Nos: 51-111, y en la que el inmunoenlazador conserva o mejora las propiedades funcionales deseadas del inmunoenlazador anti-TNF α de la invención. Los ejemplos de identidades porcentuales incluyen, pero no se limitan a, aproximadamente el 50%, 60%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90% o 95% de identidad.

En ciertas realizaciones, la invención proporciona además un inmunoenlazador, que se une específicamente al TNF α , que comprende una secuencia de aminoácidos con sustituciones conservadoras con respecto a una secuencia de aminoácidos expuesta en las SEQ ID Nos: 51-111, y en la que el inmunoenlazador retiene o mejora las propiedades funcionales deseadas del inmunoenlazador anti-TNF α de la invención.

40 En una realización más preferida, el inmunoenlazador de la invención comprende al menos una secuencia de CDR que es al menos 80%, más preferiblemente al menos 85%, 90%, 95% o 100% idéntica a cualquiera de las SEQ ID Nos: 3-50.

En una realización preferida de la invención, se proporciona un inmunoenlazador que comprende al menos una, preferiblemente dos, tres, cuatro, cinco o más preferiblemente seis CDR del grupo que consiste en las SEQ ID Nos: 3-8.

5 En otra realización preferida de la invención, se proporciona un inmunoenlazador que comprende al menos una, preferiblemente dos, tres, cuatro, cinco o más preferiblemente seis CDR del grupo que consiste en las SEQ ID Nos: 9-14.

En otra realización preferida de la invención, se proporciona un inmunoenlazador que comprende al menos una, preferiblemente dos, tres, cuatro, cinco o más preferiblemente seis CDR del grupo que consiste en las SEQ ID Nos: 15-20.

10 En otra realización preferida de la invención, se proporciona un inmunoenlazador que comprende al menos una, preferiblemente dos, tres, cuatro, cinco o más preferiblemente seis CDR del grupo que consiste en las SEQ ID Nos: 21-26.

15 En otra realización preferida de la invención, se proporciona un inmunoenlazador que comprende al menos una, preferiblemente dos, tres, cuatro, cinco o más preferiblemente seis CDR del grupo que consiste en las SEQ ID Nos: 27-32.

En otra realización preferida de la invención, se proporciona un inmunoenlazador que comprende al menos una, preferiblemente dos, tres, cuatro, cinco o más preferiblemente seis CDR del grupo que consiste en las SEQ ID Nos: 33-38.

20 En otra realización preferida de la invención, se proporciona un inmunoenlazador que comprende al menos una, preferiblemente, dos, tres, cuatro, cinco o más preferiblemente seis CDR del grupo que consiste en las SEQ ID Nos: 39-44.

En otra realización preferida de la invención, se proporciona un inmunoenlazador que comprende al menos una, preferiblemente dos, tres, cuatro, cinco o más preferiblemente seis CDR del grupo que consiste en las SEQ ID Nos: 45-50.

25 Las secuencias de CDR proporcionadas en la presente memoria en las SEQ ID Nos: 3-50 pueden comprender además sustituciones. Preferiblemente, las secuencias tienen 3, más preferiblemente 2, y más preferiblemente solo una sustitución. Dichas sustituciones son preferiblemente tales que la capacidad de unión selectiva del inmunoenlazador no se altera, pero la afinidad del inmunoenlazador se altera, preferiblemente se mejora.

Tabla 1. CDR de donantes de RabMab

Clon RabMab	CDR	Secuencia de Aminoácidos	SEQ ID NO:
EP-43	CDR-H1	GFSLSSGAMS	3
	CDR-H2	VISSGATYYASWAKG	4
	CDR-H3	GGPDDSNSMGTFDP	5
	CDR-L1	QASQSISDWLA	6
	CDR-L2	GASRLAS	7
	CDR-L3	QQGWSDSYVDNL	8
EP-1	CDR-H1	GIDLSNDAIS	9
	CDR-H2	YISDWSIRYYANWAQG	10
	CDR-H3	GAPGAGDNGI	11
	CDR-L1	QSTESVYKNNYLA	12
	CDR-L2	DASTLAS	13
	CDR-L3	AGYYRSGSGTANGS	14
EP-6	CDR-H1	GFSLSRYGVS	15

ES 2 687 259 T3

	CDR-H2	TIGEAGRAYYANWARS	16
	CDR-H3	GEVFNNGWGAFNI	17
	CDR-L1	QASESIYSGLA	18
	CDR-L2	QASTLAS	19
	CDR-L3	QQGFGTSNVENP	20
EP-15	CDR-H1	GFSLSRYGVS	21
	CDR-H2	AIGETGRAYYANWAKS	22
	CDR-H3	GEEFNNGWGAFNI	23
	CDR-L1	QASENIYTSLA	24
	CDR-L2	SASTLAS	25
	CDR-L3	QQGFATSNVENP	26
EP-19	CDR-H1	GFSLNSNEIS	27
	CDR-H2	YIGNGGMTHYASWAKG	28
	CDR-H3	SVEYTDLYYLN	29
	CDR-L1	QASDNIYRGLA	30
	CDR-L2	DASTLQS	31
	CDR-L3	LGVYGYSSDDGAA	32
EP-34	CDR-H1	GFTISRSYWIC	33
	CDR-H2	CIYGDNDITPLYANWAKG	34
	CDR-H3	LGYADYAYDL	35
	CDR-L1	QSSQSVYGNIWMA	36
	CDR-L2	QASKLAS	37
	CDR-L3	QGNFNTGDRYA	38
EP-35	CDR-H1	GFSFSGYWIC	39
	CDR-H2	CIDAGTSGGTYYATWAKG	40
	CDR-H3	GVSSNGYYFKL	41
	CDR-L1	QASQISNLLA	42
	CDR-L2	AASKLAS	43
	CDR-L3	QQGWSHTNVDNT	44
EP-42	CDR-H1	GIDLRNDAIS	45
	CDR-H2	YISDWGIKYYASWVKG	46
	CDR-H3	GAPGAGDNGI	47
	CDR-L1	QSTESVYKNNYLA	48

	CDR-L2	DASTLAS	49
	CDR-L3	AGYYRSGFGTANG	50

En otra realización, la invención proporciona anticuerpos que se unen a un epítipo en el TNF α humano como se reconoce por un anticuerpo monoclonal que contiene un conjunto de CDR (H1-H3, L1-L3, que pertenecen a un clon de RabMab) como se expone en la Tabla 1. Tales anticuerpos se pueden identificar con base en su capacidad para competir de forma cruzada con un anticuerpo de la Tabla 1 en un ensayo estándar de unión al TNF. La capacidad de un anticuerpo de prueba para inhibir la unión de un anticuerpo de la Tabla 1 al TNF α humano demuestra que el anticuerpo de prueba puede competir con el anticuerpo de la Tabla 1 por unirse al TNF α humano y por lo tanto involucra el mismo epítipo en un TNF α humano que el anticuerpo de Tabla 1. En una realización preferida, el anticuerpo que se une al mismo epítipo en un TNF α humano como los anticuerpos expuestos en la Tabla 1 es un anticuerpo monoclonal humano. Dichos anticuerpos monoclonales humanos se pueden preparar y aislar como se describe en este documento.

En una realización, los anticuerpos y fragmentos de anticuerpos de la presente invención son anticuerpos de cadena sencilla (scFv) o fragmentos Fab. En el caso de anticuerpos scFv, un dominio VL seleccionado se puede unir a un dominio VH seleccionado en cualquier orientación mediante un enlazador flexible. Un estado adecuado del enlazador del estado de la técnica consiste en secuencias de aminoácidos repetidas de GGGGS (SEQ ID NO: 122) o variantes de las mismas. En una realización preferida de la presente invención, se usa un enlazador (GGGS)₄ (SEQ ID NO: 72) o su derivado, pero también son posibles variantes de 1-3 repeticiones (Holliger y col. (1993), Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90: 6444-6448). Otros enlazadores que pueden usarse para la presente invención están descritos por Alftan y col. (1995), Protein Eng. 8: 725-731, Choi y col. (2001), Eur. J. Immunol. 31: 94-106, Hu y col. (1996), Cancer Res. 56: 3055-3061, Kipriyanov y col. (1999), J. Mol. Biol. 293: 41-56 y Roovers y col. (2001), Cancer Immunol. Immunother. 50: 51-59. La disposición puede ser NH₂-VL-enlazador-VH-COOH o NH₂-VH-enlazador-VL-COOH, siendo la orientación anterior la preferida. En el caso de fragmentos Fab, los dominios variables VL de cadena ligera seleccionados se fusionan a la región constante de una cadena kappa de Ig humana, mientras que los dominios variables VH de cadena pesada adecuados se fusionan al primer dominio constante (N-terminal) CH1 de una IgG humana. En el extremo C, se forma un puente disulfuro entre cadenas entre los dos dominios constantes.

Los anticuerpos o derivados de anticuerpos de la presente invención pueden tener afinidades con el TNF humano con constantes de disociación K_d en un intervalo de 1 fM - 10 μ M. En una realización preferida de la presente invención, la K_d es \leq 1 nM. La afinidad de un anticuerpo por un antígeno puede determinarse experimentalmente usando un método adecuado (Berzofsky y col., "Antibody-Antigen Interactions", en Fundamental Immunology, Paul, WE, Ed, Raven Press: Nueva York, NY (1992); Kuby, J. Immunology, WH Freeman and Company: Nueva York, NY) y los métodos descritos en este documento.

Los anticuerpos preferidos incluyen anticuerpos que tienen una región de cadena pesada variable (VH) y/o cadena ligera variable (VL) de entre las siguientes secuencias VH y VL (secuencias de CDR subrayadas):

SEQ ID NO: 51

EP43min VH

EVQLVESGGGLVQPGGSLRSLCAASGFSLSGAMSWVRQAPGKGLEWVSVIISSGAT
YYASWAKGRFTISRDN SKNTLYLQMN SLRAEDTAVYYCAKGGPDDSNMGT FDPWGQ
 GTLVTVSS

SEQ ID NO: 52

EP43min VL

EIVMTQSPSTLSASVGDRVIITCQASQISDWLAWYQQKPGKAPKLLIYGASRLASG
 VPSRFSGSGSGAEFTLTISLQPDDFATYYCQQGWSDSYVDNLFGGQGTKLTVLG

SEQ ID NO: 53

EP43max VH

EVQLVESGGGLVQPGGSLRSLCTVSGFSLSGAMSWVRQAPGKGLEWVVIISSGAT
YYASWAKGRFTISKDTSKNTVYLYLQMN SLRAEDTAVYYCARGGGPDDSNMGT FDPWGQ
 GTLVTVSS

SEQ ID NO: 54

EP43max VL

EIVMTQSPSTLSASVGDRVIIKCQASQISDWLAWYQQKPGKAPKLLIYGASRLASG
FPSRFSGSGSGAEFTLTISGLEPADFATYYCQQGWSDSYVDNLFGGQGTKLTVLG

SEQ ID NO: 55

EP43maxDHP VH

EVQLVESGGGSVQPGGSLRLSCTVSGFSLSGGAMSWVRQAPGKGLEWVGVIISSGAT
YYASWAKGRFTISKDTSKNTVYLQMNLSRAEDTATYYCARGGGPDDNSMGT FDPWGQ
5 GTSVTVSS

SEQ ID NO: 56

EP43minmaxVL: T22K VL

EIVMTQSPSTLSASVGDRVIIKCQASQISDWLAWYQQKPGKAPKLLIYGASRLASG
VPSRFSGSGSGAEFTLTISLQPDDEFATYYCQQGWSDSYVDNLFGGQGTKLTVLG

SEQ ID NO: 57

10 EP43minmaxVL: V58F VL

EIVMTQSPSTLSASVGDRVIIITCQASQISDWLAWYQQKPGKAPKLLIYGASRLASG
FPSRFSGSGSGAEFTLTISLQPDDEFATYYCQQGWSDSYVDNLFGGQGTKLTVLG

SEQ ID NO: 58

EP43minmaxVL: Q79E VL

EIVMTQSPSTLSASVGDRVIIITCQASQISDWLAWYQQKPGKAPKLLIYGASRLASG
VPSRFSGSGSGAEFTLTISLQPDDEFATYYCQQGWSDSYVDNLFGGQGTKLTVLG

15 SEQ ID NO: 59

EP43minmaxVL: D81A VL

EIVMTQSPSTLSASVGDRVIIITCQASQISDWLAWYQQKPGKAPKLLIYGASRLASG
VPSRFSGSGSGAEFTLTISLQPADFATYYCQQGWSDSYVDNLFGGQGTKLTVLG

SEQ ID NO: 60

EP1min VH

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSND AISWVRQAPGKGLEWVSYISDWSIR
YYANWAQGRFTISRDN SKNTLYLQMNLSRAEDTAVYYCAKGAPGAGDNGIWGQGLV
20 TVSS

NOTA: EP1min CDR-H1 no coincide con aquella de EP1max

SEQ ID NO: 61

EP1min VL

EIVMTQSPSTLSASVGDRVIIITCQSTESVYKNNYLAWYQQKPGKAPKLLIYDASTLA
SGVPSRFSGSGSGAEFTLTISLQPDDEFATYYCAGYYRSGSGTANGSFGQGTKLTVL
G

25 SEQ ID NO: 62

EP1max VH

EVQLVESGGGSVQPGGSLRSLCTVSGIDLSNDAISWVRQAPGKGLEWVAYISDWSIR
YYANWAQGRFTISKDTSKNTVYLQMNLSRAEDTATYYCARGAPGAGDNGIWGQGTTV
TVSS

SEQ ID NO: 63

EP1max VL

EIVMTQSPSTLSASVGDRVIIITCQSTESVYKNNYLAWYQQKPGKAPKLLIYDASTLA
SGVPSRFSGSGSGTEFTLTISLQPDFATYYCAGYYRSGSGTANGSFGQGTKLTVL
G

5 SEQ ID NO: 64

EP6min VH

EVQLVESGGGLVQPGGSLRSLCAASGFSLSRYGVSWVRQAPGKGLEWVSTIGEAGRA
YYANWARSRFTISRDNKNTLYLQMNLSRAEDTAVYYCAKGEVFNNGWGAFNIWGQG
TLVTVSS

SEQ ID NO: 65

EP6min VL

10 EIVMTQSPSTLSASVGDRVIIITCQASESIYSGLAWYQQKPGKAPKLLIYQASTLASG
VPSRFSGSGSGAEFTLTISLQPDFATYYCQQGFGTSNVENPFGQGTKLTVLG

SEQ ID NO: 66

EP6max VH

EVQLVESGGGLVQPGGSLRSLCTVSGFSLSRYGVSWVRQAPGKGLEWVGTIGEAGRA
YYANWARSRSTISRDTSKNTVYLQMNLSRAEDTAVYYCARGEVFNNGWGAFNIWGQG
TLVTVSS

SEQ ID NO: 67

15 EP6max VL

EIVMTQSPSTLSASVGDRVIIITCQASESIYSGLAWYQQKPGKAPKLLIYQASTLASG
VPSRFSGSGSGTDFTLAISSLQPDFATYYCQQGFGTSNVENPFGQGTKLTVLG

SEQ ID NO: 68

EP15min VH

EVQLVESGGGLVQPGGSLRSLCAASGFTFSRYGVSWVRQAPGKGLEWVSAIGETGRA
YYANWAKSRFTISRDNKNTLYLQMNLSRAEDTAVYYCAKGEEFNNGWGAFNIWGQG
TLVTVSS

20 SEQ ID NO: 69

EP15min VL

EIVMTQSPSTLSASVGDRVIIITCQASENIYTSGLAWYQQKPGKAPKLLIYSASTLASG
VPSRFSGSGSGAEFTLTISLQPDFATYYCQQGFATSNVENPFGQGTKLTVLG

SEQ ID NO: 70

EP15max VH

EVQLVESGGGSVQPGGSLRLSCTVSVGFSLSRYGVSWVRQAPGKGLEWVGAIGETGRA
YYANWAKSRSTISRDTSKNTVYQLQMNSLRAEDTATYYCARGGEEFNNGWAFNIWGQG
TTVTVSS

SEQ ID NO: 71

EP15max VL

EIVMTQSPSTLSASVGDRVIIITCQASENIYTSLAWYQQKPGKAPKLLIYSASTLASG
VPSRFSGSGSGTEFTLTISLQPDDEFATYYCQOGFATSNVENPFGQGKLTVLG

5 SEQ ID NO: 72

enlazador de glicina-serina

GGGGSGGGGSGGGGSGGGGS

SEQ ID NO: 73

EP19maxmod VH

10 EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCTVSVGFSLNSNEISWVRQAPGKGLEWVGYIGNGGMT
HYASWAKGRFTISRDTSKNTVYQLQMNSLRAEDTAVYYCASSVEYTDLYYLNIWGQGT
LVTVSS

SEQ ID NO: 74

EP19maxmod VL

EIVMTQSPSTLSASVGDRVIIITCQASDNIYRGLAWYQQKPGKAPKLLIYDASTLQSG
VPSRFSGSGSGTQFTLTISLQPDDEFATYYCLGVYGYSSDDGAAFGQGKLTVLG

SEQ ID NO: 75

15 EP19minmod VH

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLS CAASGFSLNSNEISWVRQAPGKGLEWVSYIGNGGMT
HYASWAKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKSVEYTDLYYLNIWGQGT
LVTVSS

SEQ ID NO: 76

EP19minmod VL

EIVMTQSPSTLSASVGDRVIIITCQASDNIYRGLAWYQQKPGKAPKLLIYDASTLQSG
VPSRFSGSGSGAEFTLTISLQPDDEFATYYCLGVYGYSSDDGAAFGQGKLTVLG

20 SEQ ID NO: 77

EP34min VH

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLS CAASGFTISRSYWICWVRQAPGKGLEWVSCCIYGDND
ITPLYANWAKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKLGYADYAYDLWGQG
TLVTVSS

SEQ ID NO: 78

EP34min VL

25 EIVMTQSPSTLSASVGDRVIIITCQSSQSVYGNIWMAWYQQKPGKAPKLLIYQASKLA
SGVPSRFSGSGSGAEFTLTISLQPDDEFATYYCQGNFNTGDRYAFGQGKLTVLG

SEQ ID NO: 79

EP34max VH

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCTASGFTISRSYWICWVRQAPGKGLEWVACIYGDND
ITPLYANWAKGRFPVSTDTSKNTVYLQMNLSRAEDTAVYYCARLGADYAYDLWGQG
TLVTVSS

SEQ ID NO: 80

EP34max VL

EIVMTQSPSTLSASLGDRVITTCQSSQSVYGNIWMAWYQQKSGKAPKLLIYQASKLA
SGVPSRFSGSGSGAEFSLTISSLQPDDFATYYCQGNFNTGDRYAFGGQGTKLTVLG

5 SEQ ID NO: 81

EP35min VH

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSVGYWICWVRQAPGKGLEWVSCIDAGTS
GGTYATWAKGRFTISRDNKNTLYLQMNLSRAEDTAVYYCAKGVSSNGYFKLWGQ
GTLVTVSS

SEQ ID NO: 82

EP35min VL

10 EIVMTQSPSTLSASVGDRIITTCQASQISNLLAWYQQKPGKAPKLLIYAASKLASG
VPSRFSGSGSGAEFTLTISLQPDDFATYYCQQGWSHTNVDNTFGQGTKLTVLG

SEQ ID NO: 83

EP35max VH

EVQLVESGGGSVQPGGSLRLSCTASGFSFSVGYWICWVRQAPGKGLEWVACIDAGTS
GGTYATWAKGRFTISKDTSKNTVYLQMNLSRAEDTATYYCARGVSSNGYFKLWGQ
GTTVTVSS

SEQ ID NO: 84

15 EP35max VL

EIVMTQSPSTLSASVGDRIITTCQASQISNLLAWYQQKPGKAPKLLIVAASKLASG
VPSRFSGSGSGTEFTLTISLQPDDFATYYCQQGWSHTNVDNTFGQGTKLTVLG

SEQ ID NO: 85

EP42min VH

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFRNDALSWVRQAPGKGLEWVSYISDWGIK
YYASWVKGRFTISRDNKNTLYLQMNLSRAEDTAVYYCAKGAPGAGDNGIWGQGTLLV
TVSS

20 NOTA: EP42min CDR-H1 no coincide con aquella de EP42max

SEQ ID NO: 86

EP42min VL

EIVMTQSPSTLSASVGDRIITTCQSTESVYKNNYLAWYQQKPGKAPKLLIYDASTLA
SGVPSRFSGSGSGAEFTLTISSLQPDDFATYYCAGYRSGFGTANGSFGQGTKLTVL
G

SEQ ID NO: 87

25 EP42max VH

EVQLVESGGGSVQPGGSLRLSCTVSGIDLRNDAISWVRQAPGKGLEWVSYISDWGIK
YYASWVKGRFTISKDTSKNTVYLQMNLSRAEDTATYYCARGAPGAGDNGIWGQGTTV
 TVSS

SEQ ID NO: 88

EP42max VL

EIVMTQSP

5 STLSASVGD^RVIITCQSTESVYKNNYLAWYQQKPGKAPKLLIYDASTLASGVP^SRF^S
 GSGSGTEFTLTIS^SLQ^PDDFATYYCAGYYRSGFGTANGSFGQGTKLTVLG

Producción de anticuerpos anti-TNF

La presente invención se basa, al menos en parte, en el descubrimiento de que los marcos de anticuerpos humanos altamente solubles y estables identificados mediante un ensayo de Control de Calidad (QC) son marcos particularmente adecuados para acomodar CDR de otras especies animales no humanas, por ejemplo, CDR de conejo. En particular, la invención se basa en el descubrimiento de que las regiones variables de cadena ligera y pesada de un anticuerpo humano particular (el denominado anticuerpo "FW 1.4") son particularmente adecuadas comoceptoras para CDR de una variedad de anticuerpos de conejo de diferentes especificidades de unión. Aunque el marco de FW1.4 de cadena sencilla humana de ESBATech claramente tuvo un rendimiento inferior en el ensayo de Control de Calidad y cuando se expresó en células HeLa cuando se usó junto con sus CDR originales (como se divulga en el documento WO03/097697), sorprendentemente se encontró que, cuando se combina con otras CDR, tales como las CDR de conejo, da lugar a anticuerpos de cadena sencilla muy estables, solubles y bien producibles. Además, los inmunoenlazadores humanizados generados por el injerto de CDR de conejo en estos marcos ligeros y pesados altamente compatibles retienen de forma consistente y fiable las propiedades de unión de los anticuerpos de conejo a partir de los cuales se derivan las CDR del donante. Además, los inmunoenlazadores generados por los métodos de la invención muestran de forma fiable propiedades funcionales superiores tales como solubilidad y estabilidad. Por consiguiente, es un objetivo general de la invención proporcionar métodos para injertar CDR de conejo y otras no humanas, en los marcos de anticuerpos humanos solubles y estables de cadena ligera y/o pesada de la SEQ ID NO: 1 (K127) y la SEQ ID NO: 2 (a43), respectivamente, generando anticuerpos humanizados con propiedades biofísicas superiores.

En una realización preferida, el marco comprende una o más sustituciones en el marco de la cadena pesada (VH) en una posición del grupo que consiste en las posiciones H24, H25, H56, H82, H84, H89 y H108 (sistema de numeración AHo). Adicional o alternativamente, el marco puede comprender una sustitución en el marco de la cadena ligera (VH) en la posición L87 de acuerdo con el sistema de numeración AHo. La presencia de dichas sustituciones ha demostrado proporcionar un marco aceptor que retiene casi por completo la afinidad de los anticuerpos originales del donante. En una realización más preferida, las una o más de las sustituciones seleccionadas del grupo que consiste en: treonina (T) en la posición H24, valina (V) en la posición H25, glicina (G) o alanina (A) en la posición H56, lisina (K) en la posición H82, la treonina (T) en la posición H84, valina (V) en la posición H89 y la arginina (R) en la posición H108 y treonina (T) en la posición L87 de acuerdo con el sistema de numeración AHo están presentes en la secuencia marco.

Por lo tanto, en una realización aún más preferida, el marco aceptor es

SEQ ID NO. 89: marco de la cadena pesada variable de rFW1.4

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCTAS(X)_{n=3-50}

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

RFTISRDTSKNTVYLQMNLSRAEDTAVYYCAR(X)_{n=3-50} WGQGT^LV TVSS

SEQ ID NO. 90: marco de la cadena pesada variable de rFW1.4(V2)

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

RFTISKDTSKNTVYLQMNLSRAEDTAVYYCAR(X)_{n=3-50} WGQGT^LV TVSS

40 SEQ ID NO. 91: marco de la cadena pesada variable sustituido de FW1.4

EIVMTQSPSTLSASVGD^RVIITC(X)_{n=3-50} WYQQKPGKAPKLLIY(X)_{n=3-50}

GVP^SRF^SGSGSGTEFTLTIS^SLQ^PDDFATYYC(X)_{n=3-50} FGQGTKLTVLG

SEQ ID NO. 92: marco de rFW1.4

EIVMTQSPSTLSASVGD_RVIITC(X)_{n=3-50} WYQQKPGKAPKLLIY(X)_{n=3-50}
 GVPSRFSGSGSGTEFTLTISSLQ_PDDFATYYC(X)_{n=3-50} FGQGTKLTVLG
 GGGGSGGGGSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQ_PGGSLRLSCTAS(X)_{n=3-50}
 WVRQAPGKGLEWVG(X)_{n=3-50} RFTISRDTSKNTVYLQ_MNNS
 LRAEDTAVYYCAR(X)_{n=3-50} WGQGLTVTVSS

SEQ ID NO. 93: marco de rFW1.4(V2)

EIVMTQSPSTLSASVGD_RVIITC(X)_{n=3-50} WYQQKPGKAPKLLIY(X)_{n=3-50}
 GVPSRFSGSGSGTEFTLTISSLQ_PDDFATYYC(X)_{n=3-50} FGQGTKLTVLG
 GGGGSGGGGSGGGGSGGGGS EVQLVESGGGLVQ_PGGSLRLSCTV_S(X)_{n=3-50}
 WVRQAPGKGLEWVG(X)_{n=3-50} RFTISKDTSKNTVYLQ_MNSLR
 AEDTAVYYCAR(X)_{n=3-50} WGQGLTVTVSS

5 X puede ser cualquier aminoácido de origen natural; al menos tres y hasta 50 aminoácidos pueden estar presentes. Las CDR generalmente se insertan en los sitios donde X está presente.

10 Los anticuerpos o derivados de anticuerpos de la presente invención se pueden generar usando técnicas de rutina en el campo de la genética recombinante. Conociendo las secuencias de los polipéptidos, los ADNc que los codifican pueden generarse por síntesis génica mediante métodos bien conocidos en la técnica. Estos ADNc pueden clonarse en plásmidos de vectores adecuados. Una vez que se obtiene el ADN que codifica un dominio VL y/o VH, se puede realizar mutagénesis dirigida al sitio, por ejemplo mediante PCR usando cebadores mutagénicos, para obtener diversos derivados. La mejor secuencia de "inicio" puede escogerse dependiendo del número de alteraciones deseadas en las secuencias de VL y/o VH. Una secuencia preferida es la secuencia TB-A y sus derivados, por ejemplo, las secuencias de scFv o las secuencias de péptidos de fusión de Fab se pueden elegir como plantillas para mutagénesis y/o clonación impulsada por PCR.

15 Los métodos para incorporar o injertar CDR en regiones marco incluyen los expuestos, por ejemplo, en Riechmann, L. y col. (1998) Nature 332: 323-327; Jones, P. y col. (1986) Nature 321: 522-525; Queen, C. y col. (1989) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 86: 10029-10033; patente de los Estados Unidos No. 5.225.539 de Winter, y patentes de los Estados Unidos Nos. 5.530.101; 5,585,089; 5.693.762 y 6.180.370 de Queen y col., así como los divulgados en las solicitudes provisionales de patente de los Estados Unidos Nos. 61/075697 y 61/155.041, tituladas "Humanization of Rabbit Antibodies Using Universal Antibody Frameworks", presentada el 25 de junio de 2008 y el 4 de febrero de 2009, respectivamente.

20 Las técnicas estándar de clonación y mutagénesis bien conocidas por los expertos en la técnica se pueden usar para unir enlazadores, mezclar dominios o construir fusiones para la producción de fragmentos Fab. Los protocolos básicos que describen los métodos generales de esta invención se describen en Molecular Cloning, A Laboratory Manual (Sambrook y Russell, 3ª edición, 2001) y en Current Protocols in Molecular Biology (Ausubel y col., 1999).

30 La secuencia de ADN que alberga un gen que codifica un polipéptido de scFv, o en el caso de fragmentos Fab, que codifica dos genes separados o un operón bicistrónico que comprende los dos genes para las fusiones de VL-Ck y VH-CH1 se clonan en un vector de expresión adecuado, preferiblemente uno con un promotor inducible. Se debe tener cuidado de que delante de cada gen esté presente un sitio de unión apropiado al ribosoma que asegure la traducción. Debe entenderse que los anticuerpos de la presente invención comprenden las secuencias divulgadas en lugar de que consistan en ellas. Por ejemplo, las estrategias de clonación pueden requerir que se elabore un constructo a partir del cual esté presente un anticuerpo con uno o unos pocos residuos adicionales en el extremo N-terminal. Específicamente, la metionina derivada del codón de inicio puede estar presente en la proteína final en los casos en que no se haya escindido después de la traducción. La mayoría de los constructos para anticuerpos scFv dan lugar a una alanina adicional en el extremo N-terminal. En una realización preferida de la presente invención, se elige un vector de expresión para expresión periplásmica en *E. Coli* (Krebber, 1997). Dicho vector comprende un promotor frente a una secuencia señal escindible. La secuencia de codificación para el péptido del anticuerpo se fusiona a continuación en el marco con la secuencia señal escindible. Esto permite dirigir el polipéptido expresado al periplasma bacteriano donde se escinde la secuencia señal. El anticuerpo luego se pliega. En el caso de los fragmentos Fab, tanto los péptidos de fusión VL-Ck como los VH-CH1 deben estar enlazados a una señal de exportación. El enlace S-S covalente se forma en las cisteínas C-terminales después de que los péptidos hayan alcanzado el periplasma. Si se prefiere la expresión citoplásmica de anticuerpos, dichos anticuerpos pueden obtenerse generalmente con altos rendimientos a partir de cuerpos de inclusión, que pueden separarse fácilmente de otros fragmentos celulares y proteínas. En este caso, los cuerpos de inclusión se solubilizan en un agente desnaturante tal como, por ejemplo, clorhidrato de guanidina (GndHCl) y luego replegado por procedimientos de renaturalización bien conocidos por los expertos en la técnica.

45

Los plásmidos que expresan los polipéptidos scFv o Fab se introducen en un huésped adecuado, preferiblemente una célula bacteriana, de levadura o de mamífero, lo más preferiblemente una cepa adecuada de *E. coli* como por ejemplo JM83 para expresión periplásmica o BL21 para expresión en cuerpos de inclusión. El polipéptido puede recogerse del periplasma o formar cuerpos de inclusión y purificarse usando técnicas estándar tales como cromatografía de intercambio iónico, cromatografía de fase inversa, cromatografía de afinidad y/o filtración en gel conocidas por los expertos en la técnica.

Los anticuerpos o derivados de anticuerpos de la presente invención se pueden caracterizar con respecto al rendimiento, la solubilidad y la estabilidad *in vitro*. Las capacidades de unión hacia TNF, preferiblemente hacia TNF α humano, se pueden analizar *in vitro* mediante ELISA o resonancia de plasmón superficial (BIACore), usando TNF humano recombinante como se describe en el documento WO9729131, permitiendo también el último método determinar la constante de velocidad de disociación K_{off} , que preferiblemente debe ser menor que $10^{-3}s^{-1}$. Se prefieren valores K_d de ≤ 10 nM.

Además de los anticuerpos con una fuerte afinidad de unión por el TNF humano, también es deseable generar anticuerpos anti-TNF que tengan propiedades beneficiosas desde una perspectiva terapéutica. Por ejemplo, el anticuerpo puede ser uno que muestra actividad neutralizante en un ensayo de citotoxicidad mediada por el TNF alfa de L929. En este ensayo, se indujo la toxicidad de las células de fibroblastos de ratón L929 tratadas con actinomicina con TNF recombinante humano (hTNF). Se determinó que el 90% de la citotoxicidad máxima inducida por hTNF estaba en una concentración del TNF de 1.000 pg/mL.

Todas las células L929 se cultivaron en RPMI 1640 con fenol, con medio de L-Glutamina suplementado con suero de ternera fetal (10% v/v). La actividad neutralizante de los enlazadores anti-TNF α se evaluó en RPMI 1640 sin rojo de fenol y suero de ternera fetal al 5%. Se agregan diferentes concentraciones (0-374 ng/mL) de enlazadores anti-TNF a las células L929 en presencia de 1000 pg/mL de hTNF para determinar la concentración a la que el efecto antagonista alcanza la mitad de la inhibición máxima (CE50%). La curva de respuesta a la dosis se ajustó con la regresión sigmoidea no lineal con pendiente variable y se calculó la CE50.

Variantes optimizadas

Los anticuerpos de la invención se pueden optimizar adicionalmente para propiedades funcionales mejoradas, por ejemplo, para mejorar la solubilidad y/o la estabilidad.

En ciertas realizaciones, los anticuerpos de la invención se optimizan de acuerdo con la metodología de "consenso funcional" descrita en la solicitud PCT No. PCT/EP2008/001958, titulada "Sequence Based Engineering and Optimization of Single Chain Antibodies", presentada en 12 de marzo de 2008. Por ejemplo, los inmunoenlazadores del TNF α de la invención se pueden comparar con una base de datos de scFvs seleccionados funcionalmente para identificar posiciones de residuos de aminoácidos que son más o menos tolerantes a la variabilidad que la posición o posiciones correspondientes en el inmunoenlazador del VEGF, indicando de ese modo que dicha posición o posiciones de residuos identificados pueden ser adecuadas para mejorar la funcionalidad tal como la estabilidad y/o la solubilidad.

Los ejemplos de posiciones del marco para la sustitución se describen en la solicitud PCT No. PCT/CH2008/000285, titulada "Methods of Modifying Antibodies, and Modified Antibodies with Improved Functional Properties", presentada el 25 de junio de 2008, y la solicitud PCT No. PCT/CH2008/000284, titulada "Sequence Based Engineering and Optimization of Single Chain Antibodies", presentada el 25 de junio de 2008. Por ejemplo, se pueden introducir una o más de las siguientes sustituciones en una posición del aminoácido (se hace referencia a la numeración AHo para cada posición del aminoácido enumerada a continuación) en la región variable de la cadena pesada de un inmunoenlazador de la invención:

(a) Q o E en la posición del aminoácido 1;

(b) Q o E en la posición del aminoácido 6;

(c) T, S o A en la posición del aminoácido 7, más preferiblemente T o A, incluso más preferiblemente T;

(d) A, T, P, V o D, más preferiblemente T, P, V o D, en la posición del aminoácido 10,

(e) L o V, más preferiblemente L, en la posición del aminoácido 12,

(f) V, R, Q, M o K, más preferiblemente V, R, Q o M en la posición del aminoácido 13;

(g) R, M, E, Q o K, más preferiblemente R, M, E o Q, incluso más preferiblemente R o E, en la posición del aminoácido 14;

(h) L o V, más preferiblemente L, en la posición del aminoácido 19;

(i) R, T, K o N, más preferiblemente R, T o N, incluso más preferiblemente N, en la posición del aminoácido 20;

ES 2 687 259 T3

- (j) I, F, L o V, más preferiblemente I, F o L, incluso más preferiblemente I o L, en la posición del aminoácido 21;
 - (k) R o K, más preferiblemente K, en la posición del aminoácido 45;
 - (l) T, P, V, A o R, más preferiblemente T, P, V o R, incluso más preferiblemente R, en la posición del aminoácido 47;
 - (m) K, Q, H o E, más preferiblemente K, H o E, incluso más preferiblemente K, en la posición del aminoácido 50;
 - 5 (n) M o I, más preferiblemente I, en la posición del aminoácido 55;
 - (o) K o R, más preferiblemente K, en la posición del aminoácido 77;
 - (p) A, V, L o I, más preferiblemente A, L o I, incluso más preferiblemente A, en la posición del aminoácido 78;
 - (q) E, R, T o A, más preferiblemente E, T o A, incluso más preferiblemente E, en la posición del aminoácido 82;
 - (r) T, S, I o L, más preferiblemente T, S o L, incluso más preferiblemente T, en la posición del aminoácido 86;
 - 10 (s) D, S, N o G, más preferiblemente D, N o G, incluso más preferiblemente N, en la posición del aminoácido 87;
 - (t) A, V, L o F, más preferiblemente A, V o F, incluso más preferiblemente V, en la posición del aminoácido 89;
 - (u) F, S, H, D o Y, más preferiblemente F, S, H o D, en la posición del aminoácido 90;
 - (v) D, Q o E, más preferiblemente D o Q, incluso más preferiblemente D, en la posición del aminoácido 92;
 - (w) G, N, T o S, más preferiblemente G, N o T, incluso más preferiblemente G, en la posición del aminoácido 95;
 - 15 (x) T, A, P, F o S, más preferiblemente T, A, P o F, incluso más preferiblemente F, en la posición del aminoácido 98;
 - (y) R, Q, V, I, M, F o L, más preferiblemente R, Q, I, M, F o L, incluso más preferiblemente Y, incluso más preferiblemente L, en la posición del aminoácido 103; y
 - (z) N, S o A, más preferiblemente N o S, incluso más preferiblemente N, en la posición del aminoácido 107.
- Adicional o alternativamente, se pueden introducir una o más de las siguientes sustituciones en la región variable de la cadena ligera de un inmunoenlazador de la invención:
- 20 (aa) Q, D, L, E, S o I, más preferiblemente L, E, S o I, incluso más preferiblemente L o E, en la posición del aminoácido 1;
 - (bb) S, A, Y, I, P o T, más preferiblemente A, Y, I, P o T, incluso más preferiblemente P o T en la posición del aminoácido 2;
 - 25 (cc) Q, V, T o I, más preferiblemente V, T o I, incluso más preferiblemente V o T, en la posición del aminoácido 3;
 - (dd) V, L, I o M, más preferiblemente V o L, en la posición del aminoácido 4;
 - (ee) S, E o P, más preferiblemente S o E, incluso más preferiblemente S, en la posición del aminoácido 7;
 - (ff) T o I, más preferiblemente I, en la posición del aminoácido 10;
 - (gg) A o V, más preferiblemente A, en la posición del aminoácido 11;
 - 30 (hh) S o Y, más preferiblemente Y, en la posición del aminoácido 12;
 - (ii) T, S o A, más preferiblemente T o S, incluso más preferiblemente T, en la posición del aminoácido 14;
 - (jj) S o R, más preferiblemente S, en la posición del aminoácido 18;
 - (kk) T o R, más preferiblemente R, en la posición del aminoácido 20;
 - (ll) R o Q, más preferiblemente Q, en la posición del aminoácido 24;
 - 35 (mm) H o Q, más preferiblemente H, en la posición del aminoácido 46;
 - (nn) K, R o I, más preferiblemente R o I, incluso más preferiblemente R, en la posición del aminoácido 47;
 - (oo) R, Q, K, E, T o M, más preferiblemente Q, K, E, T o M, en la posición del aminoácido 50;
 - (pp) K, T, S, N, Q o P, más preferiblemente T, S, N, Q o P, en la posición del aminoácido 53;

(qq) I o M, más preferiblemente M, en la posición del aminoácido 56;

(rr) H, S, F o Y, más preferiblemente H, S o F, en la posición del aminoácido 57;

(ss) I, V o T, más preferiblemente V o T, R, incluso más preferiblemente T, en la posición del aminoácido 74;

(tt) R, Q o K, más preferiblemente R o Q, incluso más preferiblemente R, en la posición del aminoácido 82;

5 (uu) L o F, más preferiblemente F, en la posición del aminoácido 91;

(vv) G, D, T o A, más preferiblemente G, D o T, incluso más preferiblemente T, en la posición del aminoácido 92;

(xx) S o N, más preferiblemente N, en la posición del aminoácido 94;

(yy) F, Y o S, más preferiblemente Y o S, incluso más preferiblemente S, en la posición del aminoácido 101; y

10 (zz) D, F, H, E, L, A, T, V, S, G o I, más preferiblemente H, E, L, A, T, V, S, G o I, incluso más preferiblemente A o V, en la posición del aminoácido 103.

En otras realizaciones, los inmunoenlazadores de la invención comprenden una o más de las mutaciones potenciadoras de la estabilidad y/o la solubilidad descritas en la solicitud provisional de Estados Unidos No. 61/075.692, titulada "Solubility Optimization of Immunobinders", presentada el 25 de junio de 2008. En ciertas realizaciones preferidas, el inmunoenlazador comprende una mutación potenciadora de la solubilidad en una posición del aminoácido seleccionada del grupo de posiciones de aminoácidos de cadena pesada que consiste en 12, 103 y 144 (convención de numeración AHO). En una realización preferida, el inmunoenlazador comprende una o más sustituciones seleccionadas del grupo que consiste en: (a) serina (S) en la posición del aminoácido 12 de la cadena pesada; (b) serina (S) o treonina (T) en la posición del aminoácido 103 de la cadena pesada; y (c) serina (S) o treonina (T) en la posición del aminoácido 144 de la cadena pesada. En otra realización, el inmunoenlazador comprende las siguientes sustituciones: (a) serina (S) en la posición del aminoácido 12 de la cadena pesada; (b) serina (S) o treonina (T) en la posición del aminoácido 103 de la cadena pesada; y (c) serina (S) o treonina (T) en la posición del aminoácido 144 de la cadena pesada.

Como se mencionó anteriormente, combinaciones de las secuencias VL y VH, en particular de aquellas que tienen el mismo o esencialmente el mismo conjunto de secuencias de la CDR pero diferentes secuencias marco, por ejemplo, debido a la presencia de las sustituciones mencionadas anteriormente, pueden mezclarse y combinarse mediante una secuencia enlazadora. Los ejemplos de combinaciones, sin limitarse a ellas, incluyen:

SEQ ID NO: 94

EP43min

EIVMTQSPSTLSASVGDRVIITCQASQSISDWLAWYQQKPGKAPKLLIYGASR
 LASGVPSRFSGSGSGAEFTLTISLQPDFFATYYCQQGWSDSYVDNLFQGGTK
 LTVLGGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASG
 FSLSSGAMSWVRQAPGKGLEWVSVIISGATYYASWAKGRFTISRDNKNTL
 YLQMNSLRAEDTAVYYCAKGGPDDSNMGTDFDPWGQGTLLTVSS

30 SEQ ID NO: 95

EP43max

EIVMTQSPSTLSASVGDRVIKICQASQSISDWLAWYQQKPGKAPKLLIYGASR
 LASGFPSRFSGSGSGAEFTLTISGLEPADFFATYYCQQGWSDSYVDNLFQGGTK
 LTVLGGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCTVSG
 FSLSSGAMSWVRQAPGKGLEWVGVIISGATYYASWAKGRFTISKDTSKNTV
 YLQMNSLRAEDTAVYYCARGGPDDSNMGTDFDPWGQGTLLTVSS

SEQ ID NO: 96

EP43minmax

EIVMTQSPSTLSASVGDRVIITCQASQSIDWLA WYQQKPGKAPKLLIYGASR
LASGVPSRFSGSGSGAEFTLTISLQPDDFATYYCQQGWSDSYVDNLFQGGTK
LTVLGGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCTVSG
FSLSSGA
MSWVRQAPGKGLEWVGVISSGATYYASWAKGRFTISKDTSKNTVYLQMNS
LRAEDTAVYYCARGGPDDSNMGT FDPWGQGLTVTVSS

SEQ ID NO: 97

EP43max DHP

EIVMTQSPSTLSASVGDRVIKQCASQSIDWLA WYQQKPGKAPKLLIYGASR
LASGFPSRFSGSGSGAEFTLTISGLEPADFATYYCQQGWSDSYVDNLFQGGTK
LTVLGGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGSVQPGGSLRLSCTVSGF
SLSSG
AMSWVRQAPGKGLEWVGVISSGATYYASWAKGRFTISKDTSKNTVYLQMN
SLRAEDTATYYCARGGPDDSNMGT FDPWGQGTSVTVSS

5 SEQ ID NO: 98

EP43minmaxDHP

EIVMTQSPSTLSASVGDRVIITCQASQSIDWLA WYQQKPGKAPKLLIYGASR
LASGVPSRFSGSGSGAEFTLTISLQPDDFATYYCQQGWSDSYVDNLFQGGTK
LTVLG
GGGGSGGGGSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGSVQPGGSLRLSCTVSGFSLSSG
AMSWVRQAPGKGLEWVGVISSGATYYASWAKGRFTISKDTSKNTVYLQMN
SLRAEDTATYYCARGGPDDSNMGT FDPWGQGTSVTVSS

SEQ ID NO: 99

EP43minmax VL: T22K

EIVMTQSPSTLSASVGDRVIKQCASQSIDWLA WYQQKPGKAPKLLIYGASR
LASGVPSRFSGSGSGAEFTLTISLQPDDFATYYCQQGWSDSYVDNLFQGGTK
LTVLGGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCTVSG
FSLSSGA
MSWVRQAPGKGLEWVGVISSGATYYASWAKGRFTISKDTSKNTVYLQMNS
LRAEDTAVYYCARGGPDDSNMGT FDPWGQGLTVTVSS

10

SEQ ID NO: 100

EP43minmax: VL: V58F

EIVMTQSPSTLSASVGDRVIITCQASQSIDWLA WYQQKPGKAPKLLIYGASR
LASGFPSRFSGSGSGAEFTLTISLQPDDFATYYCQQGWSDSYVDNLFQGGTK
LTVLG
GGGGSGGGGSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCTVSGFSLSSG
A

MSWVRQAPGKGLEWVGVISSGATYYASWAKGRFTISKDTSKNTVYLQMNS
LRAEDTAVYYCARGGPDDSNMGT FDPWGQGLTVTVSS

SEQ ID NO: 101

15 EP43minmax VL: D81A

EIVMTQSPSTLSASVGDRVIITCQASQSISDWLA WYQQKPGKAPKLLIYGASR
LASGVPSRFSGSGSGAEFTLTISLQPADFATYYCQQGWSDSYVDNLFQGGTK
LTVLG
GGGGSGGGGSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCTVSGFSLSSG
A
MSWVRQAPGKGLEWVGVISSGATYYASWAKGRFTISKDTSKNTVYLQMNS
LRAEDTAVYYCARGGPDDSNMGT FDPWGQGT LVTVSS

SEQ ID NO: 102

EP43minmax VL: Q79E

EIVMTQSPSTLSASVGDRVIITCQASQSISDWLA WYQQKPGKAPKLLIYGASR
LASGVPSRFSGSGSGAEFTLTISLQPADFATYYCQQGWSDSYVDNLFQGGTK
LTVLG
GGGGSGGGGSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCTVSGFSLSSG
A
MSWVRQAPGKGLEWVGVISSGATYYASWAKGRFTISKDTSKNTVYLQMNS
LRAEDTAVYYCARGGPDDSNMGT FDPWGQGT LVTVSS

5 SEQ ID NO: 103

EP1min

EIVMTQSPSTLSASVGDRVIITCQSTESVYKNNYLA WYQQKPGKAPKLLIYDA
STLASGVPSRFSGSGSGAEFTLTISLQPADFATYYCAGYYRSGSGTANGSFGQ
GTKLTVLGGGGGSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLS
CA
AS
GFTFSNDAISWVRQAPGKGLEWVSYISDWSIRYYANWAQGRFTISRDNKNT
LYLQMNSLRAEDTAVYYCAK GAPGAGDNGI WGQGT LVTVSS

SEQ ID NO: 104

EP1max

EIVMTQSPSTLSASVGDRVIITCQSTESVYKNNYLA WYQQKPGKAPKLLIYDA
STLASGVPSRFSGSGSGTEFTLTISLQPADFATYYCAGYYRSGSGTANGSFGQ
GTKLTVLGGGGGSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGSVQPGGSLRLSCT
VSGIDLSNDAISWVRQAPGKGLEWVA YISDWSIRYYANWAQGRFTISKDTSK
NTVYLQMNSLRAEDTATYYCARGAPGAGDNGI WGQGT TTVTVSS

10

SEQ ID NO: 105

EP1minmax

EIVMTQSPSTLSASVGDRVIITCQSTESVYKNNYLA WYQQKPGKAPKLLIYDA
STLASGVPSRFSGSGSGAEFTLTISLQPADFATYYCAGYYRSGSGTANGSFGQ

GTKLTVLGGGGGSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGSVQPGGSLRLSCT
VSGIDLSNDAISWVRQAPGKGLEWVA YISDWSIRYYANWAQGRFTISKDTSK
NTVYLQMNSLRAEDTATYYCARGAPGAGDNGI WGQGT TTVTVSS

SEQ ID NO: 106

15 EP6min

EIVMTQSPSTLSASVGDRVIITCQASESIYSGLA WYQQKPGKAPKLLIYQASTL
ASGVPSRFSGSGSGAEFTLTISSLQPDDFATYYCQQGFGT SNVENPFGQGTKLT
VLG
GGGGSGGGGSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFSLSR Y
GVSWVRQAPGKGLEWVSTIGEAGRAYYANWARSRFTISRDN SKNTLYLQMN
SLRAEDTAVYYCAKGEVFNNGWGAFNIWGQGT LVTVSS

SEQ ID NO: 107

EP6max

EIVMTQSPSTLSASVGDRVIITCQASESIYSGLA WYQQKPGKAPKLLIYQASTL
ASGVPSRFSGSGSGTDFTLAISSLQPDDFATYYCQQGFGT SNVENPFGQGTKL
TVLG
GGGGSGGGGSGGGGSGGGGS
EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCTVSGFSLSR YGVSWVRQAPGKGLEWVGTIG
EAGRAYYANWARSRSTISRDTSKNTVYLQMN SLRAEDTAVYYCARGEVFNN
GWGAFNIWGQGT LVTVSS

5 SEQ ID NO: 108

EP6minmax

EIVMTQSPSTLSASVGDRVIITCQASESIYSGLA WYQQKPGKAPKLLIYQASTL
ASGVPSRFSGSGSGAEFTLTISSLQPDDFATYYCQQGFGT SNVENPFGQGTKLT
VLG
GGGGSGGGGSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCTVSGFSLSR Y
GVSWVRQAPGKGLEWVGTIGEAGRAYYANWARSRSTISRDT SKNTVYLQM
NSLRAEDTAVYYCARGEVFNNGWGAFNIWGQGT LVTVSS

SEQ ID NO: 109

EP15min

EIVMTQSPSTLSASVGDRVIITCQASENIYTS LA WYQQKPGKAPKLLIYSASTL
ASGVPSRFSGSGSGAEFTLTISSLQPDDFATYYCQQGFAT SNVENPFGQGTKLT
VLG
GGGGSGGGGSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGF TFSRY
GVSWVRQAPGKGLEWVSAIGETGRAYYANWAKSRFTISRDN SKNTLYLQMN
SLRAEDTAVYYCAKGEEFNNGWGAFNIWGQGT LVTVSS

10

SEQ ID NO: 110

EP15max

EIVMTQSPSTLSASVGDRVIITCQASENIYTS LA WYQQKPGKAPKLLIYSASTL
ASGVPSRFSGSGSGTEFTLTISSLQPDDFATYYCQQGFAT SNVENPFGQGTKLT
VLG
GGGGSGGGGSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGSVQPGGSLRLSCTVSGFSLSR Y
GVSWVRQAPGKGLEWVGAIGETGRAYYANWAKSRSTISRDT SKNTVYLQM
NSLRAEDTATYYCARGEEFNNGWGAFNIWGQGT TVTVSS

SEQ ID NO: 111

15 EP15minmax

EIVMTQSPSTLSASVGDRVIITCQASENIYTSLAWYQQKPGKAPKLLIYSASTL
ASGVPSRFSGSGSGAEFTLTISLQPDDFATYYCQQGFATSNVENPFGQGTKLT
VLG
GGGGSGGGGSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGSVQPGGSLRLSCTVSGFSLSR
Y GVSWVRQAPGKGLEWVGAIGETGRAYANWAKSRSTISRDTSKNTVYLQM
NSLRAEDTATYYCARGEEFNNGWGA FN IWGQGT TVTVSS

SEQ ID NO: 112

EP19minmod

EIVMTQSPSTLSASVGDRVIITCQASDNIYRGLAWYQQKPGKAPKLLIYDAST
LQSGVPSRFSGSGSGAEFTLTISLQPDDFATYYCLGVYGYSSDDGAAFGQGT
KLTVLGGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLS
CAAS GFSLNSNEISWVRQAPGKGLEWVSYIGNGGMTHYASWAKGRFTISR
DNSKNTLYLQMNLSLRAEDTAVYYCAKSVEYTDLYYLN IWGQGT LVTVSS

5 SEQ ID NO: 113

EP19maxmod

EIVMTQSPSTLSASVGDRVIITCQASDNIYRGLAWYQQKPGKAPKLLIYDAST
LQSGVPSRFSGSGSGTQFTLTISLQPDDFATYYCLGVYGYSSDDGAAFGQGT
KLTVLGGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLS
CTVSGFSLNSNEISWVRQAPGKGLEWVSYIGNGGMTHYASWAKGRFTISR
DTSKNTVYLQMNLSLRAEDTAVYYCASSVEYTDLYYLN IWGQGT LVTVSS

SEQ ID NO: 114

EP34min

10 EIVMTQSPSTLSASVGDRVIITCQSSQSVYGNIWMAWYQQKPGKAPKLLIYQA
SKLASGVPSRFSGSGSGAEFTLTISLQPDDFATYYCQGNFNTGDRYAFGQGT
KLTVLGGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLS
CAAS GFTISRSYWICWVRQAPGKGLEWVSCIYGDNDITPLYANWAKGRFTISR
DNSKNTLYLQMNLSLRAEDTAVYYCAKLG YADYAYDLWGQGT LVTVSS

SEQ ID NO: 115

EP34max

EIVMTQSPSTLSASLGDRVIITCQSSQSVYGNIWMAWYQQKSGKAPKLLIYQA
SKLASGVPSRFSGSGSGAEFSLTISLQPDDFATYYCQGNFNTGDRYAFGQGT
KLTVLGGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLS
CTAS GFTISRSYWICWVRQAPGKGLEWVACIYGDNDITPLYANWAKGRFPV
STDTSKNTVYLQMNLSLRAEDTAVYYCARLGYADYAYDLWGQGT LVTVSS

SEQ ID NO: 116

15 EP35min

EIVMTQSPSTLSASVGDRVIITCQASQISINLLAWYQQKPGKAPKLLIYAASKL
ASGVPSRFSGSGSGAEFTLTISLQPDDFATYYCQQGWSHTNVDNTFGQGTKL
TVLG
GGGGSGGGGSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLS
CAASGFTFSVGYWICWVRQAPGKGLEWVSCIDAGTSGGTYYATWAKGRFTISR
DNSKNTLYLQMNLSLRAEDTAVYYCAKGVSSNGYYFKLWGQGT LVTVSS

SEQ ID NO: 117

EP35max

EIVMTQSPSTLSASVGDRVIITCQASQISNLLAWYQQKPGKAPKLLIVAASKL
 ASGVPSRFSGSGSGTEFTLTISSLQPDDFATYYCQQGWSHTNVDNTFGQGTKL
 TVLG
 GGGGSGGGGSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGSVQPGGSLRLSCTASGFSFSVG
 YWICWVRQAPGKGLEWVACIDAGTSGGTYYATWAKGRFTISKDTSKNTVYL
 QMNSLRAEDTATYYCARGVSSNGYYFKLWGQGTTVTVSS

SEQ ID NO: 118

5 EP35minmax

EIVMTQSPSTLSASVGDRVIITCQASQISNLLAWYQQKPGKAPKLLIYAASKL
 ASGVPSRFSGSGSGAEFTLTISSLQPDDFATYYCQQGWSHTNVDNTFGQGTKL
 TVLG
 GGGGSGGGGSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGSVQPGGSLRLSCTASGFSFSVG
 YWICWVRQAPGKGLEWVACIDAGTSGGTYYATWAKGRFTISKDTSKNTVYL
 QMNSLRAEDTATYYCARGVSSNGYYFKLWGQGTTVTVSS

SEQ ID NO: 119

EP42min

EIVMTQSPSTLSASVGDRVIITCQSTESVYKNNYLAWYQQKPGKAPKLLIYDA
 STLASGVPSRFSGSGSGAEFTLTISSLQPDDFATYYCAGYYRSGFGTANGSFGQ
 GTKLTVLGGGGGSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCT
 ASGFTFRNDAISWVRQAPGKGLEWVSYISDWGIKYYASWVKGRFTISRDNK
 NTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKGAPGAGDNGIWGQGLTVTVSS

10 SEQ ID NO: 120

EP42max

EIVMTQSPSTLSASVGDRVIITCQSTESVYKNNYLAWYQQKPGKAPKLLIYDA
 STLASGVPSRFSGSGSGTEFTLTISSLQPDDFATYYCAGYYRSGFGTANGSFGQ
 GTKLTVLGGGGGSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGSVQPGGSLRLSCT
 VSGIDLRNDAISWVRQAPGKGLEWVSYISDWGIKYYASWVKGRFTISKDTSK
 NTVYLMNSLRAEDTATYYCARGAPGAGDNGIWGQGLTVTVSS

SEQ ID NO: 121

EP42minmax

15 EIVMTQSPSTLSASVGDRVIITCQSTESVYKNNYLAWYQQKPGKAPKLLIYDA
 STLASGVPSRFSGSGSGAEFTLTISSLQPDDFATYYCAGYYRSGFGTANGSFGQ
 GTKLTVLGGGGGSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGSVQPGGSLRLSCT
 VSGIDLRNDAISWVRQAPGKGLEWVSYISDWGIKYYASWVKGRFTISKDTSK
 NTVYLMNSLRAEDTATYYCARGAPGAGDNGIWGQGLTVTVSS

En una realización preferida, una secuencia tiene al menos 90% de identidad, más preferiblemente al menos 95% de identidad y lo más preferiblemente 100% de identidad con cualquiera de las secuencias SEQ ID No. 94-121.

Usos de anticuerpos anti-TNF

20 Para aplicaciones terapéuticas, los anticuerpos anti-TNF de la invención se administran a un mamífero, preferiblemente un ser humano, en una forma de dosificación farmacéuticamente aceptable tal como las discutidas anteriormente, que incluyen los que se pueden administrar a un ser humano por vía intravenosa como un bolo o por

infusión continua durante un período de tiempo, por vía intramuscular, intraperitoneal, intracerebroespinal, subcutánea, intraarticular, intrasinovial, intratecal, oral, tópica o por inhalación. Los anticuerpos también se administran adecuadamente mediante rutas intratumorales, peritumorales, intralesionales o perilesionales, para ejercer efectos terapéuticos tanto locales como sistémicos.

5 Para la prevención o el tratamiento de la enfermedad, la dosificación apropiada de anticuerpo dependerá del tipo de enfermedad a tratar, como se definió anteriormente, la gravedad y el curso de la enfermedad, ya sea que el anticuerpo se administre con fines preventivos o terapéuticos, terapia previa, historia clínica y respuesta del paciente al anticuerpo, y la discreción del médico tratante. El anticuerpo se administra adecuadamente al paciente de una vez o durante una serie de tratamientos.

10 Los anticuerpos anti-TNF son útiles en el tratamiento de enfermedades mediadas por el TNF. Dependiendo del tipo y la gravedad de la enfermedad, aproximadamente 1 µg/kg a aproximadamente 50 mg/kg (por ejemplo, 0,1-20 mg/kg) de anticuerpo es una dosis candidata inicial para la administración al paciente, ya sea, por ejemplo, mediante una o más administraciones separadas, o por infusión continua. Una dosificación diaria o semanal típica puede variar de aproximadamente 1 µg/kg a aproximadamente 20 mg/kg o más, dependiendo de los factores mencionados anteriormente. Para administraciones repetidas durante varios días o más, dependiendo de la afección, el tratamiento se repite hasta que se produce una supresión deseada de los síntomas de la enfermedad. Sin embargo, otros regímenes de dosificación pueden ser útiles. El progreso de esta terapia se controla fácilmente mediante técnicas y ensayos convencionales, que incluyen, por ejemplo, imágenes radiográficas de los tumores.

20 De acuerdo con otra realización de la invención, la eficacia del anticuerpo para prevenir o tratar la enfermedad puede mejorarse administrando el anticuerpo en serie o en combinación con otro agente que sea eficaz para esos fines, tal como el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), un anticuerpo capaz de inhibir o neutralizar la actividad angiogénica del factor de crecimiento de fibroblastos ácidos o básicos (FGF) o factor de crecimiento de hepatocitos (HGF), un anticuerpo capaz de inhibir o neutralizar las actividades coagulantes del factor tisular, proteína C o proteína S (véase Esmon y col., publicación de patente PCT No. WO 91/01753, publicada el 21 de febrero de 1991), un anticuerpo capaz de unirse al receptor HER2 (véase Hudziak y col., publicación de patente PCT No. WO 89/06692, publicada el 27 de julio de 1989), o uno o más agentes terapéuticos convencionales tales como, por ejemplo, agentes alquilantes, antagonistas de ácido fólico, antimetabolitos del metabolismo de ácido nucleico, antibióticos, análogos de pirimidina, 5-fluorouracilo, cisplatino, nucleósidos de purina, aminas, aminoácidos, nucleósidos de triazol o corticosteroides. Dichos otros agentes pueden estar presentes en la composición que se administra o se pueden administrar por separado. Además, el anticuerpo se administra de forma adecuada en serie o en combinación con tratamientos radiológicos, ya sea que impliquen irradiación o administración de sustancias radiactivas.

35 Los anticuerpos de la invención se pueden usar como agentes de purificación por afinidad. En este proceso, los anticuerpos se inmovilizan en una fase sólida tal como resina de Sephadex o papel de filtro, usando métodos bien conocidos en la técnica. El anticuerpo inmovilizado se pone en contacto con una muestra que contiene la proteína TNF (o fragmento de la misma) que se va a purificar, y posteriormente el soporte se lava con un disolvente adecuado que eliminará sustancialmente todo el material en la muestra excepto la proteína TNF, que se une al anticuerpo inmovilizado. Finalmente, el soporte se lava con otro disolvente adecuado, tal como regulador de glicina, pH 5,0, que liberará la proteína TNF del anticuerpo.

40 Los anticuerpos anti-TNF también pueden ser útiles en ensayos de diagnóstico para la proteína TNF, por ejemplo, detectando su expresión en células, tejidos o suero específicos. Dichos métodos de diagnóstico pueden ser útiles en el diagnóstico de cáncer.

Para aplicaciones de diagnóstico, el anticuerpo típicamente se marcará con una unidad estructural detectable. Numerosas etiquetas están disponibles que generalmente se pueden agrupar en las siguientes categorías:

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

50 (b) Están disponibles marcadores fluorescentes tales como quelatos de tierras raras (quelatos de europio) o fluoresceína y sus derivados, rodamina y sus derivados, dansilo, lisamina, ficoeritrina y Texas Red. Los marcadores fluorescentes pueden conjugarse con el anticuerpo usando las técnicas descritas en *Current Protocols in Immunology*, citado más arriba, por ejemplo. La fluorescencia se puede cuantificar utilizando un fluorómetro.

55 (c) Diversos marcadores de enzima-sustrato están disponibles y la patente de Estados Unidos No. 4.275.149 proporciona una revisión de algunos de estos. La enzima generalmente cataliza una alteración química del sustrato cromogénico que se puede medir usando diversas técnicas. Por ejemplo, la enzima puede catalizar un cambio de color en un sustrato, que se puede medir espectrofotométricamente. Alternativamente, la enzima puede alterar la fluorescencia o la quimioluminiscencia del sustrato. Las técnicas para cuantificar un cambio en la fluorescencia se describieron anteriormente. El sustrato quimioluminiscente se excita electrónicamente por una reacción química y

luego puede emitir luz que puede medirse (usando un quimioluminómetro, por ejemplo) o puede donar energía a un aceptor fluorescente. Los ejemplos de marcadores enzimáticos incluyen luciferasas (por ejemplo, luciferasa de luciérnaga y luciferasa bacteriana; patente de los Estados Unidos No. 4.737.456), luciferina, 2,3-dihidroftalazindionas, malato deshidrogenasa, ureasa, peroxidasa, tal como la peroxidasa de rábano picante (HRPO), fosfatasa alcalina, beta-galactosidasa, glucoamilasa, lisozima, sacárido oxidasas (por ejemplo, glucosa oxidasa, galactosa oxidasa y glucosa-6-fosfato deshidrogenasa), oxidasas heterocíclicas (tales como uricasa y xantina oxidasa), lactoperoxidasa, microperoxidasa y similares. Las técnicas para conjugar enzimas con anticuerpos se describen en O'Sullivan y col., *Methods for the Preparation of Enzyme-Antibody Conjugates* para uso en Enzyme Immunoassay, en *Methods in Enzym.* (ed. J. Langone y H. Van Vunakis), Academic Press, Nueva York, 73: 147-166 (1981). Los ejemplos de combinaciones de enzima-sustrato incluyen, por ejemplo:

(i) peroxidasa de rábano picante (HRPO) con peroxidasa de hidrógeno como sustrato, donde la peroxidasa de hidrógeno oxida un precursor de colorante (por ejemplo, ortofenilendiamina (OPD) o clorhidrato de 3,3',5,5'-tetrametilbencidina (TMB));

(ii) fosfatasa alcalina (AP) con para-fosfato de nitrofenilo como sustrato cromogénico; y

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

Numerosas otras combinaciones de enzima-sustrato están disponibles para los expertos en la técnica. Para una revisión general de estas, véase las patentes de Estados Unidos Nos. 4.275.149 y 4.318.980. A veces, el marcador se conjuga indirectamente con el anticuerpo. El experto en la materia conocerá diversas técnicas para lograr esto. Por ejemplo, el anticuerpo puede conjugarse con biotina y cualquiera de las tres amplias categorías de marcadores mencionadas anteriormente puede conjugarse con avidina, o viceversa. La biotina se une selectivamente a avidina y, por lo tanto, el marcador se puede conjugar con el anticuerpo de esta manera indirecta. Alternativamente, para lograr la conjugación indirecta del marcador con el anticuerpo, el anticuerpo se conjuga con un hapteno pequeño (por ejemplo, digoxina) y uno de los diferentes tipos de marcadores mencionados anteriormente se conjuga con un anticuerpo anti-hapteno (por ejemplo, anticuerpo antidigoxina). Por lo tanto, se puede lograr la conjugación indirecta del marcador con el anticuerpo.

En otra realización de la invención, el anticuerpo anti-TNF no necesita marcarse, y la presencia del mismo puede detectarse usando un anticuerpo marcado que se une al anticuerpo TNF.

Los anticuerpos de la presente invención pueden emplearse en cualquier método de ensayo conocido, tal como ensayos de unión competitiva, ensayos en sándwich directos e indirectos, y ensayos de inmunoprecipitación. Zola, *Monoclonal Antibodies: A Manual of Techniques*, páginas 1447-158 (CRC Press, Inc. 1987).

Los ensayos de unión competitiva se basan en la capacidad de un estándar marcado para competir con el analito de la muestra de prueba por la unión con una cantidad limitada de anticuerpo. La cantidad de proteína TNF en la muestra de prueba es inversamente proporcional a la cantidad de estándar que se une a los anticuerpos. Para facilitar la determinación de la cantidad de estándar que se une, los anticuerpos generalmente están insolubilizados antes o después de la competencia, de modo que el estándar y el analito que están unidos a los anticuerpos se pueden separar convenientemente del estándar y del analito que permanecen sin unir.

Los ensayos en sándwich implican el uso de dos anticuerpos, cada uno capaz de unirse a una porción inmunogénica diferente, o epítopo, de la proteína a detectar. En un ensayo en sándwich, el analito de la muestra de prueba se une a un primer anticuerpo que se inmoviliza en un soporte sólido, y a continuación un segundo anticuerpo se une al analito, formando así un complejo insoluble de tres partes. Véase, por ejemplo, la patente de los Estados Unidos No. 4.376.110. El segundo anticuerpo se puede marcar con una unidad estructural detectable (ensayos en sándwich directos) o se puede medir usando un anticuerpo anti-inmunoglobulina que está marcado con una unidad estructural detectable (ensayo en sándwich indirecto). Por ejemplo, un tipo de ensayo sándwich es un ensayo ELISA, en cuyo caso el residuo detectable es una enzima.

Para inmunohistoquímica, la muestra tumoral puede ser fresca o congelada o puede incluirse en parafina y fijarse con un conservante tal como formalina, por ejemplo.

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

El anticuerpo de la presente invención se puede proporcionar en un kit, una combinación envasada de reactivos en cantidades predeterminadas con instrucciones para realizar el ensayo de diagnóstico. Cuando el anticuerpo se marca con una enzima, el kit incluirá sustratos y cofactores requeridos por la enzima (por ejemplo, un precursor de sustrato que proporciona el cromóforo o fluoróforo detectable). Además, se pueden incluir otros aditivos tales como estabilizadores, reguladores (por ejemplo, un regulador de bloque o regulador de lisis) y similares. Las cantidades relativas de los diversos reactivos pueden variar ampliamente para proporcionar concentraciones en solución de los reactivos que optimizan sustancialmente la sensibilidad del ensayo. Particularmente, los reactivos pueden

proporcionarse como polvos secos, habitualmente liofilizados, que incluyen excipientes que con la disolución proporcionarán una solución de reactivo que tiene la concentración apropiada.

Preparaciones farmacéuticas

5 En un aspecto, la invención proporciona formulaciones farmacéuticas que comprenden anticuerpos anti-TNF para el tratamiento de enfermedades mediadas por el TNF. El término "formulación farmacéutica" se refiere a preparaciones que están en tal forma que permiten que la actividad biológica del anticuerpo o derivado de anticuerpo sea inequívocamente efectiva, y que no contenga componentes adicionales que sean tóxicos para los sujetos a los que se administraría la formulación. Los excipientes "farmacéuticamente aceptables" (vehículos, aditivos) son aquellos que pueden administrarse razonablemente a un sujeto mamífero para proporcionar una dosis efectiva del ingrediente activo empleado.

10 Una formulación "estable" es una en la que el anticuerpo o derivado de anticuerpo en el mismo retiene esencialmente su estabilidad física y/o estabilidad química y/o actividad biológica durante el almacenamiento. Diversas técnicas analíticas para medir la estabilidad de proteínas están disponibles en la técnica y se revisan en Peptide and Protein Drug Delivery, 247-301, Vincent Lee Ed., Marcel Dekker, Inc., Nueva York, N.Y., Pubs. (1991) y Jones, A. Adv. Drug Delivery Rev. 10: 29-90 (1993), por ejemplo. La estabilidad se puede medir a una temperatura seleccionada durante un período de tiempo seleccionado. Preferiblemente, la formulación es estable a temperatura ambiente (aproximadamente 30°C) o a 40°C durante al menos 1 mes y/o estable a aproximadamente 2-8°C durante al menos 1 año, durante al menos 2 años. Además, la formulación es preferiblemente estable después de congelación (por ejemplo, a -70°C) y descongelación de la formulación.

20 Un anticuerpo o derivado de anticuerpo "conserva su estabilidad física" en una formulación farmacéutica si no muestra signos de agregación, precipitación y/o desnaturalización tras el examen visual de color y/o transparencia, o como se mide mediante dispersión de luz UV o mediante cromatografía de exclusión por tamaño.

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

30 Un anticuerpo o derivado de anticuerpo "conserva su actividad biológica" en una formulación farmacéutica, si la actividad biológica del anticuerpo en un momento dado está dentro de aproximadamente 10% (dentro de los errores del ensayo) de la actividad biológica exhibida en el tiempo en que la formulación farmacéutica se preparó como se determinó en un ensayo de unión a antígeno, por ejemplo. Otros ensayos de "actividad biológica" para anticuerpos se detallan a continuación.

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

40 Un "poliol" es una sustancia con múltiples grupos hidroxilo, e incluye azúcares (azúcares reductores y no reductores), alcoholes de azúcar y ácidos de azúcares. Los polioles preferidos en la presente invención tienen un peso molecular que es inferior a aproximadamente 600 kD (por ejemplo, en el intervalo de aproximadamente 120 a aproximadamente 400 kD). Un "azúcar reductor" es uno que contiene un grupo hemiacetal que puede reducir iones metálicos o reaccionar covalentemente con lisina y otros grupos amino en proteínas y un "azúcar no reductor" es aquel que no tiene estas propiedades de un azúcar reductor. Los ejemplos de azúcares reductores son fructosa, manosa, maltosa, lactosa, arabinosa, xilosa, ribosa, ramnosa, galactosa y glucosa. Los azúcares no reductores incluyen sacarosa, trehalosa, sorbosa, melecitosa y rafinosa. Manitol, xilitol, eritritol, treitol, sorbitol y glicerol son ejemplos de alcoholes de azúcar. En cuanto a los ácidos de azúcar, estos incluyen L-gluconato y sales metálicas de los mismos. Cuando se desea que la formulación sea estable a la congelación-descongelación, el poliol es preferiblemente uno que no cristaliza a temperaturas de congelación (por ejemplo, -20°C) de manera que desestabilice el anticuerpo en la formulación. Los azúcares no reductores tales como sacarosa y trehalosa son los polioles preferidos en la presente invención, prefiriéndose la trehalosa sobre la sacarosa, debido a la estabilidad de la solución superior de la trehalosa.

55 Tal como se usa en la presente memoria, "regulador" se refiere a una solución regulada que resiste los cambios en el pH por la acción de sus componentes conjugados ácido-base. El regulador de esta invención tiene un pH en el intervalo de aproximadamente 4,5 a aproximadamente 6,0; preferiblemente de aproximadamente 4,8 a aproximadamente 5,5; y lo más preferiblemente tiene un pH de aproximadamente 5,0. Los ejemplos de reguladores que controlarán el pH en este intervalo incluyen acetato (por ejemplo, acetato de sodio), succinato (tal como

succinato de sodio), gluconato, histidina, citrato y otros reguladores de ácidos orgánicos. Cuando se desea una formulación estable al congelamiento-descongelamiento, el regulador preferiblemente no es fosfato.

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

10 Un "conservante" es un compuesto que se puede incluir en la formulación para reducir esencialmente la acción bacteriana en el mismo, facilitando así la producción de una formulación de uso múltiple, por ejemplo. Ejemplos de posibles conservantes incluyen cloruro de octadecildimetilbencil amonio, cloruro de hexametonio, cloruro de benzalconio (una mezcla de cloruros de alquilbencildimetilamonio en la que los grupos alquilo son compuestos de cadena larga) y cloruro de bencetonio. Otros tipos de conservantes incluyen alcoholes aromáticos tales como fenol, butilo y alcohol bencílico, alquil parabenos tales como metil o propil parabeno, catecol, resorcinol, ciclohexanol, 3-pentanol y m-cresol. El conservante más preferido en este documento es alcohol bencílico.

15 La presente invención también proporciona composiciones farmacéuticas que comprenden uno o más anticuerpos o compuestos derivados de anticuerpos, junto con al menos un vehículo o excipiente fisiológicamente aceptable. Las composiciones farmacéuticas pueden comprender, por ejemplo, uno o más de agua, reguladores (por ejemplo, solución salina regulada neutra o solución salina regulada con fosfato), etanol, aceite mineral, aceite vegetal, dimetilsulfóxido, carbohidratos (por ejemplo, glucosa, manosa, sacarosa o dextranos), manitol, proteínas, adyuvantes, polipéptidos o aminoácidos tales como glicina, antioxidantes, agentes quelantes tales como EDTA o glutatión y/o conservantes. Como se indicó anteriormente, otros ingredientes activos pueden (pero no necesitan) incluirse en las composiciones farmacéuticas proporcionadas en este documento.

25 Un vehículo es una sustancia que puede asociarse con un anticuerpo o derivado de anticuerpo antes de la administración a un paciente, a menudo con el fin de controlar la estabilidad o la biodisponibilidad del compuesto. Los vehículos para uso dentro de tales formulaciones son generalmente biocompatibles y también pueden ser biodegradables. Los vehículos incluyen, por ejemplo, moléculas monovalentes o multivalentes tales como albúmina de suero (por ejemplo, humana o bovina), albúmina de huevo, péptidos, polilisina y polisacáridos tales como aminodextrano y poliamidoaminas. Los vehículos también incluyen materiales de soporte sólidos tales como perlas y micropartículas que comprenden, por ejemplo, polilactato, poliglicolato, poli(láctido-co-glicólido), poliácido, látex, almidón, celulosa o dextrano. Un vehículo puede soportar los compuestos en una variedad de formas, que incluyen enlaces covalentes (directamente o a través de un grupo enlazador), interacción o mezcla no covalente.

30 Las composiciones farmacéuticas se pueden formular para cualquier forma de administración apropiada, que incluye, por ejemplo, administración tópica, oral, nasal, rectal o parenteral. En ciertas realizaciones, se prefieren composiciones en una forma adecuada para uso oral. Tales formas incluyen, por ejemplo, píldoras, tabletas, pastillas, grageas, suspensiones acuosas u oleosas, polvos o gránulos dispersables, emulsión, cápsulas duras o blandas, o jarabes o elixires. En aún otras realizaciones, las composiciones proporcionadas en la presente invención pueden formularse como un liofilizado. El término parenteral como se usa en la presente memoria incluye inyección subcutánea, intradérmica, intravascular (por ejemplo, intravenosa), intramuscular, espinal, intracraneal, intratecal e intraperitoneal, así como cualquier técnica de inyección o infusión similar.

35 Las composiciones destinadas para uso oral pueden prepararse de acuerdo con cualquier método conocido en la técnica para la fabricación de composiciones farmacéuticas y pueden contener uno o más agentes, tales como agentes edulcorantes, agentes saborizantes, agentes colorantes; y preservar agentes para proporcionar preparaciones atractivas y apetecibles. Las tabletas contienen el ingrediente activo en mezcla con excipientes fisiológicamente aceptables que son adecuados para la fabricación de tabletas. Tales excipientes incluyen, por ejemplo, diluyentes inertes (por ejemplo, carbonato de calcio, carbonato de sodio, lactosa, fosfato de calcio o fosfato de sodio), agentes de granulación y desintegración (por ejemplo, almidón de maíz o ácido algínico), agentes de unión (por ejemplo, almidón, gelatina o acacia) y agentes lubricantes (por ejemplo, estearato de magnesio, ácido esteárico o talco). Los comprimidos pueden estar sin recubrir o pueden ser recubiertos mediante técnicas conocidas para retrasar la desintegración y la absorción en el tracto gastrointestinal y proporcionar así una acción sostenida durante un período más largo. Por ejemplo, se puede emplear un material retardante tal como monoestearato de glicerilo o diestearato de glicerilo.

45 Las formulaciones para uso oral también pueden presentarse como cápsulas de gelatina dura en las que el ingrediente activo se mezcla con un diluyente sólido inerte (por ejemplo, carbonato de calcio, fosfato de calcio o caolín), o como cápsulas de gelatina blanda en las que el ingrediente activo se mezcla agua o un medio oleoso (por ejemplo, aceite de maní, parafina líquida o aceite de oliva). Las suspensiones acuosas contienen el anticuerpo o derivado del anticuerpo en mezcla con excipientes adecuados para la fabricación de suspensiones acuosas. Tales excipientes incluyen agentes de suspensión (por ejemplo, carboximetilcelulosa de sodio, metilcelulosa, hidropropilmetilcelulosa, alginato de sodio, polivinilpirrolidona, goma de tragacanto y goma arábiga); y agentes dispersantes o humectantes (por ejemplo, fosfátidos naturales tales como lecitina, productos de condensación de

60

5 óxido de alquileno con ácidos grasos tales como estearato de polioxietileno, productos de condensación de óxido de etileno con alcoholes alifáticos de cadena larga tales como heptadecaetilenoxicetanol, productos de condensación de óxido de etileno con ésteres parciales derivados de ácidos grasos y un hexitol tal como monooleato de polioxietileno sorbitol, o productos de condensación de óxido de etileno con ésteres parciales derivados de ácidos grasos y anhídridos de hexitol tales como monooleato de polietileno sorbitán). Las suspensiones acuosas también pueden comprender uno o más conservantes, por ejemplo p-hidroxibenzoato de etilo o n-propilo, uno o más agentes colorantes, uno o más agentes saborizantes y uno o más agentes edulcorantes, tales como sacarosa o sacarina. Los jarabes y elixires se pueden formular con agentes edulcorantes, tales como glicerol, propilenglicol, sorbitol o sacarosa. Dichas formulaciones también pueden comprender uno o más demulcentes, conservantes, agentes saborizantes y/o agentes colorantes.

10 Las suspensiones oleosas pueden formularse suspendiendo los ingredientes activos en un aceite vegetal (por ejemplo, aceite de cacahuete, aceite de oliva, aceite de sésamo o aceite de coco) o en un aceite mineral tal como parafina líquida. Las suspensiones oleosas pueden contener un agente espesante tal como cera de abejas, parafina dura o alcohol cetílico. Se pueden añadir agentes edulcorantes, tales como los expuestos anteriormente, y/o agentes saborizantes para proporcionar preparaciones orales apetecibles. Tales suspensiones se pueden conservar mediante la adición de un antioxidante tal como ácido ascórbico.

15 Los polvos y gránulos dispersables adecuados para la preparación de una suspensión acuosa mediante la adición de agua proporcionan el ingrediente activo en mezcla con un agente dispersante o humectante, agente de suspensión y uno o más conservantes. Los agentes dispersantes o humectantes y los agentes de suspensión adecuados se ejemplifican por los ya mencionados anteriormente. También pueden estar presentes excipientes adicionales, por ejemplo edulcorantes, saborizantes y colorantes.

20 Las composiciones farmacéuticas también pueden estar en forma de emulsiones de aceite en agua. La fase oleosa puede ser un aceite vegetal (por ejemplo, aceite de oliva o aceite de cacahuete), un aceite mineral (por ejemplo, parafina líquida) o una mezcla de los mismos. Los agentes emulsionantes adecuados incluyen gomas naturales (por ejemplo, goma arábica o goma tragacanto), fosfátidos naturales (por ejemplo, soja, lecitina y ésteres o ésteres parciales derivados de ácidos grasos y hexitol), anhídridos (por ejemplo, monooleato de sorbitán) , y productos de condensación de ésteres parciales derivados de ácidos grasos y hexitol con óxido de etileno (por ejemplo, monooleato de polioxietileno sorbitán). Una emulsión también puede comprender uno o más agentes edulcorantes y/o saborizantes.

25 La composición farmacéutica se puede preparar como una suspensión acuosa u oleosa estéril inyectable en la que el modulador, dependiendo del vehículo y la concentración utilizada, se suspende o disuelve en el vehículo. Dicha composición se puede formular de acuerdo con la técnica conocida usando agentes humectantes, dispersantes y/o agentes dispersantes adecuados, tales como los mencionados anteriormente. Entre los vehículos y disolventes aceptables que se pueden emplear se encuentran agua, 1,3-butanodiol, solución de Ringer y solución isotónica de cloruro de sodio. Además, se pueden emplear aceites fijos estériles como disolvente o medio de suspensión. Para este fin, se puede emplear cualquier aceite fijo blando, incluidos mono o diglicéridos sintéticos. Además, se pueden usar ácidos grasos tales como ácido oleico en la preparación de composiciones inyectables, y se pueden disolver adyuvantes tales como anestésicos locales, conservantes y/o agentes reguladores en el vehículo.

30 Las composiciones farmacéuticas se pueden formular como formulaciones de liberación sostenida (es decir, una formulación tal como una cápsula que produce una liberación lenta del modulador después de la administración). Dichas formulaciones pueden prepararse generalmente usando tecnología bien conocida y administrarse, por ejemplo, mediante implantación oral, rectal o subcutánea, o mediante implantación en el sitio objetivo deseado. Los portadores para uso dentro de tales formulaciones son biocompatibles y también pueden ser biodegradables; preferiblemente, la formulación proporciona un nivel relativamente constante de liberación del modulador. La cantidad de un anticuerpo o derivado de anticuerpo contenido en una formulación de liberación sostenida depende, por ejemplo, del sitio de implantación, la velocidad y duración esperada de la liberación y la naturaleza de la enfermedad/trastorno a tratar o prevenir.

35 Los anticuerpos o derivados de anticuerpos proporcionados aquí generalmente se administran en una cantidad que alcanza una concentración en un fluido corporal (por ejemplo, sangre, plasma, suero, líquido cefalorraquídeo, líquido sinovial, linfa, líquido intersticial celular, lágrimas u orina) que es suficiente para unirse de forma detectable al TNF y prevenir o inhibir enfermedades/trastornos mediados por el TNF. Se considera que una dosis es efectiva si da como resultado un beneficio discernible para el paciente como se divulga en este documento. Las dosis sistémicas preferidas varían de aproximadamente 0,1 mg a aproximadamente 140 mg por kilogramo de peso corporal por día (aproximadamente 0,5 mg a aproximadamente 7 g por paciente por día), siendo generalmente las dosis orales aproximadamente 5-20 veces mayores que las dosis intravenosas. La cantidad de anticuerpo o derivado de anticuerpo que se puede combinar con los materiales del vehículo para producir una única forma de dosificación variará dependiendo del huésped tratado y del modo particular de administración. Las formas de unidades de dosificación generalmente contendrán entre aproximadamente 1 mg y aproximadamente 500 mg de un ingrediente activo.

Las composiciones farmacéuticas pueden envasarse para tratar afecciones que responden a un anticuerpo o derivado de anticuerpo dirigido al TNF. Las composiciones farmacéuticas envasadas pueden incluir un recipiente que contiene una cantidad efectiva de al menos un anticuerpo o derivado de anticuerpo como se divulga aquí e instrucciones (por ejemplo, rótulo) que indican que la composición contenida se va a usar para tratar una enfermedad/trastorno sensible a un anticuerpo o derivado de anticuerpo después de la administración en el paciente.

Los anticuerpos o derivados de anticuerpos de la presente invención también se pueden modificar químicamente. Los grupos modificadores preferidos son polímeros, por ejemplo un polialqueno, polialquileno o polioxilquileno de cadena lineal o ramificada opcionalmente sustituido o un polisacárido ramificado o no ramificado. Tal grupo efector puede aumentar la vida media del anticuerpo *in vivo*. Ejemplos particulares de polímeros sintéticos incluyen poli(etilenglicol) (PEG), poli(propilenglicol), poli(vinil alcohol) de cadena lineal o ramificada opcionalmente sustituidos o derivados de los mismos. Los polímeros particulares de origen natural incluyen lactosa, amilosa, dextrano, glucógeno o derivados de los mismos. El tamaño del polímero puede variarse según se desee, pero generalmente estará en un intervalo de peso molecular promedio de 500 Da a 50.000 Da. Para la aplicación local donde el anticuerpo está diseñado para penetrar en el tejido, un peso molecular preferido del polímero es de alrededor de 5.000 Da. La molécula de polímero se puede unir al anticuerpo, en particular al extremo C-terminal de la cadena pesada del fragmento Fab a través de un péptido de bisagra unido covalentemente como se divulga en el documento WO0194585. Con respecto a la unión de unidades estructurales de PEG, se hace referencia a "Poly(ethyleneglycol) Chemistry, Biotechnological and Biomedical Applications", 1992, J. Milton Harris (ed), Plenum Press, Nueva York y "Bioconjugation Protein Coupling Techniques for the Biomedical Sciences", 1998, M. Aslam y A. Dent, Grove Publishers, Nueva York.

Después de la preparación del anticuerpo o derivado de anticuerpo de interés como se describió anteriormente, se prepara la formulación farmacéutica que lo comprende. El anticuerpo a formular no se ha sometido a liofilización previa y la formulación de interés en este documento es una formulación acuosa. Preferiblemente, el anticuerpo o derivado de anticuerpo en la formulación es un fragmento de anticuerpo, tal como un scFv. La cantidad terapéuticamente eficaz de anticuerpo presente en la formulación se determina teniendo en cuenta los volúmenes de dosis y el modo o modos de administración deseados, por ejemplo. De aproximadamente 0,1 mg/mL a aproximadamente 50 mg/mL, preferiblemente de aproximadamente 0,5 mg/mL a aproximadamente 25 mg/mL y lo más preferiblemente de aproximadamente 2 mg/mL a aproximadamente 10 mg/mL es un ejemplo de una concentración de anticuerpo en la formulación.

Se prepara una formulación acuosa que comprende el anticuerpo o derivado de anticuerpo en una solución regulada de pH. El regulador de esta invención tiene un pH en el intervalo de aproximadamente 4,5 a aproximadamente 6,0, preferiblemente de aproximadamente 4,8 a aproximadamente 5,5, y lo más preferiblemente tiene un pH de aproximadamente 5,0. Los ejemplos de reguladores que controlarán el pH dentro de este intervalo incluyen acetato (por ejemplo, acetato de sodio), succinato (tal como succinato de sodio), gluconato, histidina, citrato y otros reguladores de ácidos orgánicos. La concentración de regulador puede ser de aproximadamente 1 mM a aproximadamente 50 mM, preferiblemente de aproximadamente 5 mM a aproximadamente 30 mM, dependiendo, por ejemplo, del regulador y de la isotonicidad deseada de la formulación. El regulador preferido es acetato de sodio (aproximadamente 10 mM), pH 5,0.

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

También se agrega un tensioactivo al anticuerpo o formulación derivada de anticuerpo. Los ejemplos de tensioactivos incluyen tensioactivos no iónicos tales como polisorbatos (por ejemplo, polisorbatos 20, 80, etc.) o poloxámeros (por ejemplo, poloxámero 188). La cantidad de tensioactivo añadida es tal que reduce la agregación del anticuerpo/derivado de anticuerpo formulado y/o minimiza la formación de partículas en la formulación y/o reduce la adsorción. Por ejemplo, el tensioactivo puede estar presente en la formulación en una cantidad de aproximadamente 0,001% a aproximadamente 0,5%, preferiblemente de aproximadamente 0,005% a aproximadamente 0,2% y lo más preferiblemente de aproximadamente 0,01% a aproximadamente 0,1%.

En una realización, la formulación contiene los agentes identificados anteriormente (es decir, anticuerpo o derivado de anticuerpo, regulador, poliol y tensioactivo) y está esencialmente libre de uno o más conservantes, tales como alcohol bencílico, fenol, m-cresol, clorobutanol y cloruro de bencetonio. En otra realización, se puede incluir un conservante en la formulación, particularmente cuando la formulación es una formulación multidosis. La

- concentración de conservante puede estar en el intervalo de aproximadamente 0,1% a aproximadamente 2%, lo más preferiblemente de aproximadamente 0,5% a aproximadamente 1%. Uno o más vehículos, excipientes o estabilizantes farmacéuticamente aceptables tales como los descritos en Remington's Pharmaceutical Sciences 21^a edición, Osol, A. Ed. (2006) pueden incluirse en la formulación siempre que no afecten adversamente a las características deseadas de la formulación. Los vehículos, excipientes o estabilizadores aceptables no son tóxicos para los receptores a las dosis y concentraciones empleadas e incluyen: agentes reguladores adicionales; codisolventes; antioxidantes que incluyen ácido ascórbico y metionina; agentes quelantes tales como EDTA; complejos metálicos (por ejemplo, complejos de Zn-proteína); polímeros biodegradables tales como poliésteres; y/o contraiones formadores de sal tales como sodio.
- 5 Las formulaciones a usar para la administración *in vivo* deben ser estériles. Esto se logra fácilmente por filtración a través de membranas de filtración estériles, antes o después de la preparación de la formulación.
- 10 La formulación se administra a un mamífero que necesita tratamiento con el anticuerpo, preferiblemente un ser humano, de acuerdo con métodos conocidos, tales como administración intravenosa en bolo o mediante infusión continua durante un período de tiempo, por vía intramuscular, intraperitoneal, vías intracerebroespinal, subcutánea, intraarticular, intrasinovial, intratecal, oral, tópica o por inhalación. En realizaciones preferidas, la formulación se administra al mamífero mediante administración intravenosa. Para tales fines, la formulación puede inyectarse usando una jeringa o a través de una línea IV, por ejemplo.
- 15 La dosificación apropiada ("cantidad terapéuticamente efectiva") del anticuerpo dependerá, por ejemplo, de la afección a tratar, la gravedad y el curso de la afección, si el anticuerpo se administra con fines preventivos o terapéuticos, terapia previa, la historia clínica y la respuesta del paciente al anticuerpo, el tipo de anticuerpo utilizado y la discreción del médico tratante. El anticuerpo o derivado de anticuerpo se administra adecuadamente al paciente de una vez o durante una serie de tratamientos y se puede administrar al paciente en cualquier momento desde el diagnóstico en adelante. El anticuerpo o derivado de anticuerpo puede administrarse como el único tratamiento o junto con otros fármacos o terapias útiles en el tratamiento de la afección en cuestión.
- 20 Como una proposición general, la cantidad terapéuticamente eficaz del anticuerpo o derivado de anticuerpo administrado estará en el intervalo de aproximadamente 0,1 a aproximadamente 50 mg/kg de peso corporal del paciente, ya sea en una o más administraciones, siendo el intervalo típico del anticuerpo usado de aproximadamente 0,3 a aproximadamente 20 mg/kg, más preferiblemente de aproximadamente 0,3 a aproximadamente 15 mg/kg, administrado diariamente, por ejemplo. Sin embargo, otros regímenes de dosificación pueden ser útiles. El progreso de esta terapia se controla fácilmente mediante técnicas convencionales.
- 25 30

Artículos de manufactura

- En otra realización de la invención, se proporciona un artículo de fabricación que comprende un recipiente que contiene la formulación farmacéutica de la presente invención, preferiblemente una formulación farmacéutica acuosa, y opcionalmente se proporcionan instrucciones para su uso. Los recipientes adecuados incluyen, por ejemplo, botellas, viales y jeringas. El contenedor puede estar formado por una variedad de materiales tales como vidrio o plástico. Un ejemplo de contenedor es un vial de vidrio de un solo uso de 3-20 cc. Alternativamente, para una formulación multidosis, el recipiente puede ser un vial de vidrio de 3-100 cc. El contenedor contiene la formulación y el rótulo en, o asociados con, el contenedor puede indicar las instrucciones de uso. El artículo de fabricación puede incluir además otros materiales deseables desde un punto de vista comercial y del usuario, que incluyen otros reguladores, diluyentes, filtros, agujas, jeringas e insertos de paquete con instrucciones de uso.
- 35 40

Ejemplificación

La presente divulgación se ilustra adicionalmente mediante los siguientes ejemplos, que no deben interpretarse como una limitación adicional. A lo largo de los ejemplos, se usaron los siguientes materiales y métodos a menos que se indique lo contrario.

45 Materiales y métodos generales

- En general, la práctica de la presente invención emplea, a menos que se indique lo contrario, técnicas convencionales de química, biología molecular, tecnología de ADN recombinante, inmunología (especialmente, por ejemplo, tecnología de anticuerpos) y técnicas estándar de preparación de polipéptidos. Véase, por ejemplo, Sambrook, Fritsch y Maniatis, *Molecular Cloning: Cold Spring Harbor Laboratory Press* (1989); *Antibody Engineering Protocols (Methods in Molecular Biology)*, 510, Paul, S., Humana Pr (1996); *Antibody Engineering: A Practical Approach (Practical Approach Series, 169)*, McCafferty, Ed., Irl Pr (1996); *Antibodies: A Laboratory Manual*, Harlow y col., C.S.H.L. Press, Pub. (1999); y *Current Protocols in Molecular Biology*, eds. Ausubel y col., John Wiley & Sons (1992).
- 50

Mediciones de termoestabilidad

- 55 Se obtuvieron espectros IR por transformada de Fourier de reflectancia total atenuada (FTIR-ATR) para varias cadenas sencillas y moléculas de seguimiento usando la celda Bio-ATR de FT-IR en un Tensor Bruker. Las

moléculas se concentraron hasta 3 mg/mL y se dializaron durante la noche a 4°C frente a PBS, pH 6,5 y el flujo del regulador se recogió como blanco. Los perfiles de desnaturalización se obtuvieron desafiando térmicamente a las moléculas con un amplio rango de temperaturas en etapas de 5°C (25 a 95°C). Todas las manipulaciones de espectros se realizaron usando el software OPUS. El regulador principal y el fondo atmosférico transitorio (CO₂ y H₂O) se restaron del espectro de proteínas. El espectro de proteínas resultante se corrigió entonces en la línea base y los espectros de proteína amida I se determinaron a partir del ancho del pico más amplio que se puede resolver en la región esperada. Los espectros de segunda derivada se obtuvieron para los espectros de banda de amida I usando una función polinómica de tercer grado con una función de suavizado. Los cambios en la estructura de la proteína se estimaron mediante análisis de segunda derivada de amida I usando una curva de calibración lineal para los cálculos iniciales de ajuste de curva asumiendo 0% de desnaturalización para las 3 mediciones más bajas y 100% de desnaturalización para las 3 mediciones más altas. Los perfiles de desnaturalización se utilizaron para aproximar los puntos medios de las transiciones de despliegue térmico (TM) para cada variante que aplica el modelo sigmoidal de Boltzmann.

Mediciones de solubilidad

Se midió la solubilidad relativa de diversas moléculas de scFv después de potenciar la agregación y precipitación de proteínas en presencia de sulfato de amonio. Se añadió sulfato de amonio a la proteína en soluciones acuosas para producir incrementos del 5% de saturación en la mezcla final de sal-proteína. La precipitación en el rango dinámico se determinó empíricamente y los intervalos de saturación se redujeron en este intervalo a intervalos de saturación del 2,5% en la mezcla final. Después de la adición de sulfato de amonio, las muestras se mezclaron suavemente y se centrifugaron durante 30 minutos a 6.000 rpm. La proteína restante en los sobrenadantes se recuperó para cada porcentaje de saturación de sulfato de amonio. Las curvas de solubilidad se determinaron midiendo la concentración de proteína en el sobrenadante usando el espectrofotómetro NanoDrop^{MR} 1000. Las mediciones de la proteína soluble remanente en sobrenadantes se normalizaron y se usaron para estimar puntos medios de solubilidad relativa para cada variante que aplica el modelo sigmoidal de Boltzmann.

Prueba de estabilidad a corto plazo

Se examinó la proteína después de dos semanas de incubación a 40°C para agregados solubles y productos de degradación. Las proteínas con una concentración de 10 mg/mL se dializaron durante la noche a 4°C frente a PBS con un amplio intervalo de pH (3,5; 4,5; 5,5; 6,5; 7,0; 7,5 y 8,5). Se almacenó proteína de control con la misma concentración en regulador estándar PBS (pH 6,5) a -80°C durante el período de 2 semanas. La determinación de las bandas de degradación por SDS-PAGE se realizó en los puntos de tiempo $t = 0$ y $t = 14$ d y los agregados solubles se evaluaron en SEC-HPLC. La determinación de la actividad restante después de 2 semanas a 40°C se realizó con Biacore.

Prueba de potencia

La actividad neutralizante de los enlazantes anti-TNF α se evaluó en un ensayo de citotoxicidad mediada por el TNF α L929. La toxicidad de células de fibroblastos de ratón L929 tratadas con actinomicina se indujo con TNF humano recombinante (hTNF). Se determinó que el 90% de la citotoxicidad máxima inducida por hTNF estaba en una concentración del TNF de 1.000 pg/mL. Todas las células L929 se cultivaron en RPMI 1640 con fenol, con medio L-Glutamina suplementado con suero de ternera fetal (10% v/v). La actividad neutralizante de los enlazadores anti-TNF α se evaluó en RPMI 1640 sin fenol y suero de ternera fetal al 5%. Se agregan diferentes concentraciones (0-374 ng/mL) de enlazadores anti-TNF a las células L929 en presencia de 1.000 pg/mL de hTNF para determinar la concentración a la que el efecto antagonista alcanza la inhibición máxima del 50% (CE50%). La curva de respuesta a la dosis se ajustó con la regresión sigmoidal no lineal con pendiente variable y se calculó la CE50.

Análisis de unión con Biacore de scFv anti-TNF

Para las mediciones de afinidad de unión a pH 5 y pH 7,4 (datos no mostrados), se emplearon medidas de resonancia de Plasmón de superficie con BIACore^{MR}-T100 usando un chip sensor de NTA y TNF marcado con His (producido en ESBATech). La superficie del chip sensor de NTA consiste en una matriz de dextrano carboximetilada inmovilizada previamente con ácido nitrilotriacético (NTA) para la captura de moléculas marcadas con histidina a través de la quelación de Ni²⁺+NTA. Trímeros TNF α N-his humanos (5 nM) son capturados por el níquel a través de sus etiquetas de his N-terminales y ESBA105 (analito) se inyectan a diversas concentraciones que van desde 30 nM hasta 0,014 nM en etapas de dilución en serie de 3 veces. En la etapa de regeneración, el complejo formado por níquel, ligando y analito se elimina por lavado. Esto permite el uso de las mismas condiciones de regeneración para diferentes muestras. La señal de respuesta se genera mediante la tecnología de resonancia de plasmón de superficie (SPR) y se mide en unidades de resonancia (RU). Todas las mediciones se realizan a 25°C. Se generaron los sensogramas para cada muestra de scFv anti-TNF después de la corrección de la celda de referencia en línea seguida de la substracción de la muestra del regulador. La constante de velocidad de disociación aparente (k_d), la constante de velocidad de asociación aparente (k_a) y la constante de equilibrio de disociación aparente (K_D) se calcularon usando el modelo de unión de Langmuir uno a uno con el software de evaluación BIACore T100 versión 1.1.

Ejemplo 1:

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

Injerto de CDR de conejo

5 A diferencia de los métodos de humanización tradicionales que emplean el marco aceptor de anticuerpo humano que comparte la mayor homología de secuencia con el anticuerpo donante no humano, las CDR de conejo se injertaron en cualquiera de los marcos FW1.4 (SEQ ID Nos. 1 y 2, unidos por un enlazador (GGGG)₄ (SEQ ID NO: 72)) para generar un injerto Min o en el marco rFW1.4 "convertido en marco de conejo" (SEQ ID No. 92) o su variante rFW1.4 (v2) (SEQ ID No. 93) para generar un injerto Max. Ambos marcos se seleccionaron principalmente por las propiedades funcionales deseables (solubilidad y estabilidad), idoneidad estructural para acomodar una gran variedad de CDR de conejo y homología razonable con la secuencia de consenso de dominio variable de conejo. El marco rFW1.4 es un derivado de FW1.4 que se modificó adicionalmente con el objetivo de servir como marco aceptor universal para prácticamente cualquier conjunto de CDR de conejo. Aunque la secuencia marco estable y soluble FW1.4 exhibe una alta homología con los anticuerpos de conejo, no es la secuencia más homóloga disponible.

15 Identificación de residuos potencialmente involucrados en la unión

Para cada secuencia de dominio variable de conejo, se identificó la contraparte de línea germinal de conejo más cercana. Si no se pudo establecer la línea germinal más cercana, la secuencia se comparó con el consenso del subgrupo o el consenso de secuencias de conejo con un alto porcentaje de similitud. Los residuos de marco raros se consideraron posibles resultados de la hipermutación somática y, por lo tanto, desempeñan un papel en la unión al antígeno. En consecuencia, tales residuos se consideraron para el injerto en el marco aceptor rFW1.4 o rFW1.4 (v2) para generar injertos Max. Particularmente, se injertaron residuos potencialmente implicados en el contacto directo con antígenos o que influyen en la disposición de VL y VH. Los residuos adicionales descritos para influir en la estructura de la CDR se sustituyeron si es necesario. No se realizaron sustituciones del marco cuando las CDR se injertaron en FW1.4 (injertos Min). Los ejemplos de posiciones del marco que se injertaron para obtener los injertos Max como se describen en este documento se pueden identificar haciendo una alineación de secuencia de las regiones marco de rFW1.4, rFW1.4 (v2) y las secuencias de scFv de interés proporcionadas en este documento. Las herramientas web como se conocen en la técnica se pueden usar, por ejemplo, para dicho fin (por ejemplo, ClustalW disponible el 23 de junio de 2009 en <http://www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw2/index.html> o MultiAlin como la disponible el 23 de junio de 2009 en <http://bioinfo.genotoul.fr/multalin>). Todas las posiciones del marco en las que rFW1.4 y rFW1.4 (v2) contienen el mismo residuo y en las cuales el scFv de interés revela un residuo diferente, son posiciones del marco que se injertaron para obtener los injertos Max.

Mezcla de dominios

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

35 Clonación y expresión de scFv

Los scFv descritos y caracterizados en este documento se produjeron de la siguiente manera. Las secuencias de VL humanizadas y las secuencias de VH humanizadas (SEQ ID NOs: 51-88, sin SEQ ID NO: 72) se conectaron a través del enlazador de SEQ ID NO: 72 para producir un scFv de la siguiente orientación: NH₂-VL-enlazador-VH-COOH (véase, por ejemplo, las SEQ ID NOs: 94-121). En muchos casos, las secuencias de ADN que codifican los diversos scFvs se sintetizaron nuevamente en el proveedor de servicios Entelechon GmbH (www.entelechon.com). Los insertos de ADN resultantes se clonaron en el vector de expresión bacteriana pGMP002 a través de los sitios de restricción NcoI y HindIII introducidos en los extremos 5' y 3' de la secuencia de ADN de scFv, respectivamente. Entre la secuencia de ADN del dominio VL y el dominio VH, se localiza un sitio de restricción BamHI. En algunos casos, el ADN que codifica scFv no se sintetizó nuevamente, pero los constructos que expresan scFv se clonaron mediante mezcla de dominio. Por consiguiente, los dominios VL se escindieron y se introdujeron en los nuevos constructos a través de los sitios de restricción NcoI y BamHI, los dominios VH a través de los sitios de restricción BamHI y HindIII. En otros casos, se introdujeron mutaciones puntuales en el dominio VH y/o VL usando métodos de ensamblaje por PCR del estado de la técnica. La clonación de GMP002 se divulga en el Ejemplo 1 del documento WO2008006235. La producción de los scFv se hizo de forma análoga a la de ESBA105 como se divulga en el Ejemplo 1 del documento WO2008006235.

Ejemplo 2: Perfilado y selección de anticuerpos de donantes de CDR de conejo

El procedimiento experimental general que se siguió para la selección de anticuerpos de conejo ("RabMab") con actividad inhibidora del TNF es el siguiente: los anticuerpos de conejo se emplearon como anticuerpos de donantes para CDR en la generación de inmunoenlazadores del TNF altamente solubles. Los conejos se inmunizaron con TNF α antes de la esplenectomía. Los esplenocitos se aislaron de los conejos para la generación de hibridomas. Se aislaron un total de 44 hibridomas y se perfilaron los sobrenadantes de estos hibridomas por su afinidad de unión, potencia biológica y especificidad de unión.

La Figura 1 representa la capacidad relativa de los sobrenadantes de los 44 hibridomas de RabMab anti-TNF en la neutralización del TNF α *in vivo*. La neutralización se probó midiendo la inhibición de la citotoxicidad del TNF α en fibroblastos L929 de ratón cultivados. Los sobrenadantes muestran diferentes eficacias en el ensayo con L929. Los valores de CE50 (concentración efectiva para lograr 50% de inhibición) se determinaron en cribados primarios (barras azules) y secundarios (barras rojas) y se normalizaron con respecto al mejor rendimiento en cada ensayo. La afinidad de unión al TNF también se midió por análisis BIACore para cada RabMab (barras verdes).

Los RabMab codificados por cada hibridoma también se secuenciaron y las secuencias se sometieron a un análisis filogenético basado en la predicción de los grupos de epítomos. Cuatro RabMab representativos (EPI-6, EPI-19, EPI-34 y EPI-43) con alta actividad de unión y potente actividad neutralizante se seleccionaron de entre diferentes familias filogenéticas como anticuerpos de donantes para el injerto de CDR. Se seleccionaron cuatro (4) RabMab adicionales (EPI-1, EPI-15, EP-35 y EP-42) para injerto de CDR con base en su actividad favorable en un ELISA de secreción (véase la Figura 2).

Ejemplo 3: Injerto de CDR y humanización funcional de anticuerpos de donante de conejo

A diferencia de los métodos de humanización tradicionales que emplean el marco aceptor de anticuerpo humano que comparte la mayor homología de secuencia con el anticuerpo donante no humano, las CDR de conejo se injertaron en un marco humano (FW 1.4) que se preseleccionó por propiedades funcionales deseables (solubilidad y estabilidad) usando un ensayo de control de calidad. Aunque la secuencia de armazón estable y soluble exhibía una alta homología con RabMab, el anticuerpo aceptor seleccionado no es la secuencia más homóloga disponible.

Se generaron varios injertos de CDR para cada uno de los RabMab. El término "injerto Min" o "min" como se usa en el presente documento se refiere a un dominio variable humanizado que se generó mediante injerto de CDR de conejo de un dominio variable de conejo a un marco aceptor humano de origen natural (FW 1.4, SEQ ID Nos. 1 y 2, enlazado por un enlazador (GGGGS)₄ (SEQ ID NO: 72)). No se realizan cambios en las regiones marco. El marco en sí fue preseleccionado por propiedades funcionales deseables (solubilidad y estabilidad). El término "injerto Max" o "max" tal como se usa en el presente documento se refiere a un dominio variable humanizado que se generó mediante injerto de CDR de conejo de un dominio variable de conejo en el marco aceptor humano "RabTor", "convertido en marco de conejo" (rFW1.4, SEQ ID No. 92), o en un derivado del mismo denominado como rFW1.4 (v2) (SEQ ID No. 93). El marco "RabTor" se preparó incorporando residuos de conejo conservados (por lo demás, que son bastante variables en otras especies) en posiciones del marco generalmente involucradas en la estructura y estabilidad del dominio variable de conejo, con el objetivo de generar un marco universalmente aplicable que acepte prácticamente cualquier conjunto de CDR de conejo sin la necesidad de injertar residuos del marco donador que no sea en posiciones que son diferentes en su secuencia progenitora presunta, por ejemplo que se alteraron durante la hipermutación somática y, por lo tanto, posiblemente contribuyen a la unión al antígeno. La secuencia progenitora presunta se define como la contraparte de línea germinal de conejo más cercana y en caso de que no se pueda establecer la contraparte germinal más cercana, el consenso de subgrupo de conejo o el consenso de secuencias de conejo con un alto porcentaje de similitud. "Min-Max" o "minmax" se refieren a un dominio variable humanizado que consiste en una cadena ligera variable del "injerto Min" combinada con una cadena pesada variable del "injerto Max", mientras que "Max-Min" o "maxmin" se refieren a un dominio variable humanizado que consiste en una cadena ligera variable del "injerto Max" combinada con una cadena pesada variable del "injerto Min".

La Tabla 2 muestra un resumen de los datos de caracterización detallados para anticuerpos humanizados de cadena sencilla que se originan a partir de ocho anticuerpos monoclonales de conejo diferentes o RabMab (EP1, EP6, EP15, EP19, EP34, EP35, EP42 y EP43). Los llamados injertos "min" (por ejemplo, EP1min) se refieren a constructos para los que solo se injertaron las CDR del donante de conejo, mientras que para los injertos llamados "max", no solo las CDR, sino también algunas posiciones de aminoácidos en el marco donador fueron injertadas. Además, la tabla 2 muestra los datos de dos anticuerpos de cadena sencilla marcados con His (EP34min_C-His y EP19max_C-His), así como el anticuerpo de referencia de cadena sencilla ESBA105 descrito en el documento WO 2006/131013. La tercera columna, denominada "L929" indica las potencias relativas de los diferentes anticuerpos de cadena sencilla según se determina en un ensayo de L929 y en comparación con la potencia de ESBA105. Los valores de k_{on} , k_{off} y K_D se expresan en unidades de $M^{-1}s^{-1}$, s^{-1} y M , respectivamente. La séptima columna presenta el punto medio del despliegue inducido térmicamente como se determina con FT-IR. La última columna indica el rendimiento relativo de proteína plegada correctamente obtenida a partir de cuerpos de inclusión solubilizados después de un enfoque de repliegamiento.

Algunos ejemplos de datos BIACore que se incluyeron en la tabla 2 se presentan en la figura 3: se muestran la cinética de unión para ESBA105 (Fig. 3a), EP43max (Fig. 3b) y EP34max (Fig. 3c) que se unen al TNF α humano. Los ejemplos de ensayos de potencia celular se presentan en la figura 4, que compara ESBA105 (círculos rellenos) contra EP43max (cuadrados sin relleno) en un ensayo de L929. En las figuras 9 y 10 se dan ejemplos adicionales de ensayos de potencia celular que comparan EP34max con los anticuerpos comercializados infliximab y adalimumab.

Tabla 2: Resumen de los datos de caracterización detallados para los cuatro monoclonales de conejo (EP6, EP19, EP34 y EP43) y sus variantes injertadas en la CDR.

Descripción	ID	L929*	Kon	Koff	KD	FT-IR TM °C	Rendimiento de RF**
EP1_min	1071	ND***	-	-	-	-	2
EP6_min	673	ND***	4,76E+04	4,94E-03	1,06E-07	50,2	35
EP15_min	1073	ND***	1,57E+05	4,10E-02	2,62E-07	-	41,5
EP19_min	616	ND***	-	-	-	-	-
EP34_min	643	ND***	-	-	-	-	-
EP35_min	1075	ND***	-	-	-	-	1
EP42_min	1076	ND***	1,42E+05	8,35E-03	5,87E-08	-	3
EP43_min	705	ND***	5,38E+03	2,98E-02	5,54E-06	70,2	30,0
EP1_min	1072	ND***	1,11E+04	6,30E-04	5,69E-08	-	44
EP6_min	674	1,1	2,84E+05	1,45E-04	5,12E-10	48,1	12
EP15_min	1074	0,39	1,53E+06	2,26E-03	1,48E-09	68,6	57,8
EP19_min	1007	0,6	2,25E+04	6,54E-05	2,91E-09	53,5	52
EP34_min	791	10,5	5,86E+05	1,68E-05	2,86E-11	72,4	4,05
EP35_min	1089	5,20	7,72E+05	1,50E-04	1,94E-10	-	0,66
EP42_min	1077	ND***	1,21E+05	4,19E-04	3,46E-09	-	47,6
EP43_min	676	6,4	1,78E+05	4,48E-05	2,51E-10	74,3	21,73
EP34_min_C-His	790	0,2					
EP19_min_C-His	789	1,9					

*L929[CE50 -E105/CE50-X], comparado en unidades de masa [ng/mL] con respecto al rendimiento de ESBA105 (WO06/131013); ** (mg/mL de solución de repliegue); *** No de terminado

Ejemplo 4: Optimización de la solubilidad y la estabilidad de EP43max, un potente ligante del TNF α

- 5 Se seleccionó EP43max para optimización adicional con base en su potente actividad de unión al TNF. La caracterización biofísica de este inmunoenzimador reveló que presenta un alto punto medio de desnaturalización ($T_m > 70^\circ\text{C}$) en un ensayo de despliegue térmico (FTIR) (véase la Figura 5). Sin embargo, EP43max se sometió a una optimización de la solubilidad para reducir su amplia fase de transición en despliegue térmico. Con el fin de mejorar la solubilidad del EP43max nativo, las tres posiciones de residuos 12, 103 o 144 en la cadena VH se sustituyeron con aminoácidos con una mayor hidrofiliidad. Se demostró que esta combinación aumenta la solubilidad de la proteína nativa sin afectar la estabilidad o la actividad de unión. (V \rightarrow S en la posición AHo 12, V \rightarrow T en la posición AHo 103, y L \rightarrow T en la posición AHo 144) para reemplazar los residuos hidrófobos en la interfaz del dominio V-C de la región de cadena pesada variable (VH) de EP43max. Además de las mutaciones potenciadoras de la solubilidad, se identificaron nueve mutaciones estabilizadoras (T10S, K47R, Y57S, L91F y T103V en VL y E1Q, E6Q, S7T y V103L I en la VH) en EP43max (véase la Tabla 3). Estos residuos estabilizadores se identificaron a partir de un análisis de consenso funcional de los marcos de control de calidad (QC) de ESBAtech. Los residuos estabilizadores en las posiciones 1 y 3 en la VL y la posición 89 en la VH ya estaban presentes en la molécula EP43max. Se identificó una mutación estabilizadora adicional (M \rightarrow L) en la posición 4 de la VL, pero se eliminó de la consideración en función del papel predicho en la unión al antígeno.

20

Tabla 3: Mutaciones estabilizadoras en EP43max

Dominio	Posición	Residuo Parental	Sustitución Preferida	Mutación Estabilizadora
VL	1	E	E	Ya presente
VL	3	V	V	Ya presente
VL	4	M	L	Involucrada en la unión T10S
VL	10	T	S	
VL	47	K	R	K47R
VL	57	Y	S	Y57S
VL	91	L	F	L91F
VL	103	T	V	T103V
VH	1	E	Q	E1Q
VH	6	E	Q	E6Q
VH	7	S	T	S7T
VH	89	V	V	Ya presente
VH	103	V	L	V103L

Columna 1, dominio variable. Columna 2, posición del aminoácido según AHO. Columna 3, residuo parental en EP43max. Columna 4, sustitución preferida para la posición indicada en la columna 2. Columna 5, mutación estabilizadora.

Ejemplo 5: Variantes optimizadas de EP43max, un potente enlazador del TNF α

Las tablas 4 y 5 muestran los datos de caracterización para tres variantes optimizadas de EP43max. EP43_maxDHP es una variante mejorada de solubilidad de EP43max y comprende las tres mutaciones potenciadoras de la solubilidad anteriores (V \rightarrow S en la posición AHO 12, V \rightarrow T en la posición AHO 103, y L \rightarrow T en la posición AHO 144). Las variantes de EP43_maxmin y EP43_minmax se generaron mediante el cambio de dominio entre injertos "min" y "max". Por ejemplo, la variante "minmax" comprende la versión de injerto mínima (injerto CDR únicamente) de la cadena ligera y la versión de injerto máxima de la cadena pesada (es decir, CDR de conejo injertados más residuos de marco de conejo implicados en la unión al antígeno) mientras que la variante "maxmin" comprendía la versión de injerto máxima de la cadena ligera y la versión de injerto mínima de la cadena pesada.

Tabla 4: Datos de caracterización para EP43max y variantes de la misma.

	FW	L929*	Kon	Koff	KD	Estabilidad por FT-IR TM °C
EP43_max	1,4	6,4	2,28E+05	5,68E-05	2,49E-10	74,32
EP43_maxDHP	1,4	6,7	2,35E+05	2,73E-05	1,16E-10	60,15
EP43_maxmin	1,4	Inactivo	1,46E+05	5,33E-03	3,66E-08	51,76
EP43_minmax	1,4	1,6	2,28E+05	1,98E-04	8,68E-10	65,81
*L929 [CE50-E105/CE50-X], comparado en unidades de masa [ng/mL]						

Tabla 5: Datos de caracterización para EP43max y variantes de la misma.

	Rendimiento de RF	Expresión	Cribado de repliegue	Purificación
EP43_max	27,73	+++	Sí	Sí
EP43_maxDHP	17	+++	Sí	Sí
EP43_maxmin	11	+++	Sí	Sí
EP43_minmax	46	+++	Sí	Sí

Las curvas de desnaturalización térmica de EP43max y sus variantes optimizadas se compararon mediante análisis FTIR (véase la Figura 6 y la Tabla 6). Se encontró que EP43minmax tiene un punto medio de despliegue menor que EP43max.

Tabla 6: Comparación de las curvas de desnaturalización térmica de EP43max y sus variantes optimizadas mediante análisis FTIR

	EP43maxDHP	EP43maxmin (959)	EP43max (676)	EP43minmax (958)
Tm °C	60,15	65,81	77,78	51,76
Pendiente	2,618	2,908	10,43	4,297
R2	0,9974	0,9969	0,9855	0,9936

Además, la variante mimax exhibió una transición de despliegue de una etapa, lo que indica que ambos dominios se despliegan a temperaturas muy similares. EP43max (Figura 7A) y su variante EP43minmax (Figura 7B) se compararon adicionalmente en una prueba de estrés térmico. El contenido de la lámina beta y la concentración de proteína soluble se evaluaron después de la concentración térmica a temperaturas crecientes (50, 60 y 70°C). EP43minmax era considerablemente más estable que EP43max a la temperatura intermedia de 60°C.

Ejemplo 6: Comparación de EP34max con enlazadores del TNF α disponibles comercialmente

Se comparó la capacidad de EP34max, Adalimumab e Infliximab para bloquear la actividad citotóxica de 1.000 pg/mL del TNF alfa humano recombinante como se detalla anteriormente en un ensayo en L929. La capacidad de EP34max, Adalimumab e Infliximab, para bloquear la actividad citotóxica de 10 pg/mL del TNF α recombinante humano se evaluó en un ensayo de Kym-1. Los resultados se muestran en las Figuras 9a, b y las Figuras 10a, b, respectivamente.

La Figura 9a ilustra la potencia de EP34max y Adalimumab para bloquear la actividad citotóxica de 1.000 pg/mL del TNF α humano recombinante (células murinas L929). Se determinó que CI₅₀ para EP34max y Adalimumab era de 1,03 ng/mL y 8,45 ng/mL, respectivamente. La Figura 9b ilustra la potencia de Adalimumab y EP34max para bloquear la actividad citotóxica de 10 pg/mL del TNF α humano recombinante (células Kym-1 humanas). Se determinó que la CI₅₀ para Adalimumab y EP34max (791) era de 66,2 ng/mL y 0,69 ng/mL, respectivamente.

La Figura 10a ilustra la potencia de EP34max e Infliximab para bloquear la actividad citotóxica de 1.000 pg/mL del TNF alfa humano recombinante (células murinas L929). Se determinó que la CI₅₀ para EP34max e Infliximab era de 1,04 ng/mL y 13,9 ng/mL, respectivamente. La Figura 10b ilustra la potencia de Infliximab y EP34max (791) para bloquear la actividad citotóxica de 10 pg/mL del TNF α humano recombinante (células Kym-1 humanas). Se determinó que la CI₅₀ para Infliximab y EP34max era de 14,98 ng/mL y 0,63 ng/mL, respectivamente. Por lo tanto, en ambos casos, EP34max mostró un mejor rendimiento que Infliximab.

Equivalentes

Numerosas modificaciones y realizaciones alternativas de la presente invención serán evidentes para los expertos en la técnica en vista de la descripción anterior. En consecuencia, esta descripción se debe considerar como ilustrativa solamente y tiene el propósito de enseñar a los expertos en la técnica el mejor modo para llevar a cabo la presente invención.

En el caso de que una o más de las publicaciones citadas y materiales similares difieran o contradigan esta solicitud, incluyendo términos definidos, uso de términos, técnicas descritas o similares, primará esta solicitud.

Los encabezados de sección utilizados en este documento son solo para fines de organización y no deben interpretarse como que limitan el tema descrito de ninguna manera.

Aunque las presentes invenciones se han descrito junto con diversas realizaciones y ejemplos, no se pretende que las presentes enseñanzas se limiten a dichas realizaciones o ejemplos.

- 5 Listado de Secuencias
 <110> ESBATech AG
 <120> Anticuerpos estables y solubles que inhiben TNFalfa
 <130> EP79178 FZRPpau
 <140> 09768692.7
- 10 <141> 2009-06-25
 <150> PCT/CH2009/000219
 <151> 2009-06-25
 <150> US61/155.041
 <151> 2009-02-24
- 15 <150> US61/075.640
 <151> 2008-06-25
 <150> US61/075.697
 <151> 2008-06-25
 <150> US61/075.692
- 20 <151> 2008-06-25
 <150> US61/075.956
 <151> 2008-06-26
 <160> 122
 <170> PatentIn versión 3.5
- 25 <210> 1
 <211> 230
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <220>
- 30 <221> Características _misc
 <222> (24)..(73)
 <223> CDR1; al menos 3 y hasta 50 aminoácidos pueden estar presentes o ausentes; Xaa puede ser cualquier aminoácido natural
 <220>
- 35 <221> Características _misc
 <222> (89)..(138)
 <223> CDR2; al menos 3 y hasta 50 aminoácidos pueden estar presentes o ausentes; Xaa puede ser cualquier aminoácido natural

<220>

<221> Características _misc

<222> (170)..(219)

5 <223> CDR3; al menos 3 y hasta 50 aminoácidos pueden estar presentes o ausentes; Xaa puede ser cualquier aminoácido natural

<400> 1

ES 2 687 259 T3

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

<210> 2

<211> 232

<212> PRT

5 <213> Homo sapiens

<220>

<221> CDP

<222> (26)..(75)

<223> CDR1; al menos 3 y hasta 50 aminoácidos pueden estar presentes o ausentes; Xaa puede ser cualquier aminoácido natural

5 <220>

<221> CDP

<222> (90)..(139)

<223> CDR2; al menos 3 y hasta 50 aminoácidos pueden estar presentes o ausentes; Xaa puede ser cualquier aminoácido natural

10 <220>

<221> CDP

<222> (172)..(221)

<223> CDR3; al menos 3 y hasta 50 aminoácidos pueden estar presentes o ausentes; Xaa puede ser cualquier aminoácido natural

15 <400> 2

ES 2 687 259 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 Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
 20 25 30

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
 35 40 45

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
 50 55 60

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Trp Val Arg Gln Ala
 65 70 75 80

Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ser Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
 85 90 95

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
 100 105 110

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
 115 120 125

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Arg Phe Thr Ile Ser
 130 135 140

Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg
 145 150 155 160

Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Lys Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
 165 170 175

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
 180 185 190

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
 195 200 205

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Trp Gly Gln
 210 215 220

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 225 230

<210> 3

<211> 10

<212> PRT

5 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> EP43 CDR-H1

ES 2 687 259 T3

<400> 3

Gly Phe Ser Leu Ser Ser Gly Ala Met Ser
1 5 10

<210> 4

<211> 16

5 <212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> EP43 CDR-H2

<400> 4

10 Val Ile Ile Ser Ser Gly Ala Thr Tyr Tyr Ala Ser Trp Ala Lys Gly
1 5 10 15

<210> 5

<211> 14

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

15 <220>

<223> EP-43 CDR-H3

<400> 5

Gly Gly Pro Asp Asp Ser Asn Ser Met Gly Thr Phe Asp Pro
1 5 10

<210> 6

20 <211> 11

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> EP43 CDR-L1

25 <400> 6

Gln Ala Ser Gln Ser Ile Ser Asp Trp Leu Ala
1 5 10

<210> 7

<211> 7

<212> PRT

30 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> EP43 CDR-L2

<400> 7

ES 2 687 259 T3

Gly Ala Ser Arg Leu Ala Ser
1 5

<210> 8

<211> 12

<212> PRT

5 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> EP43 CDR-L3

<400> 8

Gln Gln Gly Trp Ser Asp Ser Tyr Val Asp Asn Leu
1 5 10

10 <210> 9

<211> 10

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

15 <223> EP1 CDR-H1

<400> 9

Gly Ile Asp Leu Ser Asn Asp Ala Ile Ser
1 5 10

<210> 10

<211> 16

20 <212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> EP1 CDR-H2

<400> 10

Tyr Ile Ser Asp Trp Ser Ile Arg Tyr Tyr Ala Asn Trp Ala Gln Gly
1 5 10 15

25

<210> 11

<211> 10

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

30 <220>

<223> EP1 CDR-H3

<400> 11

Gly Ala Pro Gly Ala Gly Asp Asn Gly Ile
1 5 10

ES 2 687 259 T3

<210> 12

<211> 13

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

5 <220>

<223> EP1 CDR-L1

<400> 12

Gln Ser Thr Glu Ser Val Tyr Lys Asn Asn Tyr Leu Ala
1 5 10

<210> 13

10 <211> 7

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> EP1 CDR-L2

15 <400> 13

Asp Ala Ser Thr Leu Ala Ser
1 5

<210> 14

<211> 14

<212> PRT

20 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> EP1 CDR-L3

<400> 14

Ala Gly Tyr Tyr Arg Ser Gly Ser Gly Thr Ala Asn Gly Ser
1 5 10

25 <210> 15

<211> 10

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

30 <223> EP6 CDR-H1

<400> 15

Gly Phe Ser Leu Ser Arg Tyr Gly Val Ser
1 5 10

<210> 16

<211> 16

ES 2 687 259 T3

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> EP6 CDR-H2

5 <400> 16

Thr Ile Gly Glu Ala Gly Arg Ala Tyr Tyr Ala Asn Trp Ala Arg Ser
 1 5 10 15

<210> 17

<211> 13

<212> PRT

10 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> EP6 CDR-H3

<400> 17

Gly Glu Val Phe Asn Asn Gly Trp Gly Ala Phe Asn Ile
 1 5 10

15 <210> 18

<211> 11

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

20 <223> EP6 CDR-L1

<400> 18

Gln Ala Ser Glu Ser Ile Tyr Ser Gly Leu Ala
 1 5 10

<210> 19

<211> 7

25 <212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> EP6 CDR-L2

<400> 19

Gln Ala Ser Thr Leu Ala Ser
 1 5

30

<210> 20

<211> 12

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

ES 2 687 259 T3

<220>

<223> EP6 CDR-L3

<400> 20

Gln Gln Gly Phe Gly Thr Ser Asn Val Glu Asn Pro
1 5 10

5 <210> 21

<211> 10

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

10 <223> EP15 CDR-H1

<400> 21

Gly Phe Ser Leu Ser Arg Tyr Gly Val Ser
1 5 10

<210> 22

<211> 16

15 <212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> EP15 CDR-H2

<400> 22

Ala Ile Gly Glu Thr Gly Arg Ala Tyr Tyr Ala Asn Trp Ala Lys Ser
1 5 10 15

20

<210> 23

<211> 13

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

25 <220>

<223> EP15 CDR-H3

<400> 23

Gly Glu Glu Phe Asn Asn Gly Trp Gly Ala Phe Asn Ile
1 5 10

<210> 24

30 <211> 11

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> EP15 CDR-L1

ES 2 687 259 T3

<400> 24

Gln Ala Ser Glu Asn Ile Tyr Thr Ser Leu Ala
1 5 10

<210> 25

<211> 7

5 <212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> EP15 CDR-L2

<400> 25

Ser Ala Ser Thr Leu Ala Ser
1 5

10

<210> 26

<211> 12

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

15 <220>

<223> EP15 CDR-L3

<400> 26

Gln Gln Gly Phe Ala Thr Ser Asn Val Glu Asn Pro
1 5 10

<210> 27

20 <211> 10

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> EP19 CDR-H1

25 <400> 27

Gly Phe Ser Leu Asn Ser Asn Glu Ile Ser
1 5 10

<210> 28

<211> 16

<212> PRT

30 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> EP19 CDR-H2

<400> 28

ES 2 687 259 T3

Tyr Ile Gly Asn Gly Gly Met Thr His Tyr Ala Ser Trp Ala Lys Gly
1 5 10 15

<210> 29

<211> 12

<212> PRT

5 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> EP19 CDR-H3

<400> 29

Ser Val Glu Tyr Thr Asp Leu Tyr Tyr Leu Asn Ile
1 5 10

10 <210> 30

<211> 11

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

15 <223> EP19 CDR-L1

<400> 30

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

<210> 31

<211> 7

20 <212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> EP19 CDR-L2

<400> 31

Asp Ala Ser Thr Leu Gln Ser
1 5

25

<210> 32

<211> 13

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

30 <220>

<223> EP19 CDR-L3

<400> 32

Leu Gly Val Tyr Gly Tyr Ser Ser Asp Asp Gly Ala Ala
1 5 10

ES 2 687 259 T3

<210> 33

<211> 11

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

5 <220>

<223> EP34 CDR-H1

<400> 33

Gly Phe Thr Ile Ser Arg Ser Tyr Trp Ile Cys
1 5 10

<210> 34

10 <211> 18

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> EP34 CDR-H2

15 <400> 34

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

Lys Gly

<210> 35

<211> 10

<212> PRT

20 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> EP34 CDR-H3

<400> 35

Leu Gly Tyr Ala Asp Tyr Ala Tyr Asp Leu
1 5 10

25 <210> 36

<211> 13

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

30 <223> EP34 CDR-L1

<400> 36

Gln Ser Ser Gln Ser Val Tyr Gly Asn Ile Trp Met Ala
1 5 10

ES 2 687 259 T3

<210> 37

<211> 7

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

5 <220>

<223> EP34 CDR-L2

<400> 37

Gln Ala Ser Lys Leu Ala Ser
1 5

<210> 38

10 <211> 11

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> EP34 CDR-L3

15 <400> 38

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

<210> 39

<211> 11

<212> PRT

20 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> EP35 CDR-H1

<400> 39

Gly Phe Ser Phe Ser Val Gly Tyr Trp Ile Cys
1 5 10

25 <210> 40

<211> 18

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

30 <223> EP35 CDR-H2

<400> 40

Cys Ile Asp Ala Gly Thr Ser Gly Gly Thr Tyr Tyr Ala Thr Trp Ala
1 5 10 15

Lys Gly

ES 2 687 259 T3

<210> 41

<211> 11

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

5 <220>

<223> EP35 CDR-H3

<400> 41

Gly Val Ser Ser Asn Gly Tyr Tyr Phe Lys Leu

1

5

10

<210> 42

10 <211> 11

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> EP35 CDR-L1

15 <400> 42

Gln Ala Ser Gln Ser Ile Ser Asn Leu Leu Ala

1

5

10

<210> 43

<211> 7

<212> PRT

20 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> EP35 CDR-L2

<400> 43

Ala Ala Ser Lys Leu Ala Ser

1

5

25 <210> 44

<211> 12

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

30 <223> EP35 CDR-L3

<400> 44

Gln Gln Gly Trp Ser His Thr Asn Val Asp Asn Thr

1

5

10

ES 2 687 259 T3

<210> 45

<211> 10

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

5 <220>

<223> EP42 CDR-H1

<400> 45

Gly Ile Asp Leu Arg Asn Asp Ala Ile Ser
1 5 10

<210> 46

10 <211> 16

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> EP42 CDR-H2

15 <400> 46

Tyr Ile Ser Asp Trp Gly Ile Lys Tyr Tyr Ala Ser Trp Val Lys Gly
1 5 10 15

<210> 47

<211> 10

<212> PRT

20 <213> Secuencia Artificial

Gly Ala Pro Gly Ala Gly Asp Asn Gly Ile
1 5 10

<210> 48

<211> 13

<212> PRT

25 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> EP42 CDR-L1

<400> 48

Gln Ser Thr Glu Ser Val Tyr Lys Asn Asn Tyr Leu Ala
1 5 10

30 <210> 49

<211> 7

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

ES 2 687 259 T3

<220>

<223> EP42 CDR-L2

<400> 49

Asp Ala Ser Thr Leu Ala Ser
1 5

5 <210> 50

<211> 13

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

10 <223> EP42 CDR-L3

<400> 50

Ala Gly Tyr Tyr Arg Ser Gly Phe Gly Thr Ala Asn Gly

1

5

10

<210> 51

<211> 122

15 <212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> EP43min VH

<400> 51

ES 2 687 259 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 Phe Ser Leu Ser Ser Gly
 20 25 30

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

Ser Val Ile Ile Ser Ser Gly Ala Thr Tyr Tyr Ala Ser Trp Ala Lys
 50 55 60

Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu
 65 70 75 80

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

Lys Gly Gly Pro Asp Asp Ser Asn Ser Met Gly Thr Phe Asp Pro Trp
 100 105 110

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

<210> 52

<211> 111

<212> PRT

5 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> EP43min VL

<400> 52

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

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

ES 2 687 259 T3

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

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

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

Asp Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Gly Trp Ser Asp Ser Tyr
 85 90 95

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

<210> 53

<211> 122

<212> PRT

5 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> EP43max VH

<400> 53

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

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

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

Gly Val Ile Ile Ser Ser Gly Ala Thr Tyr Tyr Ala Ser Trp Ala Lys
 50 55 60

Gly Arg Phe Thr Ile Ser Lys Asp Thr Ser Lys Asn Thr Val Tyr Leu
 65 70 75 80

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

Arg Gly Gly Pro Asp Asp Ser Asn Ser Met Gly Thr Phe Asp Pro Trp
 100 105 110

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

10 <210> 54

<211> 111

<212> PRT

ES 2 687 259 T3

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> EP43max VL

<400> 54

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

5

<210> 55

<211> 122

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

10

<220>

<223> EP43maxDHP VH

<400> 55

ES 2 687 259 T3

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

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

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

Gly Val Ile Ile Ser Ser Gly Ala Thr Tyr Tyr Ala Ser Trp Ala Lys
 50 55 60

Gly Arg Phe Thr Ile Ser Lys Asp Thr Ser Lys Asn Thr Val Tyr Leu
 65 70 75 80

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

Arg Gly Gly Pro Asp Asp Ser Asn Ser Met Gly Thr Phe Asp Pro Trp
 100 105 110

Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 56

<211> 111

<212> PRT

5 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> EP43minmaxVL:T22K VL

<400> 56

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

Asp Arg Val Ile Ile Lys Cys Gln Ala Ser Gln Ser Ile Ser Asp Trp
 20 25 30

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

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

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

Asp Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Gly Trp Ser Asp Ser Tyr
 85 90 95

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

ES 2 687 259 T3

<210> 57

<211> 111

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

5 <220>

<223> EP43minmaxVL:V58F VL

<400> 57

```

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

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

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

Tyr Gly Ala Ser Arg Leu Ala Ser Gly Phe Pro Ser Arg Phe Ser Gly
           50           55           60

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

Asp Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Gly Trp Ser Asp Ser Tyr
           85           90           95

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

<210> 58

10 <211> 111

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> EP43minmaxVL:Q79E VL

15 <400> 58

ES 2 687 259 T3

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

<210> 59

<211> 111

5 <212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> EP43minmaxVL:D81A VL

<400> 59

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

10

<210> 60

<211> 118

ES 2 687 259 T3

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> EP1min VH

5 <400> 60

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

<210> 61

<211> 115

<212> PRT

10 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> EP1min VL

<400> 61

ES 2 687 259 T3

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

<210> 62

<211> 118

<212> PRT

5 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> EP1max VH

<400> 62

ES 2 687 259 T3

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

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

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

Ala Tyr Ile Ser Asp Trp Ser Ile Arg Tyr Tyr Ala Asn Trp Ala Gln
 50 55 60

Gly Arg Phe Thr Ile Ser Lys Asp Thr Ser Lys Asn Thr Val Tyr Leu
 65 70 75 80

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

Arg Gly Ala Pro Gly Ala Gly Asp Asn Gly Ile Trp Gly Gln Gly Thr
 100 105 110

Thr Val Thr Val Ser Ser
 115

<210> 63

<211> 115

<212> PRT

5 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> EP1max VL

<400> 63

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

Asp Arg Val Ile Ile Thr Cys Gln Ser Thr Glu Ser Val Tyr Lys Asn
 20 25 30

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

ES 2 687 259 T3

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

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

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

Gly Ser Gly Thr Ala Asn Gly Ser Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Thr
100 105 110

Val Leu Gly
115

<210> 64

<211> 121

<212> PRT

5 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> EP6min VH

<400> 64

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

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

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

Ser Thr Ile Gly Glu Ala Gly Arg Ala Tyr Tyr Ala Asn Trp Ala Arg
50 55 60

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

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

Lys Gly Glu Val Phe Asn Asn Gly Trp Gly Ala Phe Asn Ile Trp Gly
100 105 110

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

10 <210> 65

<211> 111

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

ES 2 687 259 T3

<220>

<223> EP6min VL

<400> 65

```
Glu Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ser Thr Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1                               5                               10                               15

Asp Arg Val Ile Ile Thr Cys Gln Ala Ser Glu Ser Ile Tyr Ser Gly
                20                               25                               30

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

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

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

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

Val Glu Asn Pro Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly
          100                               105                               110
```

5 <210> 66

<211> 121

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

10 <223> EP6max VH

<400> 66

ES 2 687 259 T3

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

<210> 67

<211> 111

<212> PRT

5 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> EP6max VL

<400> 67

ES 2 687 259 T3

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

<210> 68

<211> 121

<212> PRT

5 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> EP15min VH

<400> 68

ES 2 687 259 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 Phe Thr Phe Ser Arg Tyr
 20 25 30
 Gly Val Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ser Ala Ile Gly Glu Thr Gly Arg Ala Tyr Tyr Ala Asn Trp Ala Lys
 50 55 60
 Ser Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu
 65 70 75 80
 Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
 85 90 95
 Lys Gly Glu Glu Phe Asn Asn Gly Trp Gly Ala Phe Asn Ile Trp Gly
 100 105 110
 Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 69

<211> 111

<212> PRT

5 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> EP15min VL

<400> 69

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

ES 2 687 259 T3

<210> 70

<211> 121

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

5 <220>

<223> EP15max VH

<400> 70

```

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

```

<210> 71

10 <211> 111

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> EP15max VL

15 <400> 71

ES 2 687 259 T3

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

<210> 72

<211> 20

<212> PRT

5 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> enlazador de glicina-serina

<400> 72

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
 1 5 10 15
 Gly Gly Gly Ser
 20

10 <210> 73

<211> 120

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

15 <223> EP19maxmod

<400> 73

ES 2 687 259 T3

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

<210> 74

<211> 112

<212> PRT

5 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> EP19maxmod VL

<400> 74

ES 2 687 259 T3

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

Asp Arg Val Ile Ile Thr Cys Gln Ala Ser Asp Asn Ile Tyr Arg Gly
20 25 30

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

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

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

Asp Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Leu Gly Val Tyr Gly Tyr Ser Ser
85 90 95

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

<210> 75

<211> 120

<212> PRT

5 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> EP19minmod VH

<400> 75

ES 2 687 259 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 Phe Ser Leu Asn Ser Asn
 20 25 30

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

Ser Tyr Ile Gly Asn Gly Gly Met Thr His Tyr Ala Ser Trp Ala Lys
 50 55 60

Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu
 65 70 75 80

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

Lys Ser Val Glu Tyr Thr Asp Leu Tyr Tyr Leu Asn Ile Trp Gly Gln
 100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 76

<211> 112

<212> PRT

5 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> EP19minmod VL

<400> 76

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

Asp Arg Val Ile Ile Thr Cys Gln Ala Ser Asp Asn Ile Tyr Arg Gly
 20 25 30

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

Tyr Asp Ala Ser Thr Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly

ES 2 687 259 T3

50 55 60

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

Asp Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Leu Gly Val Tyr Gly Tyr Ser Ser
85 90 95

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

<210> 77

<211> 121

<212> PRT

5 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> EP34min VH

<400> 77

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

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

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

Val Ser Cys Ile Tyr Gly Asp Asn Asp Ile Thr Pro Leu Tyr Ala Asn
50 55 60

Trp Ala Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr
65 70 75 80

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

Tyr Cys Ala Lys Leu Gly Tyr Ala Asp Tyr Ala Tyr Asp Leu Trp Gly
100 105 110

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

10 <210> 78

<211> 112

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

15 <223> EP34min VL

ES 2 687 259 T3

<400> 78

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

<210> 79

<211> 121

5 <212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> EP34max VH

<400> 79

ES 2 687 259 T3

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

<210> 80

<211> 112

<212> PRT

5 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> EP34max VL

<400> 80

ES 2 687 259 T3

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

Asp Arg Val Ile Ile Thr Cys Gln Ser Ser Gln Ser Val Tyr Gly Asn
20 25 30

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

Leu Ile Tyr Gln Ala Ser Lys Leu Ala Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe
50 55 60

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

Gln Pro Asp Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gly Asn Phe Asn Thr
85 90 95

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

<210> 81

<211> 122

<212> PRT

5 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> EP35min VH

<400> 81

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

ES 2 687 259 T3

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

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

Val Ser Cys Ile Asp Ala Gly Thr Ser Gly Gly Thr Tyr Tyr Ala Thr
 50 55 60

Trp Ala Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr
 65 70 75 80

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

Tyr Cys Ala Lys Gly Val Ser Ser Asn Gly Tyr Tyr Phe Lys Leu Trp
 100 105 110

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

<210> 82

<211> 111

<212> PRT

5 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> EP35min VL

<400> 82

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

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

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

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

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

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

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

ES 2 687 259 T3

<210> 83

<211> 122

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

5 <220>

<223> EP35max VH

<400> 83

```

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

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

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

Val Ala Cys Ile Asp Ala Gly Thr Ser Gly Gly Thr Tyr Tyr Ala Thr
 50                               55                               60

Trp Ala Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Lys Asp Thr Ser Lys Asn Thr
 65                               70                               75                               80

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

Tyr Cys Ala Arg Gly Val Ser Ser Asn Gly Tyr Tyr Phe Lys Leu Trp
 100                              105                              110

Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
 115                               120
    
```

<210> 84

10 <211> 111

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> EP35max VL

15 <400> 84

```

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

Asp Arg Val Ile Ile Thr Cys Gln Ala Ser Gln Ser Ile Ser Asn Leu
 20                               25                               30
    
```

ES 2 687 259 T3

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

Val Ala Ala Ser Lys Leu Ala Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60

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

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

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

<210> 85

<211> 118

<212> PRT

5 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> EP42min VH

<400> 85

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

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

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

Ser Tyr Ile Ser Asp Trp Gly Ile Lys Tyr Tyr Ala Ser Trp Val Lys
 50 55 60

Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu
 65 70 75 80

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

Lys Gly Ala Pro Gly Ala Gly Asp Asn Gly Ile Trp Gly Gln Gly Thr
 100 105 110

Leu Val Thr Val Ser Ser
 115

10 <210> 86

<211> 115

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

ES 2 687 259 T3

<220>

<223> EP42min VL

<400> 86

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

5 <210> 87

<211> 118

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

10 <223> EP42max VH

<400> 87

ES 2 687 259 T3

```

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

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

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

Ser Tyr Ile Ser Asp Trp Gly Ile Lys Tyr Tyr Ala Ser Trp Val Lys
50          55          60

Gly Arg Phe Thr Ile Ser Lys Asp Thr Ser Lys Asn Thr Val Tyr Leu
65          70          75          80

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

Arg Gly Ala Pro Gly Ala Gly Asp Asn Gly Ile Trp Gly Gln Gly Thr
100         105         110

Thr Val Thr Val Ser Ser
115

```

<210> 88

<211> 115

<212> PRT

5 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> EP42max VL

<400> 88

ES 2 687 259 T3

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

Asp Arg Val Ile Ile Thr Cys Gln Ser Thr Glu Ser Val Tyr Lys Asn
 20 25 30

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

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

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

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

Gly Phe Gly Thr Ala Asn Gly Ser Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Thr
 100 105 110

Val Leu Gly
 115

<210> 89

<211> 232

<212> PRT

5 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> marco de la cadena pesada variable de rFW1.4

<220>

<221> Características _misc

10 <222> (26)..(75)

<223> X puede ser cualquier aminoácido natural; al menos tres y hasta 50 aminoácidos pueden estar presentes

<220>

<221> Características _misc

<222> (90)..(139)

15 <223> X puede ser cualquier aminoácido natural; al menos tres y hasta 50 aminoácidos pueden estar presentes

<220>

<221> Características _misc

<222> (172)..(221)

<223> X puede ser cualquier aminoácido natural; al menos tres y hasta 50 aminoácidos pueden estar presentes

20 <400> 89

ES 2 687 259 T3

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Thr Ala Ser Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
 20 25 30

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
 35 40 45

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
 50 55 60

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Trp Val Arg Gln Ala
 65 70 75 80

Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Gly Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
 85 90 95

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
 100 105 110

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
 115 120 125

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Arg Phe Thr Ile Ser
 130 135 140

Arg Asp Thr Ser Lys Asn Thr Val Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg
 145 150 155 160

Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
 165 170 175

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
 180 185 190

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
 195 200 205

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Trp Gly Gln
 210 215 220

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 225 230

<210> 90

<211> 232

<212> PRT

5 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> marco de la cadena pesada variable de rFW1.4(V2)

<220>

ES 2 687 259 T3

<221> Características _misc

<222> (26)..(75)

<223> X puede ser cualquier aminoácido natural; al menos tres y hasta 50 aminoácidos pueden estar presentes

<220>

5 <221> Características _misc

<222> (90)..(139)

<223> X puede ser cualquier aminoácido natural; al menos tres y hasta 50 aminoácidos pueden estar presentes

<220>

<221> Características _misc

10 <222> (172)..(221)

<223> X puede ser cualquier aminoácido natural; al menos tres y hasta 50 aminoácidos pueden estar presentes

<400> 90

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Thr Val Ser Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
20 25 30

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa

ES 2 687 259 T3

```

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

```

<210> 91

<211> 231

<212> PRT

5 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> marco de la cadena ligera variable sustituida de FW1.4

<220>

<221> Características _misc

10 <222> (24)..(73)

<223> X puede ser cualquier aminoácido natural; al menos tres y hasta 50 aminoácidos pueden estar presentes

<220>

ES 2 687 259 T3

<221> Características _misc

<222> (89)..(138)

<223> X puede ser cualquier aminoácido natural; al menos tres y hasta 50 aminoácidos pueden estar presentes

<220>

5 <221> Características _misc

<222> (171)..(220)

<223> X puede ser cualquier aminoácido natural; al menos tres y hasta 50 aminoácidos pueden estar presentes

<400> 91

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

ES 2 687 259 T3

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
195 200 205

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Phe Gly Gln Gly
210 215 220

Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly
225 230

<210> 92

<211> 483

<212> PRT

5 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> rFW1.4

<220>

<221> Características _misc

10 <222> (24)..(73)

<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural

<220>

<221> Características _misc

<222> (89)..(138)

15 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural

<220>

<221> Características _misc

<222> (171)..(220)

<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural

20 <220>

<221> Características _misc

<222> (277)..(326)

<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural

<220>

25 <221> Características _misc

<222> (341)..(390)

<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural

<220>

<221> Características _misc

30 <222> (423)..(472)

<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural

<400> 92

ES 2 687 259 T3

Glu Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ser Thr Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15
 Asp Arg Val Ile Ile Thr Cys Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
 20 25 30
 Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
 35 40 45
 Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
 50 55 60
 Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly
 65 70 75 80
 Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
 85 90 95
 Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
 100 105 110
 Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
 115 120 125
 Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Gly Val Pro Ser Arg Phe
 130 135 140
 Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu
 145 150 155 160
 Gln Pro Asp Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
 165 170 175
 Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
 180 185 190
 Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
 195 200 205
 Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Phe Gly Gln Gly
 210 215 220
 Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly
 225 230 235 240
 Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Glu Val Gln Leu Val
 245 250 255
 Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser
 260 265 270
 Cys Thr Ala Ser Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
 275 280 285

ES 2 687 259 T3

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
 290 295 300

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
 305 310 315 320

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu
 325 330 335

Glu Trp Val Gly Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
 340 345 350

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
 355 360 365

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
 370 375 380

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Thr Ser Lys
 385 390 395 400

Asn Thr Val Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala
 405 410 415

Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
 420 425 430

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
 435 440 445

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
 450 455 460

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr
 465 470 475 480

Val Ser Ser

<210> 93

<211> 483

<212> PRT

5 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> marco de rFW1.4 (V2)

<220>

<221> Características _misc

10 <222> (24)..(73)

<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural

<220>

<221> Características _misc

<222> (89)..(138)

<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural

<220>

5 <221> Características _misc

<222> (171)..(220)

<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural

<220>

<221> Características _misc

10 <222> (277)..(326)

<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural

<220>

<221> Características _misc

<222> (341)..(390)

15 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural

<220>

<221> Características _misc

<222> (423)..(472)

<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural

20 <400> 93

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

ES 2 687 259 T3

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Gly Val Pro Ser Arg Phe
 130 135 140

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

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

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
 180 185 190

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
 195 200 205

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Phe Gly Gln Gly
 210 215 220

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

Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Glu Val Gln Leu Val
 245 250 255

Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser
 260 265 270

Cys Thr Val Ser Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
 275 280 285

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
 290 295 300

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
 305 310 315 320

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu
 325 330 335

Glu Trp Val Gly Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
 340 345 350

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
 355 360 365

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
 370 375 380

ES 2 687 259 T3

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Arg Phe Thr Ile Ser Lys Asp Thr Ser Lys
385 390 395 400

Asn Thr Val Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala
405 410 415

Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
420 425 430

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
435 440 445

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
450 455 460

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr
465 470 475 480

Val Ser Ser

<210> 94

<211> 253

<212> PRT

5 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> EP43min scFv

<400> 94

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

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

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

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

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

Asp Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Gly Trp Ser Asp Ser Tyr
85 90 95

ES 2 687 259 T3

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

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

Gly Gly Ser Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln
 130 135 140

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

Ser Ser Gly Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu
 165 170 175

Glu Trp Val Ser Val Ile Ile Ser Ser Gly Ala Thr Tyr Tyr Ala Ser
 180 185 190

Trp Ala Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr
 195 200 205

Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr
 210 215 220

Tyr Cys Ala Lys Gly Gly Pro Asp Asp Ser Asn Ser Met Gly Thr Phe
 225 230 235 240

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

<210> 95

<211> 253

<212> PRT

5 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> EP43max scFv

<400> 95

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

Asp Arg Val Ile Ile Lys Cys Gln Ala Ser Gln Ser Ile Ser Asp Trp
 20 25 30

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

Tyr Gly Ala Ser Arg Leu Ala Ser Gly Phe Pro Ser Arg Phe Ser Gly

ES 2 687 259 T3

```

          50                      55                      60

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

Ala Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Gly Trp Ser Asp Ser Tyr
          85                      90                      95

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

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

Gly Gly Ser Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln
          130                    135                    140

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

Ser Ser Gly Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu
          165                    170                    175

Glu Trp Val Gly Val Ile Ile Ser Ser Gly Ala Thr Tyr Tyr Ala Ser
          180                    185                    190

Trp Ala Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Lys Asp Thr Ser Lys Asn Thr
          195                    200                    205

Val Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr
          210                    215                    220

Tyr Cys Ala Arg Gly Gly Pro Asp Asp Ser Asn Ser Met Gly Thr Phe
225                    230                    235                    240

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

```

<210> 96

<211> 253

<212> PRT

5 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> EP43minmax scFv

<400> 96

ES 2 687 259 T3

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

<210> 97

<211> 253

<212> PRT

5 <213> Secuencia Artificial

ES 2 687 259 T3

<220>

<223> EP43maxDHP scFv

<400> 97

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

Asp Arg Val Ile Ile Lys Cys Gln Ala Ser Gln Ser Ile Ser Asp Trp
 20 25 30

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

Tyr Gly Ala Ser Arg Leu Ala Ser Gly Phe Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60

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

Ala Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Gly Trp Ser Asp Ser Tyr
 85 90 95

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

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

Gly Gly Ser Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Ser Val Gln
 130 135 140

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

Ser Ser Gly Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu
 165 170 175

Glu Trp Val Gly Val Ile Ile Ser Ser Gly Ala Thr Tyr Tyr Ala Ser
 180 185 190

Trp Ala Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Lys Asp Thr Ser Lys Asn Thr
 195 200 205

Val Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Thr Tyr
 210 215 220

Tyr Cys Ala Arg Gly Gly Pro Asp Asp Ser Asn Ser Met Gly Thr Phe
 225 230 235 240

Asp Pro Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser
 245 250

5 <210> 98

ES 2 687 259 T3

<211> 253

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

5 <223> EP43minmaxDHP scFv

<400> 98

```

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

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

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

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

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

Asp Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Gly Trp Ser Asp Ser Tyr
 85             90             95

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

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

Gly Gly Ser Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Ser Val Gln
 130            135            140

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

Ser Ser Gly Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu
 165            170            175

```

ES 2 687 259 T3

Glu Trp Val Gly Val Ile Ile Ser Ser Gly Ala Thr Tyr Tyr Ala Ser
 180 185 190

Trp Ala Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Lys Asp Thr Ser Lys Asn Thr
 195 200 205

Val Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Thr Tyr
 210 215 220

Tyr Cys Ala Arg Gly Gly Pro Asp Asp Ser Asn Ser Met Gly Thr Phe
 225 230 235 240

Asp Pro Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser
 245 250

<210> 99

<211> 253

<212> PRT

5 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> EP43minmax VL:T22K scFv

<400> 99

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

Asp Arg Val Ile Ile Lys Cys Gln Ala Ser Gln Ser Ile Ser Asp Trp
 20 25 30

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

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

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

Asp Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Gly Trp Ser Asp Ser Tyr
 85 90 95

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

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

ES 2 687 259 T3

Gly Gly Ser Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln
 130 135 140

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

Ser Ser Gly Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu
 165 170 175

Glu Trp Val Gly Val Ile Ile Ser Ser Gly Ala Thr Tyr Tyr Ala Ser
 180 185 190

Trp Ala Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Lys Asp Thr Ser Lys Asn Thr
 195 200 205

Val Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr
 210 215 220

Tyr Cys Ala Arg Gly Gly Pro Asp Asp Ser Asn Ser Met Gly Thr Phe
 225 230 235 240

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

<210> 100

<211> 253

<212> PRT

5 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> EP43minmax: VL:V58F scFv

<400> 100

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

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

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

Tyr Gly Ala Ser Arg Leu Ala Ser Gly Phe Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60

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

Asp Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Gly Trp Ser Asp Ser Tyr

ES 2 687 259 T3

85 90 95

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

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

Gly Gly Ser Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln
130 135 140

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

Ser Ser Gly Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu
165 170 175

Glu Trp Val Gly Val Ile Ile Ser Ser Gly Ala Thr Tyr Tyr Ala Ser
180 185 190

Trp Ala Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Lys Asp Thr Ser Lys Asn Thr
195 200 205

Val Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr
210 215 220

Tyr Cys Ala Arg Gly Gly Pro Asp Asp Ser Asn Ser Met Gly Thr Phe
225 230 235 240

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

<210> 101

<211> 253

<212> PRT

5 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> EP43minmax VL:D81A scFv

<400> 101

ES 2 687 259 T3

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

<210> 102

<211> 253

<212> PRT

5 <213> Secuencia Artificial

ES 2 687 259 T3

<220>

<223> EP43minmax VL:Q79E scFv

<400> 102

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

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

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

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

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

Asp Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Gly Trp Ser Asp Ser Tyr
 85 90 95

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

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

Gly Gly Ser Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln
 130 135 140

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

Ser Ser Gly Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu
 165 170 175

Glu Trp Val Gly Val Ile Ile Ser Ser Gly Ala Thr Tyr Tyr Ala Ser
 180 185 190

Trp Ala Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Lys Asp Thr Ser Lys Asn Thr
 195 200 205

Val Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr
 210 215 220

Tyr Cys Ala Arg Gly Gly Pro Asp Asp Ser Asn Ser Met Gly Thr Phe
 225 230 235 240

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

5 <210> 103

ES 2 687 259 T3

<211> 253

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

5 <223> EP1min scFv

<400> 103

```

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

Asp Arg Val Ile Ile Thr Cys Gln Ser Thr Glu Ser Val Tyr Lys Asn
20           25           30

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

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

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

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

Gly Ser Gly Thr Ala Asn Gly Ser Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Thr
100          105          110

Val Leu Gly Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly
115          120          125

Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly
130          135          140

Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser
145          150          155          160

Gly Phe Thr Phe Ser Asn Asp Ala Ile Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro
165          170          175

Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ser Tyr Ile Ser Asp Trp Ser Ile Arg
180          185          190

Tyr Tyr Ala Asn Trp Ala Gln Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn
195          200          205

```

ES 2 687 259 T3

Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp
 210 215 220

Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Lys Gly Ala Pro Gly Ala Gly Asp Asn
 225 230 235 240

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

<210> 104

<211> 253

<212> PRT

5 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> EP1max scFv

<400> 104

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

Asp Arg Val Ile Ile Thr Cys Gln Ser Thr Glu Ser Val Tyr Lys Asn
 20 25 30

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

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

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

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

Gly Ser Gly Thr Ala Asn Gly Ser Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Thr
 100 105 110

Val Leu Gly Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly
 115 120 125

Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly
 130 135 140

Gly Ser Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Thr Val Ser
 145 150 155 160

ES 2 687 259 T3

Gly Ile Asp Leu Ser Asn Asp Ala Ile Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro
 165 170 175

Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ala Tyr Ile Ser Asp Trp Ser Ile Arg
 180 185 190

Tyr Tyr Ala Asn Trp Ala Gln Gly Arg Phe Thr Ile Ser Lys Asp Thr
 195 200 205

Ser Lys Asn Thr Val Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp
 210 215 220

Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys Ala Arg Gly Ala Pro Gly Ala Gly Asp Asn
 225 230 235 240

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

<210> 105

<211> 253

<212> PRT

5 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> EP1minmax scFv

<400> 105

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

Asp Arg Val Ile Ile Thr Cys Gln Ser Thr Glu Ser Val Tyr Lys Asn
 20 25 30

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

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

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

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

Gly Ser Gly Thr Ala Asn Gly Ser Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Thr
 100 105 110

Val Leu Gly Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly

ES 2 687 259 T3

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

<210> 106

<211> 252

<212> PRT

5 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> EP6min scFv

<400> 106

ES 2 687 259 T3

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

<210> 107

<211> 252

<212> PRT

ES 2 687 259 T3

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> EP6max scFv

<400> 107

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

<210> 108

<211> 252

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

5 <220>

<223> EP6minmax scFv

<400> 108

ES 2 687 259 T3

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

<210> 109

<211> 252

<212> PRT

ES 2 687 259 T3

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> EP15min scFv

<400> 109

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

Asp Arg Val Ile Ile Thr Cys Gln Ala Ser Glu Asn Ile Tyr Thr Ser
 20 25 30

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

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

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

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

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

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

Gly Gly Ser Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln
 130 135 140

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

Ser Arg Tyr Gly Val Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu
 165 170 175

Glu Trp Val Ser Ala Ile Gly Glu Thr Gly Arg Ala Tyr Tyr Ala Asn
 180 185 190

Trp Ala Lys Ser Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr
 195 200 205

Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr
 210 215 220

Tyr Cys Ala Lys Gly Glu Glu Phe Asn Asn Gly Trp Gly Ala Phe Asn
 225 230 235 240

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

ES 2 687 259 T3

<210> 110

<211> 252

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

5 <220>

<223> EP15max scFv

<400> 110

```

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

Asp Arg Val Ile Ile Thr Cys Gln Ala Ser Glu Asn Ile Tyr Thr Ser
          20           25           30

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

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

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

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

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

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

Gly Gly Ser Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Ser Val Gln
          130          135          140

Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Thr Val Ser Gly Phe Ser Leu

```

ES 2 687 259 T3

```

145                               150                               155                               160

Ser Arg Tyr Gly Val Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu
      165                               170                               175

Glu Trp Val Gly Ala Ile Gly Glu Thr Gly Arg Ala Tyr Tyr Ala Asn
      180                               185                               190

Trp Ala Lys Ser Arg Ser Thr Ile Ser Arg Asp Thr Ser Lys Asn Thr
      195                               200                               205

Val Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Thr Tyr
      210                               215                               220

Tyr Cys Ala Arg Gly Glu Glu Phe Asn Asn Gly Trp Gly Ala Phe Asn
      225                               230                               235                               240

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

```

<210> 111

<211> 252

<212> PRT

5 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> EP15max scFv

<400> 111

ES 2 687 259 T3

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

<210> 112

<211> 252

<212> PRT

5 <213> Secuencia Artificial

ES 2 687 259 T3

<220>

<223> EP19minmod scFv

<400> 112

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

Asp Arg Val Ile Ile Thr Cys Gln Ala Ser Asp Asn Ile Tyr Arg Gly
 20 25 30

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

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

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

Asp Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Leu Gly Val Tyr Gly Tyr Ser Ser
 85 90 95

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

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

Gly Gly Gly Ser Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val
 130 135 140

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

Leu Asn Ser Asn Glu Ile Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly
 165 170 175

Leu Glu Trp Val Ser Tyr Ile Gly Asn Gly Gly Met Thr His Tyr Ala
 180 185 190

Ser Trp Ala Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn
 195 200 205

Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val
 210 215 220

Tyr Tyr Cys Ala Lys Ser Val Glu Tyr Thr Asp Leu Tyr Tyr Leu Asn
 225 230 235 240

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

ES 2 687 259 T3

<210> 113

<211> 252

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

5 <220>

<223> EP19maxmod scFv

<400> 113

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

ES 2 687 259 T3

Asp Arg Val Ile Ile Thr Cys Gln Ala Ser Asp Asn Ile Tyr Arg Gly
 20 25 30

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

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

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

Asp Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Leu Gly Val Tyr Gly Tyr Ser Ser
 85 90 95

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

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

Gly Gly Gly Ser Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val
 130 135 140

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

Leu Asn Ser Asn Glu Ile Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly
 165 170 175

Leu Glu Trp Val Gly Tyr Ile Gly Asn Gly Gly Met Thr His Tyr Ala
 180 185 190

Ser Trp Ala Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Thr Ser Lys Asn
 195 200 205

Thr Val Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val
 210 215 220

Tyr Tyr Cys Ala Ser Ser Val Glu Tyr Thr Asp Leu Tyr Tyr Leu Asn
 225 230 235 240

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

<210> 114

<211> 253

<212> PRT

5 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> EP43min scFv

ES 2 687 259 T3

<400> 114

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

Asp Arg Val Ile Ile Thr Cys Gln Ser Ser Gln Ser Val Tyr Gly Asn
 20 25 30

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

Leu Ile Tyr Gln Ala Ser Lys Leu Ala Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe
 50 55 60

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

Gln Pro Asp Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gly Asn Phe Asn Thr
 85 90 95

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

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

Gly Gly Gly Ser Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val
 130 135 140

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

Ile Ser Arg Ser Tyr Trp Ile Cys Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys
 165 170 175

Gly Leu Glu Trp Val Ser Cys Ile Tyr Gly Asp Asn Asp Ile Thr Pro
 180 185 190

Leu Tyr Ala Asn Trp Ala Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn
 195 200 205

Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp
 210 215 220

Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Lys Leu Gly Tyr Ala Asp Tyr Ala Tyr
 225 230 235 240

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

<210> 115

<211> 253

5 <212> PRT

ES 2 687 259 T3

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> EP34max scFv

<400> 115

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

ES 2 687 259 T3

180 185 190

Leu Tyr Ala Asn Trp Ala Lys Gly Arg Phe Pro Val Ser Thr Asp Thr
195 200 205

Ser Lys Asn Thr Val Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp
210 215 220

Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Leu Gly Tyr Ala Asp Tyr Ala Tyr
225 230 235 240

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

<210> 116

<211> 253

<212> PRT

5 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> EP35min scFv

<400> 116

ES 2 687 259 T3

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

<210> 117

<211> 253

<212> PRT

ES 2 687 259 T3

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> EP35max scFv

<400> 117

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

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

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

Val Ala Ala Ser Lys Leu Ala Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

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

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

ES 2 687 259 T3

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

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

Gly Gly Ser Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Ser Val Gln
 130 135 140

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

Ser Val Gly Tyr Trp Ile Cys Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly
 165 170 175

Leu Glu Trp Val Ala Cys Ile Asp Ala Gly Thr Ser Gly Gly Thr Tyr
 180 185 190

Tyr Ala Thr Trp Ala Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Lys Asp Thr Ser
 195 200 205

Lys Asn Thr Val Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr
 210 215 220

Ala Thr Tyr Tyr Cys Ala Arg Gly Val Ser Ser Asn Gly Tyr Tyr Phe
 225 230 235 240

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

<210> 118

<211> 253

<212> PRT

5 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> EP35minmax scFv

<400> 118

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

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

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

ES 2 687 259 T3

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

<210> 119

<211> 253

<212> PRT

5 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> EP42min scFv

<400> 119

Glu Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ser Thr Leu Ser Ala Ser Val Gly

ES 2 687 259 T3

```

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

```

<210> 120

<211> 253

<212> PRT

5 <213> Secuencia Artificial

ES 2 687 259 T3

<220>

<223> EP42max scFv

<400> 120

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

Asp Arg Val Ile Ile Thr Cys Gln Ser Thr Glu Ser Val Tyr Lys Asn
 20 25 30

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

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

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

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

Gly Phe Gly Thr Ala Asn Gly Ser Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Thr
 100 105 110

Val Leu Gly Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly
 115 120 125

Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly
 130 135 140

Gly Ser Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Thr Val Ser
 145 150 155 160

Gly Ile Asp Leu Arg Asn Asp Ala Ile Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro
 165 170 175

Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ser Tyr Ile Ser Asp Trp Gly Ile Lys
 180 185 190

Tyr Tyr Ala Ser Trp Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Lys Asp Thr
 195 200 205

Ser Lys Asn Thr Val Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp

ES 2 687 259 T3

```
                210                215                220
Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys Ala Arg Gly Ala Pro Gly Ala Gly Asp Asn
225                230                235                240

Gly Ile Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
                245                250
```

<210> 121

<211> 253

<212> PRT

5 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> EP42minmax scFv

<400> 121

ES 2 687 259 T3

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

<210> 122

<211> 5

<212> PRT

5 <213> Secuencia Artificial

ES 2 687 259 T3

<220>

<223> péptido sintético

<400> 122

Gly Gly Gly Gly Ser
1 5

REIVINDICACIONES

1. Un inmunoenlazador que se une específicamente al TNF α humano, comprendiendo el inmunoenlazador:
- (i) una secuencia marco variable de la cadena pesada humana y secuencias de CDR H1, CDR H2 y CDR H3 procedentes de un inmunoenlazador de conejo, en la que el marco de región variable de la cadena pesada humana tiene al menos un 90% de identidad con la SEQ ID NO: 1; y
- (ii) una secuencia marco variable de la cadena ligera humana y secuencias de CDR L1, CDR L2 y CDR L3 procedentes de un inmunoenlazador de conejo, en la que la secuencia marco de la región variable de la cadena ligera humana tiene al menos un 85% de identidad con la SEQ ID NO: 2.
2. El inmunoenlazador de la reivindicación 1, en el que el marco de la región variable de la cadena pesada humana es o comprende la SEQ ID NO: 1, la SEQ ID NO: 89 o la SEQ ID NO: 90, y la secuencia marco de región variable de la cadena ligera humana es o comprende la SEQ ID NO: 2 o la SEQ ID NO: 91.
3. El inmunoenlazador de la reivindicación 2, que comprende una o más sustituciones en el marco de la cadena pesada (VH) en una posición del grupo que consiste en las posiciones H24, H25, H56, H82, H84, H89 y H108; y/o una sustitución en el marco de la cadena ligera (VL) en la posición L87 de acuerdo con el sistema de numeración AHo.
4. El inmunoenlazador de la reivindicación 3, en el que la sustitución se selecciona del grupo que consiste en treonina (T) en la posición H24, valina (V) en la posición H25, glicina (G) o alanina (A) en la posición H56, lisina (K) en la posición H82, treonina (T) en la posición H84, valina (V) en la posición H89 y arginina (R) en la posición H108 y treonina (T) en la posición L87 de acuerdo con el sistema de numeración AHo.
5. El inmunoenlazador de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el inmunoenlazador comprende una sustitución potenciadora de la solubilidad en al menos una de las posiciones de los aminoácidos de la cadena pesada 12, 103 y 144 (numeración AHo).
6. El inmunoenlazador de la reivindicación 5, en el que la sustitución potenciadora de la solubilidad se selecciona del grupo que consiste en: (a) Serina (S) en la posición 12; (b) treonina (T) en la posición 103; y (c) treonina (T) en la posición 144.
7. El inmunoenlazador de cualquiera de las reivindicaciones precedentes, que comprende además:
- a) una o más secuencias de CDR que son idénticas al menos en un 80% a una secuencia seleccionada del grupo que consiste en la SEQ ID NO: 3, la SEQ ID NO: 4, la SEQ ID NO: 5, la SEQ ID NO: 6, la SEQ ID NO: 7 y la SEQ ID NO: 8;
- b) una o más secuencias de CDR que son idénticas al menos en un 80% a una secuencia seleccionada del grupo que consiste en la SEQ ID NO: 9, la SEQ ID NO: 10, la SEQ ID NO: 11, la SEQ ID NO: 12, la SEQ ID NO: 13 y la SEQ ID NO: 14;
- c) una o más secuencias de CDR que son idénticas al menos en un 80% a una secuencia seleccionada del grupo que consiste en la SEQ ID NO: 15, la SEQ ID NO: 16, la SEQ ID NO: 17, la SEQ ID NO: 18, la SEQ ID NO: 19 y la SEQ ID NO: 20;
- d) una o más secuencias de CDR que son idénticas al menos en un 80% a una secuencia seleccionada del grupo que consiste en la SEQ ID NO: 21, la SEQ ID NO: 22, la SEQ ID NO: 23, la SEQ ID NO: 24, la SEQ ID NO: 25 y la SEQ ID NO: 26;
- e) una o más secuencias de CDR que son idénticas al menos en un 80% a una secuencia seleccionada del grupo que consiste en la SEQ ID NO: 27, la SEQ ID NO: 28, la SEQ ID NO: 29, la SEQ ID NO: 30, la SEQ ID NO: 31 y la SEQ ID NO: 32;
- f) una o más secuencias de CDR que son idénticas al menos en un 80% a una secuencia seleccionada del grupo que consiste en la SEQ ID NO: 33, la SEQ ID NO: 34, la SEQ ID NO: 35, la SEQ ID NO: 36, la SEQ ID NO: 37 y la SEQ ID NO: 38;
- g) una o más secuencias de CDR que son idénticas al menos en un 80% a una secuencia seleccionada del grupo que consiste en la SEQ ID NO: 39, la SEQ ID NO: 40, la SEQ ID NO: 41, la SEQ ID NO: 42, la SEQ ID NO: 43 y la SEQ ID NO: 44; o
- h) una o más secuencias de CDR que son idénticas al menos en un 80% a una secuencia seleccionada del grupo que consiste en la SEQ ID NO: 45, la SEQ ID NO: 46, la SEQ ID NO: 47, la SEQ ID NO: 48, la SEQ ID NO: 49 y la SEQ ID NO: 50.

8. El inmunoenlazador de la reivindicación 7, en el que el marco de la cadena pesada del inmunoenlazador que comprende una o más secuencias de CDR que es al menos 80% idéntico a una secuencia seleccionada del grupo de d), e), f), g) o h) tiene eliminaciones en las posiciones 85 y 88 del marco.
- 5 9. El inmunoenlazador de la reivindicación 7, en el que las una o más secuencias de CDR son idénticas al menos en un 80% a una secuencia seleccionada del grupo de a), que tiene una sustitución en al menos una de las posiciones 22, 74, 95, 97 y 99 de la región variable de la cadena ligera (VL) de acuerdo con el sistema de numeración AHo, preferiblemente treonina (T) en la posición L22, fenilalanina (F) o tirosina (Y) en la posición L74, glutamato (E) en la posición L95 o alanina (A) en la posición L99, o una combinación de los mismos.
- 10 10. El inmunoenlazador de la reivindicación 7, en el que las una o más secuencias de CDR son idénticas al menos en un 80% a una secuencia seleccionada del grupo de c), que tiene una sustitución en al menos una de las posiciones 87, 89 y 92 de la región variable de la cadena ligera (VL) de acuerdo con el sistema de numeración AHo.
- 15 11. El inmunoenlazador de la reivindicación 7, en el que las una o más secuencias de CDR son idénticas al menos en un 80% a una secuencia seleccionada del grupo de e), que tiene una sustitución en al menos una de las posiciones 86 y 87 de la región variable de la cadena ligera (VL) de acuerdo con el sistema de numeración AHo, preferiblemente treonina (T) en la posición L87 y glutamina (Q) en la posición L88.
- 20 12. El inmunoenlazador de la reivindicación 7, en el que las una o más secuencias de CDR son idénticas al menos en un 80% a una secuencia seleccionada del grupo de f), que tiene una sustitución en al menos una de las posiciones 15, 48, 90 de la cadena ligera región variable (VL) de acuerdo con el sistema de numeración AHo.
- 25 13. El inmunoenlazador de la reivindicación 7, en el que las una o más secuencias de CDR son idénticas al menos en un 80% a una secuencia seleccionada del grupo de g), que tiene una sustitución en al menos una de las posiciones 57 y 87 de la región variable de la cadena ligera (VL) de acuerdo con el sistema de numeración AHo, preferiblemente a valina (V) en la posición L57 y treonina (T) en la posición L87.
- 30 14. El inmunoenlazador de la reivindicación 7, en el que las una o más secuencias de CDR son idénticas al menos en un 80% a una secuencia seleccionada del grupo de g) o h), que tiene una sustitución en al menos una de las posiciones 1, 3, 4, 10, 47, 57, 91 y 103 de la región variable de la cadena ligera (VL) de acuerdo con el sistema de numeración AHo, preferiblemente una sustitución potenciadora de la estabilidad seleccionada del grupo que consiste en
- (a) Ácido glutámico (E) en la posición 1,
- (b) Valina (V) en la posición 3,
- 35 (c) Leucina (L) en la posición 4;
- (d) Serina (S) en la posición 10;
- (e) Arginina en la posición 47;
- (f) Serina (S) en la posición 57;
- (g) Fenilalanina (F) en la posición 91; y
- 40 (h) Valina (V) en la posición 103.
- 45 15. El inmunoenlazador de la reivindicación 7, que comprende:
- a) una región variable de la cadena pesada (VH) que tiene al menos 90% de identidad de secuencia con una secuencia seleccionada del grupo que consiste en la SEQ ID NO: 51, la SEQ ID NO: 53 y la SEQ ID NO: 55, y una región variable de la cadena ligera (VL) que tiene al menos 90% de identidad de secuencia con una secuencia seleccionada del grupo que consiste en la SEQ ID NO: 52, la SEQ ID NO: 54, la SEQ ID NO: 56, la SEQ ID NO: 57, la SEQ ID NO: 58 y la SEQ ID NO: 59;
- b) una región variable de la cadena pesada (VH) que tiene al menos 90% de identidad de secuencia con una secuencia seleccionada del grupo que consiste en la SEQ ID NO: 60 y la SEQ ID NO: 62, y/o una región variable de la cadena ligera (VL) que tiene al menos 90% de identidad de secuencia con una secuencia seleccionada del grupo que consiste en la SEQ ID NO: 61 y la SEQ ID NO: 63;
- c) que comprende una región variable de la cadena pesada (VH) que tiene al menos un 90% de identidad de secuencia con una secuencia seleccionada del grupo que consiste en la SEQ ID NO: 64 y la SEQ ID NO: 66, y/o una región variable de la cadena ligera (VL) que tiene al menos un 90% de identidad de secuencia con una secuencia seleccionada del grupo que consiste en la SEQ ID NO: 65 y la SEQ ID NO: 67;

- d) una región variable de la cadena pesada (VH) que tiene al menos 90% de identidad de secuencia con una secuencia seleccionada del grupo que consiste en la SEQ ID NO: 68 y la SEQ ID NO: 70, y/o una región variable de la cadena ligera (VL) que tiene al menos 90% de identidad de secuencia con una secuencia seleccionada del grupo que consiste en la SEQ ID NO: 69 y la SEQ ID NO: 71;
- 5 e) una región variable de la cadena pesada (VH) que tiene al menos 90% de identidad de secuencia con una secuencia seleccionada del grupo que consiste en la SEQ ID NO: 73 y la SEQ ID NO: 75, y/o una región variable de la cadena ligera (VL) que tiene al menos 90% de identidad de secuencia con una secuencia seleccionada del grupo que consiste en la SEQ ID NO: 74 y la SEQ ID NO: 76;
- 10 f) una región variable de la cadena pesada (VH) que tiene al menos 90% de identidad de secuencia con una secuencia seleccionada del grupo que consiste en la SEQ ID NO: 77 y la SEQ ID NO: 79, y/o una región variable de la cadena ligera (VL) que tiene al menos 90% de identidad de secuencia con una secuencia seleccionada del grupo que consiste en la SEQ ID NO: 78 y la SEQ ID NO: 80;
- 15 g) una región variable de la cadena pesada (VH) que tiene al menos un 90% de identidad de secuencia con una secuencia seleccionada del grupo que consiste en la SEQ ID NO: 81 y la SEQ ID NO: 83, y/o una región variable de la cadena ligera (VL) que tiene al menos 90% de identidad de secuencia con una secuencia seleccionada del grupo que consiste en la SEQ ID NO: 82 y la SEQ ID NO: 84; o
- 20 h) una región variable de la cadena pesada (VH) que tiene al menos 90% de identidad de secuencia con una secuencia seleccionada del grupo que consiste en la SEQ ID NO: 85 y la SEQ ID NO: 87, y/o una región variable de la cadena ligera (VL) que tiene al menos 90% de identidad de secuencia con una secuencia seleccionada del grupo que consiste en la SEQ ID NO: 86 y la SEQ ID NO: 88.
16. El inmunoenzimador de la reivindicación 15, que tiene al menos un 90% de identidad de secuencia, preferiblemente un 100%, con cualquiera de la SEQ ID NO: 94 a la SEQ ID NO: 121.
17. El inmunoenzimador de cualquiera de las reivindicaciones precedentes que es un anticuerpo, scFv, Fab o Dab.
- 25 18. Una composición que comprende el inmunoenzimador de una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, y un vehículo farmacéuticamente aceptable.
19. La composición de la reivindicación 18, formulada para administración tópica, oral, nasal, rectal o parenteral.
20. Una molécula de ácido nucleico aislada que codifica una región de cadena pesada variable (VH) y/o una región de cadena ligera variable (VL) de una cualquiera de las reivindicaciones precedentes.
21. Un vector de expresión que comprende la molécula de ácido nucleico de la reivindicación 20.
- 30 22. Una célula huésped que comprende el vector de expresión de la reivindicación 21.
23. El inmunoenzimador de cualquiera de las reivindicaciones 1-17 para uso como un producto farmacéutico.
24. El inmunoenzimador para su uso de acuerdo con la reivindicación 23, para las vías de administración intramuscular, intraperitoneal, intracerebroespinal, subcutánea, intraarticular, intrasinovial, intratecal, oral, tópica o por inhalación.
- 35 25. Uso del inmunoenzimador de cualquiera de las reivindicaciones 1-17 en la producción de un medicamento para el tratamiento o prevención de una enfermedad mediada por el TNF α humano.
26. El inmunoenzimador de cualquiera de las reivindicaciones 1-17 para uso en el tratamiento o prevención de una enfermedad mediada por el TNF α humano.
- 40 27. El uso de la reivindicación 25 o el inmunoenzimador para uso de la reivindicación 26, en el que la enfermedad mediada por el TNF α se selecciona del grupo que consiste en estados de inflamación crónica y/o autoinmune en general, trastornos inflamatorios en general mediados por inmunidad, enfermedad inflamatoria del SNC, enfermedades inflamatorias que afectan el ojo, articulaciones, piel, membranas mucosas, sistema nervioso central, tracto gastrointestinal, tracto urinario o pulmón, estados de uveítis en general, retinitis, uveítis HLA-B27+, enfermedad de Behçet, síndrome del ojo seco, glaucoma, síndrome de Sjogren, diabetes mellitus (incluida la neuropatía diabética), resistencia a la insulina, estados de artritis en general, artritis reumatoide, osteoartritis, artritis reactiva y síndrome de Reiter, artritis juvenil, espondilitis anquilosante, esclerosis múltiple, síndrome de Guillain-Barre, miastenia grave, esclerosis lateral amiotrófica, sarcoidosis, glomerulonefritis, nefropatía crónica, cistitis, psoriasis (incluida artritis psoriática), hidradenitis supurativa, paniculitis, pioderma gangrenoso, síndrome SAPHO (sinovitis, acné, pustulosis, hiperostosis y osteítis), acné, síndrome de Sweet, pénfigo, enfermedad de Crohn (incluidas manifestaciones extraintestinales), colitis ulcerosa, asma bronquial, neumonitis por hipersensibilidad, alergias generales, rinitis alérgica, sinusitis alérgica, enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC), fibrosis pulmonar, granulomatosis de Wegener, síndrome de Kawasaki, arteritis de células gigantes, vasculitis de Churg-Strauss, poliarteritis nodosa, quemaduras, enfermedad de injerto contra huésped, reacciones de huésped frente a

5 injerto, episodios de rechazo tras un trasplante de médula ósea u órgano, estados sistémicos y locales de vasculitis en general, lupus eritematoso sistémico y discoideo, polimiositis y dermatomiositis, esclerodermia, preeclampsia, pancreatitis aguda y crónica, hepatitis viral, hepatitis alcohólica, inflamación posquirúrgica tal como después de una
 10 cirugía ocular (por ejemplo, catarata (reemplazo de lente ocular) o cirugía de glaucoma), cirugía articular (incluida cirugía artroscópica), cirugía en estructuras articulares (por ejemplo, ligamentos), cirugía oral y/o dental, procedimientos cardiovasculares mínimamente invasivos (por ejemplo, PTCA, aterectomía) y, colocación de cánula intraluminal), procedimientos intraabdominales y ginecológicos laparoscópicos y/o endoscópicos, procedimientos urológicos endoscópicos (por ejemplo, cirugía de próstata, ureteroscopia, cistoscopia, cistitis intersticial), o
 15 inflamación perioperatoria (prevención) en general, enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Parkinson, enfermedad de Huntington, parálisis de Bell, enfermedad de Creutzfeldt-Jakob. Osteólisis relacionada con el cáncer, inflamación relacionada con el cáncer, dolor relacionado con el cáncer, caquexia relacionada con el cáncer, metástasis óseas, formas agudas y crónicas de dolor, independientemente de si estos son causados por efectos centrales o periféricos del TNF α y si se clasifican como inflamatorios, formas nociceptivas o neuropáticas de dolor, ciática, lumbalgia, síndrome del túnel carpiano, síndrome de dolor regional complejo (SDRC), gota, neuralgia postherpética, fibromialgia, estados de dolor local, síndromes de dolor crónico por tumor metastásico, dismenorrea. Sepsis bacteriana, viral o fúngica, tuberculosis, SIDA, aterosclerosis, enfermedad coronaria, hipertensión, dislipidemia, insuficiencia cardíaca e insuficiencia cardíaca crónica.

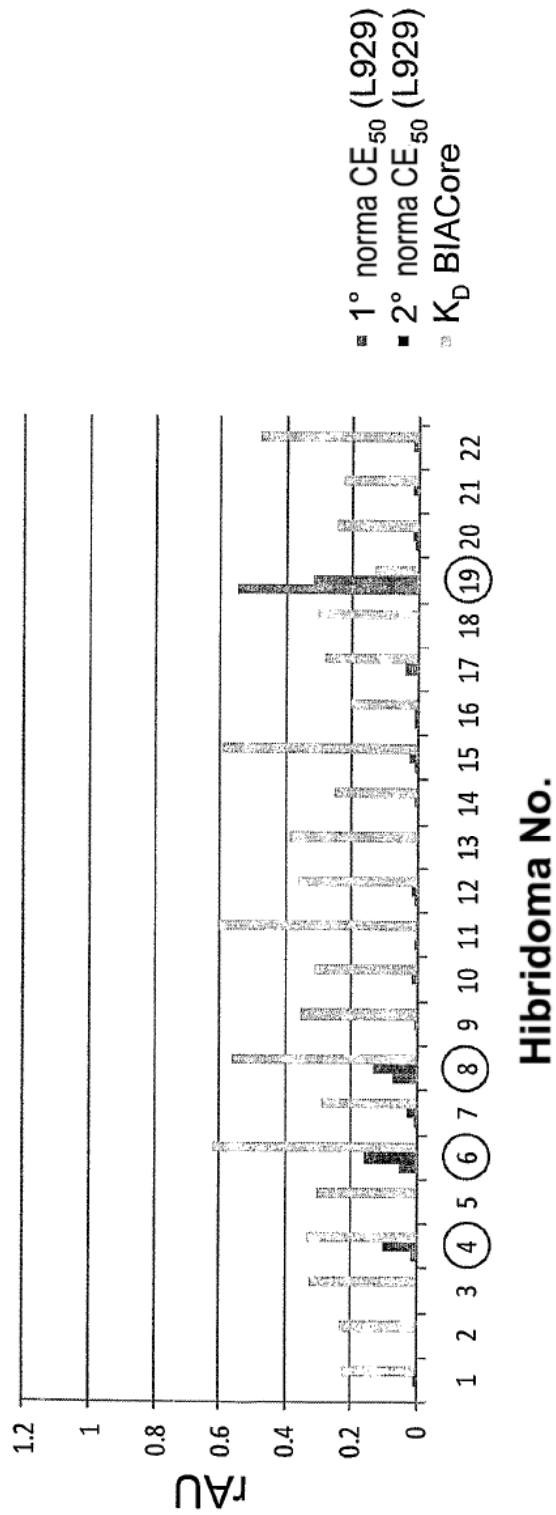


Figura 1 A

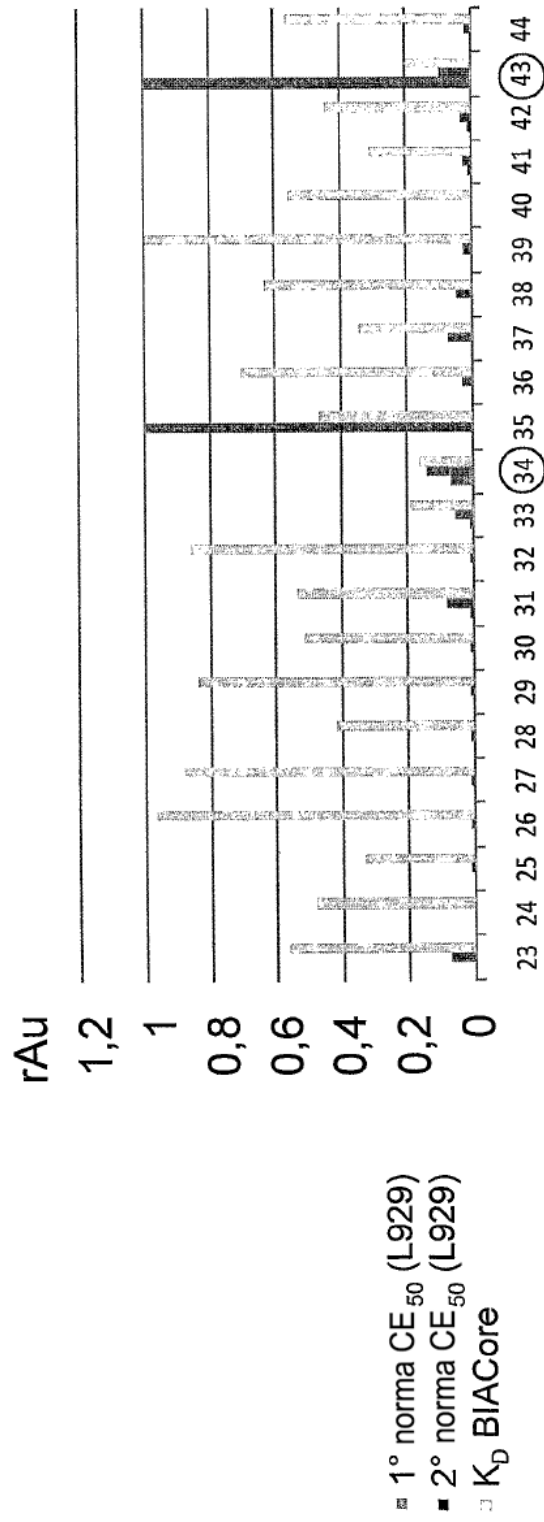
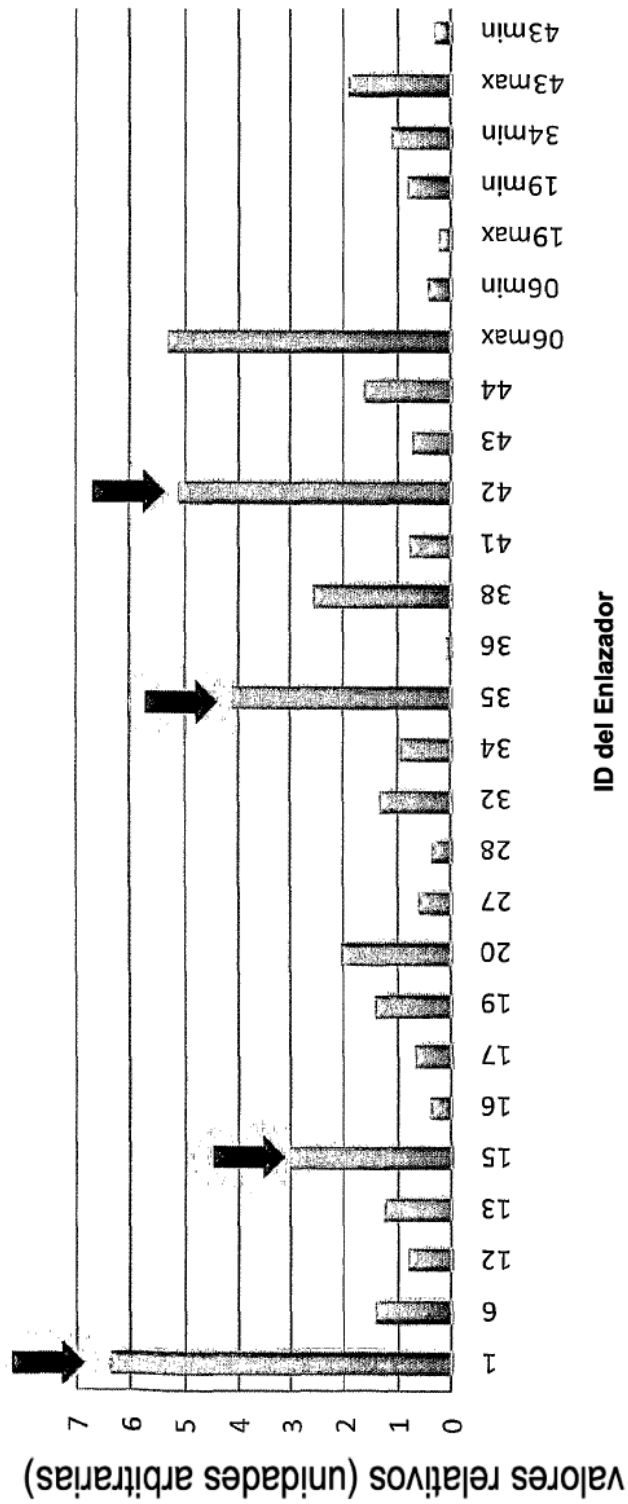


Figura 1 B

Hibridoma No.

Figura 2



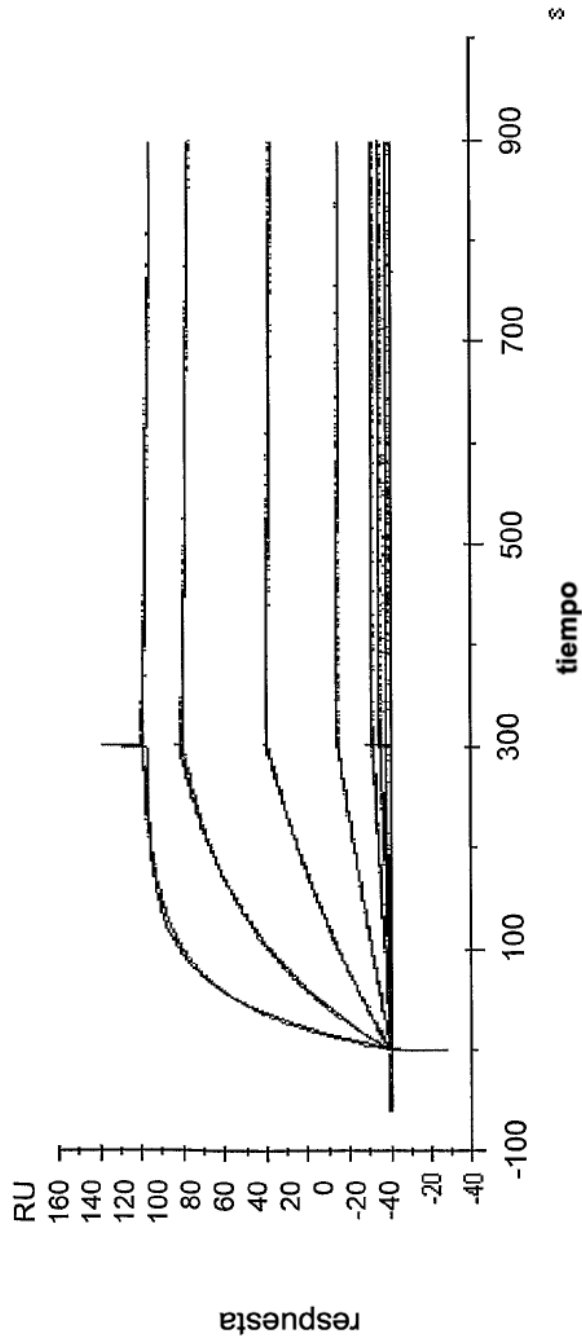


Fig. 3a

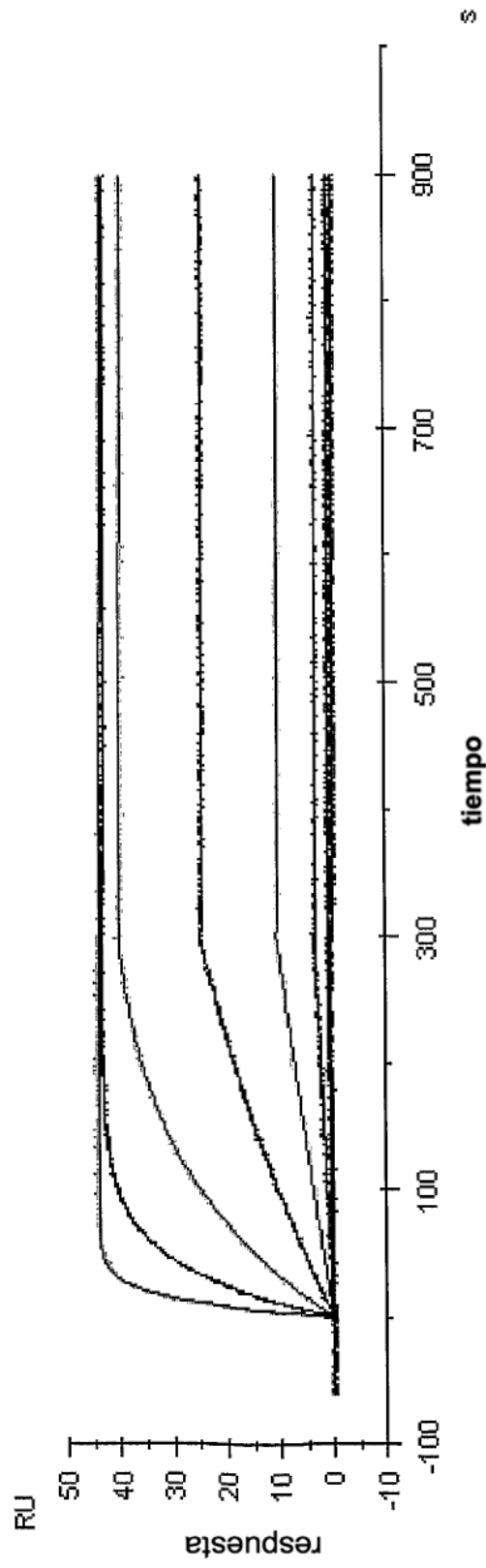


Fig. 3b

Figura 4

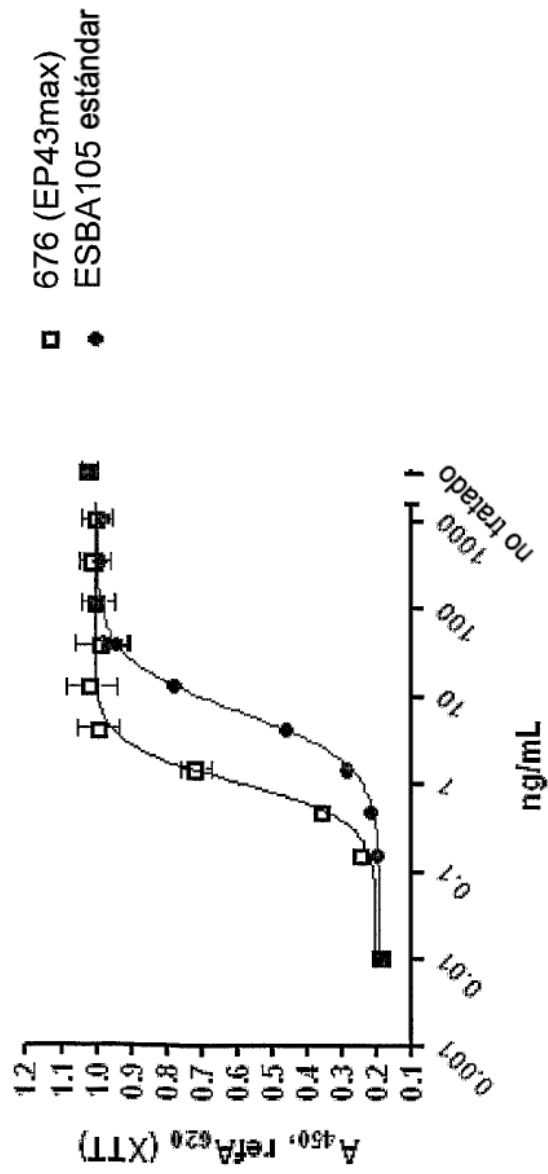


Figura 5

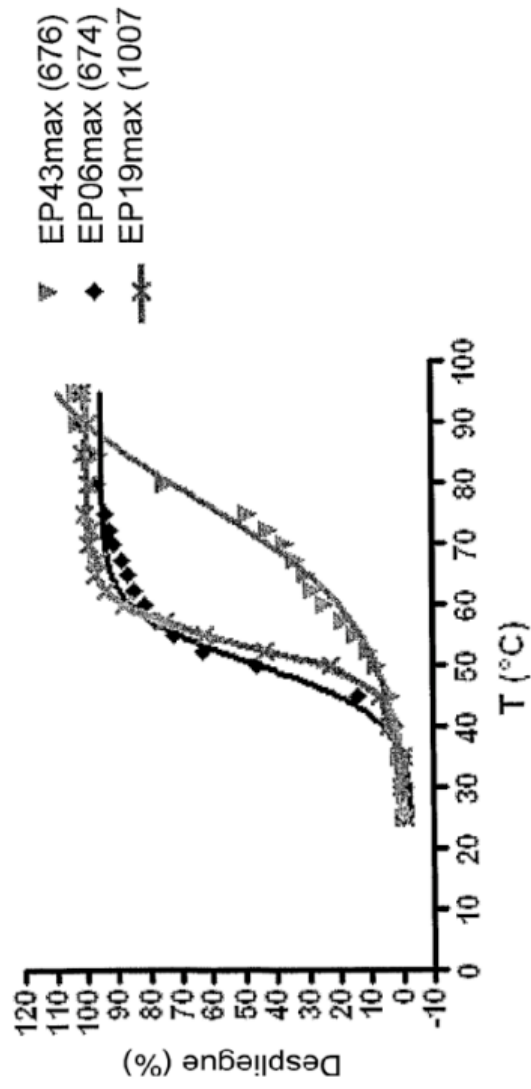


Figura 6

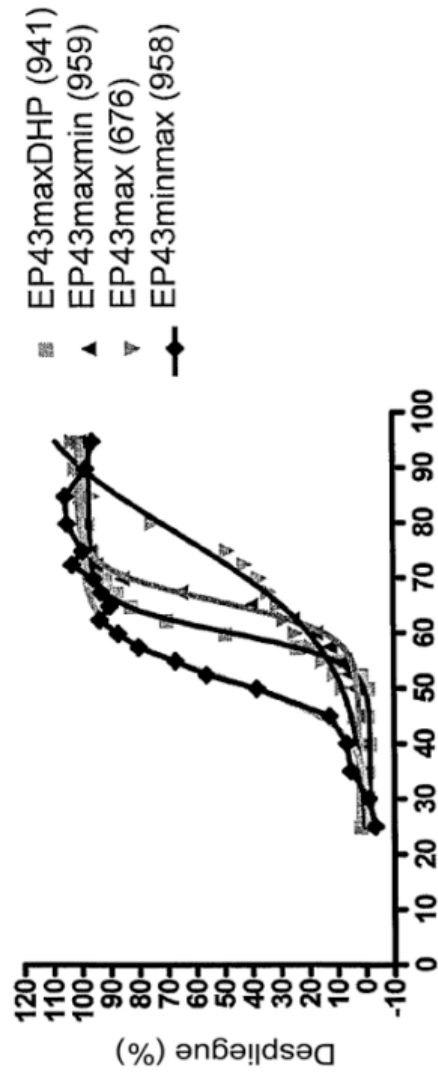


Fig. 7a

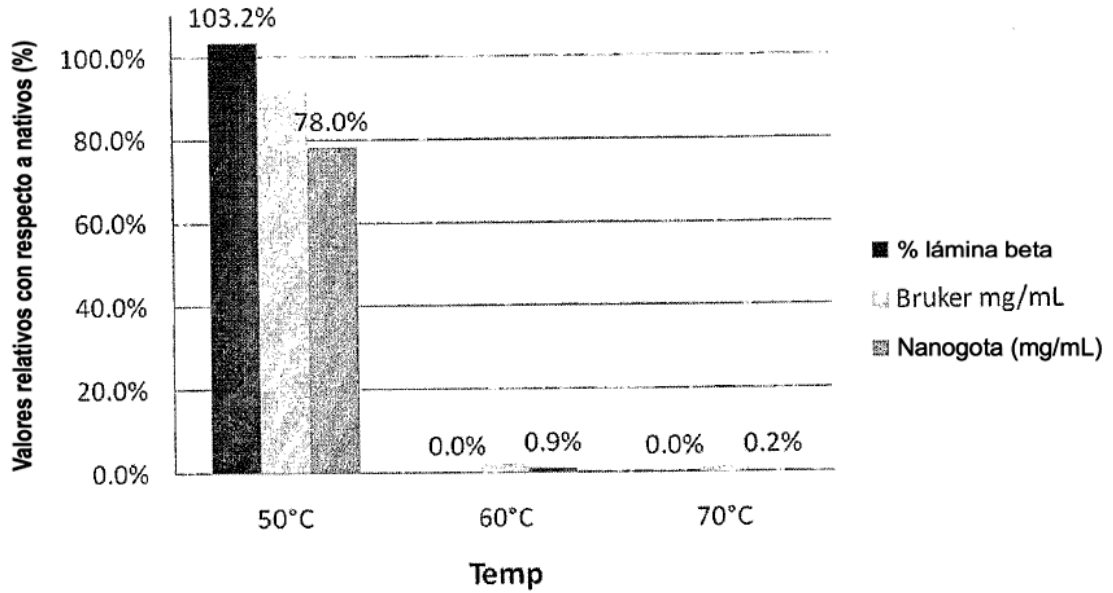
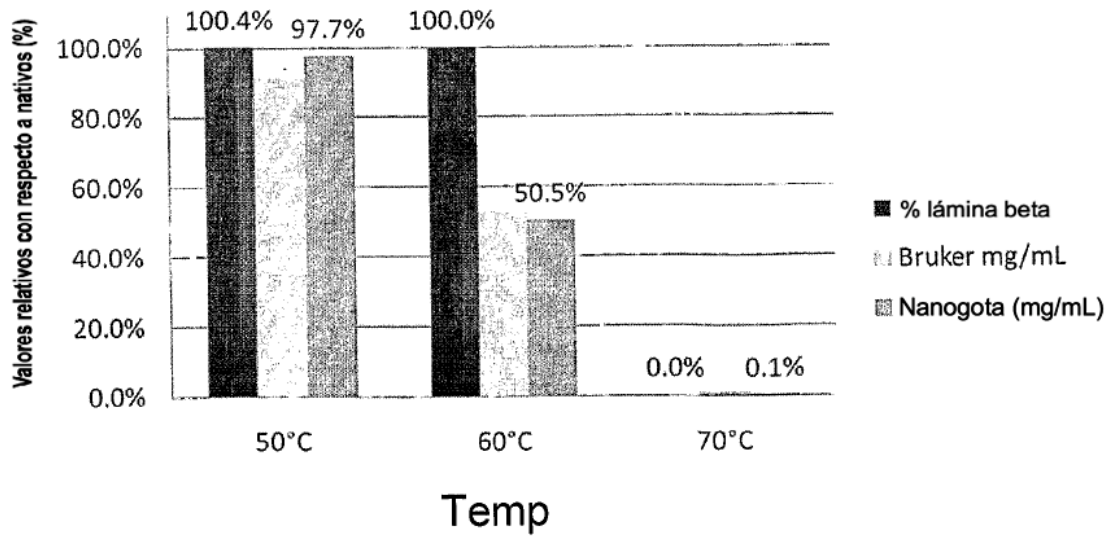


Fig. 7b



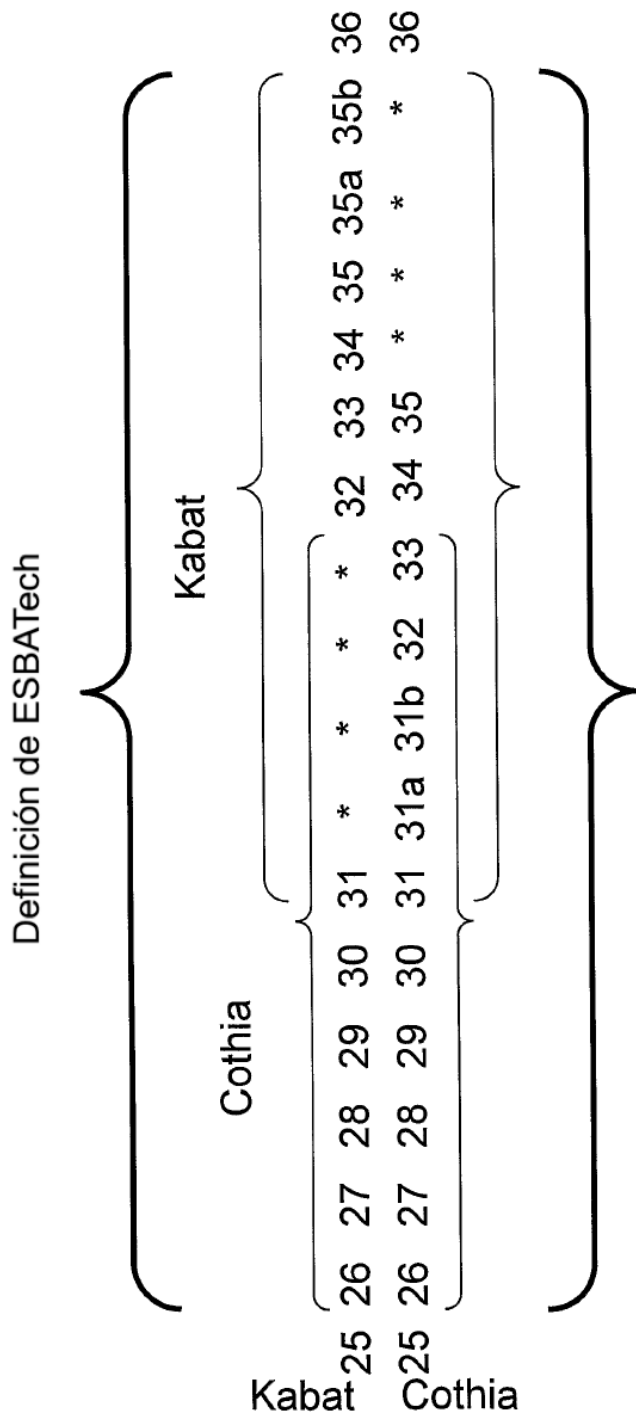


Figura 8

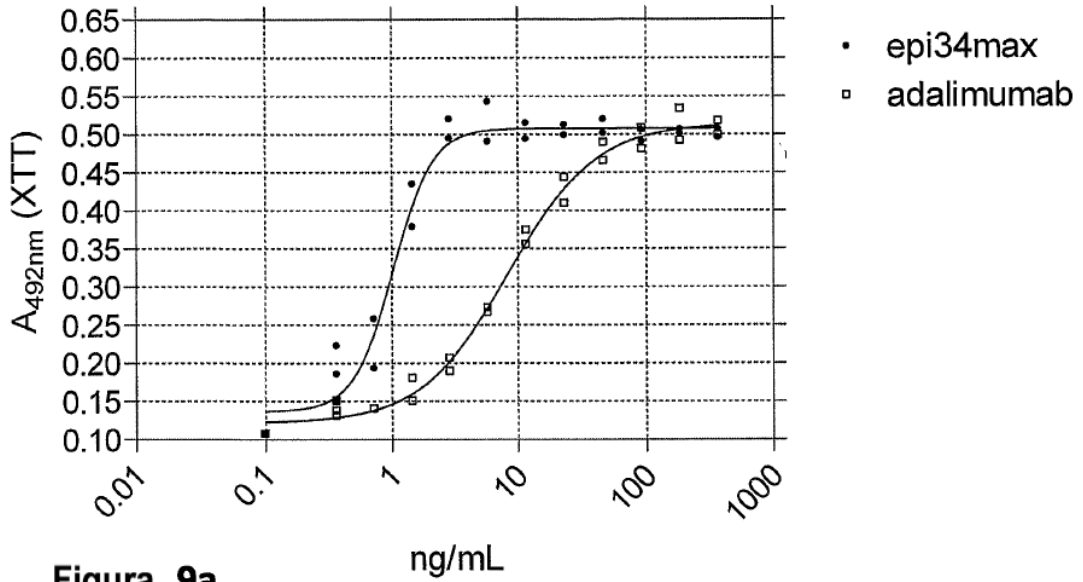


Figura 9a

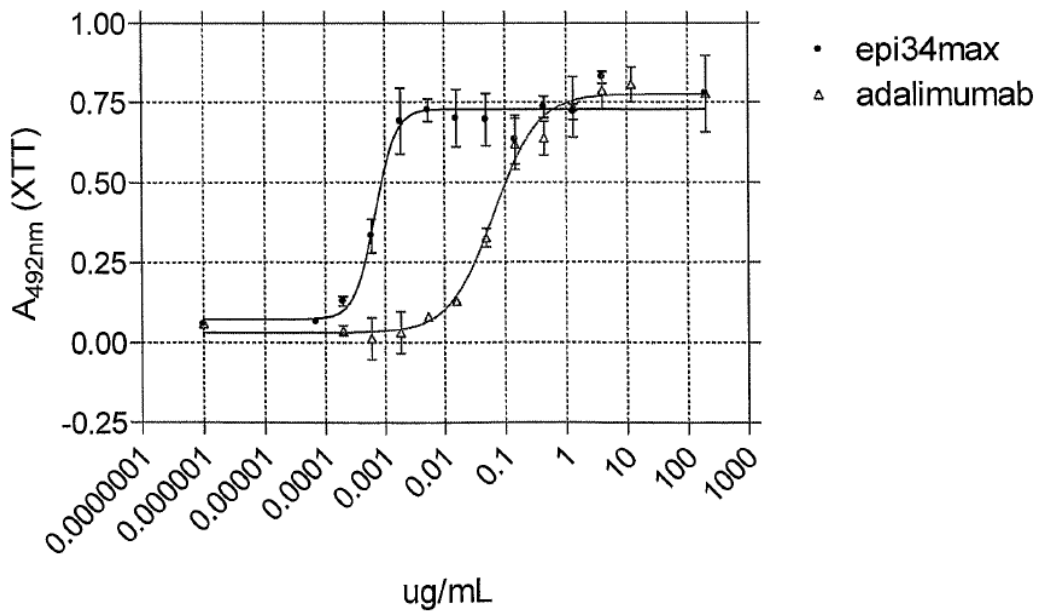


Figura 9b

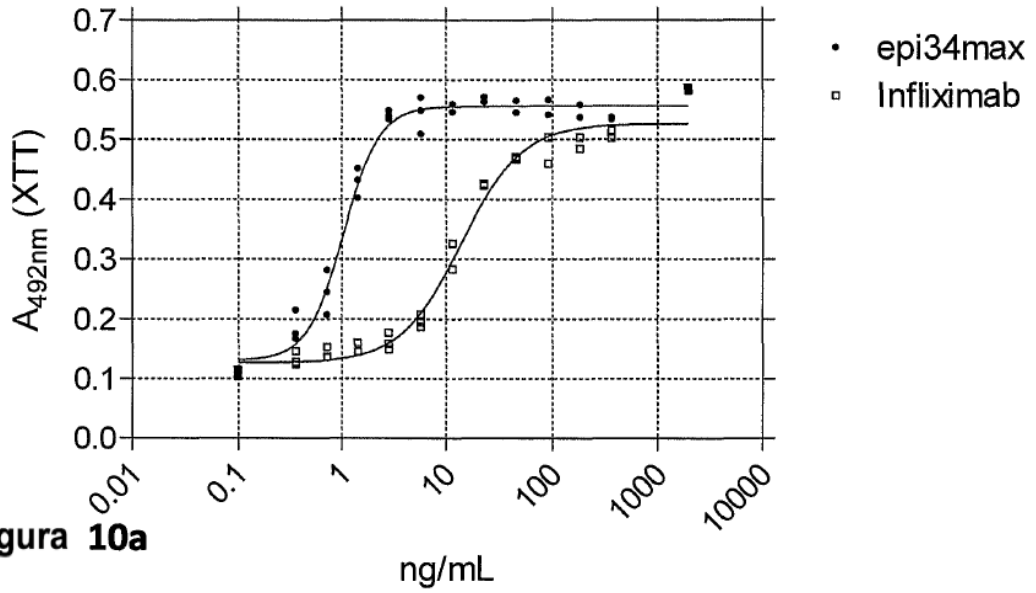


Figura 10a

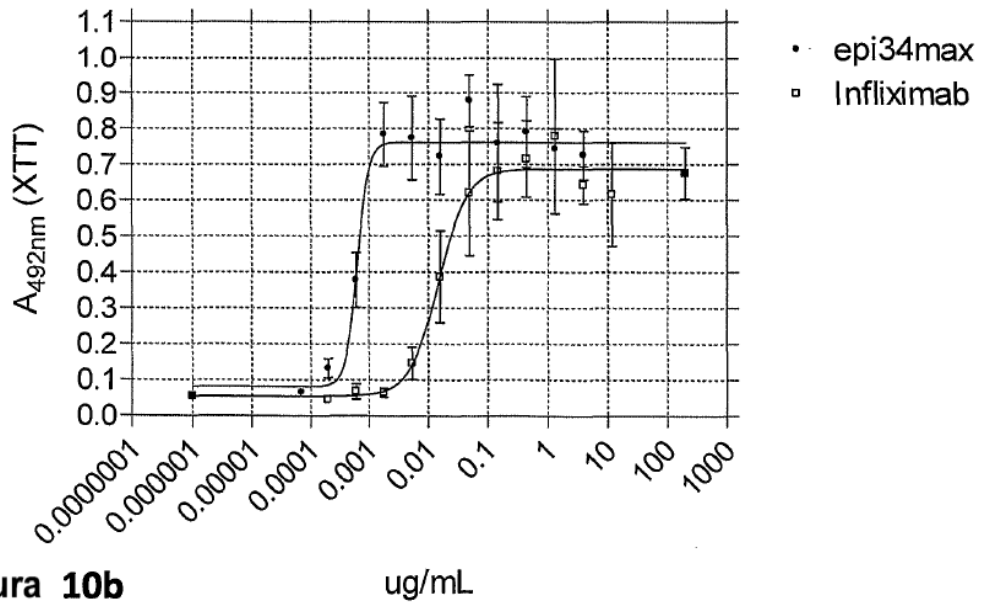


Figura 10b

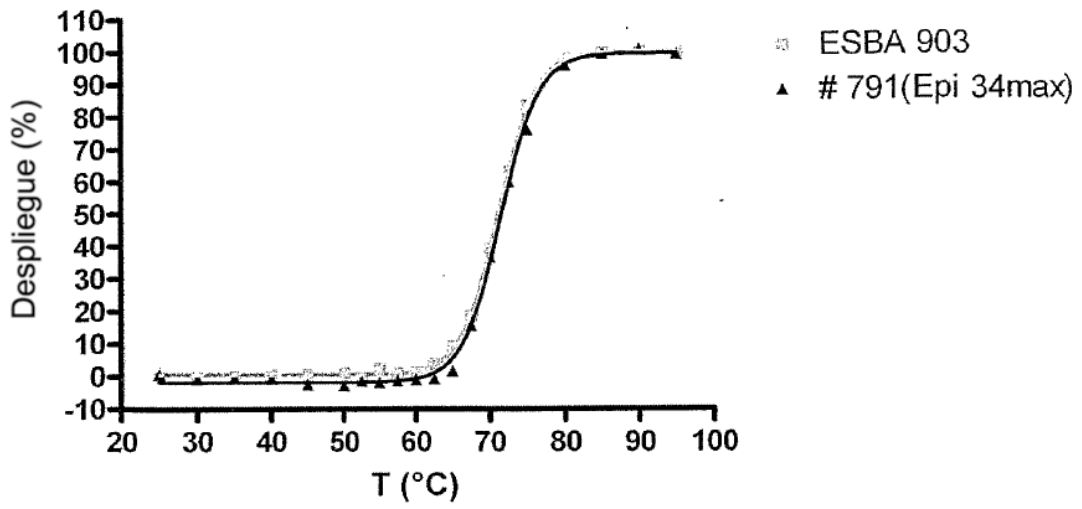


Figura 11

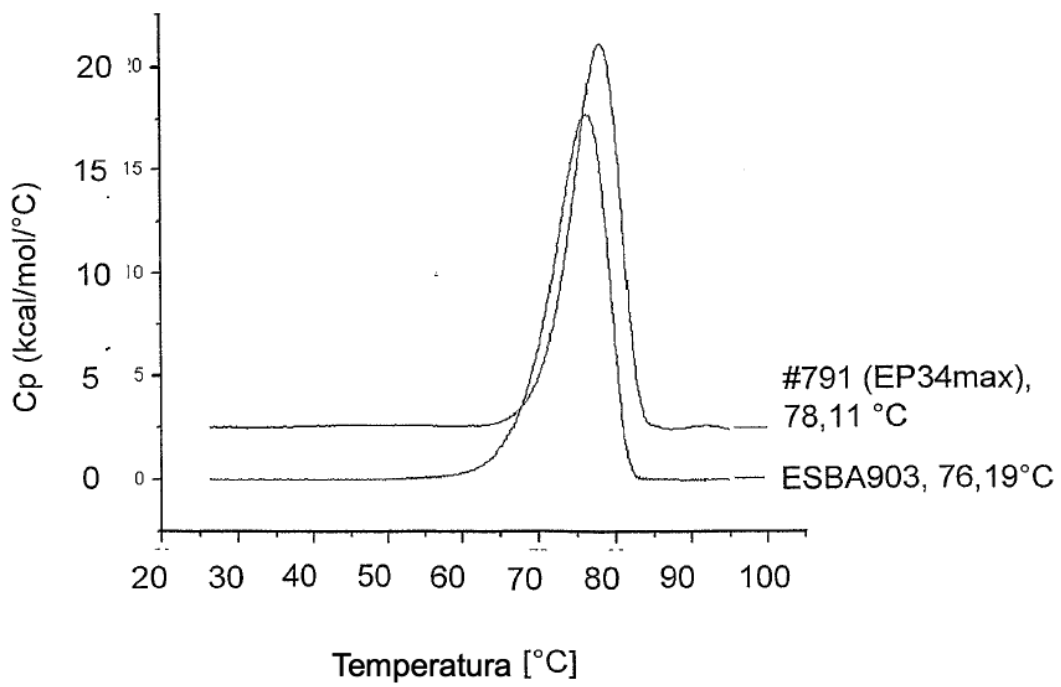


Figura 12