



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 360 641**

51 Int. Cl.:

C07K 16/28 (2006.01)

A61K 39/395 (2006.01)

C07K 14/715 (2006.01)

A61K 38/17 (2006.01)

C07K 16/24 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **08010320 .3**

96 Fecha de presentación : **28.10.1992**

97 Número de publicación de la solicitud: **1975181**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **01.10.2008**

54

Título: **Uso de antagonistas del factor de crecimiento endotelial vascular.**

45

Fecha de publicación de la mención BOPI:
07.06.2011

45

Fecha de la publicación del folleto de la patente:
07.06.2011

73

Titular/es: **GENENTECH, Inc.**
1 Dna Way
South San Francisco, California 94080, US

72

Inventor/es: **Ferrara, Napoleone y**
Kim, Kyung, Jin

74

Agente: **Ponti Sales, Adelaida**

ES 2 360 641 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

Uso de antagonistas del factor de crecimiento endotelial vascular.

5 Campo de la invención

[0001] La presente invención se refiere a antagonistas del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), a composiciones terapéuticas que comprenden los antagonistas y a procedimientos de uso de los antagonistas para propósitos diagnósticos y terapéuticos.

10

Antecedentes de la invención

[0002] Los dos principales componentes celulares del sistema vascular son las células endoteliales y de la musculatura lisa. Las células endoteliales forman el revestimiento de la superficie interna de todos los vasos sanguíneos y constituyen una interfaz no trombogénica entre la sangre y el tejido. Además, las células endoteliales son un componente importante del desarrollo de nuevos capilares y vasos sanguíneos. De este modo, las células endoteliales proliferan durante la angiogénesis, o neovascularización, asociada con formación de tumores y metástasis, y con una variedad de enfermedades o trastornos no neoplásicos.

15

[0003] Varios polipéptidos de aparición natural inducen según se informa la proliferación de células endoteliales. Entre aquellos polipéptidos se incluyen los factores de crecimiento de fibroblastos (FGF) ácidos y básicos, Burgess and Maciag, Annual Rev. Biochem., 58: 575 (1989), el factor de crecimiento endotelial derivado de plaquetas (PD-ECGF), Ishikawa y otros, Nature, 338: 557 (1989) y el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), Leung y otros, Science 246: 1.306 (1989); Ferrara y Henzel, Biochem. Biophys. Res. Commun. 161: 851 (1989); Tischer y otros, Biochem. Biophys. Res. Commun. 165: 1.198 (1989); Ferrara y otros, publicación de patente PCT n.º WO 90/13649 (publicada el 15 de noviembre, 1990); Ferrara y otros, solicitud de patente US 07/360.229

20

25

[0004] El VEGF se identificó por primera vez en medios condicionados con células foliculares o foliculoestrelladas de hipófisis bovina. Los análisis bioquímicos indican que el VEGF bovino es una proteína dimérica con una masa molecular aparente de aproximadamente 45.000 dalton y con aparente especificidad mitógena por las células endoteliales. El ADN que codifica el VEGF bovino se aisló mediante cribado de una genoteca de ADNc preparada a partir de tales células, utilizando nucleótidos basados en la secuencia de aminoácidos aminoterminales de la proteína como sondas de hibridación.

30

[0005] El VEGF humano se obtuvo mediante un primer cribado de una genoteca de ADNc preparada a partir de células humanas, utilizando ADNc de VEGF bovino como sonda de hibridación. Un ADNc identificado de este modo codifica una proteína de 165 aminoácidos que tiene una homología superior al 95% con el VEGF bovino, a la cual proteína se hace referencia como VEGF humano (hVEGF). La actividad mitógena del VEGF humano se confirmó expresando el ADNc del VEGF humano en células huésped de mamíferos. Los medios condicionados por células transfectadas con el ADNc del VEGF humano favorecieron la proliferación de células endoteliales capilares, mientras que las células de control no. Leung y otros, Science 246: 1.306 (1989).

35

40

[0006] Se identificaron varios ADNc adicionales en genotecas de ADNc humano que codifican isoformas de 121, 189 y 206 aminoácidos del hVEGF (a las que en conjunto también se hace referencia como proteínas afines a hVEGF). La proteína de 121 aminoácidos difiere del hVEGF en virtud de la delección de los 44 aminoácidos entre los restos 116 y 159 en hVEGF. La proteína de 189 aminoácidos difiere de hVEGF en virtud de la inserción de 24 aminoácidos en el residuo 116 en hVEGF, y al parecer es idéntica al factor de permeabilidad vascular humano (hVPF). La proteína de 206 aminoácidos difiere del hVEGF en virtud de una inserción de 41 aminoácidos en el resto 116 en hVEGF. Houck y otros, Mol. Endocrin. 5: 1.806 (1991); Ferrara y otros, J. Cell. Biochem. 47: 211 (1991); Ferrara y otros, Endocrine Reviews 13: 18 (1992); Keck y otros, Science 246: 1.309 (1989); Connolly y otros, J. Biol. Chem. 264: 20.017 (1989); Keck y otros, EPO Pat. Pub. n.º 0 370 989 (publicada el 30 de mayo, 1990).

45

50

[0007] El VEGF no sólo estimula la proliferación de células endoteliales, sino que también induce la permeabilidad vascular y la angiogénesis. La angiogénesis, que implica la formación de nuevos vasos sanguíneos a partir de endotelio preexistente, es un componente importante de una variedad de enfermedades y trastornos entre los cuales la formación de tumores y la metástasis, la artritis reumatoide, la soriasis, la aterosclerosis, la retinopatía diabética, la fibroplasia retrolental, el glaucoma neovascular, los hemangiomas, el rechazo inmunitario del trasplante de un tejido de córnea y de otros tejidos y la inflamación crónica.

55

[0008] En el caso de formación de un tumor, la angiogénesis es al parecer fundamental para la transición de la hiperplasia a la neoplasia, y para proporcionar alimento al tumor sólido en crecimiento. Folkman y otros, Nature 339: 58 (1989). La angiogénesis también permite a los tumores estar en contacto con el lecho vascular del huésped, que puede proporcionar una vía para la metástasis de las células tumorales. Los indicios sobre la función de la angiogénesis en la metástasis tumoral proceden, por ejemplo, de estudios que muestran una correlación entre el número y la densidad de microvasos en secciones histológicas de carcinoma de mama humano invasivo y la presencia actual de metástasis distantes. Weidner y otros, New Engl. J. Med. 324: 1 (1991).

60

65

5 **[0009]** Dada la función del crecimiento endotelial vascular y la angiogénesis, y la función de aquellos procesos en muchas enfermedades y trastornos, es deseable contar con un medio para reducir o inhibir uno o más efectos biológicos del VEGF. También es deseable contar con un medio para analizar la presencia del VEGF en condiciones normales y patológicas, y en especial en el cáncer.

Descripción resumida de la invención

10 **[0010]** La presente invención proporciona antagonistas de VEGF para su uso en el tratamiento de tumores, incluyendo (a) anticuerpos y variantes de los mismos que pueden unirse específicamente al hVEGF, (b) receptor hVEGF y tal como se define en las reivindicaciones. Los antagonistas inhiben la actividad mitogénica, angiogénica u otra actividad biológica de hVEGF y, de este modo, son útiles para el tratamiento de tumores que se caracterizan por una neovascularización excesiva indeseable, y especialmente tumores malignos sólidos.

15 **[0011]** Los antagonistas del VEGF pueden ser anticuerpos monoclonales poliespecíficos que pueden unirse a (a) un epítipo no hVEGF, por ejemplo, un epítipo de una proteína implicada en la trombogénesis o la trombólisis, o un antígeno de superficie de una célula tumoral y a (b) hVEGF.

20 **[0012]** En otros aspectos, los antagonistas del VEGF se conjugan con una parte citotóxica.

[0013] El antagonista del VEGF puede administrarse, simultánea o secuencialmente, junto con uno o más antagonistas del VEGF o con sustancias antitumorales o antiangiogénicas.

Breve descripción de las figuras

25 **[0014]**

30 La figura 1 muestra el efecto de anticuerpos monoclonales anti-hVEGF (A4.6.1 o B2.6.2) o de un anticuerpo irrelevante del factor de crecimiento antihepatocítico (anti-HGF) en la unión de los anticuerpos monoclonales anti-hVEGF a hVEGF.

35 La figura 2 muestra el efecto de anticuerpos monoclonales anti-hVEGF (A4.6.1 o B2.6.2) o de un anticuerpo irrelevante anti-HGF en la actividad biológica de hVEGF en cultivos de células endoteliales de capilares de corteza suprarrenal (ACE) bovina.

La figura 3 muestra el efecto de anticuerpos monoclonales anti-hVEGF (A4.6.1, B2.6.2 o A2.6.1) en la unión de hVEGF a células ACE bovinas.

40 La figura 4 muestra el efecto de un tratamiento con anticuerpos monoclonales anti-hVEGF A4.6.1 en el índice de formación de tumores NEG55 en ratones.

La figura 5 muestra el efecto de un tratamiento con anticuerpos monoclonales anti-hVEGF A4.6.1 en el tamaño de tumores NEG55 en ratones tras cinco semanas de tratamiento.

45 La figura 6 muestra el efecto de un tratamiento con anticuerpos monoclonales anti-hVEGF A4.6.1 (VEGF Ab) en la formación de tumores SK-LMS-1 en ratones.

50 La figura 7 muestra el efecto de varias dosis de un tratamiento con anticuerpos monoclonales anti-hVEGF A4.6.1 (VEGF Ab) en la formación de tumores A673 en ratones

La figura 8 muestra el efecto de un tratamiento con anticuerpos monoclonales anti-hVEGF A4.6.1 en la formación y supervivencia de células de glioblastoma NEG55 (G55) en cultivo.

55 La figura 9 muestra el efecto de un anticuerpo monoclonal anti-hVEGF A4.6.1 en la formación y supervivencia de células de rdbomiosarcoma A673 en cultivo.

La figura 10 muestra el efecto de un anticuerpo monoclonal anti-hVEGF A4.6.1 en la quimiotaxis sinovial inducida por líquido sinovial de células endoteliales humanas.

60 Descripción detallada de la invención

65 **[0015]** El término "hVEGF" se utiliza en la presente invención para referirse al factor de crecimiento celular endotelial humano de 165 aminoácidos, y a los factores de crecimiento celular endotelial vascular de 121, 189 y 206 aminoácidos, tal como describieron Leung y otros, Science 246: 1.306 (1989) y Houck y otros, Mol. Endocrin. 5: 1.806 (1991) junto con las formas alélicas de aparición natural y procesadas de aquellos factores de crecimiento.

[0016] La presente invención proporciona antagonistas del hVEGF que pueden inhibir una o más de las actividades biológicas del hVEGF, por ejemplo, su actividad mitogénica o angiogénica. Los antagonistas del VEGF actúan interfiriendo en la unión del hVEGF a un receptor celular, incapacitando o eliminando células que han sido activadas por hVEGF, o interfiriendo con la activación de células endoteliales vasculares después de la unión de hVEGF a un receptor celular. Todos estos puntos de intervención por un antagonista del hVEGF se considerarán equivalentes para los objetivos de la invención. De este modo, dentro del alcance de la invención se incluyen anticuerpos, y preferiblemente anticuerpos monoclonales, o fragmentos de los mismos que se unen al hVEGF. También incluidos dentro del alcance de la invención destacan el receptor hVEGF y fragmentos y variantes de secuencias de aminoácidos de los mismos que pueden unirse al hVEGF.

[0017] La expresión "receptor hVEGF" o "hVEGFr" tal como se utiliza en la presente invención se refiere a celular para hVEGF, normalmente un receptor de superficie celular observado en células endoteliales vasculares, así como a variantes del mismo que conservan la capacidad de unirse a hVEGF. Habitualmente, los receptores hVEGF y las variantes de los mismos que son antagonistas del hVEGF aparecerán de forma aislada, más que integradas en una membrana celular o fijadas en una superficie celular tal como puede ser el caso en la naturaleza. Un ejemplo de receptor hVEGF es la tirosinquinasa de tipo flms (flt), un receptor transmembrana en la familia de las tirosinquinasa. DeVries y otros, *Science* 255: 989 (1992); Shibuya y otros, *Oncogene* 5: 519 (1990). El receptor flt comprende un dominio extracelular, un dominio transmembrana y un dominio intracelular con actividad tirosinquinasa. El dominio extracelular está implicado en la unión de hVEGF mientras que el dominio intracelular está implicado en la transducción de señal.

[0018] Otro ejemplo de receptor hVEGF es el receptor flk-1 (al que también se hace referencia como KDR). Matthews y otros, *Proc. Nat. Acad. Sci.* 88: 9.026 (1991); Terman y otros, *Oncogene* 6: 1.677 (1991); Terman y otros, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 187: 1579 (1992).

[0019] La unión de hVEGF al receptor flt produce la formación de por lo menos dos complejos de peso molecular elevado, que tienen un peso molecular de al parecer 205.000 y 300.000 dalton. Se cree que el complejo de 300.000 dalton es un dímero que comprende dos moléculas receptoras unidas a una sola molécula del hVEGF.

[0020] Dentro del alcance de la presente invención también se incluyen variantes del hVEGFr. Entre los ejemplos representativos se incluyen formas truncadas de un receptor en el cual los dominios transmembrana y citoplasmático son eliminados del receptor, y proteínas de fusión en las que los polímeros o polipéptidos no hVEGFr están conjugados con el hVEGFr o, preferiblemente, con formas truncadas del mismo. Un ejemplo de tal polipéptido no hVEGF es una inmunoglobulina. En tal caso, por ejemplo, el dominio extracelular del hVEGFr es sustituido por el dominio Fv de una cadena ligera o (preferiblemente) una cadena pesada de inmunoglobulina, con el extremo terminal C del dominio extracelular del receptor unido covalentemente al extremo aminoterminal del CH1, la bisagra, el CH2 u otro fragmento de la cadena pesada. Dichas variantes se elaboran del mismo modo que las conocidas inmunoadhesonas Véase, por ejemplo, Gascoigne y otros, *Proc. Nat. Acad. Sci.* 84: 2.936 (1987); Capon y otros, *Nature* 337: 525 (1989); Aruffo y otros, *Cell* 61: 1.303 (1990); Ashkenazi y otros, *Proc. Nat. Acad. Sci.* 88: 10.535 (1991); Bennett y otros, *J. Biol. Chem.* 266: 23.060 (1991). En otras realizaciones, el hVEGFr se conjuga con un polímero no proteínico tal como polietilenglicol (PEG) (véase por ejemplo, Davis y otros, patente de EE.UU. US 4.179.337; Goodson y otros, *BioTechnology* 8: 343-346 (1990); Abuchowski y otros, *J. Biol. Chem.* 252: 3.578 (1977); Abuchowski y otros, *J. Biol. Chem.* 252: 3.582 (1977)) o carbohidratos (véase por ejemplo, Marshall y otros, *Arch Biochem. Biophys.*, 167: 77 (1975)). Esto sirve para ampliar la semivida biológica del hVEGFr y reduce la posibilidad de que el receptor sea inmunógeno en el mamífero al cual se administre. El hVEGFr se utiliza sustancialmente del mismo modo que los anticuerpos del hVEGF, teniendo en cuenta la afinidad del antagonista y su valencia en hVEGF.

[0021] El dominio extracelular del receptor hVEGF, bien por sí mismo como fusionado a un polipéptido de inmunoglobulina o a otro polipéptido portador, es especialmente útil como antagonista de hVEGF, en virtud de su capacidad para secuestrar el hVEGF presente en un huésped que no está unido a hVEGFr en una superficie celular.

[0022] El hVEGFr y las variantes del mismo también son útiles en análisis de cribado para identificar agonistas y antagonistas de hVEGF. Por ejemplo, las células huésped transfectadas con ADN que codifica hVEGFr (por ejemplo, flt o flk1) sobreexpresan el polipéptido receptor en la superficie de la célula, haciendo que tales células huésped recombinantes sean en teoría adecuadas para analizar la capacidad de un compuesto de prueba (por ejemplo, una molécula pequeña, un péptido lineal o cíclico, o un polipéptido) para unirse a hVEGFr. El hVEGFr y las proteínas de fusión hVEGFr, tales como una proteína de fusión hVEGFr-IgG, pueden utilizarse de manera similar. Por ejemplo, la proteína de fusión se une a un soporte inmovilizado y se determina la capacidad de un compuesto de prueba para desplazar el hVEGF radiomarcado del dominio hVEGFr de la proteína de fusión.

[0023] El término "recombinante", utilizado para referirse al hVEGF, al receptor hVEGF, a anticuerpos monoclonales o a otras proteínas, se refiere a proteínas que son producidas por la expresión de ADN recombinante en una célula huésped. La célula huésped puede ser procarionta (por ejemplo, una célula bacteriana tal como *E. coli*) o eucariota (por ejemplo, una levadura o una célula de mamífero).

Anticuerpos monoclonales antagonistas

- 5 [0024] La expresión "anticuerpo monoclonal" tal como se utiliza en la presente se refiere a un anticuerpo obtenido de una población de anticuerpos sustancialmente homogéneos, es decir, cada uno de los anticuerpos comprendido en la población es idéntico en especificidad y afinidad excepto por posibles mutaciones de aparición natural que pueda haber en cantidades menores. Debería apreciarse que, como resultado de tales mutaciones de aparición natural y similares, una composición de anticuerpos monoclonales de la invención, que mayormente contendrá anticuerpos que pueden unirse específicamente al hVEFG también pueden contener cantidades de otros anticuerpos.
- 10 [0025] De este modo, el modificador "monoclonal" indica el carácter del anticuerpo como habiendo sido obtenido de tal población sustancialmente homogénea de anticuerpos, y no debe interpretarse como que requiere la producción del anticuerpo mediante cualquier procedimiento en particular. Por ejemplo, los anticuerpos monoclonales de la invención pueden crearse utilizando el procedimiento de hibridoma descrito por primera vez por Kohler y Milstein, Nature 256: 495 (1975), o pueden crearse mediante procedimientos de ADN recombinante. Cabilly y otros, Patente de EE.UU. US 4.816.567.
- 15 [0026] En el procedimiento de hibridoma, se inmuniza a un ratón o a otro animal huésped adecuado con antígeno por vía subcutánea, intraperitoneal, o intramuscular para descubrir linfocitos que producen o son capaces de producir anticuerpos que se unen específicamente a la proteína o proteínas utilizadas en la inmunización. Alternativamente, los linfocitos pueden ser inmunizados *in vitro*. A continuación se fusionan los linfocitos con células de mieloma utilizando un agente de fusión adecuado, tal como polietilenglicol, para formar una célula de hibridoma. Goding, Monoclonal Antibodies: Principles and Practice, págs. 59-103 (Academic Press, 1986).
- 20 [0027] El antígeno puede ser hVEGF. El antígeno es opcionalmente un fragmento o parte de hVEFG que tiene uno o más restos de aminoácidos que participan en la unión del hVEGF a uno de sus receptores. Por ejemplo, la inmunización con el dominio extracelular de un hVEGF_r (es decir, un polipéptido hVEGF_r truncado que carece de los dominios transmembrana e intracelular) será especialmente útil en la producción de anticuerpos que son antagonistas del hVEGF, ya que es el dominio extracelular el que está implicado en la unión hVEGF.
- 25 [0028] Las células de hibridoma preparadas de este modo son cultivadas y dejadas crecer en un medio de cultivo adecuado que preferiblemente contiene una o más sustancias que inhiben el crecimiento o la supervivencia de las células parentales de mieloma no fusionadas. Por ejemplo, si las células parentales de mieloma carecen de la enzima hipoxantina guanina fosforribosil transferasa (HGPRT o HPRT), el medio de cultivo para los hibridomas habitualmente incluirá hipoxantina, aminopterina y timidina (medio HAT), sustancias que impiden el crecimiento de células deficientes en HGPRT.
- 30 [0029] Las células preferidas de mieloma son aquellas que se fusionan de manera eficaz, que sostienen un nivel elevado estable de expresión de anticuerpo mediante las células productoras de anticuerpo seleccionadas y que son sensibles a un medio tal como el medio HAT. Entre éstas, las estirpes celulares de mieloma preferidas son estirpes murinas, tales como las derivadas de los tumores murinos MOPC-21 y MPC-11, disponibles en el Salk Institute Cell Distribution Center, San Diego, California, EE.UU., células SP-2, disponibles en la American Type Culture Collection, Rockville, Maryland EE.UU. y células P3X63Ag8U.1 descritas por Yelton y otros, Curr. Top. Microbiol. Immunol. 81:1 (1978). También se han descrito estirpes celulares de mieloma humano y de heteromieloma humano-murino para la producción de anticuerpos monoclonales humanos. Kozbor, J. Immunol. 133: 3.001 (1984). Brodeur y otros, Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications, págs. 51-63 (Marcel Dekker, Inc., Nueva York, 1987).
- 35 [0030] El medio de cultivo en el que crecen las células de hibridoma se analiza para la producción de anticuerpos monoclonales dirigidos contra el antígeno. Preferiblemente, la especificidad de unión de los anticuerpos monoclonales producidos por células de hibridoma se determina mediante inmunoprecipitación o mediante un análisis de unión *in vitro*, tal como radioinmunoanálisis (RIA) o enzimoimmunoanálisis de adsorción (ELISA). Los anticuerpos monoclonales de la invención son aquellos que preferiblemente inmunoprecipitan hVEGF o aquellos que preferiblemente se unen a por lo menos uno de aquellos antígenos en el análisis de unión, y que son capaces de inhibir una actividad biológica del hVEGF.
- 40 [0031] Una vez identificadas las células de hibridoma que producen anticuerpos antagonistas de la especificidad, afinidad y actividad deseadas, pueden subclonarse los clones mediante procedimientos de dilución limitantes y cultivarse mediante procedimientos estándar. Goding, Monoclonal Antibodies: Principles and Practice, págs. 59-104 (Academic Press, 1986). Entre los medios de cultivo adecuados para este propósito se incluyen, por ejemplo, medio de Eagle modificado por Dulbecco o medio RPMI-1640. Además, las células de hibridoma pueden cultivarse *in vivo* como los tumores ascíticos en un animal.
- 45 [0032] Los anticuerpos monoclonales secretados por los subclones pueden aislarse o purificarse a partir del medio de cultivo, del líquido ascítico o del suero mediante procedimientos convencionales de purificación de inmunoglobulinas tales como, por ejemplo, columna de sefarsa-proteína A, cromatografía con hidroxipatita, electroforesis en gel, diálisis, o cromatografía de afinidad.
- 50 [0031] Una vez identificadas las células de hibridoma que producen anticuerpos antagonistas de la especificidad, afinidad y actividad deseadas, pueden subclonarse los clones mediante procedimientos de dilución limitantes y cultivarse mediante procedimientos estándar. Goding, Monoclonal Antibodies: Principles and Practice, págs. 59-104 (Academic Press, 1986). Entre los medios de cultivo adecuados para este propósito se incluyen, por ejemplo, medio de Eagle modificado por Dulbecco o medio RPMI-1640. Además, las células de hibridoma pueden cultivarse *in vivo* como los tumores ascíticos en un animal.
- 55 [0032] Los anticuerpos monoclonales secretados por los subclones pueden aislarse o purificarse a partir del medio de cultivo, del líquido ascítico o del suero mediante procedimientos convencionales de purificación de inmunoglobulinas tales como, por ejemplo, columna de sefarsa-proteína A, cromatografía con hidroxipatita, electroforesis en gel, diálisis, o cromatografía de afinidad.
- 60 [0031] Una vez identificadas las células de hibridoma que producen anticuerpos antagonistas de la especificidad, afinidad y actividad deseadas, pueden subclonarse los clones mediante procedimientos de dilución limitantes y cultivarse mediante procedimientos estándar. Goding, Monoclonal Antibodies: Principles and Practice, págs. 59-104 (Academic Press, 1986). Entre los medios de cultivo adecuados para este propósito se incluyen, por ejemplo, medio de Eagle modificado por Dulbecco o medio RPMI-1640. Además, las células de hibridoma pueden cultivarse *in vivo* como los tumores ascíticos en un animal.
- 65 [0032] Los anticuerpos monoclonales secretados por los subclones pueden aislarse o purificarse a partir del medio de cultivo, del líquido ascítico o del suero mediante procedimientos convencionales de purificación de inmunoglobulinas tales como, por ejemplo, columna de sefarsa-proteína A, cromatografía con hidroxipatita, electroforesis en gel, diálisis, o cromatografía de afinidad.

- 5 **[0033]** El ADN que codifica los anticuerpos monoclonales de la invención puede aislarse y secuenciarse fácilmente utilizando procedimientos convencionales (por ejemplo, utilizando sondas de oligonucleótidos que son capaces de unirse específicamente a genes que codifican las cadenas pesada y ligera de los anticuerpos murinos). Las células de hibridoma de la invención sirven como fuente preferida de tal ADN. Una vez aislado, el ADN puede colocarse en vectores de expresión que a continuación son transfectados a células huésped tales como células COS de simio, células de ovario de hámster chino (CHO) o células de mieloma, que al contrario no producen proteína inmunoglobulínica, para obtener la síntesis de anticuerpos monoclonales en las células huésped recombinantes.
- 10 **[0034]** El ADN puede modificarse opcionalmente para cambiar el carácter de la inmunoglobulina producida por su expresión. Por ejemplo, las formas humanizadas de anticuerpos murinos son producidas mediante la sustitución de una región determinante de complementariedad (CDR) del dominio variable del anticuerpo murino por la región correspondiente de un anticuerpo humano. En algunas realizaciones, los restos de aminoácidos de la región de entramado (FR) seleccionada del anticuerpo murino son sustituidos por los restos de aminoácidos correspondientes en el anticuerpo humano. Carter y otros, Proc. Nat. Acad. Sci. 89: 4.285 (1992); Carter y otros, BioTechnology 10: 15 163 (1992). Las formas quiméricas de anticuerpos murinos también son producidas por sustitución de la secuencia codificante por dominios constantes de las cadenas ligera y pesada humanas seleccionadas en lugar de las secuencias murinas homólogas. Cabilly y otros, Patente de EE.UU. US 4.816.567; Morrison y otros, Proc. Nat. Acad. Sci. 81: 6851 (1984).
- 20 **[0035]** Los anticuerpos incluidos dentro del alcance de la invención incluyen variantes de anticuerpos, tales como anticuerpos quiméricos (incluidos "humanizados") y anticuerpos híbridos que comprenden cadenas de inmunoglobulina que pueden unirse al hVEGF, y un epítipo no hVEGF.
- 25 **[0036]** Los anticuerpos de la presente invención incluyen todas las especies de origen, y clases de inmunoglobulina (por ejemplo, IgA, IgD, IgE, IgG e IgM) y subclases, así como fragmentos de anticuerpo (por ejemplo, Fab, F(ab')₂ y Fv), en tanto que puedan unirse al hVEGF y sean capaces de antagonizar una actividad biológica de hVEGF.
- 30 **[0037]** En una realización preferida de la invención, el anticuerpo monoclonal tendrá afinidad por el antígeno inmunizante de por lo menos aproximadamente 10⁹ litros/mol, tal como se ha determinado, por ejemplo, mediante el análisis Scatchard de Munson y Pollard, Anal. Biochem. 107: 220 (1980). Asimismo, el anticuerpo monoclonal inhibirá habitualmente la actividad mitógena o angiogénica del hVEGF en aproximadamente un 50%, preferiblemente en más de un 80% y más preferiblemente en más de un 90%, tal como se ha determinado, por ejemplo, mediante un análisis de supervivencia o proliferación celular *in vitro*, tal como se describe en el Ejemplo 2.
- 35 **[0038]** Para algunas aplicaciones terapéuticas y diagnósticas, es deseable que el anticuerpo monoclonal reaccione con unas pocas de todas las formas moleculares distintas del hVEGF. Por ejemplo, puede ser deseable disponer de un anticuerpo monoclonal que pueda unirse específicamente a polipéptidos hVEGF de secuencia de 165 aminoácidos pero no a polipéptidos hVEGF de secuencia de 121 o 189 aminoácidos. Dichos anticuerpos se identifican fácilmente mediante análisis comparativos ELISA o mediante inmunoprecipitación comparativa de los distintos polipéptidos hVEGF.
- 40 **[0039]** Para algunas aplicaciones terapéuticas y diagnósticas, es deseable que el anticuerpo monoclonal reaccione con unas pocas de todas las formas moleculares distintas del hVEGF. Por ejemplo, puede ser deseable disponer de un anticuerpo monoclonal que pueda unirse específicamente a polipéptidos hVEGF de secuencia de 165 aminoácidos pero no a polipéptidos hVEGF de secuencia de 121 o 189 aminoácidos. Dichos anticuerpos se identifican fácilmente mediante análisis comparativos ELISA o mediante inmunoprecipitación comparativa de los distintos polipéptidos hVEGF.
- Conjugados con partes citotóxicas
- 45 **[0039]** En algunas realizaciones es deseable proporcionar una parte citotóxica conjugada con un anticuerpo monoclonal específico de hVEGF o con un hVEGF_r. En estas realizaciones la citotoxina sirve para incapacitar o eliminar células que expresan hVEGF o se unen al mismo. El conjugado es dirigido a la célula por el dominio que es capaz de unirse al hVEGF.
- 50 **[0040]** De este modo, los anticuerpos monoclonales que son capaces de unirse al hVEGF están conjugados a citotoxinas. De un modo parecido, el hVEGF_r está conjugado a una citotoxina.
- 55 **[0041]** Habitualmente, la citotoxina es una citotoxina proteínica, por ejemplo, toxina de la difteria, toxina del ricino o toxina de *Pseudomonas*, aunque en el caso de algunas clases de inmunoglobulinas el propio dominio Fc del anticuerpo monoclonal puede servir para proporcionar la citotoxina (por ejemplo, en el caso de anticuerpos IgG₂, que son capaces de fijar complemento y de participar en la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC)). No obstante, no es necesario que la citotoxina sea proteínica y puede incluir agentes quimioterapéuticos utilizados hasta ese momento, por ejemplo, en el tratamiento de tumores.
- 60 **[0042]** La citotoxina se relaciona habitualmente con un anticuerpo monoclonal o fragmento del mismo mediante un enlace amida en la cadena principal dentro del dominio Fc del anticuerpo (o situado en parte del mismo o en todo) Cuando la función direccional es proporcionada por el hVEGF_r, la parte citotóxica es sustituida en cualquier dominio del receptor que no participe en la unión hVEGF; preferiblemente, la parte es sustituida en lugar de o en los dominios transmembrana y/o citoplasmático del receptor. El sitio óptimo de sustitución se determinará mediante experimentación sistemática y forma parte de las habilidades normales del experto en la materia.
- 65 **[0043]** Los conjugados que son fusiones de proteínas se crean fácilmente en cultivo celular recombinante mediante

la expresión de un gen que codifica el conjugado. Alternativamente, los conjugados se crean entrecruzando covalentemente la parte citotóxica con una cadena secundaria de restos de aminoácidos o con un carboxilo del extremo terminal C del anticuerpo o del receptor, utilizando procedimientos conocidos *per se* tales como intercambio disulfuro o unión a través de un enlace tioéster utilizando por ejemplo iminotiolato y metil-4-mercaptobutirimadato

5

Conjugados con otras partes

[0044] Los anticuerpos monoclonales y el hVEGF_r que son antagonistas del hVEGF están también conjugados a sustancias que quizás no se clasifican fácilmente como citotoxinas por sí mismas, pero que aumentan la actividad de las composiciones de la presente. Por ejemplo, los anticuerpos monoclonales o hVEGF_r capaces de unirse al hVEGF están fusionados con polipéptidos heterólogos, tales como secuencias víricas, con receptores celulares, con citocinas tales como TFN, interferones o interleucinas, con polipéptidos que tienen actividad anticoagulante y con otros polipéptidos biológicamente o inmunológicamente activos. Dichas fusiones se crean fácilmente mediante procedimientos recombinantes. Habitualmente, tales polipéptidos no inmunoglobulínicos son sustituidos por el dominio o los dominios constantes de un anticuerpo anti-hVEGF o por el dominio transmembrana y/o intracelular de un hVEGF_r. Alternativamente, son sustituidos por un dominio variable de un sitio de unión a antígenos de un anticuerpo anti-hVEGF descrito en la presente invención.

10

15

[0045] En realizaciones preferidas, tales polipéptidos no inmunoglobulínicos están unidos a los dominios constantes de un anticuerpo descrito en la presente invención, o son sustituidos por los mismos. Bennett y otros, J. Biol. Chem. 266: 23.060-23.067 (1991). Alternativamente, son sustituidos por el Fv de un anticuerpo de la presente invención para crear un anticuerpo polivalente quimérico que comprenda por lo menos un sitio presente de unión a antígenos que tenga especificidad por el hVEGF, y un sitio remplazado de unión a antígenos que tenga una función o especificidad distintas de las del anticuerpo de inicio.

20

25

Anticuerpos heteroespecíficos

[0046] Los anticuerpos monoclonales capaces de unirse al hVEGF sólo es necesario que contengan un único sitio de unión para los epítomos enumerados, habitualmente un solo complejo cadena ligera/pesada o un fragmento del mismo. No obstante, tales anticuerpos también pueden llevar opcionalmente dominios de unión que son capaces de unirse a un epítomo que no se encuentra en el hVEGF. Por ejemplo, la sustitución de la correspondiente secuencia de aminoácidos o restos de aminoácidos de un anticuerpo nativo anti-hVEGF por la determinante de complementariedad, y si es necesario por restos de entramado, de un anticuerpo con especificidad por un antígeno distinto del hVEGF creará un anticuerpo poliespecífico que comprende un sitio de unión a antígenos que tiene especificidad por el hVEGF y otro sitio de unión a antígenos que tiene especificidad por el antígeno no hVEGF. Estos anticuerpos son por lo menos bivalentes, pero pueden ser polivalentes, dependiendo del número de sitio de unión a antígenos que posea la clase de anticuerpos elegida. Por ejemplo, los anticuerpos de la clase IgM serán polivalentes.

30

35

[0047] En realizaciones preferidas de la invención tales anticuerpos son capaces de unirse a un epítomo hVEGF y a: (a) un polipéptido activo en coagulación sanguínea, tal como una proteína C o un factor tisular, (b) una proteína citotóxica tal como un factor de necrosis tumoral (TNF), o (c) un receptor de superficie celular no hVEGF_r, tal como CD4, o un receptor HER-2 (Maddon y otros, Cell 42: 93 (1985); Coussens y otros, Science 230: 1.137 (1985)). Los anticuerpos multivalentes heteroespecíficos se crean de un modo conveniente cotransformando una célula huésped con ADN que codifica las cadenas pesada y ligera de ambos anticuerpos y recuperando a partir de entonces, mediante cromatografía de inmutafinidad o similar, la proporción de anticuerpos expresados que tienen la propiedades de unión a antígenos deseadas. Alternativamente, tales anticuerpos se crean mediante recombinación *in vitro* de anticuerpos mono-específicos.

40

45

Anticuerpos monovalentes

[0048] Los procedimientos para preparar anticuerpos monovalentes son bien conocidos en el estado de la técnica. Por ejemplo, un procedimiento implica la expresión recombinante de la cadena ligera y la cadena pesada modificada de la inmunoglobulina. La cadena pesada se halla truncada generalmente en cualquier punto en la región Fc de modo que se impide el entrecruzamiento de las cadenas pesadas. Alternativamente, los restos relevantes de cisteína son sustituidos por otro resto de aminoácido o son eliminados para evitar el entrecruzamiento. Los procedimientos *in vitro* son también adecuados para preparar anticuerpos monovalentes. Por ejemplo, los fragmentos Fab se preparan mediante escisión enzimática de un anticuerpo intacto.

50

55

Usos diagnósticos

[0049] Para las aplicaciones diagnósticas, los anticuerpos o hVEGF_r de la invención habitualmente pueden marcarse con una parte detectable. La parte detectable puede ser cualquiera que sea capaz de producir, directa o indirectamente, una señal detectable. Por ejemplo, la parte detectable puede ser un radioisótopo, tal como ³H, ¹⁴C, ³²P, ³⁵S, o ¹²⁵I, un compuesto fluorescente o quimioluminiscente, tal como fluoresceína isotiocianato, rodamina o luciferina; marcadores isotópicos radiactivos, tales como por ejemplo, ¹²⁶I, ³²P, ¹⁴C o ³H o una enzima, tal como

60

65

fosfatasa alcalina, betagalactosidasa o peroxidasa de rábano picante.

[0050] Puede utilizarse cualquier procedimiento conocido en el estado de la técnica para conjugar el anticuerpo o hVEGF_r con la parte detectable, incluidos los procedimientos descritos por Hunter y otros, *Nature*, 144: 945 (1962); David y otros, *Biochemistry*, 13: 1.014 (1974); Pain y otros, *J. Immunol. Meth.* 40: 219 (1981); y Nygren, *J. Histochem. and Cytochem.* 30: 407 (1982).

[0051] Los anticuerpos y receptores de la presente invención pueden utilizarse en cualquier procedimiento de análisis conocido, tal como análisis de unión competitiva, análisis de intercalado, directos e indirectos, y análisis de inmunoprecipitación. Zola, *Monoclonal Antibodies: A Manual of Techniques*, págs. 147-158 (CRC Press, Inc., 1987).

[0052] Los análisis de unión competitiva se basan en la capacidad de un estándar marcado (que puede ser hVEGF o una parte inmunológicamente reactiva del mismo) para competir con el analito de la muestra de prueba (hVEGF) a la hora de unirse con una cantidad limitada de anticuerpo. La cantidad de hVEGF en la muestra de prueba es inversamente proporcional a la cantidad de estándar que se une a los anticuerpos o receptores. Para facilitar la determinación de la cantidad de estándar que se une, los anticuerpos o receptores generalmente se insolubilizan antes o después de la competición, de modo que el estándar y el analito que están unidos a los anticuerpos o receptores pueden separarse de un modo conveniente del standard y el analito que permanecen sin unir.

[0053] Los análisis de intercalado implican el uso de dos anticuerpos o receptores, cada uno de ellos capaz de unirse a distinta parte inmunógena, o epítipo, de la proteína que tiene que detectarse. En un análisis de intercalado, el analito de la muestra de prueba se une con un primer anticuerpo o receptor que es inmovilizado en un soporte sólido y a partir de entonces un segundo anticuerpo se une al analito, formando de este modo un complejo insoluble de tres partes. David y Greene, patente de EE.UU. US 4.376.110. El segundo anticuerpo o receptor puede marcarse con una parte detectable (análisis de intercalado directo) o puede medirse utilizando un anticuerpo anti-inmunoglobulina que está marcado con una parte detectable (análisis de intercalado indirecto). Por ejemplo, un tipo de análisis de intercalado es un análisis ELISA, en cuyo caso la parte detectable es una enzima.

[0054] Los anticuerpos o receptor de la presente invención también son útiles para una técnica de diagnóstico por la imagen *in vivo*, en la que se administra un anticuerpo o hVEGF_r marcado con una parte detectable a un paciente, preferiblemente en el torrente circulatorio, y se analiza la presencia y localización del anticuerpo o receptor marcado en el paciente. Esta técnica de diagnóstico por la imagen es útil, por ejemplo, en la estadificación y tratamiento de neoplasmas. El anticuerpo o hVEGF_r se marca con una parte que es detectable en un mamífero, bien mediante resonancia magnética nuclear, radiología u otro medio de detección conocido en el estado de la técnica.

Usos terapéuticos

[0055] Para aplicaciones terapéuticas, se administran los antagonistas de la invención a un mamífero, preferiblemente a un humano, en una forma de dosificación farmacéuticamente aceptable, que incluye aquellas que pueden administrarse a un humano por vía intravenosa como bolo o mediante infusión continua a lo largo de un período de tiempo, por vía intramuscular, intraperitoneal, intracerebrospinal, subcutánea, intraarticular, intrasnovial, intratecal, oral, tópica o por inhalación. Los antagonistas también se administran adecuadamente por vía intratumoral, peritumoral, intralesional o perilesional para ejercer efectos terapéuticos locales así como sistémicos. La vía intraperitoneal se espera que sea particularmente útil, por ejemplo, en el tratamiento de tumores ováricos.

[0056] Dichas formas de dosificación incluyen portadores farmacéuticamente aceptables que son inherentemente no tóxicos y no terapéuticos. Entre los ejemplos de tales portadores se incluyen intercambiadores iónicos, alúmina, estearato de aluminio, lecitina, proteínas séricas, tales como albúmina sérica humana, sustancias tampón tales como fosfatos, glicina, ácido sórbico, sorbato de potasio, mezclas glicéridas parciales de ácidos grasos vegetales saturados, agua, sales o electrólitos tales como sulfato de protamina, fosfato de hidrógeno disódico, fosfato de hidrógeno de potasio, cloruro de sodio, sales de cinc, sílice coloidal, trisilicato de magnesio, pirrolidona de polivinilo, sustancias a base de celulosa y polietilenglicol. Entre los portadores para formas tópicas de antagonistas a base de gel se incluyen polisacáridos tales como carboximetilcelulosa sódica o metilcelulosa, polivinilpirrolidona, poliácridatos, polímeros bloque de polioxietileno-polioxipropileno y alcoholes de cera de madera. En todas las administraciones, son adecuadas formas convencionales de administración prolongada. Entre tales formas se incluyen, por ejemplo, microcápsulas, nanocápsulas, liposomas, parches, formas de inhalación, atomizadores nasales, comprimidos sublinguales y preparados de liberación prolongada. El antagonista se formulará habitualmente en tales vehículos a una concentración de aproximadamente 0,1 mg/ml a 100 mg/ml.

[0057] Entre los ejemplos adecuados de preparados de liberación prolongada se incluyen matrices semipermeables de polímeros hidrófobos sólidos que contienen el antagonista las cuales se hallan en forma de artículos conformados, por ejemplo, películas o microcápsulas. Entre los ejemplos de matrices de liberación prolongada se incluyen hidrogeles de poliésteres (por ejemplo, poli(2-hidroxietilmetacrilato) tal como se describe en Langer y otros, *J. Biomed. Mater. Res.* 15: 167 (1981) y Langer, *Chem. Tech.*, 12: 98-105 (1982), o poli(vinilalcohol), poliláctidos (Patente de EE.UU. US 3.773.919), copolímeros de ácido L-glutámico y gamma etil-L- glutamato (Sidman y otros, *Biopolymers*, 22: 547 (1983), etileno-vinil acetato no degradable (Langer y otros, *supra*), copolímeros degradables

de ácido láctico y ácido glicólico tales como el Lupron Depot™ (microesferas inyectables compuestas de copolímero ácido láctico-ácido glicólico y acetato de leuprolido) y poli-D(-)-3-ácido hidroxibutírico. Aunque polímeros tales como el etileno-vinil acetato y el ácido láctico-ácido glicólico permiten la liberación de moléculas durante más de 100 días, algunos hidrogeles liberan proteínas durante períodos de tiempo más cortos. Cuando los antagonistas de polipéptidos encapsulados permanecen en el cuerpo durante un período largo de tiempo pueden desnaturalizarse o agregarse como resultado de la exposición a la humedad a 37 °C, lo que es causa de una pérdida de la actividad biológica y de posibles cambios en la inmunogenicidad. Pueden concebirse estrategias razonables para la estabilización dependiendo del mecanismo implicado. Por ejemplo, si se descubre que el mecanismo de agregación es la formación de enlaces SS intermoleculares a través de intercambio tio-disulfuro, puede conseguirse la estabilización modificando restos sulfhidrilo, liofilizando a partir de soluciones ácidas, controlando el contenido de humedad, utilizando aditivos apropiados y elaborando composiciones de matrices de polímeros específicos.

[0058] La liberación prolongada de composiciones antagonistas de hVEGF también incluye anticuerpos antagonistas y hVEGFr secuestrados por liposomas. Los liposomas que contienen los antagonistas se preparan mediante procedimientos conocidos en el estado de la técnica, tales como los que se describen en Epstein y otros, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 82: 3.688 (1985); Hwang y otros, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77: 4.030 (1980); patente de EE.UU. US 4.485.045; patente de EE.UU. US 4.544.545. Normalmente los liposomas son de tipo unilamelar pequeño (aproximadamente 200-800 angstroms) en los cuales el contenido lípido es mayor que aproximadamente el 30% del colesterol molecular, ajustándose la proporción seleccionada al tratamiento HRG óptimo. Los liposomas con aumento del tiempo de circulación se describen en la patente de EE.UU. US 5.013.556.

[0059] Otro uso de la presente invención comprende incorporar un antagonista del hVEGF en artículos formados. Dichos artículos pueden utilizarse para modular el crecimiento de las células endoteliales y la angiogénesis. Además, la invasión de tumores y la metástasis pueden modularse con estos artículos.

[0060] Para la prevención o tratamiento de la enfermedad, la posología adecuada de antagonista dependerá del tipo de enfermedad que deba tratarse, tal como se ha definido anteriormente, la gravedad y el curso de la enfermedad, si los anticuerpos se administran con propósitos preventivos o terapéuticos, del tratamiento anterior, de los antecedentes clínicos del paciente y de la respuesta al antagonista, y del criterio del médico que lleva el caso. El antagonista se administra de manera adecuada al paciente de una sola vez o a lo largo de series de tratamientos.

[0062] Los antagonistas del hVEGF son útiles en el tratamiento de varias enfermedades y trastornos neoplásicos. Los neoplasmas que son susceptibles de tratamiento incluyen carcinomas de mama, carcinomas de pulmón, carcinomas gástricos, carcinomas de esófago, carcinomas colorrectales, carcinomas de hígado, carcinomas de ovario, tecomas, arrenoblastomas, carcinomas cervicales, carcinomas del endometrio, hiperplasia del endometrio, endometriosis, fibrosarcomas, coriocarcinoma, cáncer de cabeza y cuello, carcinoma nasofaríngeo, carcinomas de laringe, hepatoblastoma, sarcoma de Kaposi, melanoma, carcinomas de piel, hemangioma, hemangioma cavernoso, hemangioblastoma, carcinomas de páncreas, retinoblastoma, astrocitoma, glioblastoma, Schwannoma, oligodendroglioma, meduloblastoma, neuroblastomas, rabdomiosarcoma, sarcoma osteogénico, leiomiomas, carcinomas del tracto urinario, carcinomas de tiroides, tumor de Wilm, carcinoma de células renales y carcinoma de próstata.

[0063] Dependiendo del tipo y la gravedad de la enfermedad, aproximadamente de 1 µg/kg a 15 mg/kg de antagonista es una posible posología inicial para administrar al paciente, bien, por ejemplo, mediante una o más administraciones separadas, o mediante infusión continua. Una posología diaria habitual oscilaría entre aproximadamente 1 µg/kg a 100 mg/kg o más, dependiendo de los factores mencionados anteriormente. En el caso de administraciones repetidas a lo largo de varios días o más, dependiendo de la enfermedad, se repite el tratamiento hasta que tiene lugar la supresión deseada de los síntomas de la enfermedad. No obstante, pueden ser útiles otras pautas. El progreso de esta terapia se controla fácilmente mediante técnicas y análisis convencionales incluyendo, por ejemplo, obtención de imágenes radiográficas de tumores.

[0064] Según otra realización de la invención, la eficacia del antagonista para prevenir o tratar la enfermedad puede mejorarse administrando el antagonista serialmente o en combinación con otro agente que sea eficaz para estos propósitos, tales como el factor de necrosis tumoral (TNF), un anticuerpo capaz de inhibir o neutralizar la actividad angiogénica del factor de crecimiento de fibroblastos (FGF) ácidos o básicos o el factor de crecimiento de hepatocitos (HGF), un anticuerpo capaz de inhibir o neutralizar las actividades coagulantes del factor tisular, la proteína C, o la proteína S (véase Esmon y otros, publicación de patente PCT n.º WO 91/01753, publicada el 21 de febrero de 1991), o uno o más agentes terapéuticos convencionales tales como, por ejemplo, agentes alquilantes, antagonistas del ácido fólico, anti-metabolitos del metabolismo del ácido nucleico, antibióticos, análogos de la pirimidina, 5-fluorouracilo, nucleósidos de purina, aminas, aminoácidos, nucleósidos de triazol, o corticosteroides. Estos agentes pueden estar presentes en la composición administrada o pueden administrarse por separado. Asimismo, el antagonista se administra de manera adecuada serialmente o en combinación con tratamientos radiológicos, bien implicando la irradiación o la administración de sustancias radioactivas.

[0065] En una realización, la vascularización de tumores es atacada en la terapia de combinación. Se administran uno o más antagonistas del hVEGF a pacientes con tumores a dosis terapéuticamente eficaces tal como se

determina, por ejemplo, observando la necrosis del tumor o su foco metastásico, si lo hay. Esta terapia continúa hasta un punto en que no se observa más un efecto beneficioso o el examen clínico no muestra restos del tumor o de cualquier foco metastásico. A continuación, se administra TNF, solo o en combinación con un agente auxiliar, tal como alfa-, beta- o gamma-interferón, anticuerpo anti-HER2, heregulina, anticuerpo anti-heregulina, factor D, interleuquina-1 (IL-1), interleuquina-2 (IL-2), factor de estimulación de colonias de granulocitos y macrófagos (GM-CSF) o agentes que inducen la coagulación microvascular en tumores, tales como anticuerpo anti-proteína C, anticuerpo anti-proteína S, o proteína de unión a C4b (véase, Esmon, et al., Publicación de Patente PCT No. WO 91/01753, publicada el 21 de febrero de 1991), o calor o radiación.

[0066] Dado que los agentes auxiliares variarán en su efectividad, es deseable comparar su impacto en el tumor mediante el cribado de matrices de modo convencional. La administración del antagonista del hVEGF y TNF se repite hasta conseguir el efecto clínico deseado. Alternativamente, el antagonista o antagonistas del hVEGF se administran junto con TNF y, opcionalmente, un agente o agentes auxiliares. En casos en los que se hallan tumores sólidos en las extremidades o en otras localizaciones susceptibles de aislamiento de la circulación, los agentes terapéuticos aquí descritos se administran al tumor u órgano aislado. En otras realizaciones, se administra al paciente conjuntamente con el antagonista del hVEGF un antagonista del FGF o del factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), tal como un anticuerpo neutralizante anti-FGF o anti-PDGF. El tratamiento con antagonistas del hVEGF se puede suspender de manera óptima durante periodos de curación de heridas o neovascularización deseable.

Otros usos

[0067] Los anticuerpos anti-hVEGF de la presente invención también son útiles como agentes de purificación por afinidad. En este proceso, los anticuerpos contra hVEGF se inmovilizan en un soporte adecuado, tal como una resina Sephadex o papel de filtro, utilizando métodos conocidos en la técnica. A continuación, el anticuerpo inmovilizado se pone en contacto con una muestra que contiene el hVEGF a purificar y, a continuación, se lava el soporte con un disolvente adecuado que eliminará sustancialmente todo el material en la muestra a excepción del hVEGF, que está unido al anticuerpo inmovilizado. Finalmente, el soporte se lava con otro disolvente adecuado, tal como tampón de glicina, pH 5,0, que liberará el hVEGF del anticuerpo.

[0068] Los siguientes ejemplos se ofrecen únicamente con propósitos ilustrativos, y de ningún modo pretenden limitar el alcance de la invención.

Ejemplo 1

Preparación de anticuerpos monoclonales anti-hVEGF

[0069] Para obtener hVEGF conjugado con hemocianina de lapa (KLH) para inmunización, se mezcló hVEGF recombinante (165 aminoácidos), Leung y otros, Science 246: 1.306 (1989), con KLH a una proporción 4:1 en presencia de glutaraldehído al 0,05% y se incubó la mezcla a temperatura ambiente durante 3 horas removiendo suavemente. A continuación se dializó la mezcla frente a solución salina tamponada con fosfato (PBS) a 4 °C durante toda la noche.

[0070] Se inmunizó a ratones Balb/c cuatro veces cada dos semanas mediante inyecciones intraperitoneales con 5 µg de hVEGF conjugado con 20 µg de KLH, y se volvieron a inmunizar con la misma dosis de hVEGF conjugado con KLH cuatro días antes de la fusión celular.

[0071] Las células del bazo de los ratones inmunizados se fusionaron con células de mieloma P3X63Ag8U.1 Yelton y otros, Curr. Top. Microbiol. Immunol. 81: 1 (1978), utilizando polietilenglicol (PEG) al 35% tal como se describe en Yarmush y otros, Proc. Nat. Acad. Sci. 77: 2.899 (1980). Los hibridomas se seleccionaron en medio HAT.

[0072] Se cribaron los sobrenadantes de los cultivos celulares de hibridoma para la producción de anticuerpos anti-hVEGF mediante análisis ELISA utilizando placas de microtitulación recubiertas con hVEGF. Se determinó el anticuerpo que se había unido al hVEGF en cada uno de los pocillos utilizando inmunoglobulina IgG de cabra anti-murina conjugada con fosfatasa alcalina y el sustrato p-nitrofenil fosfato. Harlow & Lane, Antibodies: A Laboratory Manual, pág. 597 (Cold Spring Harbor Laboratory, 1988). Las células de hibridoma determinadas de este modo para producir anticuerpos anti-hVEGF se subclonaron mediante dilución limitante, y se eligieron dos de estos clones, designados A4.6.1 y B2.6.2, para posteriores estudios.

Ejemplo 2

Caracterización de anticuerpos monoclonales anti-hVEGF

A. Especificidad de antígenos

[0073] Las especificidades de unión de los anticuerpos monoclonales anti-hVEGF producidos por los hibridomas

A4.6.1 y B2.6.2 se determinaron mediante ELISA. Los anticuerpos monoclonales se añadieron a los pocillos de las placas de microtitulación que anteriormente habían sido recubiertas con hVEGF, FGF, HGF o con factor de crecimiento epidérmico. El anticuerpo unido se detectó con peroxidasa conjugada con inmunoglobulinas IgG de cabra anti-murinas. Los resultados de estos análisis confirmaron que los anticuerpos monoclonales producidos por los hibridomas A4.6.1 y B2.6.2 se unen al hVEGF, pero no de forma detectable a aquellos otros factores de crecimiento de proteínas.

B. Mapeo de epítomos

[0074] Se utilizó un análisis ELISA de unión competitiva para determinar si los anticuerpos monoclonales producidos por los hibridomas A4.6.1 y B2.6.2 se unen a los mismos epítomos (sitios) o a epítomos distintos en el hVEGF. Kim y otros, *Infect. Immun.* 57: 944 (1989). Se añadió cada uno de los anticuerpos monoclonales anti-hVEGF sin marcar (A4.6.1 o B2.6.2) o el anticuerpo irrelevante anti-HGF (isotipo IgG1) a los pocillos de placas de microtitulación que anteriormente habían sido recubiertos con hVEGF. A continuación se añadieron anticuerpos monoclonales anti-hVEGF biotinilados (BIO-A4.6.1 o BIO-B2.6.2). La proporción de anticuerpo biotinilado frente a anticuerpo sin marcar era 1:1.000. La unión de los anticuerpos biotinilados se visualizó mediante la adición de peroxidasa conjugada con avidina, seguido de o-fenilendiamina dihidrocloruro y peróxido de hidrógeno. El cambio de color en la reacción, que indica la cantidad de anticuerpo biotinilado unido, se determinó midiendo la densidad óptica (DO) a 495 nm de longitud de onda.

[0075] Tal como se muestra en la figura 1, en cada caso, la unión de anticuerpo anti-hVEGF biotinilado fue inhibida por el anticuerpo sin marcar correspondiente, pero no por el otro anticuerpo anti-hVEGF sin marcar o el anticuerpo anti-HGF. Estos resultados indican que los anticuerpos monoclonales producidos por los hibridomas A4.6.1 y B2.6.2 se unen a distintos epítomos en el hVEGF.

C. Isotipado

[0076] Los isotipos de los anticuerpos monoclonales anti-hVEGF producidos por los hibridomas A4.6.1 y B2.6.2 se determinaron mediante ELISA. Se añadieron muestras del medio de cultivo (sobrenadante) en las cuales crecía cada uno de los hibridomas a las placas de pocillos de microtitulación que anteriormente se habían recubierto con hVEGF. Los anticuerpos monoclonales anti-hVEGF capturados se incubaron con distintas inmunoglobulinas de cabra anti-murinas conjugadas con fosfatasa alcalina específica del isotipo y se determinó la unión de los anticuerpos conjugados a los anticuerpos monoclonales anti-hVEGF mediante la adición de p-nitrofenilo fosfato. Se midió el cambio de color en la reacción a 405 nm con un lector de placas ELISA.

[0077] Mediante este procedimiento, se determinó que el isotipo de los anticuerpos monoclonales producidos por los hibridomas A4.6.1 y B2.6.2 era una IgG1.

D. Afinidad de unión

[0078] Las afinidades de los anticuerpos monoclonales anti-hVEGF producidos por los hibridomas A4.6.1 y B2.6.2 por hVEGF se determinaron mediante análisis de unión competitiva. Se añadió una concentración subóptima predeterminada de anticuerpo monoclonal a las muestras que contenían 20.000-40.000 cpm de hVEGF marcado con ^{125}I (1-2 ng) y varias cantidades conocidas de hVEGF sin marcar (1-1.000 ng). Tras 1 hora a temperatura ambiente, se añadieron 100 μl de antisuero Ig de cabra anti-murino (Pel-Freez, Rogers, AR USA) y se incubaron las mezclas durante otra hora a temperatura ambiente. Se precipitaron los complejos de anticuerpo y proteína unida (complejos inmunes) mediante la adición de 500 μl de polietilenglicol al 6% (PEG, % en peso molecular} 8.000) a 4 $^{\circ}\text{C}$., seguido de centrifugación a 2.000 x G. Durante 20 minutos a 4 $^{\circ}\text{C}$. Se determinó la cantidad de ^{125}I -hVEGF unido al anticuerpo monoclonal anti-hVEGF en cada muestra contando el material sedimentado en un contador gamma.

[0079] Las constantes de afinidad se calcularon a partir de los datos obtenidos mediante análisis Scatchard. Se calculó que la afinidad del anticuerpo monoclonal anti-hVEGF producido por el hibridoma A4.6.1 era de $1,2 \times 10^9$ litros/mol. Se calculó que la afinidad del anticuerpo monoclonal anti-hVEGF producido por el hibridoma B2.6.2 era de $2,5 \times 10^9$ litros/mol.

E. Inhibición de la actividad mitógena hVEGF

[0080] Se sembraron células endoteliales de capilares (ACE) de corteza suprarrenal bovina, Ferrara y otros, *Proc. Nat. Acad. Sci.* 84: 5.773 (1987), a una densidad de 10^4 células/ml en 12 placas de múltiples pocillos, y se añadieron 2,5 ng/ml del hVEGF a cada pocillo en presencia o ausencia de varias concentraciones de los anticuerpos monoclonales anti-hVEGF producidos por los hibridomas A4.6.1 o B2.6.2, o un anticuerpo monoclonal irrelevante anti-HGF. Tras cultivo de 5 días, se contaron las células de cada pocillo en un contador Coulter. Como control, se cultivaron células ACE en ausencia de hVEGF añadido.

[0081] Tal como se muestra en la figura 2, ambos anticuerpos monoclonales anti-hVEGF inhibieron la capacidad del

hVEGF añadido para soportar el crecimiento o la supervivencia de las células ACE bovinas. El anticuerpo monoclonal producido por el hibridoma A4.6.1 inhibió por completo la actividad mitógena del hVEGF (en más de aproximadamente un 90% de inhibición), mientras que el anticuerpo monoclonal producido por el hibridoma B2.6.2 sólo inhibió parcialmente la actividad mitógena del hVEGF.

5

F. Inhibición de la unión al hVEGF

[0082] Las células ACE bovinas se sembraron a una densidad de $2,5 \times 10^4$ células/0,5 ml/pocillo en 24 placas de pocillos de microtitulación en medio Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) que contenía suero de ternera al 10%, glutamina 2 mM y 1 ng/ml de factor básico de crecimiento de fibroblastos. Tras cultivar durante toda la noche, se lavaron las células una vez en tampón de unión (volúmenes iguales de DMEM y medio F12 más HEPES 25 mM y albúmina sérica bovina al 1%) a 4 °C.

10

[0083] Se preincubaron 12.000 cpm de ^{126}I -hVEGF (aproximadamente 5×10^4 cpm/ng/ml) durante 30 minutos con 5 µg del anticuerpo monoclonal anti-hVEGF producido por los hibridomas A4.6.1, B2.6.2 o A2.6.1 (250 µl del volumen total), y a continuación se añadieron las mezclas a las células ACE bovinas en las placas de microtitulación. Tras incubar las células durante 3 horas a 4 °C, se lavaron las células tres veces con tampón de unión a 4 °C, se solubilizaron mediante la adición de 0,5 ml de NaOH 0,2 N y se contaron en un contador gamma.

15

[0084] Tal como se muestra en la figura 3 (arriba), los anticuerpos monoclonales anti-hVEGF producidos por los hibridomas A4.6.1 y B2.6.2 inhibieron la unión del hVEGF a las células ACE bovinas. Por el contrario, los anticuerpos monoclonales anti-hVEGF producidos por el hibridoma A2.6.1 no tuvieron al parecer ningún efecto en la unión del hVEGF a las células ACE bovinas. Coincidente con los resultados obtenidos en el análisis de proliferación celular descrito anteriormente, el anticuerpo monoclonal producido por el hibridoma A4.6.1 inhibió la unión del hVEGF a una mayor cantidad de anticuerpo monoclonal producido por el hibridoma B2.6.2.

20

25

[0085] Tal como se muestra en la figura 3 (abajo), el anticuerpo monoclonal anti-hVEGF producido por el hibridoma A4.6.1 inhibió por completo la unión del hVEGF a las células ACE bovinas en una proporción molar 1:250 del hVEGF frente al anticuerpo.

30

G. Reactividad cruzada con otras isoformas VEGF

[0086] Para determinar si el anticuerpo monoclonal anti-hVEGF producido por el hibridoma A4.6.1 reacciona con las formas del hVEGF de 121 y 189 aminoácidos, se analizó el anticuerpo para conocer su capacidad para inmunoprecipitar aquellos polipéptidos.

35

[0087] Las células humanas 293 se transfectaron con vectores que comprenden la secuencia codificante de nucleótidos de los polipéptidos hVEGF de 121 y 189 aminoácidos, tal como se ha descrito. Leung y otros, Science 246: 1.306 (1989). Dos días después de la transfección, se transfirieron las células a un medio que carecía de cisteína y de metionina. Se incubaron las células 30 minutos en aquel medio, a continuación se añadieron 100 µCi/ml de ^{36}S -metionina y ^{36}S -cisteína al medio y se incubaron las células durante otras dos horas. El marcado se averiguó transfiriendo las células a un medio sin suero e incubando durante tres horas. Se recogieron los medios de cultivo y se lisaron las células incubando durante 30 minutos en tampón de lisis (NaCl 150 mM, NP40 al 1%, desoxicolato al 0,5%, dodecil sulfato sódico (SDS) al 0,1%, Tris 50 mM, pH 8,0). Los residuos celulares se eliminaron de los lisados mediante centrifugación a 200 x G durante 30 minutos.

40

45

[0088] Se incubaron muestras de 500 µl de cultivo celular y se incubaron los lisados celulares con 2 µl de anticuerpo de hibridoma A4.6.1 (2,4 mg/ml) durante 1 hora a 4 °C, y a continuación se incubaron con 5 µl de inmunoglobulina IgG de conejo anti-murina IgG durante 1 hora a 4 °C. Se precipitaron los complejos inmunes de hVEGF marcado con ^{35}S y anticuerpo monoclonal anti-hVEGF con proteína A-sefarosa (Pharmacia), a continuación se sometieron a electroforesis en gel de poliacrilamida al 12%-SDS en condiciones de reducción. El gel se expuso a película radiográfica para analizar proteínas radiomarcadas inmunoprecipitadas mediante autorradiografía.

50

[0089] Los resultados de aquel análisis indicaron que el anticuerpo monoclonal anti-hVEGF producido por el hibridoma A4.6.1 presentaba reactividad cruzada con ambas formas del hVEGF de 121 y 189 aminoácidos.

55

Ejemplo 3

Preparación de receptor hVEGF-proteína de fusión IgG

60

[0090] Las secuencias codificantes de nucleótidos y de aminoácidos del receptor hVEGF flt se describen en Shibuya y otros, Oncogene 5: 519-524 (1990) La secuencia codificante del dominio extracelular del receptor hVEGF flt se fusionó con la secuencia codificante de una cadena pesada de IgG1 humana en un proceso de dos fases

[0091] Se utilizó mutagénesis dirigida para introducir una restricción BstBI en el ADN que codifica flt en el sitio 5' del codón para el aminoácido 759 de flt, y para convertir el único sitio de restricción BstEII del plásmido pBSSK.FC,

65

Bennett y otros, Biol. Chem. 266: 23.060-23.067 (1991), en un sitio BstBI. El plásmido modificado se digirió con EcoRI y BstBI y el gran fragmento resultante del ADN plásmido se unió junto con un fragmento EcoRI-BstBI del ADN flt que codifica el dominio extracelular (1-758 aminoácidos) del receptor hVEGF flt.

5 **[0092]** La construcción resultante se digirió con ClaI y NotI para generar un fragmento de aproximadamente 3,3 kb, que a continuación se insertó en el sitio de clonación múltiple del vector de expresión de mamíferos pHEBO2 (Leung y otros, Neuron 8: 1.045 (1992) mediante ligación. Los extremos del fragmento de 3,3 kb se modifican, por ejemplo, mediante la adición de enlazadores, para obtener inserción del fragmento en el vector en la orientación correcta para la expresión.

10 **[0093]** Las células huésped de mamíferos (por ejemplo, células CEN4; Leung y otros, *supra*) son transfectadas con el plásmido pHEBO2 que contiene el inserto flt mediante electroporación. Las células transfectadas son cultivadas en un medio que contiene aproximadamente suero bovino fetal al 10%, glutamina 2 mM y antibióticos, y cuando se alcanza aproximadamente una confluencia del 75% son transferidas al medio sin suero. El medio es condicionado durante 3-4 días antes de la recogida y la proteína de fusión flt-IgG es purificada del medio condicionado mediante cromatografía en una matriz de afinidad de proteína A esencialmente tal como se describe en Bennett y otros, J. Biol. Chem. 266: 23.060-23.067 (1991).

20 Ejemplo 4 (Ejemplo de referencia)

Inhibición de la formación de tumores con antagonistas hVEGF

25 **[0094]** Varias estirpes celulares de tumor humano que crecían en cultivo fueron analizadas para comprobar la producción de hVEGF mediante ELISA. Se observó que las estirpes celulares de tumor de ovario, pulmón, colon, gástrico, mama y cerebro producían hVEGF. Para posteriores estudios se utilizaron tres estirpes celulares que producían hVEGF, NEG 55 (al que también se hace referencia como G55) (estirpe celular de glioma humano obtenida del Dr. M. Westphal, Departamento de Neurocirugía, Hospital Universitario Eppendorf, Hamburgo, Alemania, a la que también se hace referencia como G55), A-673 (estirpe celular de rhabdomyosarcoma humano obtenida de la American Type Culture Collection (ATCC)), Rockville, Maryland EE.UU. 20852 con el número de estirpe celular CRL 1598) y SK-LMS-1 (estirpe celular de leiomyosarcoma obtenida de la ATCC con el número de estirpe celular HTB 88).

35 **[0095]** Se inyectó a ratones hembra Beige/nude de seis a diez semanas de vida (Charles River Laboratory, Wilmington, Massachusetts EE.UU.) con una inyección por vía subcutánea de $1-5 \times 10^8$ células tumorales en 100-200 μ l de PBS. En distintos momentos después de que se hubiera establecido la formación de tumor, se inyectó a los ratones por vía intraperitoneal una o dos veces por semana con diversas dosis de anticuerpo monoclonal anti-hVEGF A4.6.1, de un anticuerpo monoclonal anti-gp 120 irrelevante o de PBS. Se determinó el tamaño del tumor cada semana y al final del estudio se extirparon los tumores y se pesaron.

40 **[0096]** El efecto de varias cantidades de anticuerpo monoclonal anti-hVEGF A4.6.1 en la formación de tumores NEG 55 en ratones se muestra en las figuras 4 y 5. La figura 4 muestra que en los ratones tratados con 25 μ g o 100 μ g de anticuerpo monoclonal anti-hVEGF A4.6.1 empezando una semana después de la inoculación de células NEG 55 era sustancialmente inferior el índice de formación de tumores en comparación con los ratones tratados con el anticuerpo irrelevante o el PBS. La figura 5 muestra que cinco semanas después de la inoculación de las células NEG 55, el tamaño de los tumores en los ratones tratados con anticuerpo anti-hVEGF A4.6.1 era de aproximadamente un 50% (en el caso de ratones tratados con dosis de 25 μ g del anticuerpo) a un 85% (en el caso de ratones tratados con dosis de 100 μ g del anticuerpo) inferior al tamaño de los tumores tratados con anticuerpo irrelevante o PBS.

50 **[0097]** El efecto del tratamiento con anticuerpo monoclonal anti-hVEGF A4.6.1 en la formación de tumores SK-LMS-1 en ratones se muestra en la figura 6. Cinco semanas después de la inoculación de las células SK-LMS-1, el tamaño medio de los tumores en ratones tratados con el anticuerpo anti-hVEGF A4.6.1 era aproximadamente un 75% inferior al tamaño de los tumores en ratones tratados con anticuerpo irrelevante o PBS.

55 **[0098]** El efecto del tratamiento con anticuerpo monoclonal anti-hVEGF A4.6.1 en la formación de tumores A673 en ratones se muestra en la figura 7. Cuatro semanas después de la inoculación de las células A673, el tamaño medio de los tumores en ratones tratados con el anticuerpo anti-hVEGF A4.6.1 era aproximadamente de un 60% (en el caso de ratones tratados con dosis de 10 μ g del anticuerpo) a más de un 90% (en el caso de ratones tratados con dosis de 50-400 μ g del anticuerpo) inferior al tamaño de los tumores en ratones tratados con anticuerpo irrelevante o PBS.

60 Ejemplo 5

65 Análisis del efecto directo del anticuerpo anti-hVEGF en la formación de células tumorales en cultivo

[0099] Se sembraron células de glioblastoma humano NEG55 o células de rhabdomyosarcoma A673 a una densidad de 7×10^3 células/pocillo en placas de multipocillos (12 pocillos/placa) en medio F12/DMEM que contenía suero fetal de ternero al 10%, glutamina al 2mM y antibióticos. A continuación se añadió anticuerpo anti-hVEGF A4.6.1 a los cultivos celulares hasta una concentración final de 0-20,0 μg anticuerpo/ml. Al cabo de 5 días, las células cultivadas en los pocillos se disociaron mediante exposición a tripsina y se contaron en un contador Coulter.

[0100] Las figuras 8 y 9 muestran los resultados de aquellos estudios. Al parecer, el anticuerpo anti-hVEGF A4.6.1 no tiene ningún efecto significativo en el crecimiento de las células NEG55 o A673 en cultivo. Estos resultados indican que el anticuerpo anti-hVEGF A4.6.1 no es citotóxico y sugieren claramente que los efectos antitumorales del anticuerpo observados son debidos a la inhibición de la neovascularización mediada por VEGF.

Ejemplo 6

Efecto del anticuerpo anti-hVEGF en la quimiotaxis celular endotelial

[0101] La quimiotaxis de células endoteliales y otras células, entre las cuales monocitos y linfocitos, desempeñan una función importante en la patogenia de artritis reumatoide. La migración y proliferación de células endoteliales acompaña la angiogénesis que tiene lugar en la membrana sinovial reumatoide. El tejido vascularizado (tejido de granulación sinovial o paño sinovial) invade y destruye el cartílago articular.

[0102] Para determinar si los antagonistas hVEGF interfieren en este proceso, analizamos el efecto del anticuerpo anti-hVEGF A4.6.1 en la quimiotaxis de células endoteliales estimulada por líquido sinovial de pacientes que sufren artritis reumatoide. Como control, también analizamos el efecto del anticuerpo anti-hVEGF A4.6.1 en la quimiotaxis de células endoteliales estimulada por líquido sinovial de pacientes que sufren artrosis (la angiogénesis que tiene lugar en la artritis reumatoide no tiene lugar en la artrosis).

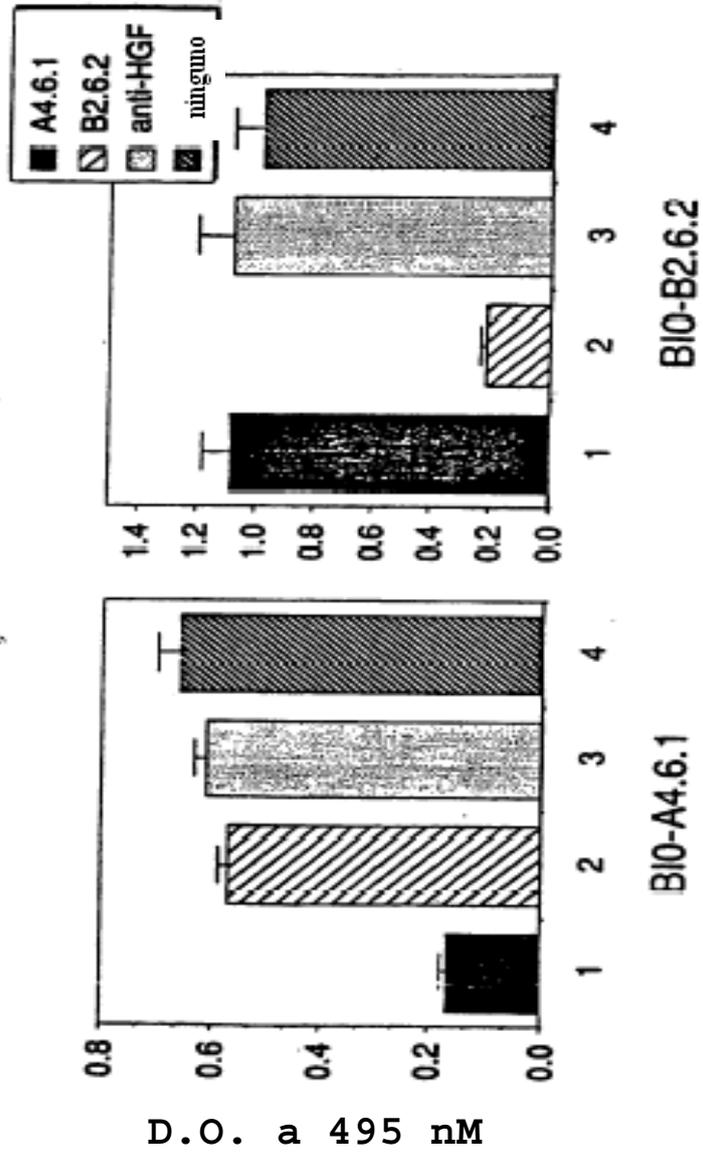
[0103] La quimiotaxis de células endoteliales se analizó utilizando cámaras de Boyden modificadas según procedimientos establecidos. Thompson y otros, Cancer Res. 51: 2.670 (1991); Phillips y otros, Proc. Exp. Biol. Med. 197: 458 (1991). Se dejó que aproximadamente 10^4 células endoteliales de vena umbilical se adhirieran a filtros recubiertos con gelatina (tamaño del poro de 0,8 μm) en microcámaras multipocillo de 48 pocillos en medio de cultivo que contenía suero fetal bovino al 0,1%. Al cabo de dos horas, se invirtieron las cámaras y se añadieron las muestras de prueba (líquido sinovial de artritis reumatoide, líquido sinovial de artrosis, FGF básico (bFGF) (hasta una concentración final de 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$), o PBS) y anticuerpo monoclonal anti-hVEGF A4.6.1 (hasta una concentración final de 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$) a los pocillos. Al cabo de cuatro horas, se tiñieron y contaron las células que habían migrado.

[0104] La figura 10 muestra los resultados promedio de aquellos estudios. Los valores que se muestran en la columna "Líquido sinovial" y al final de la página para los controles representan el número medio de células endoteliales que migraron en presencia de líquido sinovial, bFGF o PBS solo. Los valores de la columna "Líquido sinovial + mAB VEGF" representan el número medio de células endoteliales que migraron en presencia de líquido sinovial más el anticuerpo anti-hVEGF A4.6.1 añadido. Los valores de la columna "% de supresión" indican el porcentaje de reducción en la migración de células endoteliales inducida por líquido sinovial resultante de la adición de anticuerpo anti-hVEGF. Tal como se ha indicado, el anticuerpo anti-hVEGF inhibió considerablemente la capacidad del líquido sinovial de artritis reumatoide (inhibición media en porcentaje 53,40) pero no el líquido sinovial de artrosis (inhibición media en porcentaje 13,64) para inducir la migración de células endoteliales.

REIVINDICACIONES

1. Antagonista del hVEGF para su uso en el tratamiento de tumores, en el que el antagonista del hVEGF es:
 - (a) un anticuerpo monoclonal anti-hVEGF o un fragmento del anticuerpo monoclonal anti-hVEGF; o
 - (b) un receptor hVEGF aislado,
 y en el que el antagonista inhibe la actividad mitogénica de hVEGF.
2. Antagonista del hVEGF según la reivindicación 1, en el que el anticuerpo está humanizado.
3. Antagonista del hVEGF según la reivindicación 1, en el que los dominios transmembrana y citoplásmico están eliminados del receptor.
4. Antagonista del hVEGF según la reivindicación 3, en el que el receptor hVEGF aislado consiste en el dominio extracelular de un receptor hVEGF.
5. Antagonista de hVEGF según cualquiera de las reivindicaciones 1, 3 y 4, en el que el receptor hVEGF es el receptor flt
6. Antagonista de hVEGF según cualquiera de las reivindicaciones 1, 3 y 4, en el que el receptor hVEGF es el receptor KDR.
7. Antagonista de hVEGF según cualquiera de las reivindicaciones 1 y 3 a 6, en el que el receptor hVEGF se fusiona con un polipéptido portador.
8. Antagonista de hVEGF según la reivindicación 7, en el que el polipéptido portador es un polipéptido de inmunoglobulina.
9. Antagonista de hVEGF según la reivindicación 8, en el que el antagonista del hVEGF es una proteína de fusión flt-IgG.
10. Antagonista de hVEGF según cualquiera de las reivindicaciones 1 y 3 a 6, en el que el receptor hVEGF está conjugado a un polímero no proteínico.
11. Antagonista de hVEGF según la reivindicación 10, en el que el polímero es polietilenglicol.
12. Antagonista de hVEGF según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que es para la utilización en una cantidad suficiente para reducir el tamaño de un tumor.
13. Antagonista de hVEGF según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el tumor es un tumor maligno sólido.
14. Antagonista de hVEGF según la reivindicación 12 o la reivindicación 13, que inhibe la neovascularización mediada por hVEGF.
15. Antagonista de hVEGF según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que está acoplado con un grupo citotóxico.
16. Antagonista de hVEGF según la reivindicación 15, en el que el grupo citotóxico es una citotoxina proteínica o un dominio Fc del anticuerpo monoclonal.
17. Antagonista de hVEGF según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que es para utilizar en serie o en combinación con otro agente para el tratamiento de tumores.
18. Antagonista de hVEGF según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que es para utilizar en serie o en combinación con tratamientos radiológicos.

FIGURA I



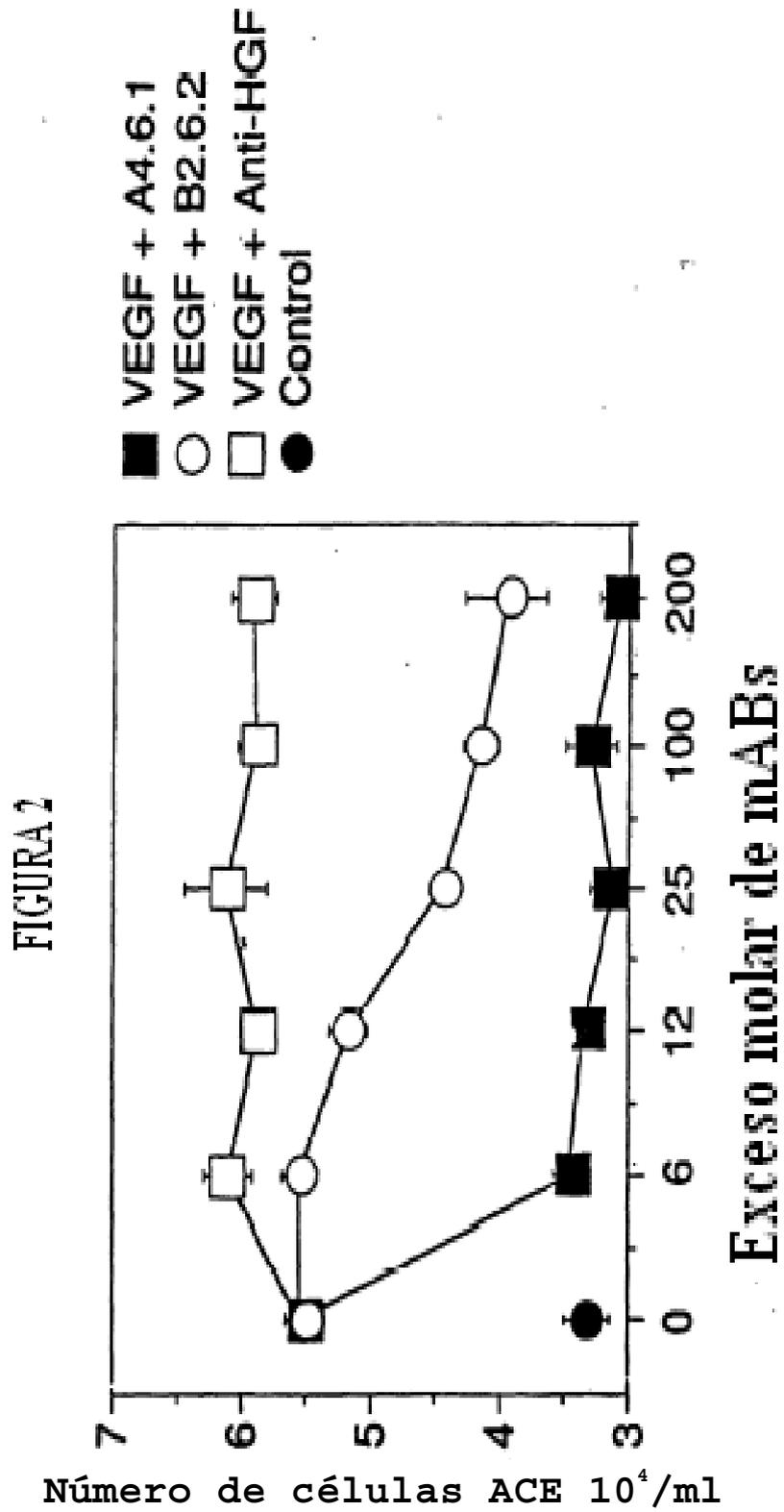


FIGURA 3

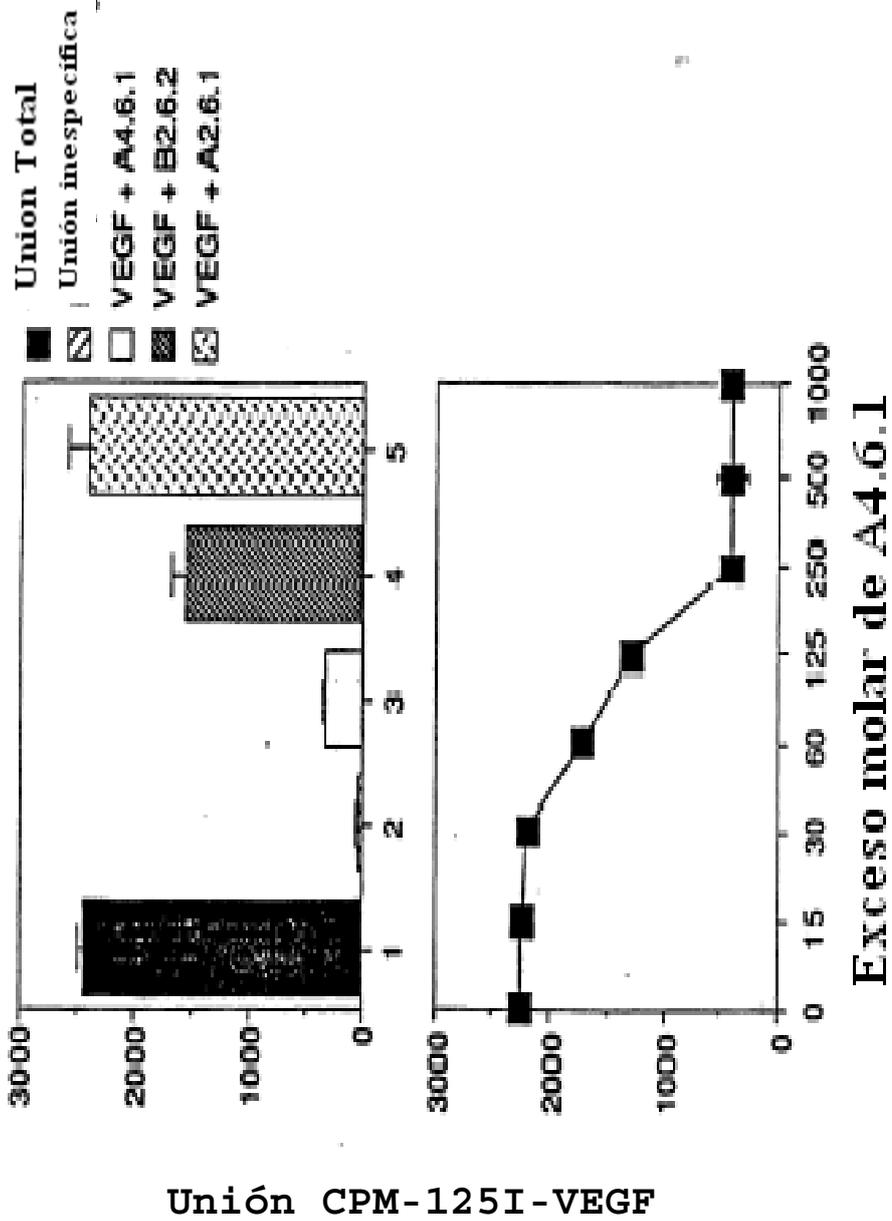


Figura 4

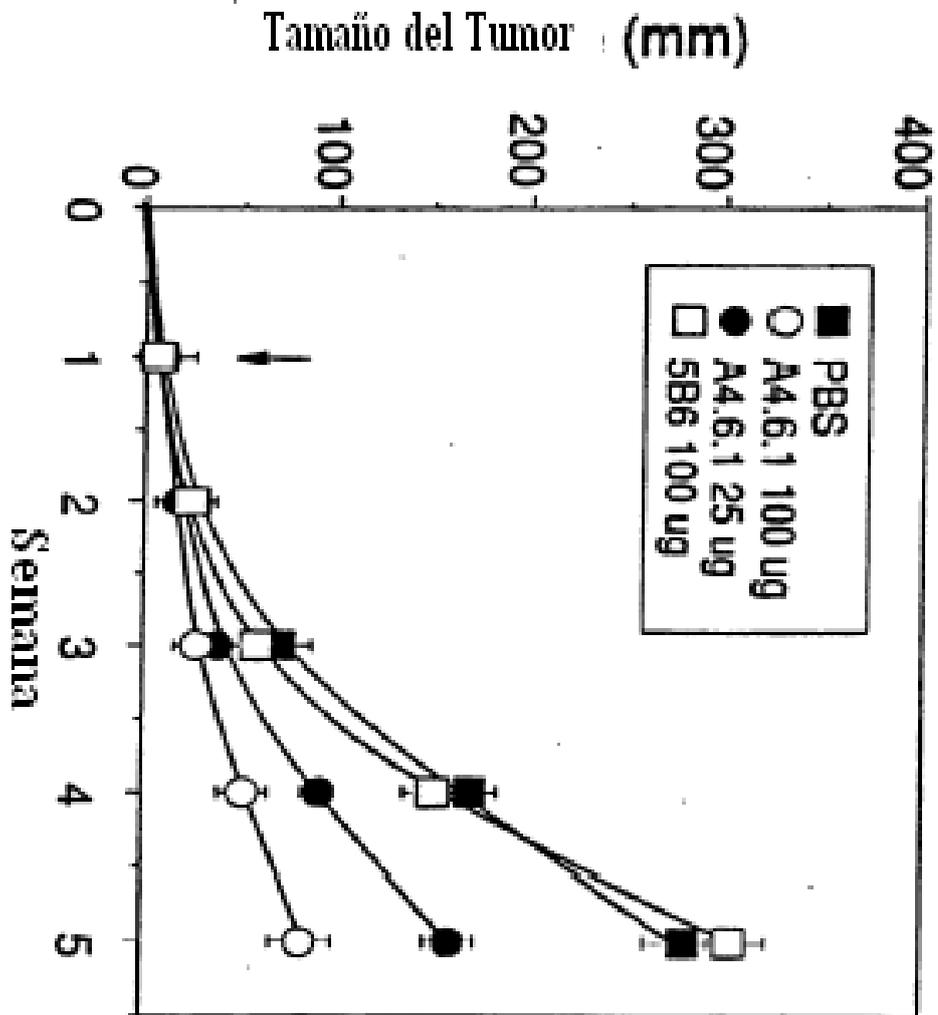


Figura 5

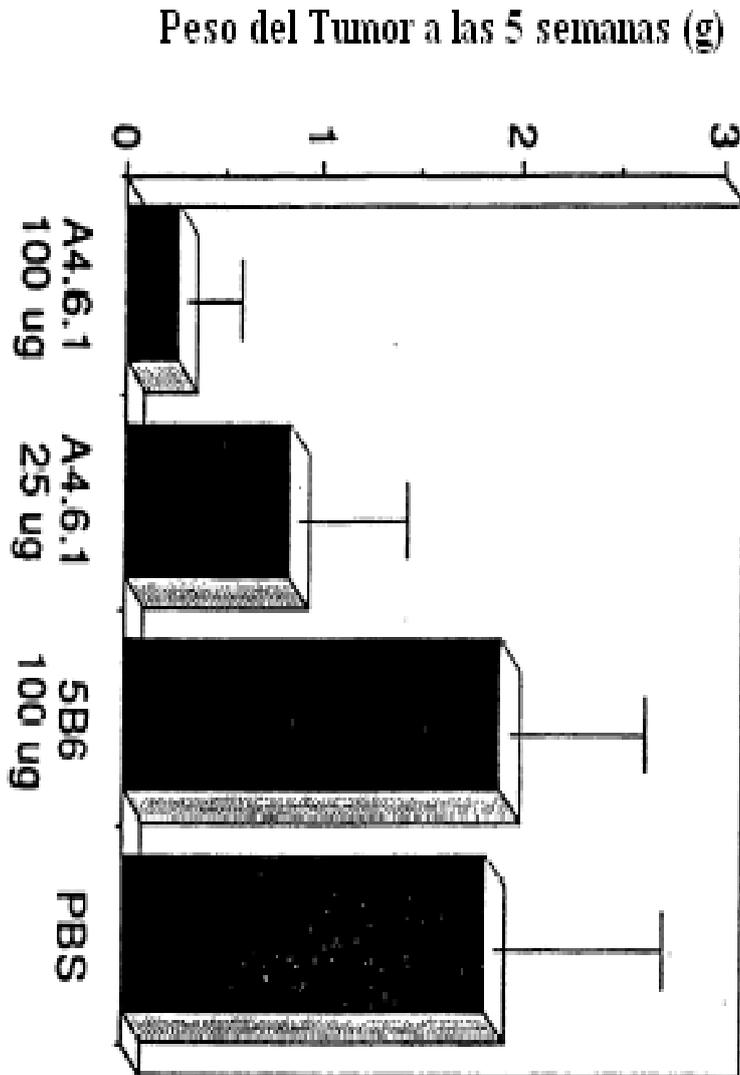


Figura 6

LEIOMIOSARCOMA SKLMS1

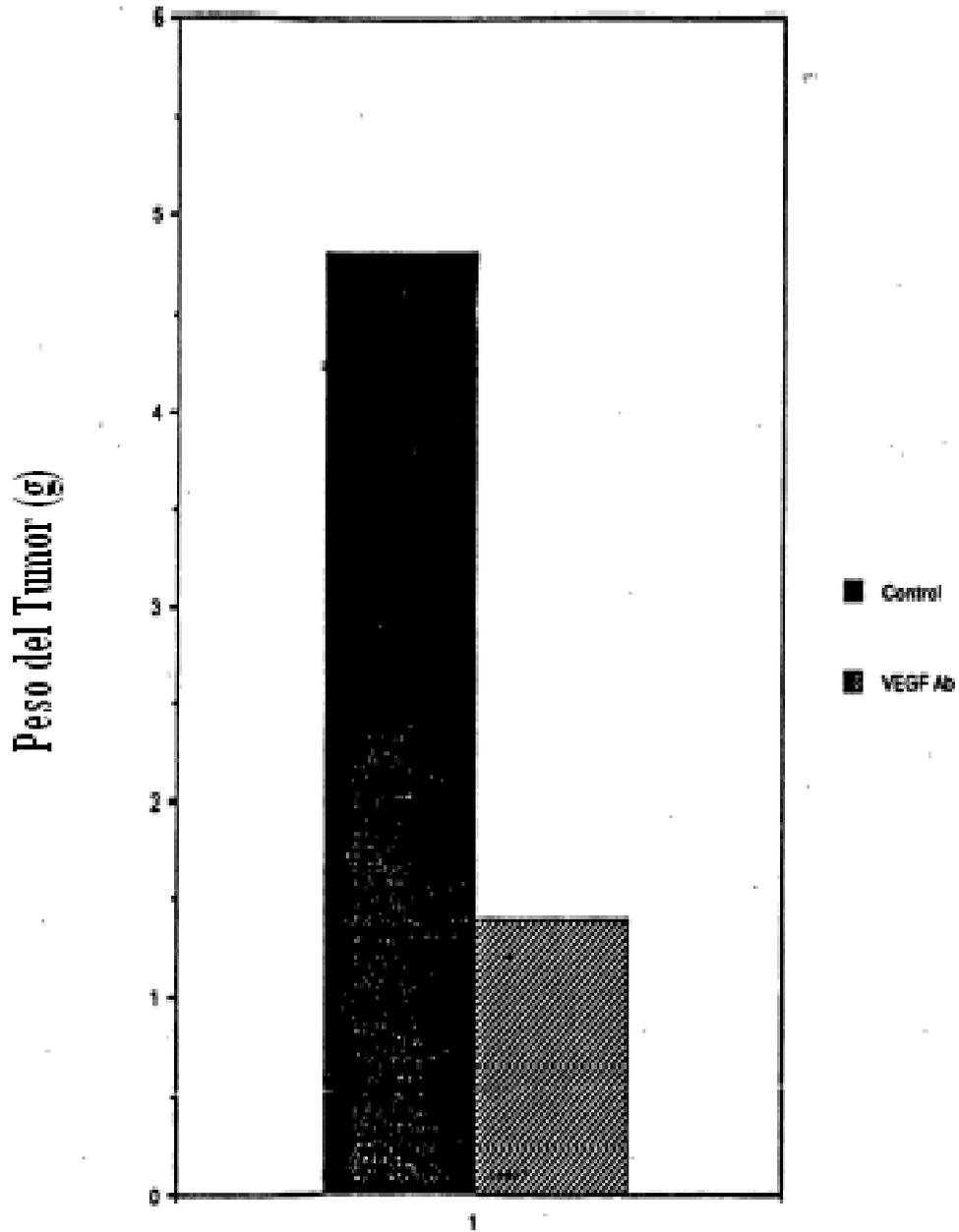


Figura 7

RABDOMIOSARCOMA A673 PESO DEL TUMOR A LAS CUATRO SEMANAS DE LA INYECCIÓN

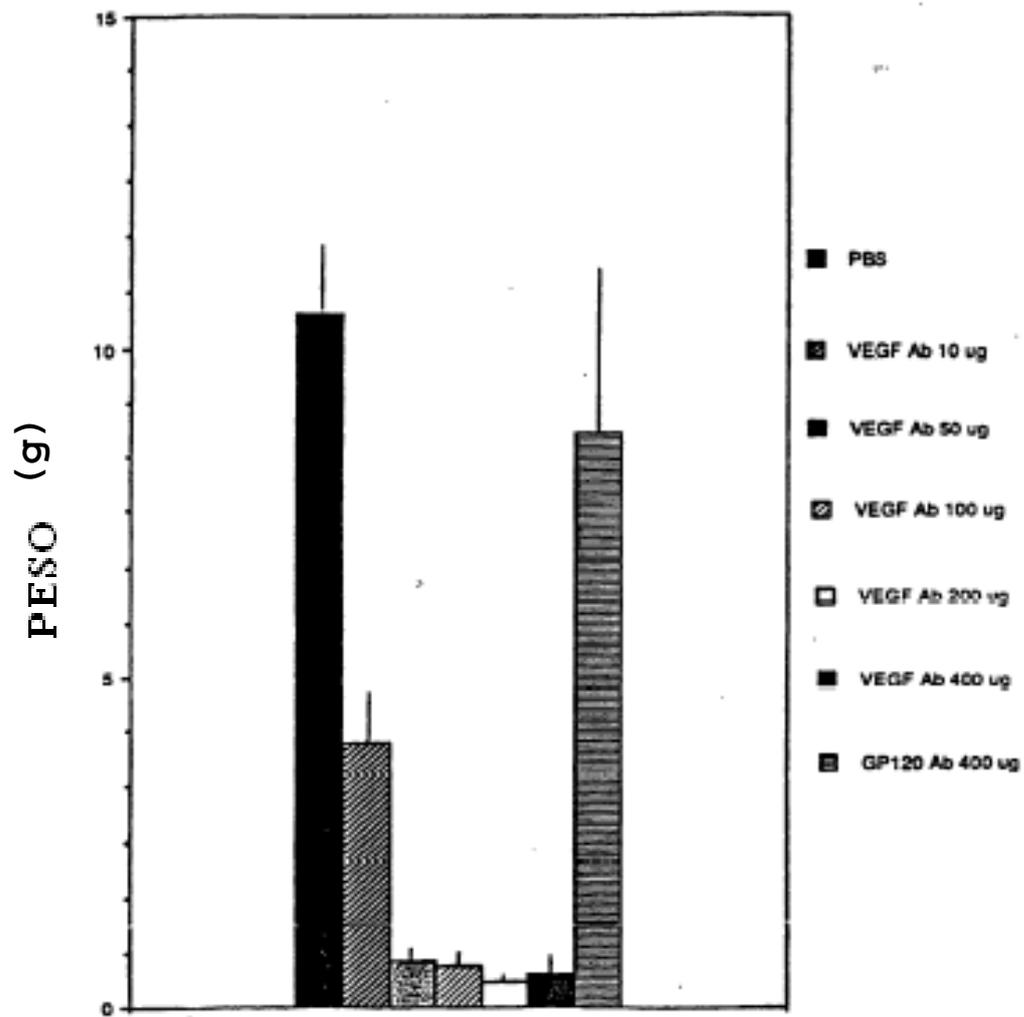


Figura 8

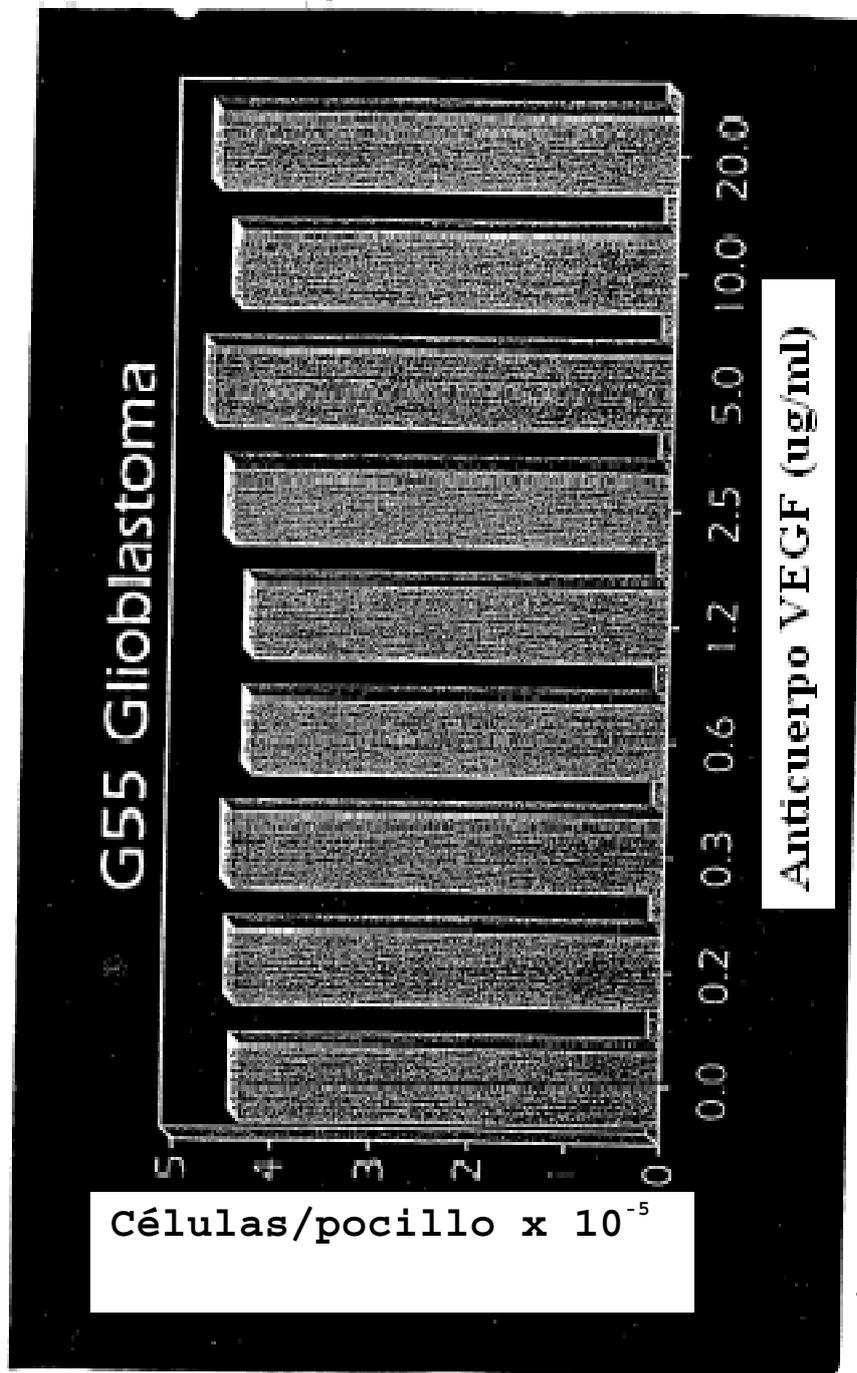


Figura 9

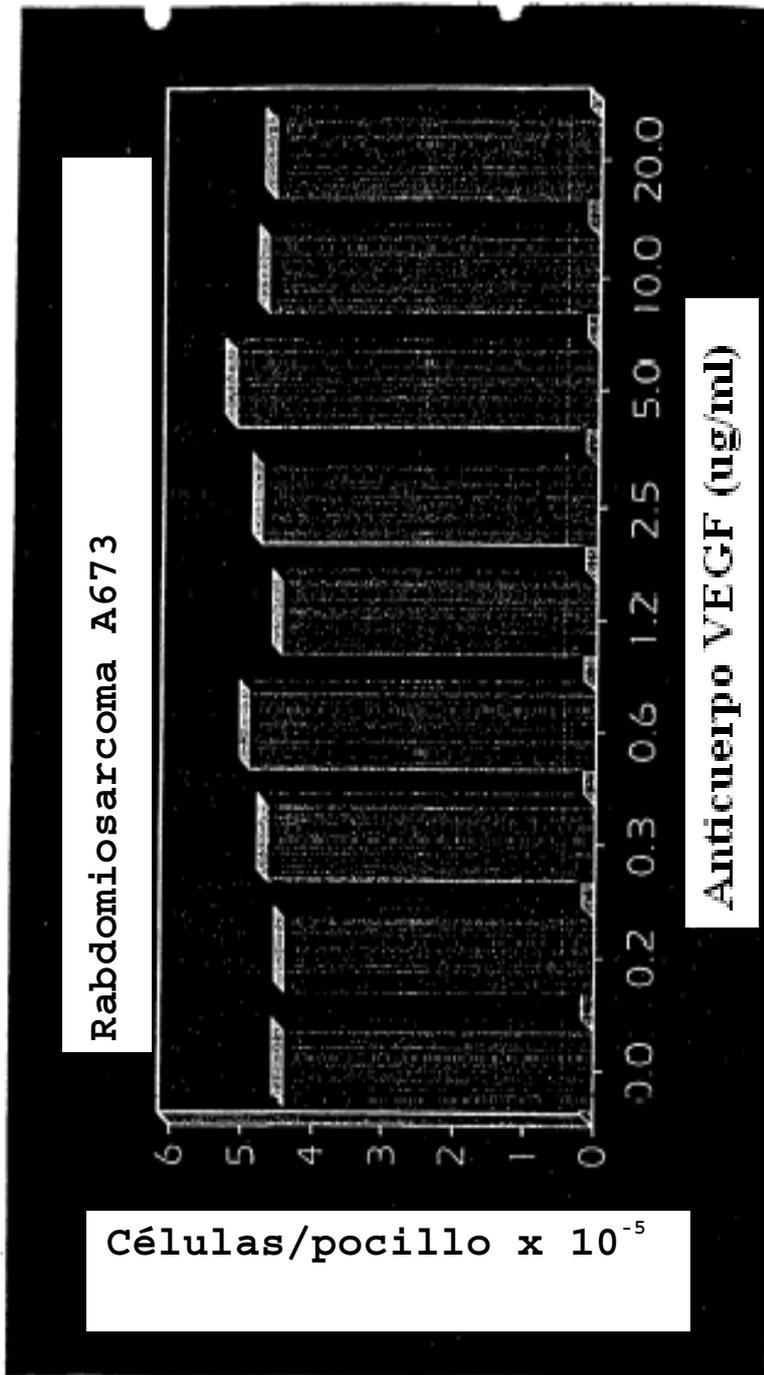


Figura 10

Quimiotaxis endotelial
(número de células)

Tipo de muestra	Muestra	Fecha del análisis	Líquido sinovial mAB VEGF		
			Líquido Sinovial	mAB VEGF	Supresión
Líquido sinovial reumatoides	318	5.7.92	5.2±0.2	2.7±0.3	48
	150	5.7.92	7.0±0.3	2.8±0.4	60
	312	5.7.92	6.7±0.4	3.7±0.3	45
	264	5.7.92	6.2±0.4	3.1±0.3	50
	267	5.7.92	5.7±0.6	4.4±0.3	23
	202	5.22.92	10.0±0.5	3.4±0.6	66
	314	5.22.92	7.5±0.3	3.1±0.6	59
	237	5.22.92	6.1±0.5	2.2±0.3	64
	206	5.22.92	6.7±0.5	2.2±0.3	67
	317	5.22.92	5.2±0.3	2.5±0.6	52
Líquido sinovial artrosis	165	6.2.92	4.0±0.3	2.8±0.4	30
	211	6.2.92	3.4±0.5	3.0±0.2	11.7
	195	6.2.92	3.5±0.2	3.3±0.3	5.7
	122	6.2.92	3.7±0.3	3.2±0.4	13.5
	16	6.2.92	4.1±0.3	3.8±0.5	7.3

Promedio % supresión para fluidos RA $53,4 \pm 4,2$

Promedio % supresión para fluidos OA $13,6 \pm 3,9$

Fluidos sinoviales se diluyeron 1:50

Controles

6.2.92	PBS	3.3±0.30
	bFGF 1µg/ml	5.7±0.38
5.22.92	PBS	1.2±0.38
	bFGF 1µg/ml	7.8±0.31
5.2.92	PBS	1.3±0.18
	bFGF 1µg/ml	9.0±0.41