



19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 362 931**

51 Int. Cl.:  
**A61K 39/395** (2006.01)  
**A61P 35/00** (2006.01)  
**C07K 16/28** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **07023361 .4**  
96 Fecha de presentación : **04.03.2003**  
97 Número de publicación de la solicitud: **1916001**  
97 Fecha de publicación de la solicitud: **30.04.2008**

54 Título: **Anticuerpos humanos específicos contra KDR y usos de los mismos.**

30 Prioridad: **04.03.2002 US 361783 P**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**15.07.2011**

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**15.07.2011**

73 Titular/es: **IMCLONE L.L.C.**  
**180 Varick Street**  
**New York, New York 10014, US**

72 Inventor/es: **Zhu, Zhenping**

74 Agente: **Carpintero López, Mario**

ES 2 362 931 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 humanos específicos contra KDR y usos de los mismos

**Campo de la invención**

5 La presente invención se refiere a anticuerpos humanos que se unen a KDR, que bloquean la unión de KDR al receptor del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGFR) y que neutralizan la activación de KDR. Los anticuerpos se usan para tratar enfermedades neoplásicas y trastornos hiperproliferativos, y pueden usarse en solitario o en combinación con otros antagonistas de VEGFR, y con antagonistas del receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR).

**Antecedentes de la invención**

10 La angiogénesis es un proceso altamente complejo de desarrollo de nuevos vasos sanguíneos que implica la proliferación y migración de, y la infiltración tisular por células endoteliales capilares de vasos sanguíneos preexistentes, el ensamblaje celular en estructuras tubulares, la unión de ensamblajes tubulares de reciente formación a sistemas vasculares de circuito cerrado y la maduración de los vasos capilares recién formados.

15 La angiogénesis es importante en procesos fisiológicos normales, incluyendo el desarrollo embrionario, el crecimiento folicular y la cicatrización de heridas, así como en afecciones patológicas, tales como el crecimiento de tumores, y en enfermedades no neoplásicas que impliquen una neovascularización anormal, incluyendo glaucoma neovascular (Folkman, J. y Klagsbrun, M., *Science*, 235: 442-7 (1987)). Otras patologías incluyen, pero sin limitación, enfermedades neoplásicas incluyendo, pero sin limitación, tumores sólidos, aterosclerosis y otras enfermedades inflamatorias, tales como artritis reumatoide y afecciones oftalmológicas tales como retinopatía diabética y degeneración macular relacionada con la edad. Las afecciones o enfermedades a las que contribuye una angiogénesis persistente o descontrolada se han denominado enfermedades dependientes de la angiogénesis o asociadas a la angiogénesis.

20 Un medio para controlar dichas enfermedades y afecciones patológicas comprende restringir el suministro de sangre a aquellas células implicadas en mediar o causar la enfermedad o afección, por ejemplo, ocluyendo los vasos sanguíneos que la suministran a las porciones de los órganos en las que están presentes tumores. Dichas estrategias requieren que se identifique el sitio del tumor y generalmente se limitan al tratamiento en un solo sitio, o en un pequeño número de sitios. Una desventaja adicional de la restricción mecánica directa del suministro sanguíneo es que se desarrollan vasos sanguíneos colaterales, a menudo bastante rápidamente, restaurando el suministro de sangre al tumor.

30 Otras estrategias se han centrado en la modulación de factores que están implicados en la regulación de la angiogénesis. Aunque normalmente inactiva, la proliferación endotelial vascular está altamente regulada, incluso durante la angiogénesis. El VEGF es un factor que se ha implicado como regulador de la angiogénesis *in vivo* (Klagsbrun, M. y D'Amore, P., *Annual Rev. Physiol.*, 53: 217-39 (1991)).

35 Un mitógeno específico de células endoteliales, VEGF, actúa como inductor de la angiogénesis, promoviendo específicamente la proliferación de células endoteliales. Es una glicoproteína homodimérica que consiste en dos subunidades de 23 kD. Se han identificado cuatro isoformas monoméricas diferentes de VEGF resultantes de un corte y empalme alternativo de ARNm. Estas incluyen dos formas unidas a membrana (VEGF206 y VEGF189) y dos formas solubles (VEGF165 y VEGF121). El VEGF165 es la isoforma más abundante en todos los tejidos humanos excepto en la placenta.

40 El VEGF se expresa en tejidos embrionarios (Breier y col., *Development*, 114: 521-32 (1992)), macrófagos y queratinocitos epidérmicos en proliferación durante la cicatrización de heridas (Brown y col., *J. Exp. Med.* 176: 1375-9 (1992)), y puede ser responsable del edema tisular asociado con inflamación (Ferrara y col., *Endocr. Rev.*, 13: 18-32 (1992)). Los estudios de hibridación *in situ* han demostrado altos niveles de expresión de VEGF en varias líneas tumorales humanas, incluyendo glioblastoma multiforme, hemangioblastoma, otras neoplasias del sistema nervioso central y sarcoma de Kaposi asociado con SIDA (Plate, K. y col., *Nature*, 359: 845-8 (1992); Plate, K. y col., *Cancer Res.*, 53: 5822-7 (1993); Berkman, R. y col., *J. Clin. Invest.*, 91: 153-9 (1993); Nakamura, S. y col., *AIDS Weekly*, 13 (1) (1992)). También se han encontrado altos niveles de expresión de VEGF en placas y lesiones ateroscleróticas y en células inflamatorias.

45 El VEGF media su efecto biológico a través de receptores de VEGF de alta afinidad que se expresan de forma selectiva en células endoteliales durante, por ejemplo, la embriogénesis (Millauer, B. y col. *Cell*, 72: 835-46 (1993)) y la formación de tumores, y que se han implicado en la modulación de la angiogénesis y en el crecimiento de tumores. Estos receptores comprenden un dominio citosólico de tirosina quinasa que inicia la ruta de señalización implicada en el crecimiento celular.

50 Los receptores de VEGF típicamente son tirosina quinasas de tipo receptor de clase III caracterizadas por tener varios bucles de tipo inmunoglobulina, típicamente 5 ó 7, en sus dominios de unión a ligando de receptor extracelular aminoterminal (Kaipainen y col., *J. Exp. Med.*, 178: 2077-88 (1993)). Las otras dos regiones incluyen una región

- transmembrana y un dominio catalítico intracelular carboxiterminal interrumpido por una inserción de secuencias interquinasa hidrófilas de diversas longitudes, denominada dominio de inserto quinasa (Terman y col., *Oncogene*, 6: 1677-83 (1991)). Los receptores de VEGF incluyen el receptor tirosina quinasa tipo fms (flt-1), o VEGFR-1, secuenciado por Shibuya y col., *Oncogene*, 5: 519-24 (1990), el receptor que contiene el dominio de inserto quinasa/quinasa de hígado fetal (KDR/flk-1), o VEGFR-2, descrito en el documento WO 92/14248, presentado el 20 de febrero de 1992 y Terman y col., *Oncogene*, 6: 1677-83 (1991) y secuenciado por Matthews y col., *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, 88: 9026-30 (1991), aunque otros receptores también pueden unirse a VEGF. Otro receptor tirosina quinasa, VEGFR-3 (flt-4), se une a los homólogos de VEGF VEGF-C y VEGF-D, y es importante en el desarrollo de vasos linfáticos.
- 5 La liberación de VEGF por una masa tumoral estimula la angiogénesis en células endoteliales adyacentes. Cuando el VEGF se expresa por la masa tumoral, las células endoteliales adyacentes a las células tumorales VEGF+ regularán positivamente la expresión de receptores de VEGF, por ejemplo, VEGFR-1 y VEGFR-2. Se cree en general que KDR/VEGFR-2 es el transductor de señales de VEGF principal que da como resultado la proliferación de células endoteliales, migración, diferenciación, formación de tubos, aumento de la permeabilidad vascular y mantenimiento de la integridad vascular. VEGFR-1 posee una actividad quinasa mucho más débil y es incapaz de generar una respuesta mitogénica cuando se estimula por VEGF, aunque se une a VEGF con una afinidad que es aproximadamente 10 veces superior a KDR. VEGFR-1 también se ha implicado en la migración inducida por VEGF y factor de crecimiento de placenta (P1GF) de monocitos y macrófagos y en la producción de factor tisular.
- 10 Se expresan altos niveles de VEGFR-2, por ejemplo, por células endoteliales que infiltran gliomas (Plate, K. y col. (1992)), y están específicamente reguladas positivamente por el VEGF producido por glioblastomas humanos (Plate, K. y col. (1993)). El descubrimiento de altos niveles de expresión de VEGFR-2 en células endoteliales asociadas a glioblastoma (GAEC) sugiere que la actividad del receptor se induce durante la formación del tumor, puesto que los transcritos de VEGFR-2 apenas son detectables en células endoteliales cerebrales normales, indicando la generación de un bucle paracrino de VEGF/VEGFR. Esta regulación positiva está confinada a las células endoteliales vasculares en estrecha proximidad con el tumor. El bloqueo de la actividad de VEGF con anticuerpos monoclonales anti-VEGF (AcM) neutralizantes da como resultado la inhibición del crecimiento de xenoinjertos de tumor humano en ratones atímicos (Kim, K. y col. *Nature*, 362: 841-4 (1993)), sugiriendo un papel directo para el VEGF en la angiogénesis relacionada con tumores.
- 15 Por consiguiente, se han desarrollado antagonistas de VEGFR para tratar tumores vascularizados y otras enfermedades angiogénicas. Estos han incluido anticuerpos neutralizantes que bloquean la señalización por receptores de VEGF expresados en células endoteliales vasculares para reducir el crecimiento de tumores por bloqueo de la angiogénesis a través de un bucle paracrino dependiente del endotelio. Véase, por ejemplo, la Patente de Estados Unidos N° 6.365.157 (Rockwell y col.), y los documentos WO 00/44777 (Zhu y col.), WO 01154723 (Kerbel); WO 01/74296 (Witte y col.), WO 01/90192 (Zhu), WO 03/002144 (Zhu) y WO 03/000183 (Carmeliet y col.).
- 20 También se han encontrado receptores de VEGF en algunas células no endoteliales, tales como células tumorales que producen VEGF, en las que se genera un bucle autocrino independiente del endotelio para mantener el crecimiento del tumor. Por ejemplo, el VEGF se expresa casi de forma invariable por todas las líneas celulares de leucemia establecidas y leucemias humanas recién aisladas. Además, el VEGFR-2 y el VEGFR-1 se expresan por ciertas leucemias humanas. Fielder y col., *Blood* 89: 1870-5 (1997); Bellamy y col., *Cancer Res.* 59:728-33 (1999).
- 25 Se ha demostrado que un bucle autocrino de VEGF/VEGFR-2 humano media la supervivencia y la migración de células de leucemia *in vivo*. Dias y col., *J. Clin. Invest.* 106: 511-21 (2000); y documento WO 01/74296 (Witte y col.). De forma similar, la producción de VEGF y la expresión de VEGFR también se han descrito para algunas líneas celulares de tumores sólidos *in vitro*. (Véase, Sato, K. y col., *Tohoku J. Exp. Med.*, 185: 173-84 (1998); Ishii, Y., *Nippon Sanka Fujinka Gakkai Zasshi*: 47: 133-40 (1995); y Ferrer, F. A. y col., *Urology*, 54: 567-72 (1999)). Se ha demostrado además que los AcM contra VEGFR-1 inhiben un bucle autocrino de VEGFR/VEGFR-1 humano en células de carcinoma de mama. Wu, y col., "Monoclonal antibody against VEGFR1 inhibits flt1-positive DU4475 human breast tumor growth by a dual mechanism involving anti-angiogenic and tumor cell growth inhibitory activities," AACR NCI EORTC International Conference on Molecular Targets and Cancer Therapeutics, 29 Oct.-2 Nov. 2001, Resumen n° 7.
- 30 Lu y col (*International Journal of Cancer*, NY; Estados Unidos; Vol. 97, En. 2002, páginas 393-399) describe fragmentos Fab humanos de alta afinidad aislados dirigidos contra KDR a partir de una biblioteca en fago de anticuerpos.
- 35 Continúa existiendo la necesidad de agentes que inhiban la actividad receptora de VEGF para tratar o prevenir enfermedades o afecciones dependientes de receptor de VEGF, inhibiendo por ejemplo la angiogénesis patológica o el crecimiento de tumores a través de la inhibición del bucle paracrino y/o autocrino de VEGF/VEGFR.
- 40
- 45
- 50
- 55

### **Sumario de la invención**

La presente invención proporciona anticuerpos humanos y porciones de los mismos que se unen a KDR, bloquean la unión del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) a KDR y neutralizan la activación de KDR, como se define por las reivindicaciones. La invención proporciona un anticuerpo aislado o un fragmento del mismo que se

une selectivamente a un receptor que contiene un dominio de inserto quinasa (KDR) humano, en el que el anticuerpo o fragmento del mismo comprende regiones determinantes de complementariedad representadas por la SEC ID N°: 81 en la CDRL1; la SEC ID N°: 82 en la CDRL2; la SEC ID N°: 83 en la CDRL3; la SEC ID N°: 13 en la CDRH1; la SEC ID N°: 14 en la CDRH2; y la SEC ID N°: 15 en la CDRH3.

- 5 Preferentemente, un anticuerpo o fragmento del mismo de acuerdo con la invención comprende un dominio variable de cadena ligera representado por la SEC ID N°: 53, y un dominio variable de cadena pesada representado por la SEC ID N°: 24.

Un anticuerpo o fragmento del mismo de acuerdo con la invención se selecciona preferentemente del grupo que consiste en un anticuerpo de cadena sencilla, un Fab, un Fv de cadena sencilla, un diacuerpo y un triacuerpo.

- 10 Aspectos adicionales de la invención se refieren a un polinucleótido aislado que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica un anticuerpo o fragmento de la invención, un vector de expresión que comprende un polinucleótido de SEC ID N°: 52 y una célula huésped recombinante que comprende dicho vector de expresión.

- 15 Los anticuerpos se usan para tratar enfermedades neoplásicas, incluyendo, por ejemplo, tumores sólidos y no sólidos. Los anticuerpos también pueden usarse para el tratamiento de trastornos hiperproliferativos. Por consiguiente, la invención proporciona procedimientos de neutralización de la activación de KDR, procedimientos de inhibición del crecimiento de tumores, incluyendo la inhibición de la angiogénesis asociada a tumores, y procedimientos de tratamiento de otros trastornos relacionados con la angiogénesis. También se proporcionan kits que tienen anticuerpos humanos o fragmentos de anticuerpos que se unen a receptores de VEGFR.

- 20 Los anticuerpos pueden usarse en solitario o en combinación con otros antagonistas de VEGFR y/o inhibidores de la angiogénesis, tales como, por ejemplo, antagonistas del receptor de factor de crecimiento epidérmico (EGFR). La invención también proporciona moléculas de ácido nucleico que codifican los anticuerpos.

- 25 Abreviaturas - VEGF, factor de crecimiento endotelial vascular; bFGF, factor de crecimiento de fibroblastos básico, KDR, receptor que contiene un dominio de inserto quinasa (también denominado receptor de VEGF 2); FLK-1, quinasa de hígado fetal 1; scFv, Fv de cadena sencilla; HUVEC, células endoteliales de vena umbilical humana; PBS, solución salina tamponada con fosfato 0,01 M (pH 7,2); PBST, PBS que contiene Tween-20 al 0,1%; AP, fosfatasa alcalina; EGF, factor de crecimiento epidérmico; V<sub>E</sub> y V<sub>L</sub>, dominio variable de la cadena pesada y ligera de inmunoglobulina, respectivamente.

### **Descripción de las figuras**

- 30 La Figura 1 muestra la identificación y expresión de fragmentos Fab anti-KDR humanos. Figura 1A: Patrones de digestión con *Bst*NI de cuatro Fab anti-KDR neutralizantes. Figura 1B: Análisis de SDS-PAGE de fragmentos Fab purificados en condiciones no reductoras. Carril 1, D1F7; Carril 2, D2C6; Carril 3, D1H4; Carril 4, D2H2.

- 35 La Figura 2 representa la unión a KDR, el bloqueo de la interacción KDR/VEGF y el bloqueo de la interacción Flk-1/VEGF por fragmentos Fab anti-KDR humanos. Figura 2A: Unión dependiente de la dosis de Fab anti-KDR humano a KDR inmovilizado. Figura 2B: Inhibición de la unión de KDR a VEGF inmovilizado por Fab anti-KDR. Figura 2C: inhibición de la unión de Flk-1 a VEGF inmovilizado por Fab anti-KDR. Se incubaron diversas cantidades de proteínas Fab con una cantidad fija de KDR-AP (2B) o Flk-1-AP (2C) en solución a temperatura ambiente (TA) durante 1 h.

- 40 La Figura 3 representa el mapeo de epítomos para los fragmentos Fab anti-KDR. KDR-AP, sus variantes de delección de dominio-AP y Flk-1-AP se capturaron en una placa de 96 pocillos y se incubaron con fragmentos Fab anti-KDR humanos. Los datos se presentan respecto a la unión de los fragmentos Fab a KDR de longitud completa.

La Figura 4 representa la inhibición de la mitogenia de HUVEC inducida por VEGF por fragmentos Fab anti-KDR humanos. Se añadieron diversas cantidades de fragmentos Fab anti-KDR a pocillos por duplicado y se incubaron a 37 °C durante 1 h, después de lo cual se añadió VEGF a los pocillos a una concentración final de 16 ng/ml. Las células se recogieron y se determinó la radiactividad incorporada en el ADN.

- 45 La Figura 5 representa la inhibición de la migración estimulada por VEGF de células de leucemia humanas por los fragmentos Fab anti-KDR. Figura 5A: El VEGF promueve la migración de células HL60 y HEL de una forma dependiente de la dosis. Figura 5B: Inhibición de la migración estimulada por VEGF de células de leucemia humanas por los fragmentos Fab anti-KDR. La cantidad de KDR-AP que se unió al VEGF inmovilizado se cuantificó por incubación de las placas con sustrato AP y lectura de A405 nm.

- 50 La Figura 6 representa la unión a KDR y el bloque de la interacción de KDR/VEGF por anticuerpos anti-KDR humanos. Figura 6A: Unión dependiente de la dosis de anti-KDR a KDR inmovilizado. Se incubaron diversas cantidades de anticuerpos a temperatura ambiente durante 1 h en placas de 96 pocillos revestidas con KDR. Figura 6B: Inhibición de la unión de KDR a VEGF inmovilizado por anticuerpos anti-KDR humanos. Se incubaron diversas cantidades de los anticuerpos con una cantidad fija de KDR-AP en solución a temperatura ambiente durante 1 hora.

La Figura 7 representa la inhibición de la unión de VEGF y la mitogénia inducida por VEGF de HUVEC. Figura 7A: Inhibición de la unión de VEGF radiomarcado a KDR de superficie celular por anticuerpos anti-KDR humanos. Diversas cantidades de anticuerpos anti-KDR se mezclaron con 2 ng de VEGF<sub>165</sub> marcado con <sup>125</sup>I y se añadieron a una monocapa confluyente al 80-90% de células HUVEC. Las células se incubaron a temperatura ambiente durante 2 h, se lavaron y se determinó la radiactividad unida. Figura 7B: Inhibición de la mitogénia de HUVEC inducida por VEGF por anticuerpos anti-KDR humanos. Se incubaron diversas cantidades de anticuerpos anti-KDR humanos con células HUVEC durante 1 h, seguido de la adición de VEGF. Se recogieron células y se determinó la radiactividad incorporada en el ADN.

La Figura 8 representa la expresión de KDR y VEGF por células de leucemia humanas. Figura 8A: Se determinaron los niveles de ARNm seleccionado mediante RT-PCR. Carril 1: Marcadores de peso molecular; 1000, 850, 650, 500, 400 pb; Carril 2: Control negativo; Carril 3: Células HL60 (promielocíticas); Carril 4: Células HEL (megacariocíticas); Carril 5: Células U937 (histiocíticas); Carril 6: HUVEC. Figura 8B: Secreción de VEGF por células de leucemia humana cultivadas con FCS al 10% o en medio sin suero.

La Figura 9 representa la inhibición de la migración estimulada por VEGF de células de leucemia humana por anticuerpos anti-KDR humanos. Figura 9A: Células HL60. Figura 9B: Células HEL. Figura 9C: Células U937.

La Figura 10 representa la inhibición del progreso de la leucemia *in vivo* según se determinó por los índices de supervivencia. Ratones NOD-SCID irradiados a dosis subletal se inocularon con  $2 \times 10^7$  células HL60 y se trataron con diversas dosis de IMC-1C11, IMC-2C6 o IMC-1121 por inyección intraperitoneal.

### **Descripción detallada de la invención**

La presente invención proporciona anticuerpos de acuerdo con las reivindicaciones que se unen específicamente a un dominio extracelular de VEGFR-2 (KDR). Los anticuerpos comprenden regiones flanqueantes de  $V_H$  y  $V_L$  humanas (FW), así como regiones determinantes de complementariedad (CDR) humanas. Preferentemente, los dominios variables  $V_H$  y  $V_L$  completos son humanos o derivados de secuencias humanas. Por ejemplo, un dominio variable de la invención puede obtenerse a partir de un linfocito de sangre periférica que contenga un gen de región variable reorganizado. Como alternativa, porciones de dominios variables tales como CDR y regiones FW pueden proceder de diferentes secuencias humanas. En otro ejemplo, un dominio variable  $V_H$  humano está codificado por un segmento génico  $V_H$  humano y una secuencia sintética para la región CDR3H (es decir, un segmento génico  $D_H$ - $J_H$  sintético). Así mismo, un dominio variable  $V_L$  humano puede estar codificado por un segmento génico  $V_L$  humano y una secuencia sintética para la región CDR3L (es decir, un segmento génico  $J_L$  sintético).

Los anticuerpos de la presente invención también incluyen aquellos cuyas características de unión se han mejorado por mutación directa, procedimientos de maduración por afinidad, presentación en fago o transposición de cadenas. La afinidad y especificidad pueden modificarse o mejorarse mutando CDR y explorando para sitios de unión a antígeno que tengan las características deseadas (véase, por ejemplo, Yang y col., J. Mol. Biol., 254: 392-403 (1995)). Las CDR se mutan de una diversidad de formas. Una forma es aleatorizar restos individuales o combinaciones de restos de modo que en una población de sitios de unión a antígeno de otro modo idénticos, los veinte aminoácidos se encuentran en posiciones particulares. Como alternativa, se inducen mutaciones sobre una variedad de restos de CDR por procedimientos de PCR propensa a errores (véase, por ejemplo, Hawkins y col., J. Mol. Biol., 226: 889-896 (1992)). Por ejemplo, los vectores de presentación en fago que contienen genes de la región variable de la cadena ligera y pesada pueden propagarse en cepas mutantes de *E. coli* (véase, por ejemplo Low y col., J. Mol. Biol., 250: 359-368 (1996)). Estos procedimientos de mutagénesis son ilustrativos de los muchos procedimientos conocidos por un experto en la materia.

Los anticuerpos se unen a KDR y neutralizan la activación, por ejemplo, bloqueando la dimerización del receptor y/o la unión a VEGF. Los anticuerpos de la invención pueden usarse para neutralizar la activación de VEGFR *in vitro* o *in vivo* uniéndose a un dominio extracelular de un receptor de VEGF. Los dominios extracelulares de un receptor de VEGF incluyen, por ejemplo, un dominio de unión a ligando en una porción extracelular del receptor. *In vivo*, los anticuerpos inhiben la angiogénesis y/o reducen el crecimiento de tumores.

Los anticuerpos son proteínas que reconocen y se unen a un antígeno o sustancia específica. Los anticuerpos de la presente invención se unen a KDR al menos tan fuertemente como el ligando natural. La afinidad, representada por la constante de equilibrio para la disociación de un antígeno con un anticuerpo ( $K_d$ ) mide la fuerza de unión entre un determinante antigénico y un sitio de unión a anticuerpo. La avidéz es la medida de la fuerza de unión entre un anticuerpo con su antígeno. La avidéz está relacionada tanto con la afinidad entre un epítipo con su sitio de unión a antígeno en el anticuerpo como con la valencia del anticuerpo. La valencia se refiere al número de sitios de unión a antígeno que tiene una inmunoglobulina para un epítipo particular. Por ejemplo, un anticuerpo monovalente tiene un sitio de unión para un epítipo particular. Un determinante antigénico o epítipo es el sitio en un antígeno en el que se une un anticuerpo dado. Son valores típicos de  $K$   $10^5$  a  $10^{11}$  litros/mol. Se considera que cualquier  $K$  inferior a  $10^4$  litros/mol indica una unión que es inespecífica. La inversa de  $K$  se denomina  $K_d$ . (La  $K_d$  también puede denominarse constante de disociación). Cuanto menor sea el valor de  $K_d$ , más fuerte será la fuerza de unión entre un determinante antigénico y el sitio de unión a anticuerpo.

El ligando natural de KDR es VEGF humano. El VEGF se une a KDR con una afinidad ( $K_d$ ) de aproximadamente 0,93 nM. Para obstaculizar la unión de VEGF a KDR, un anticuerpo anti-KDR debería unirse a KDR al menos tan fuertemente como VEGF. En otras palabras, el anticuerpo anti-KDR tiene que competir con éxito con el VEGF con respecto a su unión a KDR. Un anticuerpo con una  $K_d$  de como mucho 5 nM se considera que se une tan fuertemente como el ligando natural. Los anticuerpos de la invención se unen a KDR preferentemente con una afinidad de como mucho aproximadamente 4 nM, más preferentemente con una afinidad de como mucho 3 nM, más preferentemente con una afinidad de como mucho 2 nM y, opcionalmente, con una afinidad de como mucho aproximadamente 1 nM. La avidéz de anticuerpos bivalentes, por supuesto, será superior a la afinidad. Los anticuerpos bivalentes se unen a KDR preferentemente con una avidéz superior a 0,5 nM, más preferentemente superior a 0,25 nM y, opcionalmente, superior a 0,1 nM.

Los anticuerpos de la invención neutralizan KDR (Véanse los Ejemplos). En la presente memoria descriptiva, neutralizar un receptor significa disminuir y/o inactivar la actividad quinasa intrínseca del receptor para transducir una señal. Un ensayo fiable para la neutralización de KDR es la inhibición de la fosforilación del receptor.

La presente invención no está limitada a ningún mecanismo particular de neutralización de KDR. El mecanismo seguido por un anticuerpo no es necesariamente el mismo que el seguido por otro. Algunos mecanismos posibles incluyen impedir la unión del ligando de VEGF al dominio de unión extracelular del KDR e impedir la dimerización u oligomerización de receptores. Sin embargo, no pueden descartarse otros mecanismos.

Los anticuerpos de la invención incluyen, pero sin limitación, anticuerpos de origen natural, fragmentos bivalentes tales como  $(Fab')_2$ , fragmentos monovalentes tales como Fab, anticuerpos de cadena sencilla, Fv de cadena sencilla (scFv), anticuerpos de dominio único, anticuerpos de cadena sencilla multivalente, diacuerpos, triacuerpos y similares que se unen específicamente con antígenos.

Los anticuerpos de cadena sencilla monovalente (es decir, scFv) incluyen un fragmento de cadena pesada variable de anticuerpo ( $V_H$ ) unido a un fragmento de cadena ligera variable de anticuerpo ( $V_L$ ) por un engarce peptídico que permite que los dos fragmentos se asocien para formar un sitio de unión a antígeno funcional (véase, por ejemplo, la Patente de Estados Unidos Nº 4.946.778 (Ladner y col.), documento WO 88/09344, (Huston y col.). El documento WO 92/01047 (McCafferty y col.) describe la presentación de fragmentos scFv en la superficie de paquetes de presentación genética recombinantes solubles, tales como bacteriófagos. Un anticuerpo de cadena sencilla con un engarce (L) puede representarse como  $V_L$ -L- $V_H$  o  $V_H$ -L- $V_L$ .

Cada dominio de los anticuerpos de la presente invención puede ser un dominio variable de cadena ligera o pesada de anticuerpo completo, o puede ser un equivalente funcional o un mutante o derivado de un dominio de origen natural, o un dominio sintético construido, por ejemplo, *in vitro* usando una técnica tal como la descrita en el documento WO 93/11236 (Griffiths y col.). Por ejemplo, es posible unir entre sí dominios correspondientes a dominios variables de anticuerpo que carezcan de al menos un aminoácido. La característica de caracterización importante es la capacidad de cada dominio para asociarse con un dominio complementario para formar un sitio de unión a antígeno. Por consiguiente, las expresiones "fragmento de cadena ligera/pesada variable" no debería interpretarse que excluyen variantes que no tengan un efecto material sobre cómo funciona la invención.

Los equivalentes funcionales de la invención incluyen polipéptidos con secuencias de aminoácidos sustancialmente iguales que la secuencia de aminoácidos de las regiones variable o hipervariable de los anticuerpos de KDR de longitud completa. La expresión "sustancialmente la misma" secuencia de aminoácidos se define en el presente documento como una secuencia con una homología de al menos el 70%, preferentemente de al menos aproximadamente el 80% y, más preferentemente, de al menos aproximadamente el 90% con otra secuencia de aminoácidos, según se determinó por el procedimiento de búsqueda FASTA de acuerdo con Pearson y Lipman, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85, 2444-8 (1988).

Los anticuerpos de dominio único tienen un solo dominio variable que es capaz de unirse eficazmente al antígeno. Se conocen en la técnica ejemplos de anticuerpos en los que a la afinidad y especificidad de unión contribuye principalmente el uno o el otro dominio variable. Véase, por ejemplo, Jeffrey, P.D. y col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90: 10310-4 (1993), que desvela un anticuerpo anti-digoxina que se une a digoxina principalmente por la cadena pesada del anticuerpo. Por consiguiente, pueden identificarse dominios de anticuerpo sencillos que se unan bien a receptores de VEGF. Dichos dominios de anticuerpo pueden obtenerse, por ejemplo, a partir de anticuerpos de origen natural, o bibliotecas de presentación en fago de Fab o scFv. Se entiende que, para generar un anticuerpo de un solo dominio a partir de un anticuerpo que comprende un dominio  $V_H$  y  $V_L$ , pueden desearse ciertas sustituciones de aminoácidos fuera de las regiones CDR para aumentar la unión, expresión o solubilidad. Por ejemplo, puede ser deseable modificar restos aminoácidos que, de otro modo, estarían enterrados en la interfaz  $V_H$ - $V_L$ .

Más recientemente, se han descubierto en camélidos (camellos, dromedarios y llamas) anticuerpos que son homodímeros de cadenas pesadas. Estos anticuerpos de cadena pesada están desprovistos de cadenas ligeras y del primer dominio constante. (Véase, por ejemplo Muyldermans, S., 2001, J. Biotechnol. 74: 277-302). Los fragmentos de unión a antígeno de tamaño reducido están bien expresados en bacterias, se unen a antígenos con gran afinidad y son muy estables. Las bibliotecas de presentación en fago de anticuerpos de dominio único (es decir, que tienen un solo dominio variable que puede ser un dominio variable de cadena ligera o de cadena pesada)

pueden producirse y explorarse de la misma forma que bibliotecas de scFv y Fab. Los armazones para dichos anticuerpos de dominio único pueden ser dominios variables humanos o de ratón modificados. Se señala que los anticuerpos de dominio único pueden unirse a antígeno en una diversidad de modos de unión a antígeno. Es decir, las interacciones de antígeno-anticuerpo primarias no se limitan a los restos aminoacídicos correspondientes a las CDR de anticuerpos que contienen  $V_H$ - $V_L$ , y pueden tenerse en cuenta interacciones de unión fuera de restos de CDR al optimizar las características de unión de dichos anticuerpos.

Los anticuerpos de cadena sencilla carecen de algunos o todos los dominios constantes de los anticuerpos completos de los que proceden. Por lo tanto, pueden superar algunos de los problemas asociados con el uso de anticuerpos completos. Por ejemplo, los anticuerpos de cadena sencilla tienden a estar libres de ciertas interacciones no deseadas entre regiones constantes de cadena pesada y otras moléculas biológicas. Además, los anticuerpos de cadena sencilla son considerablemente más pequeños que los anticuerpos completos y pueden tener una mayor permeabilidad que los anticuerpos completos, permitiendo que los anticuerpos de cadena sencilla se localicen y se unan a sitios de unión a antígeno diana más eficazmente. Además, los anticuerpos de cadena sencilla pueden producirse a relativamente gran escala en células procariontas, facilitando de este modo su producción. Además, el tamaño relativamente pequeño de los anticuerpos de cadena sencilla hace menos probable que provoquen una respuesta inmune no deseada en un destinatario que los anticuerpos completos.

Los engarces peptídicos usados para producir los anticuerpos de cadena sencilla pueden ser péptidos flexibles seleccionados para asegurar que pueda producirse un plegamiento tridimensional apropiado de los dominios  $V_L$  y  $V_H$  una vez que están unidos, para mantener la especificidad de unión a molécula diana del anticuerpo anti-KDR de longitud completa. En general, el extremo carboxilo terminal de la secuencia de  $V_L$  o  $V_H$  puede unirse covalentemente mediante dicho engarce peptídico al extremo terminal de aminoácido de una secuencia  $V_H$  o  $V_L$  complementaria. El engarce es generalmente de 10 a 50 restos aminoacídicos. Preferentemente, el engarce es de 10 a 30 restos aminoacídicos. Más preferentemente, el engarce es de 12 a 30 restos aminoacídicos. Más preferentemente, es un engarce de 15 a 25 restos aminoacídicos. Un ejemplo de dichos péptidos de engarce incluye (Gly-Gly-Gly-Gly-Ser)<sub>3</sub>.

Los anticuerpos de cadena sencilla, que tienen cada uno un dominio  $V_H$  y  $V_L$  unido covalentemente por un primer engarce peptídico, pueden unirse covalentemente por al menos un engarce peptídico más para formar un anticuerpo de cadena sencilla multivalente. Los anticuerpos de cadena sencilla multivalentes permiten la construcción de fragmentos de anticuerpo que tengan la especificidad y aidez de anticuerpos completos, pero carezcan de las regiones constantes de los anticuerpos de longitud completa.

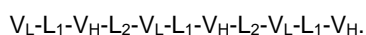
Los anticuerpos multivalentes pueden ser monoespecíficos o multiespecíficos. El término especificidad se refiere al número de tipos diferentes de determinantes antigénicos a los que puede unirse un anticuerpo particular. Si el anticuerpo se une a un solo tipo de determinante antigénico, el anticuerpo es monoespecífico. Si el anticuerpo se une a diferentes tipos de determinantes antigénicos, entonces el anticuerpo es multiespecífico.

Por ejemplo, un anticuerpo de cadena sencilla multivalente biespecífico permite el reconocimiento de dos tipos diferentes de epítomos. Los epítomos pueden estar ambos en el KDR. Como alternativa, un epítomo puede estar en el KDR y el otro epítomo puede estar en otro antígeno.

Cada cadena de un anticuerpo de cadena sencilla multivalente incluye un fragmento de cadena ligera variable y un fragmento de cadena pesada variable y está unido por un engarce peptídico a al menos otra cadena. El engarce peptídico está compuesto por al menos quince restos aminoacídicos. El número máximo de restos aminoacídicos es de aproximadamente cien. En una realización preferida, el número de dominios  $V_L$  y  $V_H$  es equivalente. Preferentemente, el engarce peptídico ( $L_1$ ) que une los dominios  $V_H$  y  $V_L$  para formar una cadena y el engarce peptídico ( $L_2$ ) que une dos o más cadenas para formar un scFv multivalente tienen sustancialmente la misma secuencia de aminoácidos.

Por ejemplo, un anticuerpo de cadena sencilla bivalente puede representarse de la forma siguiente:  $V_L$ - $L_1$ - $V_H$ - $L_2$ - $V_L$ - $L_1$ - $V_H$ ; o  $V_L$ - $L_1$ - $V_H$ - $L_2$ - $V_H$ - $L_1$ - $V_H$ ; o  $V_H$ - $L_1$ - $V_L$ - $L_2$ - $V_H$ - $L_1$ - $V_L$ ; o  $V_H$ - $L_1$ - $V_L$ - $L_2$ - $V_L$ - $L_1$ - $V_H$ .

Los anticuerpos de cadena sencilla multivalentes que son trivalentes o más tienen uno o más fragmentos de anticuerpo unidos a un anticuerpo de cadena sencilla bivalente por engarces peptídicos adicionales. Un ejemplo de un anticuerpo de cadena sencilla trivalente es:



Dos anticuerpos de cadena sencilla pueden combinarse para formar un diacuerpo, también conocido como dímero bivalente. Los diacuerpos tienen dos cadenas y dos sitios de unión y pueden ser monoespecíficos o biespecíficos. Cada cadena del diacuerpo incluye un dominio  $V_H$  conectado a un dominio  $V_L$ . Los dominios están conectados con engarces que son lo bastante cortos para evitar el emparejamiento entre dominios en la misma cadena, dirigiendo de este modo el emparejamiento entre dominios complementarios en diferentes cadenas para recrear los dos sitios de unión a antígeno. Por consiguiente, una cadena de un diacuerpo biespecífico comprende una  $V_H$  de una primera especificidad y una  $V_L$  de una segunda especificidad, mientras que la segunda cadena comprende una  $V_H$  de la segunda especificidad y una  $V_L$  de la primera especificidad. El engarce peptídico incluye al menos cinco restos

aminoacídicos y no más de diez restos aminoacídicos, por ejemplo, (Gly-Gly-Gly-Gly-Ser), (Gly-Gly-Gly-Gly-Ser)<sub>2</sub>. (SEC ID N°: 19.) La estructura del diacuerpo es rígida y compacta. Los sitios de unión a antígeno están en extremos opuestos de la molécula.

5 Tres anticuerpos de cadena sencilla pueden combinarse para formar triacuerpos, también conocidos como trímeros trivalentes. Los triacuerpos se construyen con el extremo de aminoácido terminal de un dominio V<sub>L</sub> o V<sub>H</sub> directamente fusionado al extremo carboxilo terminal de un dominio V<sub>L</sub> o V<sub>H</sub>, es decir, sin ninguna secuencia de engarce. El triacuerpo tiene tres cabezas de Fv con los polipéptidos dispuestos de una forma cíclica cabeza con cola. Una conformación posible del triacuerpo es plana, con los tres sitios de unión localizados en un plano en un ángulo de 120 grados entre ellos. Los triacuerpos pueden ser monoespecíficos, biespecíficos y triespecíficos.

10 Preferentemente, los anticuerpos de la presente invención contienen las seis regiones determinantes de complementariedad del anticuerpo completo, aunque también son funcionales anticuerpos que contienen menos que todas dichas regiones, tal como tres, cuatro o cinco CDR.

15 Para minimizar la inmunogenicidad de anticuerpos que se unen a receptores de VEGF, la presente invención proporciona anticuerpos que comprenden secuencias de dominio constante y variable humano. Los anticuerpos proceden de una fuente humana y se unen a un dominio extracelular de KDR y neutralizan la activación del receptor. Puede prepararse ADN que codifica anticuerpos humanos por recombinación de ADN que codifica regiones constantes humanas y ADN que codifica regiones variables derivadas de seres humanos. Por ejemplo, los anticuerpos de la invención pueden obtenerse por exploración de bibliotecas que consisten en combinaciones de dominios variables de cadena pesada y cadena ligera humana. Los ácidos nucleicos a partir de los que se expresan  
20 los anticuerpos pueden mutarse somáticamente o ser secuencias de línea germinal derivadas de linfocitos B sin sensibilización previa.

El ADN que codifica anticuerpos humanos puede prepararse por recombinación de ADN que codifica regiones constantes y regiones variables humanas, distintas de CDR, derivadas sustancialmente o exclusivamente de las regiones de anticuerpo humano correspondientes, y ADN que codifica CDR derivadas de un ser humano.

25 Las fuentes adecuadas de ADN que codifican fragmentos de anticuerpos incluyen cualquier célula, tal como hibridomas y células de bazo, que exprese el anticuerpo de longitud completa. Otra fuente son anticuerpos de cadena sencilla producidos a partir de una biblioteca de presentación en fago como se conoce en la técnica.

Los anticuerpos de la presente invención pueden ser o pueden combinar miembros de cualquier clase de inmunoglobulina, tal como IgG, IgM, IgA, IgD, o IgE, y las subclases de las mismas.

30 La proteína usada para identificar anticuerpos de unión a VEGFR de la invención es habitualmente KDR, y normalmente está limitada al dominio extracelular de KDR. El dominio extracelular de KDR puede estar libre o conjugado con otra molécula.

35 En los ejemplos a continuación se aislaron anticuerpos anti-KDR de alta afinidad que bloquean la unión de VEGF a KDR a partir de una biblioteca de presentación en fago construida a partir de genes de la región variable de cadena ligera y cadena pesada humana. Más del 90% de los clones recuperados después de tres rondas de selección son específicos para KDR. Las afinidades de unión para KDR de los Fab explorados están en el intervalo nanomolar, que son tan elevadas como las de varios anticuerpos monoclonales anti-KDR bivalentes producidos usando la tecnología de hibridomas.

40 Los anticuerpos de la presente invención pueden fusionarse a restos aminoacídicos adicionales. Dichos restos pueden ser una etiqueta peptídica, quizá para facilitar el aislamiento, o pueden ser una secuencia señal para la secreción del polipéptido a partir de una célula huésped tras la síntesis. Convenientemente, se usan péptidos líder secretorios, que son aminoácidos unidos al extremo N-terminal de un polipéptido para dirigir el movimiento del polipéptido fuera del citosol.

45 La presente invención también proporciona ácidos nucleicos que comprenden una secuencia que codifica un polipéptido de acuerdo con la invención y diversos repertorios de dicho ácido nucleico.

50 Los anticuerpos de la invención neutralizan la activación de KDR. Una medida de la neutralización de KDR es la inhibición de la actividad tirosina quinasa del receptor. La inhibición de tirosina quinasa puede determinarse usando procedimientos bien conocidos. Los anticuerpos de la presente invención generalmente causan la inhibición o regulación de acontecimientos de fosforilación. Por consiguiente, los ensayos de fosforilación son útiles en la determinación de anticuerpos útiles en el contexto de la presente invención. La inhibición de tirosina quinasa puede determinarse midiendo el nivel de autofosforilación del receptor de quinasa recombinante y/o la fosforilación de sustratos naturales o sintéticos. La fosforilación puede detectarse, por ejemplo, usando un anticuerpo específico para fosfotirosina en un ensayo de ELISA o en una transferencia de western. Algunos ensayos para actividad  
55 tirosina quinasa se describen en Panek y col., J. Pharmacol. Exp. Thera, 283: 1433-44 (1997) y Batley y col, Life Sci., 62: 143-50 (1998).

Además, pueden utilizarse procedimientos para detección de la expresión de proteína, en los que las proteínas que



se están midiendo están reguladas por la actividad tirosina quinasa de KDR. Estos procedimientos incluyen inmunohistoquímica (IHC) para la detección de la expresión de proteína, hibridación *in situ* fluorescente (FISH) para la detección de la amplificación génica, ensayos de unión a radioligando competitivos, técnicas de inmunotransferencia de matriz sólida, tales como transferencias de Northern y Southern, reacción en cadena de la polimerasa con transcripción inversa (RT-PCR) y ELISA. Véase, por ejemplo, Grandis y col., *Cancer*, 78: 1284-92. (1996); Shimizu y col., *Japan J. Cancer Res.*, 85: 567-71 (1994); Sauter y col., *Am. J. Path.*, 148: 1047-53 (1996); Collins, *Glia*, 15: 289-96 (1995); Radinsky y col., *Clin. Cancer Res.*, 1: 19-31 (1995); Petrides y col., *Cancer Res.*, 50: 3934-39 (1990); Hoffmann y col., *Anticancer Res.*, 17: 4419-26 (1997); Wikstrand y col., *Cancer Res.*, 55: 3140-48 (1995).

5 Pueden utilizarse ensayos *in vivo*. Por ejemplo, puede observarse inhibición de receptor tirosina quinasa mediante ensayos mitogénicos usando líneas celulares estimuladas con ligando de receptor en presencia y ausencia de inhibidor. Por ejemplo, pueden usarse células HUVEC (ATCC) estimuladas con VEGF para ensayar la inhibición de VEGFR. Otro procedimiento implica ensayar la inhibición del crecimiento de células tumorales que expresan VEGF usando, por ejemplo, células tumorales humanas inyectadas en un ratón. Véase la Patente de Estados Unidos N° 6.365.157 (Rockwell y col.).

10 En los procedimientos de la presente invención, una cantidad terapéuticamente eficaz de un anticuerpo de la invención se administra a un mamífero que lo necesite. El término "administrar", como se usa en la presente memoria, significa administrar los anticuerpos de la presente invención a un mamífero por cualquier procedimiento que pueda conseguir el resultado buscado. Pueden administrarse, por ejemplo, por vía intravenosa o por vía intramuscular. Aunque los anticuerpos humanos de la invención son particularmente útiles para la administración a seres humanos, pueden administrarse a otros mamíferos también. El término "mamífero", como se usa en el presente documento, pretende incluir, pero sin limitación, seres humanos, animales de laboratorio, mascotas domésticas y animales de granja. La expresión "cantidad terapéuticamente eficaz" se refiere a una cantidad de anticuerpo de la presente invención que, cuando se administra a un mamífero, es eficaz para producir el efecto terapéutico deseado, tal como inhibiendo la actividad quinasa.

Aunque sin desear quedar ligado a mecanismo particular alguno, las enfermedades y afecciones que pueden tratarse o prevenirse mediante los presentes procedimientos incluyen, por ejemplo, aquellas en las que una angiogénesis patógena o el crecimiento de un tumor se estimula a través de un bucle autocrino y/o paracrino de VEGFR.

20 La neutralización de la activación de un receptor de VEGF en células endoteliales o no endoteliales, tales como células tumorales, puede realizarse *in vitro* o *in vivo*. La neutralización de la activación por VEGF de un receptor de VEGF en una muestra de células que expresan receptor de VEGF comprende poner en contacto las células con un antagonista, por ejemplo, un anticuerpo de la invención. Las células se ponen en contacto *in vitro* con el antagonista, por ejemplo, el anticuerpo, antes de, simultáneamente o después de añadir VEGF a la muestra de célula.

35 *In vivo*, un anticuerpo de la invención se pone en contacto con un receptor de VEGF por administración a un mamífero, preferentemente un ser humano. Un procedimiento de neutralización *in vivo* es útil para inhibir el crecimiento de tumores, la angiogénesis asociada con el crecimiento de tumores u otra afección patológica asociada con la angiogénesis, en un mamífero. Por consiguiente, los anticuerpos de la invención son agentes inmunoterapéuticos antiangiogénicos y antitumorales.

40 Los tumores que pueden tratarse incluyen tumores primarios y tumores metastásicos, así como tumores resistentes al tratamiento. Los tumores resistentes al tratamiento incluyen tumores que dejan de responder o son resistentes al tratamiento con agentes quimioterápicos solamente, anticuerpos solamente, radiación sólo o combinaciones de los mismos. Los tumores resistentes al tratamiento también incluyen tumores que parecen inhibirse por tratamiento con dichos agentes, pero que vuelven a presentarse a los cinco años, a veces hasta diez años o más tiempo después de interrumpirse el tratamiento.

45 Los anticuerpos de la presente invención son útiles para tratar tumores que expresan receptores de VEGF, especialmente KDR. Dichos tumores son característicamente sensibles al VEGF presente en su entorno, y pueden producir además y estimularse por VEGF en un bucle estimulador autocrino. El procedimiento es por lo tanto eficaz para tratar un tumor sólido o no sólido que no esté vascularizado, o que todavía no esté sustancialmente vascularizado. Los ejemplos de tumores sólidos que pueden tratarse por consiguiente incluyen carcinoma de mama, carcinoma de pulmón, carcinoma colorrectal, carcinoma pancreático, glioma y linfoma. Algunos ejemplos de dichos tumores incluyen tumores epidermoides, tumores escamosos, tales como tumores de cabeza y cuello, tumores colorrectales, tumores de próstata, tumores de mama, tumores de pulmón incluyendo tumores pulmonares microcíticos y no microcíticos, tumores pancreáticos, tumores de tiroides, tumores de ovario y tumores de hígado. Otros ejemplos incluyen sarcoma de Kaposi, neoplasias del SNC, neuroblastomas, hemangioblastomas capilares, meningiomas y metástasis cerebrales, melanoma, carcinomas y sarcomas gastrointestinales y renales, rabdomiosarcoma, glioblastoma, preferentemente glioblastoma multiforme y leiomiomas. Los ejemplos de cánceres de piel vascularizados para los que son eficaces los antagonistas de la presente invención incluyen carcinoma de células escamosas, carcinoma de células basales y carcinomas de piel que pueden tratarse por supresión del crecimiento de queratinocitos malignos, tales como queratinocitos malignos humanos.

Los ejemplos de tumores no sólidos incluyen leucemia, mieloma múltiple y linfoma. Algunos ejemplos de leucemias incluyen leucemia mielógena aguda (LMA), leucemia mielógena crónica (LMC), leucemia linfocítica aguda (LLA) y leucemia linfocítica crónica (LLC), leucemia eritrocítica o leucemia monocítica. Algunos ejemplos de linfomas incluyen linfoma de Hodgkin y no Hodgkin.

- 5 Los resultados experimentales descritos a continuación demuestran que los anticuerpos de la invención bloquean específicamente la estimulación inducida por VEGF de KDR (VEGFR-2) en células de leucemia. Los estudios *in vivo* descritos también a continuación muestran que los anticuerpos eran capaces de inhibir significativamente el crecimiento de tumores en ratones atímicos.

- 10 Un cóctel de antagonistas de receptores de VEGF, por ejemplo, anticuerpos monoclonales, proporciona un tratamiento especialmente eficaz para inhibir el crecimiento de células tumorales. El cóctel puede incluir antagonistas de VEGFR distintos de anticuerpos, y puede tener tan pocos como 2, 3 ó 4 antagonistas de receptores, y tantos como 6, 8 ó 10.

- 15 En otro aspecto de la invención, se usan anticuerpos anti-KDR para inhibir la angiogénesis. La estimulación de VEGFR del endotelio vascular está asociada con enfermedades angiogénicas y vascularización de tumores. Típicamente, el endotelio vascular se estimula de una forma paracrina por VEGF de otras fuentes (por ejemplo, células tumorales).

- 20 Por consiguiente, los anticuerpos anti-KDR humanos son eficaces para tratar a sujetos con tumores o neoplasias vascularizadas o enfermedades angiogénicas. Dichos tumores y neoplasias incluyen, por ejemplo, tumores malignos y neoplasias, tales como blastomas, carcinomas o sarcomas, y tumores y neoplasias altamente vasculares. Los cánceres que pueden tratarse mediante los procedimientos de la presente invención incluyen, por ejemplo, cánceres del cerebro, tracto genitourinario, sistema linfático, estómago, renal, colon, laringe y pulmón y hueso. Los ejemplos no limitantes incluyen además tumores epidermoides, tumores escamosos, tales como tumores de cabeza y cuello, tumores colorrectales, tumores de próstata, tumores de mama, tumores de pulmón, incluyendo adenocarcinoma pulmonar y tumores pulmonares microcíticos y no microcíticos, tumores pancreáticos, tumores de tiroides, tumores de ovario y tumores de hígado. El procedimiento también se usa para el tratamiento de cánceres de piel vascularizados, incluyendo carcinoma de células escamosas, carcinoma de células basales y cánceres de piel que pueden tratarse suprimiendo el crecimiento de queratinocitos malignos, tales como queratinocitos malignos humanos. Otros cánceres que pueden tratarse incluyen sarcoma de Kaposi, neoplasias del SNC (neuroblastomas, hemangioblastomas capilares, meningiomas y metástasis cerebrales), melanoma, carcinomas y sarcomas gastrointestinales y renales, rhabdomyosarcoma, glioblastoma, incluyendo glioblastoma multiforme y leiomyosarcoma.

- 35 Un aspecto adicional de la presente invención incluye procedimientos de tratamiento o prevención de afecciones patológicas caracterizadas por una angiogénesis excesiva, que implica, por ejemplo, la vascularización y/o inflamación, tales como aterosclerosis, artritis reumatoide (AR), glaucoma neovascular, retinopatía proliferativa, incluyendo retinopatía diabética proliferativa, degeneración macular, hemangiomas, angiofibromas y psoriasis. Otros ejemplos no limitantes de enfermedad angiogénica no neoplásica son retinopatía de prematuridad (fibroplasia retrolenticular), rechazo de injerto corneal, diabetes mellitus insulino dependiente, esclerosis múltiple, miastenia grave, enfermedad de Chron, nefritis autoinmune, cirrosis biliar primaria, pancreatitis aguda, rechazo de aloinjerto, inflamación alérgica, dermatitis de contacto y reacciones de hipersensibilidad retardada, enfermedad inflamatoria del intestino, choque séptico, osteoporosis, artrosis, defectos cognitivos inducidos por inflamación neuronal, síndrome de Osler-Weber, reestenosis e infecciones fúngicas, parasitarias y víricas, incluyendo infecciones por citomegalovirus.

- 45 La identificación de dicha enfermedad está bien dentro de la capacidad y conocimiento de un experto en la materia. Por ejemplo, los individuos humanos que estén padeciendo una enfermedad angiogénica o neoplásica clínicamente significativa o que estén en riesgo de desarrollar síntomas clínicamente significativos son adecuados para la administración de los presentes anticuerpos de receptores de VEGF. Un experto en la materia puede determinar fácilmente, por ejemplo, mediante el uso de ensayos clínicos, del examen físico y de la historia médica/familiar si un individuo es un candidato para dicho tratamiento.

Además, se incluye el uso de los presentes anticuerpos *in vivo* e *in vitro* para procedimientos de diagnóstico o de investigación que son bien conocidos en la técnica.

- 50 Los presentes anticuerpos anti-KDR pueden administrarse para tratamientos terapéuticos a un paciente que padece un tumor o una afección patológica asociada a angiogénesis en una cantidad suficiente para prevenir, inhibir o reducir la progresión del tumor o afección patológica. La progresión incluye, por ejemplo, el crecimiento, invasividad, metástasis y/o reaparición del tumor o afección patológica. Una cantidad adecuada para lograr esto se define como una dosis terapéuticamente eficaz. Las cantidades eficaces para este uso dependerán de la gravedad de la enfermedad y del estado general del sistema inmune del propio paciente. Los programas de dosificación también variarán con la patología y el estado del paciente y, típicamente, variarán de una sola dosificación en embolada o infusión continua a múltiples administraciones al día (por ejemplo, cada 4-6 horas), o según se indique por el médico que lo trate y la afección del paciente. Debería señalarse, sin embargo, que la presente invención no se limita a ninguna dosis particular.

Pueden administrarse anticuerpos anti-KDR en combinación con uno o más agentes antineoplásicos distintos. Para ejemplos de terapias de combinación, véase, por ejemplo, la Patente de Estados Unidos N° 6.217.866 (Schlessinger y col) (Anticuerpos anti-EGFR en combinación con agentes antineoplásicos); documento WO 99/60023 (Waksal y col.) (Anticuerpos anti-EGFR en combinación con radiación). Puede usarse cualquier agente antineoplásico adecuado, tal como un agente quimioterápico o radiación. Los ejemplos de agentes quimioterápicos incluyen, pero sin limitación, cisplatino, doxorubicina, paclitaxel, irinotecán (CPT-11), topotecán o una combinación de los mismos. Cuando el agente antineoplásico es radiación, la fuente de la radiación puede ser externa (terapia de radiación de haz externo - EBRT) o interna (braquiterapia - BT) al paciente que se esté tratando. La dosis de agente antineoplásico administrado depende de numerosos factores incluyendo, por ejemplo, el tipo de agente, el tipo y la gravedad del tumor que se esté tratando y la vía de administración del agente. Debería enfatizarse, sin embargo, que la presente invención no está limitada a ninguna dosis particular.

Adicionalmente, pueden administrarse anticuerpos anti-KDR de la invención con anticuerpos que neutralicen otros receptores implicados en el crecimiento de tumores o la angiogénesis. Un ejemplo de dicho receptor es el receptor VEGFR-1/Flt-1. En una realización de la invención, un anticuerpo anti-KDR se usa en combinación con un antagonista de receptor que se une específicamente a VEGF-1. Son particularmente preferidas proteínas de unión a antígeno que se unen al dominio extracelular de VEGFR-1 y bloquean la unión por uno o ambos de sus ligandos, VEGF y PlGF, y/o neutralizan la activación inducida por VEGF o inducida por PlGF de VEGFR-1. Por ejemplo, el AcM 6.12 es un scFv que se une a VEGFR-1 expresado en superficie celular y soluble. El scFv 6.12 comprende los dominios V<sub>L</sub> y V<sub>H</sub> del anticuerpo monoclonal de ratón AcM 6.12. Una línea celular de hibridoma que produce el AcM 6.12 se ha depositado en la ATCC con el número PTA-3344 de acuerdo con las disposiciones del Tratado de Budapest sobre el Reconocimiento Internacional del Depósito de Microorganismos a los Fines del Procedimiento en Materia de Patentes y el reglamento conforme al mismo (Tratado de Budapest).

Otro ejemplo de dicho receptor es EGFR. En una realización de la presente invención, se usa un anticuerpo anti-KDR en combinación con un antagonista de EGFR. Un antagonista de EGFR puede ser un anticuerpo que se une a EGFR o un ligando de EGFR e inhiba la unión de EGFR a su ligando. Los ligandos para EGFR incluyen, por ejemplo, EGF, TGF- $\alpha$  anfirregulina, EGF de unión a heparina (HB-EGF) y betarrecululina. Se cree que EGF y TGF- $\alpha$  son los ligandos endógenos principales que dan como resultado la estimulación mediada por EGFR, aunque se ha demostrado que TGF- $\alpha$  es más potente para promover la angiogénesis. Debería apreciarse que el antagonista de EGFR puede unirse externamente a la porción extracelular de EGFR, que puede o no inhibir la unión del ligando, o internamente al dominio tirosina quinasa. Los ejemplos de antagonistas de EGFR que se unen a EGFR incluyen, sin limitación, moléculas biológicas tales como anticuerpos (y equivalentes funcionales de los mismos) específicos para EGFR y moléculas pequeñas, tales como inhibidores de quinasa sintéticos que actúan directamente sobre el dominio citoplasmático de EGFR.

Otros ejemplos de receptores de factor de crecimiento implicados en la oncogénesis son los receptores para factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGFR), factor de crecimiento de tipo insulina (IGFR), factor de crecimiento nervioso (NGFR) y factor de crecimiento de fibroblastos (FGFR).

En una realización alternativa adicional, el antagonista de VEGFR puede administrarse en combinación con uno o más adyuvantes adecuados, tales como, por ejemplo, citocinas (IL-10 e IL-13, por ejemplo) u otros inmunoestimulantes. Véase, por ejemplo, Larrivé y col., anteriormente. Debería apreciarse sin embargo, que la administración de un solo anticuerpo anti-KDR es suficiente para prevenir, inhibir o reducir la progresión del tumor de una forma terapéuticamente eficaz.

En una terapia de combinación, el anticuerpo anti-KDR se administra antes, durante o después de comenzar la terapia con otro agente, así como cualquier combinación de los mismos, es decir, antes y durante, antes y después, durante y después, o antes, durante y después de comenzar la terapia con agente antineoplásico. Por ejemplo, el anticuerpo anti-KDR puede administrarse entre 1 y 30 días, preferentemente 3 y 20 días, más preferentemente entre 5 y 12 días antes de comenzar la terapia de radiación.

En la presente invención, puede usarse cualquier procedimiento o vía adecuada para administrar anticuerpos anti-KDR de la invención y, opcionalmente, coadministrar agentes antineoplásicos y/o antagonistas de otros receptores. Las vías de administración incluyen, por ejemplo, administración oral, intravenosa, intraperitoneal, subcutánea o intramuscular. La dosis de antagonista administrado depende de numerosos factores incluyendo, por ejemplo, el tipo de antagonistas, el tipo y la gravedad del tumor que se esté tratando y la vía de administración de los antagonistas. Debería enfatizarse, sin embargo, que la presente invención no está limitada a ningún procedimiento o vía de administración particular.

Se señala que un anticuerpo anti-KDR puede administrarse como un conjugado, que se une específicamente al receptor y administra una carga útil tóxica letal después de la internalización del ligando-toxina.

Se entiende que los anticuerpos anti-KDR de la invención, cuando se usan en un mamífero con el fin de una profilaxis o tratamiento, se administrarán en forma de una composición que comprende además un vehículo farmacéuticamente aceptable. Los vehículos farmacéuticamente aceptables adecuados incluyen, por ejemplo, uno o más de agua, solución salina, solución salina tamponada con fosfato, dextrosa, glicerol, etanol y similares, así como

combinaciones de los mismos. Los vehículos farmacéuticamente aceptables pueden comprender además cantidades minoritarias de sustancias auxiliares tales como agentes humectantes o emulsionantes, conservantes o tampones, que aumenten la vida útil o eficacia de las proteínas de unión. Las composiciones de la inyección pueden, como se sabe bien en la técnica, formularse para proporcionar una liberación rápida, sostenida o retardada de la administración de principio activo al mamífero.

También se proporcionan kits para inhibir el crecimiento de tumores y/o la angiogénesis que comprenden una cantidad terapéuticamente eficaz de un anticuerpo anti-KDR humano. Los kits pueden contener además cualquier antagonista adecuado de, por ejemplo, otro receptor de factor de crecimiento implicado en la oncogénesis o angiogénesis (por ejemplo, VEGFR-1/Flt-1, BGFR, PDGFR, IGFR, NGFR, FGFR, etc., como se ha descrito anteriormente). Como alternativa, o además, los kits pueden comprender además un agente antineoplásico. Los ejemplos de agentes antineoplásicos adecuados en el contexto de la presente invención se han descrito en la presente memoria. Los kits pueden comprender además un adyuvante, habiéndose descrito también ejemplos anteriormente.

Un anticuerpo anti-KDR de la invención puede unirse químicamente o biosintéticamente a uno o más agentes antineoplásicos o antiangiogénicos.

Se contemplan además anticuerpos anti-KDR a los que se unen restos indicadores o diana. Los restos indicadores son los primeros miembros de parejas de unión. Los agentes antineoplásicos, por ejemplo, se conjugan con segundos miembros de dichas parejas y, de este modo, se dirigen al sitio en el que se une el anticuerpo anti-KDR. Un ejemplo común de dicha pareja de unión es avidina y biotina. La biotina se conjuga con un anticuerpo anti-KDR y, de este modo, proporciona una diana para un agente antineoplásico u otro resto que se conjuga con avidina o estreptavidina. Como alternativa, la biotina u otro resto de este tipo se une a un anticuerpo anti-KDR de la invención y se usa como indicador, por ejemplo, en un sistema de diagnóstico en el que un agente productor de señal detectable se conjuga con avidina o.

Por consiguiente, los presentes antagonistas de receptores pueden usarse por lo tanto *in vivo* e *in vitro* para procedimientos de investigación, diagnóstico, profilácticos o tratamiento que son bien conocidos en la técnica.

### **Ejemplos**

Los Ejemplos y Ejemplos de referencia que siguen se exponen para contribuir a la comprensión de la invención, pero no pretenden ni debería interpretarse que limiten su alcance de ningún modo. Los ejemplos no incluyen descripciones detalladas de procedimientos convencionales, tales como los empleados en la construcción de vectores y plásmidos, la inserción de genes que codifican polipéptidos en dichos vectores y plásmidos, o la introducción de plásmidos en células huésped. Dichos procedimientos son bien conocidos por los expertos en la materia y se describen en numerosas publicaciones incluyendo Sambrook, J., y Russell, D. W. (2001) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 3ª edición, Cold Spring Harbor Laboratory Press.

### **Ejemplo I. Producción de Fab humano**

#### **Ejemplo I(a). Proteínas y líneas celulares**

Se obtuvieron HUVEC de cultivo primario del Dr. S. Rafii en el Cornell Medical Center, Nueva York, y se mantuvieron en medio EBM-2 (Clonetics, Walkersville, MD) a 37 °C, CO<sub>2</sub> al 5%. Las proteínas de fusión solubles, KDR-fosfatasa alcalina (AP), sus variantes de delección de dominio de inmunoglobulina (Ig) y Flk-1-AP se expresaron en NIH 3T3 transfectadas de forma estable y se purificaron a partir de sobrenadantes de cultivo celular por cromatografía de afinidad usando un anticuerpo monoclonal inmovilizado contra AP, como se describe por Lu y col., *J. Biol. Chem.* 275: 14321-30 (2000). La proteína VEGF<sub>165</sub> se expresó en baculovirus y se purificó siguiendo los procedimientos descritos en Zhu y col., *Cancer Res.* 58: 3209-14 (1998). Las líneas celulares de leucemia, HL60 y HEL se mantuvieron en RPMI que contenía suero fetal de ternera al 10%.

#### **Ejemplo I(b). ELISA de fago**

Se escogieron clones TG1 individuales y se cultivaron a 37 °C en placas de 96 pocillos y se rescataron con fago auxiliar M13K07, como se ha descrito anteriormente. La preparación de fago amplificado se bloqueó con 1/6 volumen de leche al 18%/PB8 a temperatura ambiente durante 1 h y se añadió a placas de microtitulación de 96 pocillos Maxi-sorp (Nunc) revestidas con KDR-AP o AP (1 µg/ml x 100 µl). Después de la incubación a temperatura ambiente durante 1 h las placas se lavaron 3 veces con PBST y se incubaron con un conjugado de conejo anti-fago M13-HRP (Amersham Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ). Las placas se lavaron 5 veces, se añadió sustrato de peroxidasa TMB (KPL, Gaithersburg, MD) y la absorbancia a 450 nm se leyó usando un lector de microplacas (Molecular Devices, Sunnyvale, CA).

#### **Ejemplo I(c). Análisis del patrón de BstNI en ADN y secuenciación de nucleótidos**

La diversidad de los clones de Fab anti-KDR después de cada ronda de selección se analizó mediante patrones de digestión con enzimas de restricción (es decir, huellas de ADN). El inserto de gen de Fab de clones individuales se

amplificó por PCR usando cebadores: PUC19 inverso, 5' AGCGGATAACAATTTTCACACAGG 3'; y fdtet seq, 5' GTCGTCTTTCCAGACGTTAGT 3'. El producto amplificado se digirió con una enzima de corte frecuente, *Bst*NI, y se analizó en un gel de agarosa al 3%. Las secuencias de ADN de clones representativos de cada patrón de digestión se determinaron por secuenciación con didesoxinucleótidos.

#### 5 **Ejemplo I(d). Expresión y purificación de fragmentos Fab solubles**

Se usaron plásmidos de clones individuales para transformar un huésped de *E. coli* no supresor HB2151. La expresión de los fragmentos Fab en HB2151 se indujo por cultivo de las células en medio 2YTA que contenía isopropil-1-tio-β-D-galactopiranosido 1 mM (IPTG, Sigma) a 30 °C. Se preparó un extracto periplásmico de las células resuspendiendo el sedimento celular en Tris 25 mM (pH 7,5) que contenía sacarosa al 20% (p/v), NaCl 200 mM, EDTA 1 mM y PMSF 0,1 mM, seguido de incubación a 4°C con agitación suave durante 1 h. Después de la centrifugación a 15.000 rpm durante 15 min, la proteína Fab soluble se purificó a partir del sobrenadante por cromatografía de afinidad usando una columna de Proteína G siguiendo el protocolo del fabricante (Amersham Pharmacia Biotech).

#### 15 **Ejemplo I(e). Selección de Fab anti-KDR humano a partir de una biblioteca de presentación en fago**

Se usó para la selección una gran biblioteca de presentación en fago de Fab humano que contenía  $3,7 \times 10^{10}$  clones (DeHaard y col., J. Biol. Chem. 274: 18218-30 (1999)). La biblioteca consiste en genes de cadena ligera variable y genes de cadena pesada variable de anticuerpo amplificados por PCR fusionados a genes de cadena ligera constante humana ( $\kappa$  y  $\lambda$ ) y ADN que codifica el dominio C<sub>H</sub>1 de cadena pesada de IgG1, respectivamente. Ambas construcciones de cadena ligera y pesada están precedidas por una secuencia señal -*pe*/B para la cadena ligera y secuencia señal de gen III para la cadena pesada. Las construcciones de cadena pesada codifican además una porción de la proteína de gen III para la presentación en fago, una etiqueta de hexahistidina y una etiqueta c-myc de 11 aminoácidos de longitud seguida de un codón ámbar (TAG). Las etiquetas de hexahistidina y c-myc pueden usarse para la purificación o detección. El codón ámbar permite la presentación en fago usando huéspedes supresores (tales como células TG1) o producción de fragmentos Fab en forma soluble cuando se transforman en un huésped no supresor (tal como células HB2151).

La reserva de la biblioteca se cultivó hasta la fase logarítmica, se rescató con fago auxiliar M13-KO7 y se amplificó durante una noche en medio 2YTAK (2YT que contenía 100 µg/ml de ampicilina y 50 µg/ml de kanamicina) a 30 °C. La preparación de fago se precipitó en PEG al 4%/NaCl 0,5 M, se resuspendió en leche desnatada al 3%/PBS que contenía 500 µg/ml de proteína AP y se incubó a 37 °C durante 1 h para capturar fagos que presentasen fragmentos Fab anti-AP y bloquear otra unión inespecífica.

Tubos Maxisorp Star revestidos con KDR-AP (10 µg/ml en PBS) (Nunc, Roskilde, Dinamarca) se bloquearon primero con leche al 3%/PBS a 37 °C durante 1 h y después se incubaron con la preparación de fago a temperatura ambiente durante 1 h. Los tubos se lavaron 10 veces con PBST (PBS que contenía Tween 20 al 0,1%), seguido de 10 veces con PBS. El fago unido se eluyó a temperatura ambiente durante 10 min con 1 ml de una solución recién preparada de trietilamina 100 mM (Sigma, St. Louis, MO). El fago eluido se incubó con 10 ml de células TG1 en fase semilogarítmica a 37 °C durante 30 min en reposo y 30 min en agitación. Las células TG1 infectadas se sedimentaron y se sembraron en varias placas de 2YTAG grandes y se incubaron durante una noche a 30 °C. Todas las colonias cultivadas en las placas se rasparon en de 3 a 5 ml de medio 2YTA, se mezclaron con glicerol (concentración final al 10%), se dividieron en alícuotas y se almacenaron a -70 °C. Para la siguiente ronda de selección, se añadieron 100 µl de la reserva de fago a 25 ml de medio 2YTAG y se cultivaron hasta fase semilogarítmica. El cultivo se rescató con fago auxiliar M13K07, se amplificó, se precipitó y se usó para la selección siguiendo el procedimiento descrito anteriormente, con concentraciones reducidas de KDR-AP inmovilizado sobre el inmunotubo y un número aumentado de lavados después del procedimiento de unión.

Se realizaron un total de tres rondas de selección sobre KDR inmovilizado, con concentraciones de proteína y un número de lavados variables después del procedimiento de unión inicial. Después de cada ronda de selección, se escogieron aleatoriamente 93 clones y se ensayaron por ELISA de fago para determinar su unión a KDR. Se escogieron setenta de los 93 clones (75%) después de la segunda selección, y más del 90% de los clones se recuperados después de la tercera selección eran positivos en la unión a KDR, sugiriendo una alta eficacia del procedimiento de selección. Los segmentos de ADN que codifican Fab de los 70 agentes de unión identificados en la segunda selección se amplificaron, se digirieron con *Bst*NI, y se compararon para patrones de huella genética. Se observaron un total de 42 patrones diferentes, indicando una diversidad excelente del Fab anti-KDR aislado. El examen de reactividad cruzada demostró que 19 de los 42 anticuerpos eran agentes de unión a KDR específicos, mientras que los 23 anticuerpos restantes se unían tanto a KDR como a su homólogo murino, Flk-1. Se consiguió una selección adicional con un ensayo de unión a VEGF competitivo en el que se determinó la unión de KDR soluble a VEGF inmovilizado en presencia o ausencia de los fragmentos Fab anti-KDR. El ensayo identificó cuatro clones Fab que eran capaces de bloquear la unión entre VEGF y KDR. Tres eran agentes de unión específicos de KDR y uno presentaba reactividad cruzada con Flk-1. La generación de huellas de ADN y el análisis de secuenciación confirmaron que los cuatro anticuerpos de bloqueo de KDR/VBGF eran diferentes (Figura 1A) con secuencias de aminoácidos y ADN únicas.

Las secuencias de aminoácidos para CDR1, CDR2 y CDR3 de  $V_H$  y  $V_L$  para los cuatro clones de ejemplo de referencia se proporcionan en la Tabla 1.

<b>Tabla 1 - Secuencias de CDR de Fab humanos que se unen a KDR</b>			
Clon	CDR1	CDR2	CDR3
Cadena ligera			
D2C6	RASQSVSSYLA (SEC ID N°: 1)	DSSNRAT (SEC ID N°: 2)	LQHNTFPPT (SEC ID N°: 3)
D2H2	RASQGISSRLA (SEC ID N°: 4)	AASSLQT (SEC ID N°: 5)	QQANRFPPT (SEC ID N°: 6)
DIH4	AGTTTDLTYDLVS (SEC ID N°: 7)	DGNKRPS (SEC ID N°: 8)	NSYVSSRFYV (SEC ID N°: 9)
D1F7	SGBTSWGTNTAN (SEC ID N°: 10)	NNNQRP (SEC ID N°: 11)	AAWDDSLNGHWV (SEC ID N°: 12)
Cadena pesada			
D2C6	GFTFSSYSMN (SEC ID N°: 13)	SISSSSSIYYADSVKG (SEC ID N°: 14)	VTDAFDI (SEC ID N°: 15)
D2H2	GFTFSSYSMN (SEC ID N°: 13)	SISSSSSIYYADSVKG (SEC ID N°: 14)	VTDAFDI (SEC ID N°: 15)
D1H4	GFTFSSYSMN (SEC ID N°: 13)	SISSSSSIYYADSVKG (SEC ID N°: 14)	VTDAFDI (SEC ID N°: 15)
D1F7	GGTFSSYAIS (SEC ID N°: 16)	GGHFIFGTANYAQKFQG (SEC ID N°: 17)	GYDYYDSSGVASPPDY (SEC ID N°: 18)
Las secuencias completas para las cadenas $V_H$ y $V_L$ se presentan en el Listado de Secuencias. Para el ejemplo de referencia D1F7, las secuencias de nucleótidos y aminoácidos para $V_H$ se presentan mediante las SEC ID N°: 19 y 20, respectivamente, y las secuencias de nucleótidos y aminoácidos para $V_L$ se representan mediante las SEC ID N°: 21 y 22.			

5 Para el ejemplo de referencia D2C6, las secuencias de nucleótidos y aminoácidos para  $V_H$  se representan mediante las SEC ID N°: 23 y 24, respectivamente, y las secuencias de nucleótidos y aminoácidos para  $V_L$  se representan mediante las SEC ID N°: 25 y 26.

Para el ejemplo de referencia D2H2, las secuencias de nucleótidos y aminoácidos para  $V_H$  se representan mediante las SEC ID N°: 30 y 31, respectivamente, y las secuencias de nucleótidos y aminoácidos para  $V_L$  se representan mediante las SEC ID N°: 32 y 33.

10 Para el ejemplo de referencia D1H4, las secuencias de nucleótidos y aminoácidos para  $V_H$  se representan mediante las SEC ID N°: 27 y 24, respectivamente, y las secuencias de nucleótidos y aminoácidos para  $V_L$  se representan mediante las SEC ID N°: 28 y 29.

15 Se creó una segunda biblioteca combinando la cadena pesada sencilla del ejemplo de referencia D2C6 con una población diversa de cadenas ligeras derivadas de la biblioteca original. Se identificaron diez Fab adicionales, denominados SA1, SA3, SB10, SB5, SC7, SD2, SD5, SF2, SF7 y 1121. Las secuencias de nucleótidos y aminoácidos para  $V_L$  de los diez Fab están representadas de la forma siguiente. Para el ejemplo de referencia SA1, las secuencias de nucleótidos y aminoácidos para  $V_L$  se representan mediante las SEC ID N°: 34 y 35. Para el ejemplo de referencia SA3, las secuencias de nucleótidos y aminoácidos para  $V_L$  se representan mediante las SEC ID N°: 36 y 37. Para el ejemplo de referencia SB10, las secuencias de nucleótidos y aminoácidos para  $V_L$  se representan mediante las SEC ID N°: 38 y 39. Para el ejemplo de referencia SB5, las secuencias de nucleótidos y aminoácidos para  $V_L$  se representan mediante las SEC ID N°: 40 y 41. Para el ejemplo de referencia SC7, las secuencias de nucleótidos y aminoácidos para  $V_L$  se representan mediante las SEC ID N°: 42 y 43. Para el ejemplo de referencia SD2, las secuencias de nucleótidos y aminoácidos para  $V_L$  se representan mediante las SEC ID N°: 44 y 45. Para el ejemplo de referencia SD5, las secuencias de nucleótidos y aminoácidos para  $V_L$  se representan mediante las SEC ID N°: 46 y 47. Para el ejemplo de referencia SF2, las secuencias de nucleótidos y aminoácidos para  $V_L$  se representan mediante las SEC ID N°: 48 y 49. Para el ejemplo de referencia SF7, las secuencias de nucleótidos y aminoácidos para  $V_L$  se representan mediante las SEC ID N°: 50 y 51. Para el ejemplo 1121, las

secuencias de nucleótidos y aminoácidos para  $V_L$  se representan mediante las SEC ID N°: 52 y 53.

Las secuencias de CDR de  $V_L$  se presentan en la Tabla 2.

Tabla 2 - Secuencias de CDR de cadena ligera de Fab humanos que se unen a KDR			
Clon	CDR1	CDR2	CDR3
SA1	TGSHSNFGAGTDV (SEC ID N°: 54)	GDSNRPS (SEC ID N°: 55)	QSYDYGLRGWV (SEC ID N°: 56)
SA3	RASQNINNYLN (SEC ID N°: 57)	AASTLQS (SEC ID N°: 58)	QQYSRYPPPT (SEC ID N°: 59)
SB10	TGSSTDVGNYYNIS (SEC ID N°: 60)	DVTSRPS (SEC ID N°: 61)	NSYSATDTLV (SEC ID N°: 52)
SBS	TGQSSNIGADYDVH (SEC ID N°: 63)	GHNNRPS (SEC ID N°: 64)	QSYDSSLSGLV (SEC ID N°: 65)
SC7	RASQDISSWLA (SEC ID N°: 66)	AASLLQS (SEC ID N°: 67)	QQADSFPPPT (SEC ID N°: 68)
SD2	RASQSIKRWLA (SEC ID N°: 69)	AASTLQS (SEC ID N°: 70)	QQANSFPPT (SEC ID N°: 71)
SD5	SGSRSNIGAEHYEVQ (SEC ID N°: 72)	GDTNRPS (SEC ID N°: 73)	QSYDTSLRGPV (SEC ID N°: 74)
SF2	TGSSSNIGTGVDVH (SEC ID N°: 75)	AYTNRPS (SEC ID N°: 76)	QSFDDSLNGLV (SEC ID N°: 77)
SF7	TGSHSNFGAGTDVH (SEC ID N°: 78)	GDTHRPS (SEC ID N°: 79)	QSYDYGLRGWV (SEC ID N°: 80)
1121	RASQGIDNWLG (SEC ID N°: 81)	DASMLDT (SEC ID N°: 82)	QQAKAFPPT (SEC ID N°: 83)

### **Ejemplo de referencia II. Ensayos**

#### **Ejemplo de referencia II(a). Unión a KDR cuantitativa y bloqueo de la interacción de KDR/VEGF.**

- 5 En un ensayo de unión directa, se añadieron diversas cantidades de proteínas Fab solubles a placas de microtitulación Maxi-sorp de 96 pocillos revestidas con KDR y se incubaron a temperatura ambiente durante 1 h, después de lo cual las placas se lavaron 3 veces con PBST. Las placas se incubaron después a temperatura ambiente durante 1 h con 100  $\mu$ l de un conjugado de conejo anti-anticuerpo Fab humano-HRP (Jackson ImmunoResearch Laboratory Inc., West Grove, PA). Las placas se lavaron y se revelaron siguiendo el procedimiento descrito anteriormente para el ELISA de fago. En un ensayo de bloqueo de KDR/VEGF competitivo, se mezclaron diversas cantidades de proteínas Fab con una cantidad fija de KDR-AP (100 ng) y se incubaron a temperatura ambiente durante 1 h. Las mezclas se transfirieron después a placas de microtitulación de 96 pocillos prerrevestidas con VBGF<sub>165</sub> (200 ng/pocillo) y se incubaron a temperatura ambiente durante 2 h adicionales, después de lo cual las placas se lavaron 5 veces y se añadió el sustrato para AP (p-nitrofenil fosfato, Sigma). La absorbancia a 405 nm se midió para cuantificar las moléculas de KDR-AP unidas (8). La  $CI_{50}$ , es decir, la concentración de proteína Fab necesaria para una inhibición del 50% de la unión de KDR a VEGF, se calculó después.

Los cuatro clones de bloqueo de VEGF (D2C6, D2H2, D1H4, D1F7) se expresaron como Fab soluble y se purificaron a partir de extractos periplásmicos de *E. coli* mediante cromatografía de afinidad de Proteína G. El rendimiento de las proteínas Fab purificadas de estos clones variaba de 60 a 400  $\mu$ g/litro de cultivo. El análisis de SDS-PAGE de cada preparación de Fab purificado producía una sola banda de proteína con el tamaño molecular esperado (Figura 1B).

La Figura 2 muestra la unión dependiente de la dosis de los fragmentos Fab anti-KDR a receptor inmovilizado según se ensayó mediante un ELISA de unión directa. Los clones D2C6 y D2H2 eran agentes de unión más eficaces, seguidos por los clones D1H4 y D1F7. Los cuatro Fab también bloquean la unión de KDR a VEGF inmovilizado (Figura 2B). Las concentraciones de anticuerpo necesarias para un 50% de inhibición de la unión de KDR a VEGF son de aproximadamente 2 nM para los clones D2C6, D2H2 y D1H4 y de 20 nM para el clon D1F7. Sólo el clon D1F7 bloquea la unión del VEGF a Flk-1 (Figura 2C) con una  $CI_{50}$  de aproximadamente 15 nM.

#### **Ejemplo de referencia II(b). Análisis de BIAcore del scFv soluble**

Las cinéticas de unión de proteínas Fab solubles a KDR se midieron por resonancia de plasmón superficial usando un biodetector BIAcore (Pharmacia Biosensor). La proteína de fusión KDR-AP se inmovilizó sobre una microplaca detectora y se inyectaron proteínas Fab solubles a concentraciones que variaban de 1,5 nM a 100 nM. Se obtuvieron sensogramas a cada concentración y se evaluaron usando un programa, BIA Evaluation 2.0, para determinar las constantes de velocidad *kon* y *koff*. La *Kd* se calculó a partir de la relación de las constantes de velocidad *koff/kon*.

Los tres fragmentos Fab específicos de KDR se unen a receptor inmovilizado con una *Kd* de 2 a 4 nM (Tabla 3). El

clon con reactividad cruzada, D1F7, tiene una  $K_d$  de 45 nM, que es de aproximadamente 10 a 15 veces más débil que las de los clones específicos de KDR. Cabe señalar que, aunque la  $K_d$  global para los tres fragmentos Fab específicos de KDR es similar, la cinética de unión individual, es decir, la  $k_{on}$  y  $k_{off}$ , para estos anticuerpos es bien diferente, por ejemplo, D2C6 posee la velocidad de asociación más rápida mientras que D1H4 tiene la velocidad de disociación más lenta (Tabla 3).

**Tabla 3 - Cinética de unión de los cuatro fragmentos Fab anti-KDR humanos neutralizantes**

Clon	$k_{on}$ ( $10^4 M^{-1} S^{-1}$ )	$k_{off}$ ( $10^{-4} S^{-1}$ )	$K_d$ (nM)
Hu-2C6 Fab	$27,3 \pm 8,6^*$	$5,38 \pm 0,54$	1,97
Hu-2H2 Fab	$12,4 \pm 29$	$4,87 \pm 0,18$	3,93
Hu-1H4 Fab	$5,55 \pm 0,59$	$1,53 \pm 0,22$	2,76
Hu-1F7 Fab	$4,14 \pm 1,21$	$18,7 \pm 2,12$	45,2

\*Todos los números se determinaron mediante análisis de BIAcore y representan la media  $\pm$  ET de al menos tres determinaciones separadas.

#### Ejemplo de referencia II(c). Mapeo de epítomos de unión

La producción de variantes de delección de dominio de tipo Ig extracelular KDR se ha descrito anteriormente (Lu y col. (2000)). En un ensayo de mapeo de epítomos, se inmovilizó primero KDR-AP de longitud completa, fusiones con AP de dos variantes de delección de dominio de Ig de KDR y Flk-1-AP sobre una placa de 96 pocillos (Nunc) usando un anticuerpo de conejo anti-AP (DAKO-immunoglobulins Glostrup, Dinamarca) como reactivo de captura. Después, la placa se incubó con diversas proteínas Fab anti-KDR a temperatura ambiente durante 1 h, seguido de incubación con un conjugado de anticuerpo de conejo anti-Fab humano-MP. La placa se lavó y se reveló como se ha descrito anteriormente.

Los epítomos de unión de los fragmentos Fab anti-KDR se mapearon usando el KDR de longitud completa y dos variantes de delección de dominio de Ig de KDR. KDR(1-3) es una variante de KDR que contiene los tres primeros dominios de Ig N-terminales. KDR (3) es una variante que sólo contiene el tercer dominio de Ig. Como se muestra en la Figura 3, los clones D2C6 y D1H4 se unen igual de bien a KDR, KDR(1-3) y KDR(3), localizando por lo tanto su epítopo o epítomos de unión dentro del dominio 3 de Ig. Los clones D2H2 y D1F7 se unen muchos más eficazmente a KDR de longitud completa y KDR (1-3), indicando un epítopo o epítomos de unión más amplios dentro de los dominios de Ig de KDR 1 a 3. Sólo el clon D1F7 presenta reactividad cruzada con Flk-1.

#### Ejemplo de referencia II(d). Ensayo antimitogénico

Se sembraron HUVEC ( $5 \times 10^3$  células/pocillo) sobre placas de cultivo de tejido de 96 pocillos (Wallach, Inc., Gaithersburg, MD) en 200  $\mu$ l de medio BBM-2 sin VEGF, factor de crecimiento de fibroblastos básico (bFGF) o factor de crecimiento epidérmico (EGF) y se incubaron a 37 °C durante 72 h. Se añadieron diversas cantidades de proteínas Fab a pocillos por duplicado y se preincubaron a 37 °C durante 1 h, después de lo cual se añadió VEGF<sub>165</sub> a una concentración final de 16 ng/ml. Después de 18 h de incubación, se añadieron 0,25  $\mu$ Ci de [<sup>3</sup>H]TdR (Amersham) a cada pocillo y se incubaron durante 4 h adicionales. Las células se lavaron después una vez con PBS, se trataron con tripsina y se recogieron sobre un filtro de vidrio (Printed Filtermat A, Wallach) con un recolector de células (Harvester 96, MACH III, TOMTEC, Orange, CT). La membrana se lavó tres veces con H<sub>2</sub>O y se secó al aire. Se añadió líquido de centelleo y se determinó la radiactividad incorporada en el ADN en un contador de centelleo (Wallach, Contador de Centelleo Microbeta Modelo 1450).

La capacidad del Fab anti-KDR humano para bloquear la actividad mitogénica estimulada por VEGF en HUVEC se muestra en la Figura 4. Los cuatro fragmentos Fab humanos inhibían la síntesis de ADN inducida por VEGF en HUVEC de una forma dependiente de la dosis. La concentración de Fab que inhibía el 50% (CE<sub>50</sub>) de la incorporación de [<sup>3</sup>H]-TdR estimulada por VEGF en HUVEC es de aproximadamente 0,5 nM para los clones D2C6 y D1H4, 0,8 nM para el clon D2H2 y 15 nM para el clon D1F7. Los controles incluían VEGF solamente (1500 cpm) y medio sencillo (60 cpm). Se ensayaron pocillos por duplicado. Los datos mostrados son representativos de al menos tres experimentos separados.

#### Ejemplo II(e). Ensayo de migración de leucemia

Se lavaron células HL60 y HEL tres veces con medio RPMI 1640 sencillo sin suero y se suspendieron en el medio a  $1 \times 10^6$ /ml. Se añadieron alícuotas de 100  $\mu$ l de suspensión celular a insertos transpocillo de tamaño de poro de 3  $\mu$ m para células HL60, o insertos transpocillo de tamaño de poro de 8  $\mu$ m para células HEL (Costar®, Coming Incorporated, Corning, NY) y se incubaron con las proteínas Fab anti-KDR (5  $\mu$ g/ml) durante 30 min a 37 °C.



Después los insertos se pusieron en los pocillos de placas de 24 pocillos que contenían 0,5 ml de RPMI 1640 sin suero con o sin VEGF<sub>165</sub>. La migración se llevó a cabo a 37 °C, CO<sub>2</sub> al 5% durante 16-18 h para células HL60, o durante 4 h para células HEL. Las células migradas se recogieron de los compartimentos inferiores y se contaron con un contador Coulter (Modelo Z1, Coulter Electronics Ltd., Luton, Inglaterra).

- 5 El VEGF indujo migración de células HL60 y HEL de una forma dependiente de la dosis consiguiéndose una estimulación máxima a 200 ng/ml (Figura 5A). Todos los fragmentos Fab anti-KDR inhibían significativamente la migración estimulada por VEGF de células HL60 y HEL (Figura 5B). Como control, un fragmento Fab de C225, un anticuerpo dirigido contra el receptor de BGF, no mostraba un efecto inhibitorio significativo en este ensayo.

### **Ejemplo III. Producción de IgG**

#### **10 Ejemplo III(a). Construcción de vectores para la expresión de IgG**

Se construyeron vectores separados para la expresión de cadena pesada y cadena ligera de IgG. Los genes de V<sub>L</sub> clonados se digirieron y se ligaron en el vector pKN100 (MRC). Los genes de V<sub>H</sub> clonados se digirieron y se ligaron en el vector pGID105 que contenía el dominio constante de cadena pesada de IgG I (γ) humano. El pKN100 y el pGID105 están disponibles en MRC. Las construcciones se examinaron por digestión con enzima de restricción y se verificaron por secuenciación con didesoxinucleótido. En ambos casos, la expresión está bajo el control del promotor de HCMV y terminaba mediante una secuencia de terminación artificial.

- 15 Los genes de cadena ligera y pesada ensamblados se clonaron después en los vectores de expresión Lonza GS pEE6.1 y pEE12.1. Se recombinaron vectores de cadena ligera y pesada en vectores individuales para la transfección estable de células CHO y células NSO. Las células transfectadas se cultivaron en glutamina sin medio y expresaban anticuerpos a niveles tan altos como de 1 g/l.

#### **20 Ejemplo III(b). Producción y caracterización de IgG anti-KDR humana**

Tanto el IMC-2C6 como el IMC-1121 se produjeron en líneas celulares NSO transfectadas de forma estable y cultivadas en condiciones sin suero, y se purificaron a partir de un cultivo celular discontinuo usando cromatografía de afinidad de Proteína A. La pureza de las preparaciones de anticuerpos se analizó mediante SDS-PAGE y las concentraciones se determinaron mediante ELISA, usando un anticuerpo anti-Fc humano como agente de captura y un conjugado de anticuerpo anti-cadena κ humana-peroxidasa de rábano picante (HRP) como agente de detección. Se usó un anticuerpo de uso clínico, IMC-C225, como patrón para la calibración. El nivel de endotoxina de cada preparación de anticuerpo se examinó para asegurar que los productos estuvieran libres de contaminación por endotoxinas.

- 30 Se evaluaron anticuerpos anti-KDR para determinar su unión a KDR y el bloqueo de la unión de VBGF. En el ensayo de unión directa, se añadieron diversas cantidades de anticuerpos a placas de microtitulación Maxisorp de 96 pocillos revestidas con KDR (Nunc, Roskilde, Dinamarca) y se incubaron a temperatura ambiente (TA) durante 1 h, después de lo cual las placas se lavaron 3 veces con PBS que contenía Tween 20 al 0,1%. Después, las placas se incubaron a TA durante 1 h con 100 μl de un conjugado de conejo anti-Fc de IgG humana-HRP (Jackson ImmunoResearch Laboratory Inc., West Grove, PA). Las placas se lavaron y se revelaron como anteriormente. Se compararon los anticuerpos humanos IMC-2C6 e IMC-1121 con IMC-1C11 (anticuerpo de ratón específico para KDR) e IMC-C225 (un anticuerpo quimérico específico para EGFR). Los anticuerpos anti-KDR se unen a KDR de una forma dependiente de la dosis, siendo IMC-1121 el agente de unión más fuerte (Figura 6A).

- 40 La eficacia de los anticuerpos anti-KDR para bloquear la unión de KDR a VBGF se midió con un ensayo de competición. Se mezclaron diversas cantidades de anticuerpos con una cantidad fija de KDR-AP (100 ng) y se incubaron a TA durante 1 h. Después, las mezclas se transfirieron a placas de microtitulación de 96 pocillos previamente revestidas con VBQF<sub>165</sub> (200 ng/pocillo) y se incubaron a TA durante 2 h adicionales, después de lo cual las placas se lavaron 5 veces y se añadió el sustrato para AP (p-nitrofenil fosfatasa, Sigma), seguido por lectura de la absorbancia a 405 nm para cuantificar las moléculas de KDR-AP unidas. La CI<sub>50</sub>, es decir, la concentración de anticuerpo necesaria para una inhibición del 50% de la unión de KDR a VEGF, se calculó después. Los anticuerpos anti-KDR bloqueaban fuertemente la unión de KDR a VBGF (Figura 6B), con una potencia similar. La CI<sub>50</sub> es de aproximadamente 0,8 a 1,0 nM para los tres anticuerpos. El anticuerpo de control, IMC-C225 (anti-EGFR humano) no se une a KDR y no bloquea la interacción de KDR/VEGF.

- 50 La afinidad o avidéz del anticuerpo se determinó mediante análisis de BIAcore, como anteriormente. Las cinéticas de unión, es decir, la constante de la velocidad de asociación (*kon*) y la constante de la velocidad de disociación (*koff*) de los anticuerpos anti-KDR se midieron y se calculó la constante de disociación **Kd** (Tabla 4).

**Tabla 4 - Cinética de unión de anticuerpos anti-KDR**

Anticuerpo	$k_{on}$ ( $10^4 \text{ M}^{-1}\text{S}^{-1}$ )	$k_{off}$ ( $10^{-4}\text{S}^{-1}$ )	Kd(nM)
scFv p1C11 de referencia	7,7 ± 2,1*	1,0 ± 0,09	1,4±0,3
IMC-1C11 de referencia	13,4 ± 2,9	0,37 ± 0,13	0,27 ± 0,06
Fab Hu-2C6 de referencia	17,1 ± 5,7	5,5 ± 0,76	3,6 ± 1,7
IgG IMC-2C6 de referencia	21,2, ± 8,1	0,43 ± 0,03	0,20 ± 0,01
Fab Hu-1121	29,6 ± 7,3	0,31 ± 0,06	0,11 ± 0,02
IgG IMC-1121	47,9 ± 2,4	0,25 ± 0,04	0,05 ± 0,01

\*Todos los números se determinaron mediante análisis de BIAcore y representan la media ± ET de al menos tres determinaciones por separado.

IMC-1C11 se une a KDR inmovilizado con una constante de disociación ( $K_d$ ) de 0,27 nM, aproximadamente 5 veces superior a su homólogo Fab. La  $K_d$  para IMC-2C6 es de 0,2 nM, que es aproximadamente 18 veces superior a la del Fab Hu-2C6 monovalente principalmente debido a una mejora en la velocidad de disociación. La maduración por afinidad de Hu-2C6 conducía a Fab Hu-1121 con una mejora de 33 veces en la  $K_d$  (de 3,6 nM a 0,11 nM). La conversión de Fab Hu-1121 en IgG bivalente, IMC-1121, dio como resultado un aumento de aproximadamente 2 veces en la actividad de unión global.

#### **Ejemplo III(c). Inhibición de la unión de VEGF a células y de la mitogénesis estimulada por VEGF de HUVBC**

En un radioinmunoensayo basado en células, se mezclaron diversas cantidades de anticuerpos anti-KDR con una cantidad fija (2 ng) de VEGF<sub>165</sub> marcado con <sup>125</sup>I (R & D Systems) y se añadió a una monocapa confluyente al 80-90% de HUVEC cultivadas en una placa de microtitulación de 96 pocillos. La placa se incubó a TA durante 2 h, se lavó 5 veces con PBS frío y se contaron las cantidades de radiactividad que se unían a las células endoteliales. Como se muestra en la Figura 7A, los anticuerpos anti-KDR competían eficazmente con VEGF radiomarcado por la unión a HUVEC. Los datos representan las medias ± DT para determinaciones por triplicado.

Los anticuerpos también bloqueaban la mitogénesis de HUVEC estimulada por VEGF de una forma dependiente de la dosis (Figura 7B). Como se ha descrito anteriormente para los Fab, diversas cantidades de los anticuerpos anti-KDR se preincubaron primero con HUVEC privadas de factor de crecimiento ( $5 \times 10^3$  células/pocillo) a 37 °C durante 1 h, después de lo cual se añadió VEGF<sub>165</sub> a una concentración final de 16 ng/ml. Después de 18 h de incubación, se añadió 0,25 µCi de [<sup>3</sup>H]-TdR (Amersham) a cada pocillo y se incubó durante 4 h adicionales. Las células se lavaron, se recogieron y la radiactividad incorporada en el ADN se determinó en un contador de centelleo. IMC-1121, el anticuerpo con la mayor afinidad, es el inhibidor más eficaz con una DE50, es decir, la concentración que da como resultado un 50% de inhibición de la incorporación de [<sup>3</sup>H]-TdR, de aproximadamente 0,7 nM, en comparación con la de 1,5 nM para tanto IMC-1C11 como IMC-2C6.

#### **Ejemplo IV. Inhibición de células de leucemia y progresión de la leucemia**

##### **Ejemplo IV(a). Expresión de VEGF y BDR por células de leucemia**

Se examinó la expresión de VEGF y KDR mediante RT-PCR en tres líneas celulares de leucemia mieloide: HL60 (promielocítica); HEL (megacariocítica); y U937 (histiocítica). Se usaron los cebadores siguientes para amplificar VEGF, Flt-1, KDR, y el control interno,  $\alpha$ -actina: VEGF directo: 5'-TCGGGCCTCCGAAACCATGA-3' (SEC ID N°: 86), e inverso: 5'-CCTGGTGAGAGATCTGGTTC-3' (SEC ID N°: 87); Flt-1 directo: 5'-TTTTGTGATTTTGGCCTTGC-3' (SEC ID N°: 88), e inverso: 5'-CAGGCTCATGAACTTGAAAGC-3' (SEC ID N°: 89); KDR directo: 5'-GTGACCAACATGGAGTCGTG-3' (SEC ID N°: 90), e inverso: 5'-CCAGAGATTCCATGCCACTT-3' (SEC ID N°: 91);  $\alpha$ -actina directo: 5'-TCATGTTTGGAGACCTTCAA-3' (SEC ID N°: 92), e inverso: 5'-GTCTTTGCGGATGTCCACG-3' (SEC ID N°: 93). Los productos de PCR se analizaron en un gel de agarosa al 1%. Como se muestra en la Figura 8A, las tres líneas son positivas para la expresión de VEGF, y HL60 y HEL, pero no U937, también son positivas para la expresión de KDR. Las tres líneas celulares también son positivas para la expresión de Flt-1, según se detectó mediante RT-PCR (no se muestra).

La producción de VEGF se examinó para las tres líneas celulares de leucemia cultivadas en FCS al 10% o condiciones sin suero. Las células de leucemia se recogieron, se lavaron con medio RPMI 1640 sencillo y se sembraron en placas de 24 pocillos a una densidad de  $5 \times 10^5$ /ml con o sin adición de FCS al 10%. Las células se

cultivaron a 37 °C durante 72 h, después de lo cual se contó el número total de células usando un contador Coulter (Modelo Z1, Coulter Electronics Ltd., Luton, Inglaterra) y la concentración de VEGF en el sobrenadante se determinó usando un kit de ELISA (Biosource International, Camarillo, CA). Las células de leucemia secretan una cantidad significativa de VEGF cuando se cultivan *in vitro* (Figura 8B) y las células tanto HL60 como U937 producían más VEGF en condiciones de privación de suero.

#### **Ejemplo IV(b). Inhibición de la migración de células de leucemia inducida por VEGF**

Se realizaron ensayos de migración de células de leucemia como se ha descrito en el Ejemplo II(e) con las tres líneas celulares de leucemia. La migración se llevó a cabo durante 16-18 h para células HL60 o durante 4 h para células HEL y U937.

Las tres líneas celulares de leucemia migran en respuesta a VEGF (Figura 9). La incubación con anticuerpos anti-KDR inhibía, de una forma dependiente de la dosis, la migración inducida por VEGF de células HL60 y HEL (Figura 9A y 9B), pero no tenían efecto sobre la migración de células U937 que no expresan KDR (Figura 9C). Sin embargo, la migración inducida por VEGF de células U937 se inhibía eficazmente por un anticuerpo anti-Fit-1 humano, el AcM 612 (Figura 9C). Como se esperaba, el anticuerpo anti-EGFR, IMC-C225, no mostraba efectos sobre la migración inducida por VEGF de células de leucemia humanas.

#### **Ejemplo IV(b). Inhibición del desarrollo de leucemia *in vivo***

Se usaron ratones NOD-SCID del mismo sexo (hembras) de 6 a 8 semanas de edad en todos los experimentos. Los ratones se irradiaron con 3,5 Gy de una fuente de rayos gamma  $^{137}\text{Cs}$  a una velocidad de dosis de aproximadamente 0,9 Gy/min y se inocularon por vía intravenosa con  $2 \times 10^7$  células HL60. Tres días después de la inoculación de tumor, se trataron grupos de 7 a 9 ratones dos veces por semana con diversas dosis de anticuerpos IMC-1C11, IMC-2C6 o IMC-1121 mediante inyección intraperitoneal. Se observó a los ratones diariamente para determinar signos de toxicidad y se registró el tiempo de supervivencia. Para el análisis estadístico, se usó el ensayo de Mann-Whitney Rank Sum unilateral no paramétrico.

Todos los ratones no tratados murieron en 17 días (Figura 10, tiempo medio de supervivencia,  $14 \pm 3$  días). A esta alta carga tumoral, el tratamiento con IMC-1C11 a 200  $\mu\text{g}/\text{ratón}/\text{inyección}$  aumentaba moderadamente la supervivencia, pero todos los ratones morían en 35 días (supervivencia media:  $21 \pm 7$  días; mediana de la supervivencia 19 días, respectivamente.  $p = 0,03$  en comparación con el grupo de control). El IMC-2C6 proporcionado a la misma dosis de 200  $\mu\text{g}/\text{ratón}/\text{inyección}$  prolongaba significativamente la supervivencia de ratón a  $34 \pm 12$  días (mediana = 29 días.  $p < 0,01$  en comparación con el control y  $p = 0,01$  en comparación con el grupo tratado con IMC-1C11). El anticuerpo con la mayor afinidad, IMC-1121, demostró un efecto antileucemia mucho más fuerte, particularmente con respecto a IMC-1C11. Los ratones tratados con IMC-1121 sobrevivían  $63 \pm 12$  días (mediana = 60 días.  $p < 0,001$  en comparación con los grupos tratados tanto con IMC-1C11 como con IMC-2C6). A una menor dosis de anticuerpo ensayado (100  $\mu\text{g}/\text{ratón}/\text{inyección}$ ), el IMC-1121 también era más eficaz. Los ratones tratados con la menor dosis de IMC-1121 sobrevivían  $46 \pm 16$  días (mediana = 41 días). No se observaron toxicidades manifiestas en ninguno de los animales tratados con anticuerpo durante todo el transcurso del experimento.

#### LISTADO DE SECUENCIAS

<110> ImClone Systems Incorporated  
 <120> Anticuerpos humanos específicos contra KDR y usos de los mismos  
 <130> 11245/47876  
 <140> PCT/US03/06459  
 <141> 04-03-2003  
 <150> 60/361.783  
 <151> 04-03-2002  
 <160> 93  
 <170> wordPerfect 8.0 para windows

<210> 1  
 <211> 11  
 <212> PRT  
 <213> Humana

<400> 1

Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Tyr Leu Ala  
 5 10

<210> 2

<211> 7  
<212> PRT  
<213> Humana

5 <400> 2

**Asp Ser Ser Asn Arg Ala Thr**  
5

10 <210> 3  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> Humana

15 <400> 3

**Leu Gln His Asn Thr Phe Pro Pro Thr**  
5

20 <210> 4  
<211> 11  
<212> PRT  
<213> Humana

<400> 4

**Arg Ala Ser Gln Gly Ile Ser Ser Arg Leu Ala**  
5 10

25 <210> 5  
<211> 7  
<212> PRT  
<213> Humana

30 <400> 5

**Ala Ala Ser Ser Leu Gln Thr**  
5

35 <210> 6  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> Humana

40 <400> 6

**Gln Gln Ala Asn Arg Phe Pro Pro Thr**  
5

45 <210> 7  
<211> 14  
<212> PRT  
<213> Humana

50 <400> 7

**Ala Gly Thr Thr Thr Asp Leu Thr Tyr Tyr Asp Leu Val Ser**  
5 10

55 <210> 8  
<211> 7  
<212> PRT  
<213> Humana

<400> 8

Asp Gly Asn Lys Arg Pro Ser  
5

5 <210> 9  
<211> 10  
<212> PRT  
<213> Humana

10 <400> 9

Asn Ser Tyr Val Ser Ser Arg Phe Tyr Val  
5 10

15 <210> 10  
<211> 13  
<212> PRT  
<213> Humana

20 <400> 10

Ser Gly Ser Thr Ser Asn Ile Gly Thr Asn Thr Ala Asn  
5 10

25 <210> 11  
<211> 7  
<212> PRT  
<213> Humana

<400> 11

Asn Asn Asn Gln Arg Pro Ser  
5

30 <210> 12  
<211> 12  
<212> PRT  
<213> Humana

35 <400> 12

Ala Ala Trp Asp Asp Ser Leu Asn Gly His Trp Val  
5 10

40 <210> 13  
<211> 10  
<212> PRT  
<213> Humana

45 <400> 13

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

50 <210> 14  
<211> 17  
<212> PRT  
<213> Humana

55 <400> 14

Ser Ile Ser Ser Ser Ser Ser Tyr Ile Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys  
5 10 15

Gly  
17

5 <210> 15  
<211> 7  
<212> PRT  
<213> Humana  
  
<400> 15

Val Thr Asp Ala Phe Asp Ile  
5

10  
  
15 <210> 16  
<211> 10  
<212> PRT  
<213> Humana  
  
<400> 16

Gly Gly Thr Phe Ser Ser Tyr Ala Ile Ser  
5 10

20  
  
25 <210> 17  
<211> 18  
<212> PRT  
<213> Humana  
  
<400> 17

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

Gln Gly  
18

30 <210> 18  
<211> 16  
<212> PRT  
<213> Humana  
  
35 <400> 18

Gly Tyr Asp Tyr Tyr Asp Ser Ser Gly Val Ala Ser Pro Phe Asp Tyr  
5 10 15

40 <210> 19  
<211> 375  
<212> ADN  
<213> Humana  
  
45 <400> 19

gag gtc cag ctg gtg cag tct ggg gct gag gtg aag aag cct ggg gcc 48  
 Glu Val Gln Leu Val<sub>5</sub> Gln Ser Gly Ala Glu Val<sub>10</sub> Lys Lys Pro Gly Ala<sub>15</sub>

tca gtg aag gtc tcc tgc aag gct tct gga ggc acc ttc agc agc tat 96  
 Ser Val Lys Val<sub>20</sub> Ser Cys Lys Ala Ser<sub>25</sub> Gly Gly Thr Phe Ser<sub>30</sub> Ser Tyr

gct atc agc tgg gtg cga cag gcc cct gga caa ggg ctt gag tgg atg 144  
 Ala Ile Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met<sub>45</sub>

gga ggg atc atc cct atc ttt ggt aca gca aac tac gca cag aag ttc 192  
 Gly Gly<sub>50</sub> Ile Ile Pro Ile Phe<sub>55</sub> Gly Thr Ala Asn Tyr<sub>60</sub> Ala Gln Lys Phe

cag ggc aga gtc act ttt acc gcg gac aaa tcc acg agt aca gcc tat 240  
 Gln Gly Arg Val Thr Phe<sub>70</sub> Thr Ala Asp Lys Ser<sub>75</sub> Thr Ser Thr Ala Tyr<sub>80</sub>

atg gag ttg agg agc ctg aga tct gac gac acg gcc gtg tat tac tgt 288  
 Met Glu Leu Arg Ser<sub>85</sub> Leu Arg Ser Asp Asp<sub>90</sub> Thr Ala Val Tyr Tyr<sub>95</sub> Cys

gcg aga gga tac gat tac tat gat agt agt ggc gtg gct tcc ccc ttt 336  
 Ala Arg Gly Tyr<sub>100</sub> Asp Tyr Tyr Asp Ser<sub>105</sub> Ser Gly Val Ala Ser<sub>110</sub> Pro Phe

gac tac tgg ggc cag gga acc ctg gtc acc gtc tca agc 375  
 Asp Tyr Trp<sub>115</sub> Gly Gln Gly Thr Leu Val<sub>120</sub> Thr Val Ser Ser<sub>125</sub>

<210> 20  
 <211> 125  
 <212> PRT  
 <213> Humana  
 <400> 20

5

Glu Val Gln Leu Val<sub>5</sub> Gln Ser Gly Ala Glu Val<sub>10</sub> Lys Lys Pro Gly Ala<sub>15</sub>  
 Ser Val Lys Val<sub>20</sub> Ser Cys Lys Ala Ser<sub>25</sub> Gly Gly Thr Phe Ser<sub>30</sub> Ser Tyr  
 Ala Ile Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met<sub>45</sub>  
 Gly Gly<sub>50</sub> Ile Ile Pro Ile Phe<sub>55</sub> Gly Thr Ala Asn Tyr<sub>60</sub> Ala Gln Lys Phe  
 Gln Gly Arg Val Thr Phe<sub>70</sub> Thr Ala Asp Lys Ser<sub>75</sub> Thr Ser Thr Ala Tyr<sub>80</sub>  
 Met Glu Leu Arg Ser<sub>85</sub> Leu Arg Ser Asp Asp<sub>90</sub> Thr Ala Val Tyr Tyr<sub>95</sub> Cys  
 Ala Arg Gly Tyr<sub>100</sub> Asp Tyr Tyr Asp Ser<sub>105</sub> Ser Gly Val Ala Ser<sub>110</sub> Pro Phe  
 Asp Tyr Trp<sub>115</sub> Gly Gln Gly Thr Leu Val<sub>120</sub> Thr Val Ser Ser<sub>125</sub>

10

<210> 21  
 <211> 333  
 <212> ADN  
 <213> Humana

15

<400> 21

cag	tct	gtg	ctg	act	cag	cca	ccc	tca	gcg	tct	ggg	acc	ccc	ggg	cag	48
Gln	Ser	Val	Leu	Thr	Gln	Pro	Pro	Ser	Ala	Ser	Gly	Thr	Pro	Gly	Gln	
				5					10					15		
agg	gtc	acc	atc	tct	tgt	tct	gga	agc	acc	tcc	aac	atc	ggt	act	aat	96
Arg	Val	Thr	Ile	Ser	Cys	Ser	Gly	Ser	Thr	Ser	Asn	Ile	Gly	Thr	Asn	
			20					25					30			
act	gca	aac	tgg	ttc	cag	cag	ctc	cca	gga	acg	gcc	ccc	aaa	ctc	ctc	144
Thr	Ala	Asn	Trp	Phe	Gln	Gln	Leu	Pro	Gly	Thr	Ala	Pro	Lys	Leu	Leu	
		35					40					45				
atc	cac	aat	aat	aat	cag	cgg	ccc	tca	ggg	gtc	cct	gac	cga	ttc	tct	192
Ile	His	Asn	Asn	Asn	Gln	Arg	Pro	Ser	Gly	Val	Pro	Asp	Arg	Phe	Ser	
	50					55					60					
ggc	tcc	aag	tct	ggc	acc	tca	gcc	tcc	ctg	gcc	atc	agt	ggg	ctc	cag	240
Gly	Ser	Lys	Ser	Gly	Thr	Ser	Ala	Ser	Leu	Ala	Ile	Ser	Gly	Leu	Gln	
65					70					75					80	
tct	gag	gat	gag	gct	gat	tat	tac	tgt	gca	gca	tgg	gat	gac	agc	ctg	288
Ser	Glu	Asp	Glu	Ala	Asp	Tyr	Tyr	Cys	Ala	Ala	Trp	Asp	Asp	Ser	Leu	
				85					90					95		
aat	ggc	cat	tgg	gtg	ttc	ggc	gga	ggg	acc	aag	ctg	acc	gtc	ctg		333
Asn	Gly	His	Trp	Val	Phe	Gly	Gly	Gly	Thr	Lys	Leu	Thr	Val	Leu		
			100					105					110			

5

<210> 22  
 <211> 111  
 <212> PRT  
 <213> Humana

10

<400> 22

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

15

<210> 23  
 <211> 348  
 <212> ADN  
 <213> Humana

20

<400> 23



gag gtg cag ctg gtg cag tct ggg gga ggc ctg gtc aag cct ggg ggg 48

Glu Val Gln Leu Val<sub>5</sub> Gln Ser Gly Gly<sub>10</sub> Gly Leu Val Lys Pro Gly<sub>15</sub> Gly

tcc ctg aga ctc tcc tgt gca gcc tct gga ttc acc ttc agt agc tat 96  
Ser Leu Arg Leu<sub>20</sub> Ser Cys Ala Ala Ser<sub>25</sub> Gly Phe Thr Phe Ser<sub>30</sub> Ser Tyr

agc atg aac tgg gtc cgc cag gct cca ggg aag ggg ctg gag tgg gtc 144  
Ser Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu<sub>45</sub> Glu Trp Val

tca tcc att agt agt agt agt agt tac ata tac tac gca gac tca gtg 192  
Ser Ser Ile Ser Ser Ser Ser Ser Tyr Ile Tyr Tyr Ala Asp Ser Val

aag ggc cga ttc acc atc tcc aga gac aac gcc aag aac tca ctg tat 240  
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr<sub>80</sub>

ctg caa atg aac agc ctg aga gcc gag gac acg gct gtg tat tac tgt 288  
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys<sub>95</sub>

gcg aga gtc aca gat gct ttt gat atc tgg ggc caa ggg aca atg gtc 336  
Ala Arg Val Thr Asp Ala Phe Asp Ile Trp Gly Gln Gly Thr<sub>110</sub> Met Val

acc gtc tca agc 348  
Thr Val Ser Ser<sub>115</sub>

<210> 24  
<211> 116  
<212> PRT  
<213> Humana

5

<400> 24

Glu Val Gln Leu Val<sub>5</sub> Gln Ser Gly Gly<sub>10</sub> Gly Leu Val Lys Pro Gly<sub>15</sub> Gly

Ser Leu Arg Leu<sub>20</sub> Ser Cys Ala Ala Ser<sub>25</sub> Gly Phe Thr Phe Ser<sub>30</sub> Ser Tyr

Ser Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu<sub>45</sub> Glu Trp Val

Ser Ser Ile Ser Ser Ser Ser Ser Tyr Ile Tyr Tyr Ala Asp Ser Val

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr<sub>80</sub>

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys<sub>95</sub>

Ala Arg Val Thr Asp Ala Phe Asp Ile Trp Gly Gln Gly Thr<sub>110</sub> Met Val

Thr Val Ser Ser<sub>115</sub>

10

<210> 25  
<211> 321  
<212> ADN

<213> Humana

<400> 25

```

gaa att gtg atg aca cag tct cca gcc acc ctg tct ttg tct cca ggg      48
Glu Ile Val Met Thr 5 Gln Ser Pro Ala Thr 10 Leu Ser Leu Ser Pro 15 Gly

gaa aga gcc acc ctc tcc tgc agg gcc agt cag agt gtt agc agc tac      96
Glu Arg Ala Thr 20 Leu Ser Cys Arg Ala 25 Ser Gln Ser Val 30 Ser Ser Tyr

tta gcc tgg tac caa cag aaa cct gcc cag gct ccc agg ctc ctc atc      144
Leu Ala Trp Tyr 35 Gln Gln Lys Pro 40 Gly Gln Ala Pro Arg 45 Leu Leu Ile

tat gat tca tcc aac agg gcc act gcc atc cca gcc aga ttc agt ggc      192
Tyr Asp Ser Ser 50 Asn Arg Ala 55 Thr Gly Ile Pro Ala 60 Arg Phe Ser Gly

agt ggg tct ggg aca gac ttc act ctc acc atc agc agc cta gag cct      240
Ser Gly Ser Gly 65 Thr Asp 70 Phe Thr Leu Thr 75 Ile Ser Ser Leu Glu Pro 80

gaa gat ttt gca act tat tac tgt cta cag cat aac act ttt cct ccg      288
Glu Asp Phe Ala 85 Thr Tyr Tyr Cys Leu Gln 90 His Asn Thr Phe Pro 95 Pro

acg ttc gcc caa ggg acc aag gtg gaa atc aaa      321
Thr Phe Gly Gln 100 Gly Thr Lys Val 105 Glu Ile Lys

```

5

<210> 26

<211> 107

<212> PRT

10

<213> Humana

<400> 26

```

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

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Tyr
                    20                                25                                30

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

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

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

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Leu Gln His Asn Thr Phe Pro Pro
                    85                                90                                95

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

```

15

<210> 27

<211> 348

<212> ADN

<213> Humana

20

<400> 27

gag gtc cag ctg gtg cag tct ggg gga ggc ctg gtc aag cct ggg ggg 48  
 Glu Val Gln Leu Val 5 Gln Ser Gly Gly 10 Leu Val Lys Pro Gly Gly 15

tcc ctg aga ctc tcc tgt gca gcc tct gga ttc acc ttc agt agc tat 96  
 Ser Leu Arg Leu 20 Ser Cys Ala Ala Ser 25 Gly Phe Thr Phe Ser 30 Ser Tyr

agc atg aac tgg gtc cgc cag gct cca ggg aag ggg ctg gag tgg gtc 144  
 Ser Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu 45 Glu Trp Val

tca tcc att agt agt agt agt agt tac ata tac tac gca gac tca gtg 192  
 Ser Ser 50 Ile Ser Ser Ser Ser 55 Ser Tyr Ile Tyr Tyr 60 Ala Asp Ser Val

aag ggc cga ttc acc atc tcc aga gac aac gcc aag aac tca ctg tat 240  
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr 80 65 70 75 80

ctg caa atg aac agc ctg aga gcc gag gac acg gct gtg tat tac tgt 288  
 Leu Gln Met Asn Ser 85 Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr 95 Cys

gcg aga gtc aca gat gct ttt gat atc tgg ggc caa ggg aca atg gtc 336  
 Ala Arg Val Thr 100 Asp Ala Phe Asp Ile Trp Gly Gln Gly Thr Met Val 110

acc gtc tca agc 348  
 Thr Val Ser Ser 115

<210> 28  
 <211> 330  
 <212> ADN  
 <213> Humana

5

<400> 28

cag tct gcc ctg act cag cct gcc tcc ctg tct ggg tct cct gga cag 48  
 Gln Ser Ala Leu Thr 5 Gln Pro Ala Ser Leu Ser Gly Ser Pro Gly Gln 15

tcg atc acc atc tcc tgc gct gga acc acc act gat ctt aca tat tat 96  
 Ser Ile Thr 20 Ser Cys Ala Gly Thr 25 Thr Thr Asp Leu Thr Tyr Tyr 30

gac ctt gtc tcc tgg tac caa cag cac cca ggc caa gca ccc aaa ctc 144  
 Asp Leu Val Ser Trp Tyr Gln Gln His Pro Gly Gln Ala Pro Lys Leu 45 35 40 45

gtg att tat gac ggc aat aag cgg ccc tca gga gtt tct aat cgc ttc 192  
 Val Ile Tyr Asp Gly Asn Lys 55 Arg Pro Ser Gly Val 60 Ser Asn Arg Phe 50

tct ggc tcc aag tct ggc aac acg gcc tcc ctg aca atc tct gga ctc 240  
 Ser Gly Ser Lys Ser Gly 70 Asn Thr Ala Ser Leu Thr Ile Ser Gly Leu 80 65 70 75 80

cag gct gag gac gag gct gat tat tac tgc aac tca tat gta agc agc 288  
 Gln Ala Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Asn Ser Tyr Val Ser Ser 95 85 90 95

agg ttt tat gtc ttc gga act ggg acc aag gtc acc gtc cta 330  
 Arg Phe Tyr Val Phe Gly Thr Gly Thr Lys Val Thr Val Leu 110 100 105 110

10



<211> 116  
 <212> PRT  
 <213> Humana

5 <400> 31

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

10 <210> 32  
 <211> 321  
 <212> ADN  
 <213> Humana

15 <400> 32

gac atc cag ttg acc cag tct cca tct tct gtg tct gca tct gta gga 48  
 Asp Ile Gln Leu Thr<sub>5</sub> Ser Pro Ser<sub>10</sub> Val Ser Ala Ser Val<sub>15</sub> Gly  
 gac aga gtc acc atc act tgt cgg gcg agt cag ggt att agt agt cgg 96  
 Asp Arg Val Thr<sub>20</sub> Ile Thr Cys Arg Ala<sub>25</sub> Ser Gln Gly Ile Ser Ser Arg  
 tta gcc tgg tat cag cag aaa cca ggg aaa gcc cct aag ctc ctg atc 144  
 Leu Ala Trp<sub>35</sub> Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys<sub>45</sub> Leu Leu Ile  
 tat gct gca tcc agt ttg caa act ggg gtc cca tca agg ttc agc ggc 192  
 Tyr Ala Ala Ser Ser Leu Gln Thr Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly  
 agt gga tct ggg aca gat ttc act ctc act atc agc agc ctg cag cct 240  
 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro<sub>80</sub>  
 gaa gat ttt gca act tac tat tgt caa cag gct aac agg ttc cct ccg 288  
 Glu Asp Phe Ala Thr<sub>85</sub> Tyr Tyr Cys Gln<sub>90</sub> Ala Asn Arg Phe Pro Pro  
 act ttc ggc cct ggg acc aaa gtg gat atc aaa 321  
 Thr Phe Gly Pro<sub>100</sub> Gly Thr Lys Val Asp<sub>105</sub> Ile Lys

20 <210> 33  
 <211> 107  
 <212> PRT



























<213> Humana

<400> 58

Ala Ala Ser Thr Leu Gln Ser  
5

5

<210> 59

<211> 9

<212> PRT

10 <213> Humana

<400> 59

Gln Gln Tyr Ser Arg Tyr Pro Pro Thr  
5

15

<210> 60

<211> 14

<212> PRT

20 <213> Humana

<400> 60

Thr Gly Ser Ser Thr Asp Val Gly Asn Tyr Asn Tyr Ile Ser  
5 10

25

<210> 61

<211> 7

<212> PRT

<213> Humana

30

<400> 61

Asp Val Thr Ser Arg Pro Ser  
5

35

<210> 62

<211> 10

<212> PRT

<213> Humana

<400> 62

40

Asn Ser Tyr Ser Ala Thr Asp Thr Leu Val  
5 10

45

<210> 63

<211> 14

<212> PRT

<213> Humana

<400> 63

Thr Gly Gln Ser Ser Asn Ile Gly Ala Asp Tyr Asp Val His  
5 10

50

<210> 64

<211> 7

<212> PRT

55 <213> Humana

<400> 64

Gly His Asn Asn Arg Pro Ser  
5

5  
<210> 65  
<211> 11  
<212> PRT  
<213> Humana  
  
<400> 65

Gln Ser Tyr Asp Ser Ser Leu Ser Gly Leu Val  
5 10

10  
  
15  
<210> 66  
<211> 11  
<212> PRT  
<213> Humana  
  
<400> 66

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

20  
  
25  
<210> 67  
<211> 7  
<212> PRT  
<213> Humana  
  
<400> 67

Ala Ala Ser Leu Leu Gln Ser  
5

30  
  
35  
<210> 68  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> Humana  
  
<400> 68

Gln Gln Ala Asp Ser Phe Pro Pro Thr  
5

40  
  
45  
<210> 69  
<211> 11  
<212> PRT  
<213> Humana  
  
<400> 69

Arg Ala Ser Gln Ser Ile Lys Arg Trp Leu Ala  
5 10

50  
  
<210> 70  
<211> 7  
<212> PRT  
<213> Humana  
  
<400> 70

Ala Ala Ser Thr Leu Gln Ser  
5

55

<210> 71  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> Humana

5

<400> 71

Gln Gln Ala Asn Ser Phe Pro Pro Thr  
5

10

<210> 72  
<211> 14  
<212> PRT  
<213> Humana

15

<400> 72

Ser Gly Ser Arg Ser Asn Ile Gly Ala His Tyr Glu Val Gln  
5 10

20

<210> 73  
<211> 7  
<212> PRT  
<213> Humana

25

<400> 73

Gly Asp Thr Asn Arg Pro Ser  
5

30

<210> 74  
<211> 11  
<212> PRT  
<213> Humana

<400> 74

Gln Ser Tyr Asp Thr Ser Leu Arg Gly Pro Val  
5 10

35

<210> 75  
<211> 14  
<212> PRT  
<213> Humana

40

<400> 75

Thr Gly Ser Ser Ser Asn Ile Gly Thr Gly Tyr Asp Val His  
5 10

45

<210> 76  
<211> 7  
<212> PRT  
<213> Humana

50

<400> 76

Ala Tyr Thr Asn Arg Pro Ser  
5

55

<210> 77  
<211> 11  
<212> PRT  
<213> Humana



Gln Gln Ala Lys Ala Phe Pro Pro Thr  
5

5

<210> 84  
<211> 2351  
<212> ADN  
<213> Humana  
  
<400> 84

ggtaccgag aaagaaccgg ctcccagatt ctgggcattt cgcccggctc gaggtgcagg 59  
 atg cag agc aag gtg ctg ctg gcc gtc gcc ctg tgg ctc tgc gtg gag 107  
 Met Gln Ser Lys Val Leu Leu Ala Val Ala Leu Trp Leu Cys Val Glu  
 5 10 15  
 acc cgg gcc gcc tct gtg ggt ttg cct agt gtt tct ctt gat ctg ccc 155  
 Thr Arg Ala Ala Ser Val Gly Leu Pro Ser Val Ser Leu Asp Leu Pro  
 20 25 30  
 agg ctc agc ata caa aaa gac ata ctt aca att aag gct aat aca act 203  
 Arg Leu Ser Ile Gln Lys Asp Ile Leu Thr Ile Lys Ala Asn Thr Thr  
 35 40 45  
 ctt caa att act tgc agg gga cag agg gac ttg gac tgg ctt tgg ccc 251  
 Leu Gln Ile Thr Cys Arg Gly Gln Arg Asp Leu Asp Trp Leu Trp Pro  
 50 55 60  
 aat aat cag agt ggc agt gag caa agg gtg gag gtg act gag tgc agc 299  
 Asn Asn Gln Ser Gly Ser Glu Gln Arg Val Glu Val Thr Glu Cys Ser  
 65 70 75 80  
 gat ggc ctc ttc tgt aag aca ctc aca att cca aaa gtg atc gga aat 347  
 Asp Gly Leu Phe Cys Lys Thr Leu Thr Ile Pro Lys Val Ile Gly Asn  
 85 90 95  
 gac act gga gcc tac aag tgc ttc tac cgg gaa act gac ttg gcc tcg 395  
 Asp Thr Gly Ala Tyr Lys Cys Phe Tyr Arg Glu Thr Asp Leu Ala Ser  
 100 105 110  
 gtc att tat gtc tat gtt caa gat tac aga tct cca ttt att gct tct 443  
 Val Ile Tyr Val Tyr Val Gln Asp Tyr Arg Ser Pro Phe Ile Ala Ser  
 115 120 125  
 gtt agt gac caa cat gga gtc gtg tac att act gag aac aaa aac aaa 491  
 Val Ser Asp Gln His Gly Val Val Tyr Ile Thr Glu Asn Lys Asn Lys  
 130 135 140  
 act gtg gtg att cca tgt ctc ggg tcc att tca aat ctc aac gtg tca 539  
 Thr Val Val Ile Pro Cys Leu Gly Ser Ile Ser Asn Leu Asn Val Ser  
 145 150 155 160  
 ctt tgt gca aga tac cca gaa aag aga ttt gtt cct gat ggt aac aga 587  
 Leu Cys Ala Arg Tyr Pro Glu Lys Arg Phe Val Pro Asp Gly Asn Arg  
 165 170 175  
 att tcc tgg gac agc aag aag ggc ttt act att ccc agc tac atg atc 635  
 Ile Ser Trp Asp Ser Lys Lys Gly Phe Thr Ile Pro Ser Tyr Met Ile  
 180 185 190  
 agc tat gct ggc atg gtc ttc tgt gaa gca aaa att aat gat gaa agt 683  
 Ser Tyr Ala Gly Met Val Phe Cys Glu Ala Lys Ile Asn Asp Glu Ser  
 195 200 205  
 tac cag tct att atg tac ata gtt gtc gtt gta ggg tat agg att tat 731  
 Tyr Gln Ser Ile Met Tyr Ile Val Val Val Val Gly Tyr Arg Ile Tyr  
 210 215 220  
 gat gtg gtt ctg agt ccg tct cat gga att gaa cta tct gtt gga gaa 779  
 Asp Val Val Leu Ser Pro Ser His Gly Ile Glu Leu Ser Val Gly Glu  
 225 230 235 240

aag	ctt	gtc	tta	aat	tgt	aca	gca	aga	act	gaā	cta	aat	gtg	ggg	att	827
Lys	Leu	Val	Leu	Asn 245	Cys	Thr	Ala	Arg	Thr 250	Glu	Leu	Asn	Val	Gly 255	Ile	
gac	ttc	aac	tgg	gaa	tac	cct	tct	tcg	aag	cat	cag	cat	aag	aaa	ctt	875
Asp	Phe	Asn	Trp 260	Glu	Tyr	Pro	Ser	Ser 265	Lys	His	Gln	His	Lys 270	Lys	Leu	
gta	aac	cga	gac	cta	aaa	acc	cag	tct	ggg	agt	gag	atg	aag	aaa	ttt	923
Val	Asn	Arg 275	Asp	Leu	Lys	Thr	Gln 280	Ser	Gly	Ser	Glu	Met 285	Lys	Lys	Phe	
ttg	agc	acc	tta	act	ata	gat	ggg	gta	acc	cgg	agt	gac	caa	gga	ttg	971
Leu	Ser 290	Thr	Leu	Thr	Ile	Asp 295	Gly	Val	Thr	Arg	Ser 300	Asp	Gln	Gly	Leu	
tac	acc	tgt	gca	gca	tcc	agt	ggg	ctg	atg	acc	aag	aag	aac	agc	aca	1019
Tyr	Thr	Cys	Ala	Ala	Ser 310	Ser	Gly	Leu	Met	Thr 315	Lys	Lys	Asn	Ser	Thr 320	
ttt	gtc	agg	gtc	cat	gaa	aaa	cct	ttt	gtt	gct	ttt	gga	agt	ggc	atg	1067
Phe	Val	Arg	Val	His 325	Glu	Lys	Pro	Phe	Val 330	Ala	Phe	Gly	Ser	Gly 335	Met	
gaa	tct	ctg	gtg	gaa	gcc	acg	gtg	ggg	gag	cgt	gtc	aga	atc	cct	gcg	1115
Glu	Ser	Leu	Val 340	Glu	Ala	Thr	Val	Gly 345	Glu	Arg	Val	Arg	Ile 350	Pro	Ala	
aag	tac	ctt	ggt	tac	cca	ccc	cca	gaa	ata	aaa	tgg	tat	aaa	aat	gga	1163
Lys	Tyr	Leu 355	Gly	Tyr	Pro	Pro	Pro 360	Glu	Ile	Lys	Trp	Tyr 365	Lys	Asn	Gly	
ata	ccc	ctt	gag	tcc	aat	cac	aca	att	aaa	gcg	ggg	cat	gta	ctg	acg	1211
Ile	Pro 370	Leu	Glu	Ser	Asn	His 375	Thr	Ile	Lys	Ala	Gly 380	His	Val	Leu	Thr	
att	atg	gaa	gtg	agt	gaa	aga	gac	aca	gga	aat	tac	act	gtc	atc	ctt	1259
Ile	Met	Glu	Val	Ser	Glu 390	Arg	Asp	Thr	Gly	Asn 395	Tyr	Thr	Val	Ile	Leu 400	
acc	aat	ccc	att	tca	aag	gag	aag	cag	agc	cat	gtg	gtc	tct	ctg	gtt	1307
Thr	Asn	Pro	Ile	Ser 405	Lys	Glu	Lys	Gln	Ser 410	His	Val	Val	Ser	Leu 415	Val	
gtg	tat	gtc	cca	ccc	cag	att	ggt	gag	aaa	tct	cta	atc	tct	cct	gtg	1355
Val	Tyr	Val	Pro 420	Pro	Gln	Ile	Gly	Glu 425	Lys	Ser	Leu	Ile	Ser 430	Pro	Val	
gat	tcc	tac	cag	tac	ggc	acc	act	caa	acg	ctg	aca	tgt	acg	gtc	tat	1403
Asp	Ser	Tyr 435	Gln	Tyr	Gly	Thr	Thr 440	Gln	Thr	Leu	Thr	Cys 445	Thr	Val	Tyr	
gcc	att	cct	ccc	ccg	cat	cac	atc	cac	tgg	tat	tgg	cag	ttg	gag	gaa	1451
Ala	Ile 450	Pro	Pro	Pro	His	His 455	Ile	His	Trp	Tyr	Trp 460	Gln	Leu	Glu	Glu	
gag	tgc	gcc	aac	gag	ccc	agc	cat	gct	gtc	tca	gtg	aca	aac	cca	tac	1499
Glu	Cys	Ala	Asn	Glu	Pro 470	Ser	His	Ala	Val	Ser 475	Val	Thr	Asn	Pro	Tyr 480	
cct	tgt	gaa	gaa	tgg	aga	agt	gtg	gag	gac	ttc	cag	gga	gga	aat	aaa	1547
Pro	Cys	Glu	Glu	Trp 485	Arg	Ser	Val	Glu	Asp 490	Phe	Gln	Gly	Gly	Asn 495	Lys	
att	gaa	ggt	aat	aaa	aat	caa	ttt	gct	cta	att	gaa	gga	aaa	aac	aaa	1595
Ile	Glu	Val	Asn 500	Lys	Asn	Gln	Phe	Ala 505	Leu	Ile	Glu	Gly	Lys 510	Asn	Lys	

act	gta	agt	acc	ctt	gtt	atc	caa	gcg	gca	aat	gtg	tca	gct	ttg	tac	1643
Thr	Val	Ser	Thr	Leu	Val	Ile	Gln	Ala	Ala	Asn	Val	Ser	Ala	Leu	Tyr	
		515					520					525				
aaa	tgt	gaa	gcg	gtc	aac	aaa	gtc	ggg	aga	gga	gag	agg	gtg	atc	tcc	1691
Lys	Cys	Glu	Ala	Val	Asn	Lys	Val	Gly	Arg	Gly	Glu	Arg	Val	Ile	Ser	
		530				535					540					
ttc	cac	gtg	acc	agg	ggt	cct	gaa	att	act	ttg	caa	cct	gac	atg	cag	1739
Phe	His	Val	Thr	Arg	Gly	Pro	Glu	Ile	Thr	Leu	Gln	Pro	Asp	Met	Gln	
		545			550					555					560	
ccc	act	gag	cag	gag	agc	gtg	tct	ttg	tgg	tgc	act	gca	gac	aga	tct	1787
Pro	Thr	Glu	Gln	Glu	Ser	Val	Ser	Leu	Trp	Cys	Thr	Ala	Asp	Arg	Ser	
				565					570					575		
acg	ttt	gag	aac	ctc	aca	tgg	tac	aag	ctt	ggc	cca	cag	cct	ctg	cca	1835
Thr	Phe	Glu	Asn	Leu	Thr	Trp	Tyr	Lys	Leu	Gly	Pro	Gln	Pro	Leu	Pro	
			580					585					590			
atc	cat	gtg	gga	gag	ttg	ccc	aca	cct	ggt	tgc	aag	aac	ttg	gat	act	1883
Ile	His	Val	Gly	Glu	Leu	Pro	Thr	Pro	Val	Cys	Lys	Asn	Leu	Asp	Thr	
		595					600					605				
ctt	tgg	aaa	ttg	aat	gcc	acc	atg	ttc	tct	aat	agc	aca	aat	gac	att	1931
Leu	Trp	Lys	Leu	Asn	Ala	Thr	Met	Phe	Ser	Asn	Ser	Thr	Asn	Asp	Ile	
	610					615					620					
ttg	atc	atg	gag	ctt	aag	aat	gca	tcc	ttg	cag	gac	caa	gga	gac	tat	1979
Leu	Ile	Met	Glu	Leu	Lys	Asn	Ala	Ser	Leu	Gln	Asp	Gln	Gly	Asp	Tyr	
					630					635					640	
gtc	tgc	ctt	gct	caa	gac	agg	aag	acc	aag	aaa	aga	cat	tgc	gtg	gtc	2027
Val	Cys	Leu	Ala	Gln	Asp	Arg	Lys	Thr	Lys	Lys	Arg	His	Cys	Val	Val	
				645					650					655		
agg	cag	ctc	aca	gtc	cta	gag	cgt	gtg	gca	ccc	acg	atc	aca	gga	aac	2075
Arg	Gln	Leu	Thr	Val	Leu	Glu	Arg	Val	Ala	Pro	Thr	Ile	Thr	Gly	Asn	
			660					665					670			
ctg	gaa	aat	cag	acg	aca	agt	att	ggg	gaa	agc	atc	gaa	gtc	tca	tgc	2123
Leu	Glu	Asn	Gln	Thr	Thr	Ser	Ile	Gly	Glu	Ser	Ile	Glu	Val	Ser	Cys	
		675					680					685				
acg	gca	tct	ggg	aat	ccc	cct	cca	cag	atc	atg	tgg	tat	aaa	gat	aat	2171
Thr	Ala	Ser	Gly	Asn	Pro	Pro	Pro	Gln	Ile	Met	Trp	Phe	Lys	Asp	Asn	
	690					695					700					
gag	acc	ctt	gta	gaa	gac	tca	ggc	att	gta	ttg	aag	gat	ggg	aac	cgg	2219
Glu	Thr	Leu	Val	Glu	Asp	Ser	Gly	Ile	Val	Leu	Lys	Asp	Gly	Asn	Arg	
					710					715					720	
aac	ctc	act	atc	cgc	aga	gtg	agg	aag	gag	gac	gaa	ggc	ctc	tac	acc	2267
Asn	Leu	Thr	Ile	Arg	Arg	Val	Arg	Lys	Glu	Asp	Glu	Gly	Leu	Tyr	Thr	
				725					730					735		
tgc	cag	gca	tgc	agt	gtt	ctt	ggc	tgt	gca	aaa	gtg	gag	gca	ttt	ttc	2315
Cys	Gln	Ala	Cys	Ser	Val	Leu	Gly	Cys	Ala	Lys	Val	Glu	Ala	Phe	Phe	
			740					745					750			
ata	ata	gaa	ggt	gcc	cag	gaa	aag	acg	aac	ttg	gaa					2351
Ile	Ile	Glu	Gly	Ala	Gln	Glu	Lys	Thr	Asn	Leu	Glu					
		755					760									

<210> 85  
 <211> 764  
 <212> PRT  
 <213> Humana

<400> 85



Met Gln Ser Lys Val<sub>5</sub> Leu Leu Ala Val<sub>10</sub> Ala Leu Trp Leu Cys Val<sub>15</sub> Glu  
 Thr Arg Ala Ala<sub>20</sub> Ser Val Gly Leu Pro<sub>25</sub> Ser Val Ser Leu Asp<sub>30</sub> Leu Pro  
 Arg Leu Ser<sub>35</sub> Ile Gln Lys Asp<sub>40</sub> Ile Leu Thr Ile Lys Ala<sub>45</sub> Asn Thr Thr  
 Leu Gln<sub>50</sub> Ile Thr Cys Arg Gly<sub>55</sub> Gln Arg Asp Leu Asp<sub>60</sub> Trp Leu Trp Pro  
 Asn<sub>65</sub> Asn Gln Ser Gly<sub>70</sub> Ser Glu Gln Arg Val Glu<sub>75</sub> Val Thr Glu Cys Ser<sub>80</sub>  
 Asp Gly Leu Phe Cys<sub>85</sub> Lys Thr Leu Thr<sub>90</sub> Ile Pro Lys Val Ile Gly<sub>95</sub> Asn  
 Asp Thr Gly Ala<sub>100</sub> Tyr Lys Cys Phe Tyr<sub>105</sub> Arg Glu Thr Asp Leu Ala Ser  
 Val Ile Tyr<sub>115</sub> Val Tyr Val Gln Asp<sub>120</sub> Tyr Arg Ser Pro Phe<sub>125</sub> Ile Ala Ser  
 Val Ser<sub>130</sub> Asp Gln His Gly Val<sub>135</sub> Val Tyr Ile Thr Glu<sub>140</sub> Asn Lys Asn Lys  
 Thr Val<sub>145</sub> Val Ile Pro Cys<sub>150</sub> Leu Gly Ser Ile Ser<sub>155</sub> Asn Leu Asn Val Ser<sub>160</sub>  
 Leu Cys Ala Arg Tyr<sub>165</sub> Pro Glu Lys Arg Phe<sub>170</sub> Val Pro Asp Gly Asn Arg  
 Ile Ser Trp Asp<sub>180</sub> Ser Lys Lys Gly Phe<sub>185</sub> Thr Ile Pro Ser Tyr<sub>190</sub> Met Ile  
 Ser Tyr Ala<sub>195</sub> Gly Met Val Phe Cys<sub>200</sub> Glu Ala Lys Ile Asn<sub>205</sub> Asp Glu Ser  
 Tyr Gln<sub>210</sub> Ser Ile Met Tyr Ile<sub>215</sub> Val Val Val Val Gly<sub>220</sub> Tyr Arg Ile Tyr  
 Asp Val<sub>225</sub> Val Leu Ser Pro<sub>230</sub> Ser His Gly Ile Glu<sub>235</sub> Leu Ser Val Gly Glu<sub>240</sub>  
 Lys Leu Val Leu Asn<sub>245</sub> Cys Thr Ala Arg Thr<sub>250</sub> Glu Leu Asn Val Gly<sub>255</sub> Ile  
 Asp Phe Asn Trp<sub>260</sub> Glu Tyr Pro Ser Ser<sub>265</sub> Lys His Gln His Lys<sub>270</sub> Lys Leu  
 Val Asn Arg Asp<sub>275</sub> Leu Lys Thr Gln Ser Gly Ser Glu Met<sub>285</sub> Lys Lys Phe  
 Leu Ser<sub>290</sub> Thr Leu Thr Ile Asp<sub>295</sub> Gly Val Thr Arg Ser Asp<sub>300</sub> Gln Gly Leu  
 Tyr Thr Cys Ala Ala Ser<sub>310</sub> Ser Gly Leu Met Thr<sub>315</sub> Lys Lys Asn Ser Thr<sub>320</sub>  
 Phe Val Arg Val His<sub>325</sub> Glu Lys Pro Phe Val<sub>330</sub> Ala Phe Gly Ser Gly<sub>335</sub> Met  
 Glu ser Leu Val<sub>340</sub> Glu Ala Thr Val Gly<sub>345</sub> Glu Arg Val Arg Ile<sub>350</sub> Pro Ala

Lys Tyr Leu Gly Tyr Pro Pro Pro Glu Ile Lys Trp Tyr Lys Asn Gly  
 355 360 365  
 Ile Pro Leu Glu Ser Asn His Thr Ile Lys Ala Gly His Val Leu Thr  
 370 375 380  
 Ile Met Glu Val Ser Glu Arg Asp Thr Gly Asn Tyr Thr Val Ile Leu  
 385 390 395 400  
 Thr Asn Pro Ile Ser Lys Glu Lys Gln Ser His Val Val Ser Leu Val  
 405 410 415  
 Val Tyr Val Pro Pro Gln Ile Gly Glu Lys Ser Leu Ile Ser Pro Val  
 420 425 430  
 Asp Ser Tyr Gln Tyr Gly Thr Thr Gln Thr Leu Thr Cys Thr Val Tyr  
 435 440 445  
 Ala Ile Pro Pro Pro His His Ile His Trp Tyr Trp Gln Leu Glu Glu  
 450 455 460  
 Glu Cys Ala Asn Glu Pro Ser His Ala Val Ser Val Thr Asn Pro Tyr  
 465 470 475 480  
 Pro Cys Glu Glu Trp Arg Ser Val Glu Asp Phe Gln Gly Gly Asn Lys  
 485 490 495  
 Ile Glu Val Asn Lys Asn Gln Phe Ala Leu Ile Glu Gly Lys Asn Lys  
 500 505 510  
 Thr Val Ser Thr Leu Val Ile Gln Ala Ala Asn Val Ser Ala Leu Tyr  
 515 520 525  
 Lys Cys Glu Ala Val Asn Lys Val Gly Arg Gly Glu Arg Val Ile Ser  
 530 535 540  
 Phe His Val Thr Arg Gly Pro Glu Ile Thr Leu Gln Pro Asp Met Gln  
 545 550 555 560  
 Pro Thr Glu Gln Glu Ser Val Ser Leu Trp Cys Thr Ala Asp Arg Ser  
 565 570 575  
 Thr Phe Glu Asn Leu Thr Trp Tyr Lys Leu Gly Pro Gln Pro Leu Pro  
 580 585 590  
 Ile His Val Gly Glu Leu Pro Thr Pro Val Cys Lys Asn Leu Asp Thr  
 595 600 605  
 Leu Trp Lys Leu Asn Ala Thr Met Phe Ser Asn Ser Thr Asn Asp Ile  
 610 615 620  
 Leu Ile Met Glu Leu Lys Asn Ala Ser Leu Gln Asp Gln Gly Asp Tyr  
 625 630 635 640  
 Val Cys Leu Ala Gln Asp Arg Lys Thr Lys Lys Arg His Cys Val Val  
 645 650 655  
 Arg Gln Leu Thr Val Leu Glu Arg Val Ala Pro Thr Ile Thr Gly Asn  
 660 665 670  
 Leu Glu Asn Gln Thr Thr Ser Ile Gly Glu Ser Ile Glu Val Ser Cys  
 675 680 685  
 Thr Ala Ser Gly Asn Pro Pro Pro Gln Ile Met Trp Phe Lys Asp Asn  
 690 695 700  
 Glu Thr Leu Val Glu Asp Ser Gly Ile Val Leu Lys Asp Gly Asn Arg

705					710					715					720
Asn	Leu	Thr	Ile	Arg	Arg	Val	Arg	Lys	Glu	Asp	Glu	Gly	Leu	Tyr	Thr
				725					730					735	
Cys	Gln	Ala	Cys	Ser	Val	Leu	Gly	Cys	Ala	Lys	Val	Glu	Ala	Phe	Phe
			740					745					750		
Ile	Ile	Glu	Gly	Ala	Gln	Glu	Lys	Thr	Asn	Leu	Glu				
		755					760								

5 <210> 86  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

10 <220>  
 <223> cebador de amplificación para VEGF

<400> 86

togggcctcc gaaacctga 20

15 <210> 87  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

20 <220>  
 <223> cebador de amplificación para VEGF

<400> 87

25 cctggtgaga gatctggttc 20

30 <210> 88  
 <211> 19  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> cebador de amplificación para Flt-1

35 <400> 88

tttgtgattt tggccttgc 19

40 <210> 89  
 <211> 21  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

45 <220>  
 <223> cebador de amplificación para Flt-1

<400> 89

50 caggctcatg aactgaaag c 21

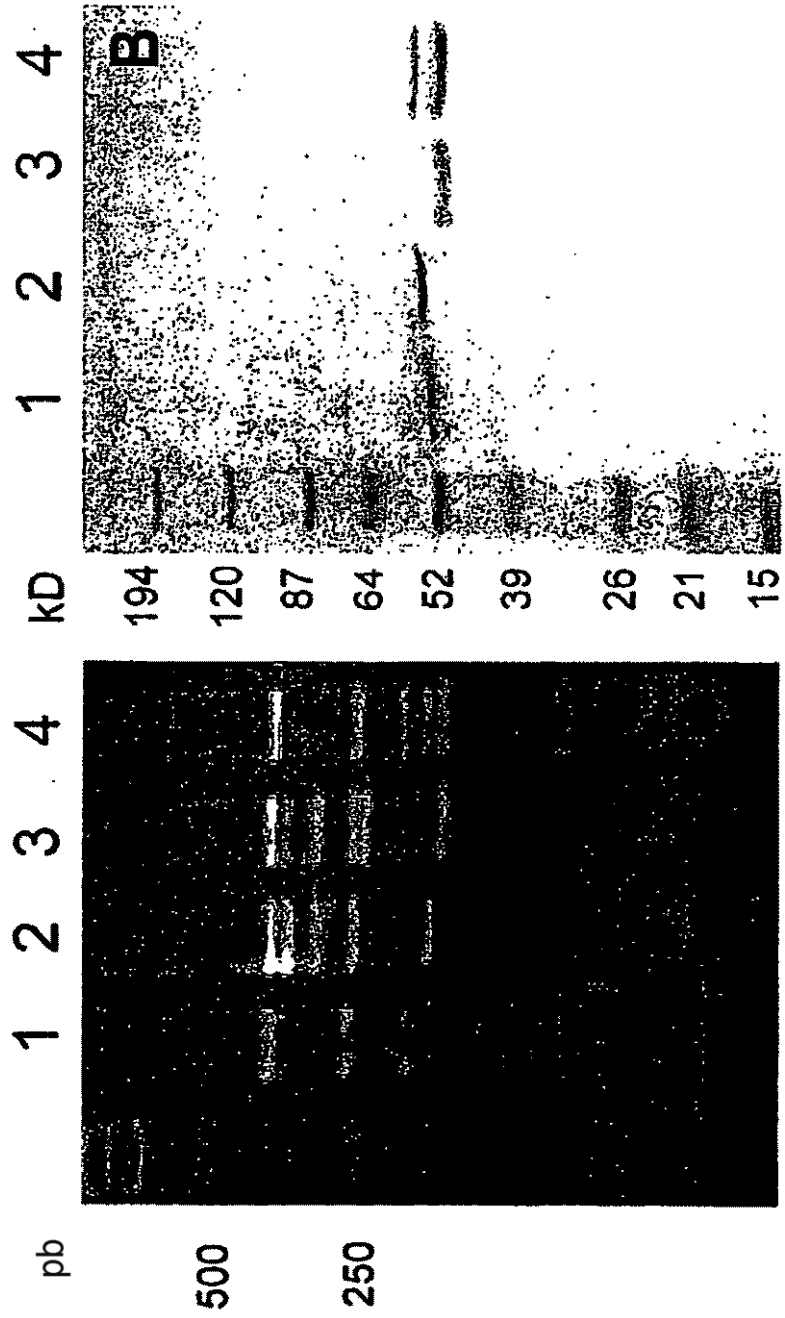
<210> 90  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> cebador de amplificación para KDR  
 5 <400> 90  
 gtgaccaaca tggagtcgtg 20  
 <210> 91  
 10 <211> 20  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 15 <223> cebador de amplificación para KDR  
 <400> 91  
 ccagagattc catgccactt 20  
 20 <210> 92  
 <211> 19  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 25 <220>  
 <223> cebador de amplificación para KDR  
 <400> 92  
 30 tcatgtttga gacctcaa 19  
 <210> 93  
 <211> 19  
 35 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> cebador de amplificación para KDR  
 40 <400> 93  
 gtctttgcfg atgtccacg 19  
 45

**REIVINDICACIONES**

1. Un anticuerpo aislado o fragmento del mismo que se une selectivamente al receptor que contiene el dominio de inserto quinasa (KDR) humano, en el que el anticuerpo o fragmento del mismo comprende regiones determinantes de complementariedad representadas por la SEC ID N°: 81 en la CDRL1; la SEC ID N°: 82 en la CDRL2; la SEC ID N°: 83 en la CDRL3; la SEC ID N°: 13 en la CDRH1; la SEC ID N°: 14 en la CDRH2; y la SEC ID N°: 15 en la CDRH3.
2. El anticuerpo o fragmento del mismo de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el anticuerpo o fragmento del mismo comprende un dominio variable de cadena ligera representado por la SEC ID N°: 53 y un dominio variable de cadena pesada representado por la SEC ID N°: 24.
3. El anticuerpo o fragmento del mismo de acuerdo con las reivindicaciones 1 ó 2, en el que el anticuerpo o fragmento del mismo se selecciona del grupo que consiste en un anticuerpo de cadena sencilla, un Fab, un Fv de cadena sencilla, un diacuerpo y un triacuerpo.
4. Un polinucleótido aislado que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica el anticuerpo o fragmento del mismo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-3.
5. El polinucleótido de la reivindicación 4, en el que la secuencia de nucleótidos comprende la SEC ID N°: 52.
6. Un vector de expresión que comprende el polinucleótido de la reivindicación 5.
7. Una célula huésped recombinante que comprende el vector de expresión de la reivindicación 6.
8. La célula huésped recombinante de la reivindicación 7, que produce un polipéptido que comprende la SEC ID N°: 24 y un polipéptido que comprende la SEC ID N°: 53.
9. Un anticuerpo o fragmento del mismo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 para su uso en terapia.
10. Un anticuerpo o fragmento del mismo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, para su uso en el tratamiento de enfermedades neoplásicas.
11. Un anticuerpo para el uso de la reivindicación 10, en el que la enfermedad neoplásica es un tumor del colon, un tumor de mama o un tumor no sólido.
12. Un anticuerpo para el uso de la reivindicación 10 u 11, en el que la enfermedad neoplásica es un tumor que sobreexpresa KDR.
13. Una composición farmacéutica que comprende un anticuerpo o fragmento del mismo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 y un vehículo farmacéuticamente aceptable.
14. Un anticuerpo o fragmento del mismo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 para su uso antes, durante o después de comenzar la terapia con otro agente seleccionado de un antagonista de VEGFR-1, un antagonista de EGFR, un agente quimioterápico o radiación en el tratamiento de una enfermedad neoplásica.

Figura 1



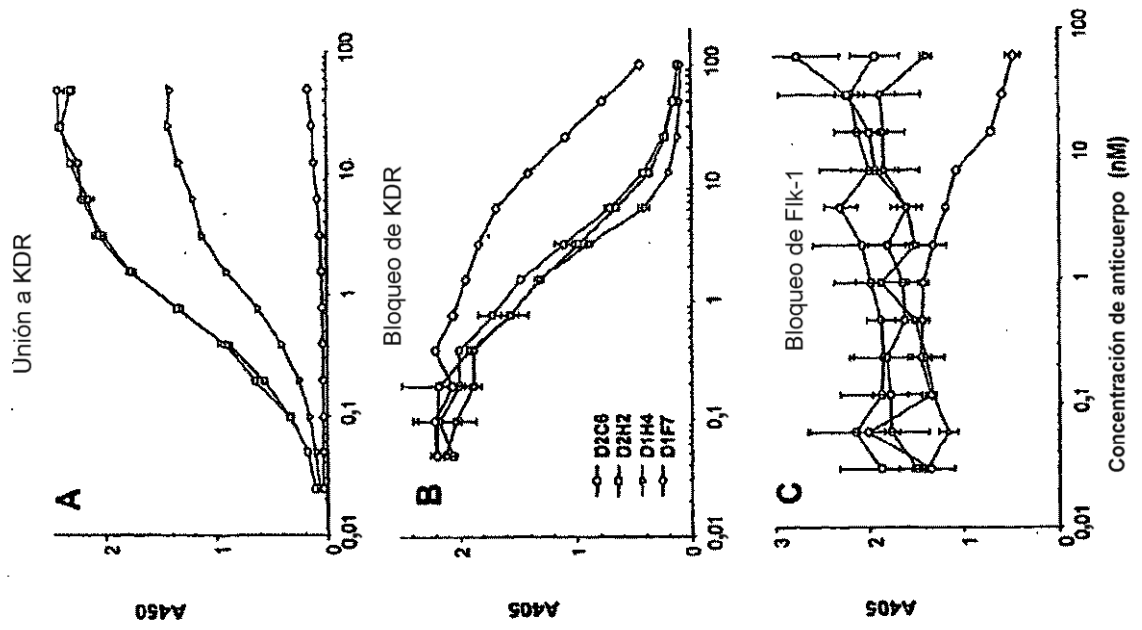


Figura 2

Figura 3

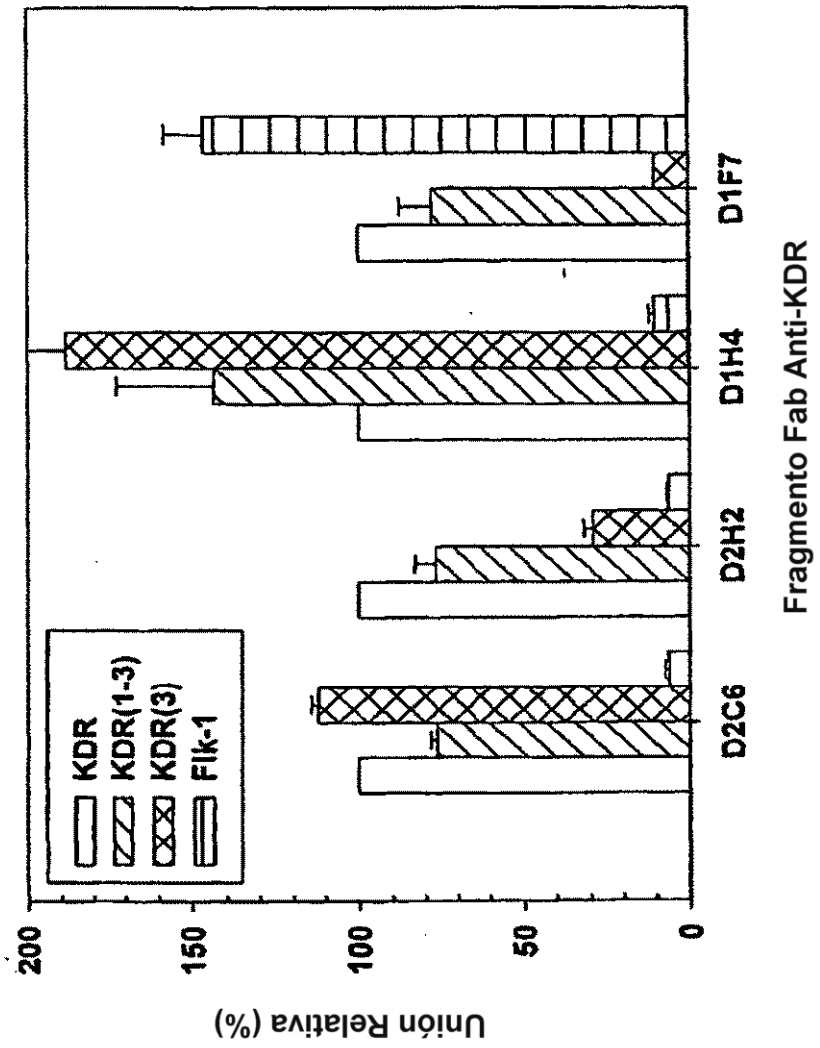




Figura 4

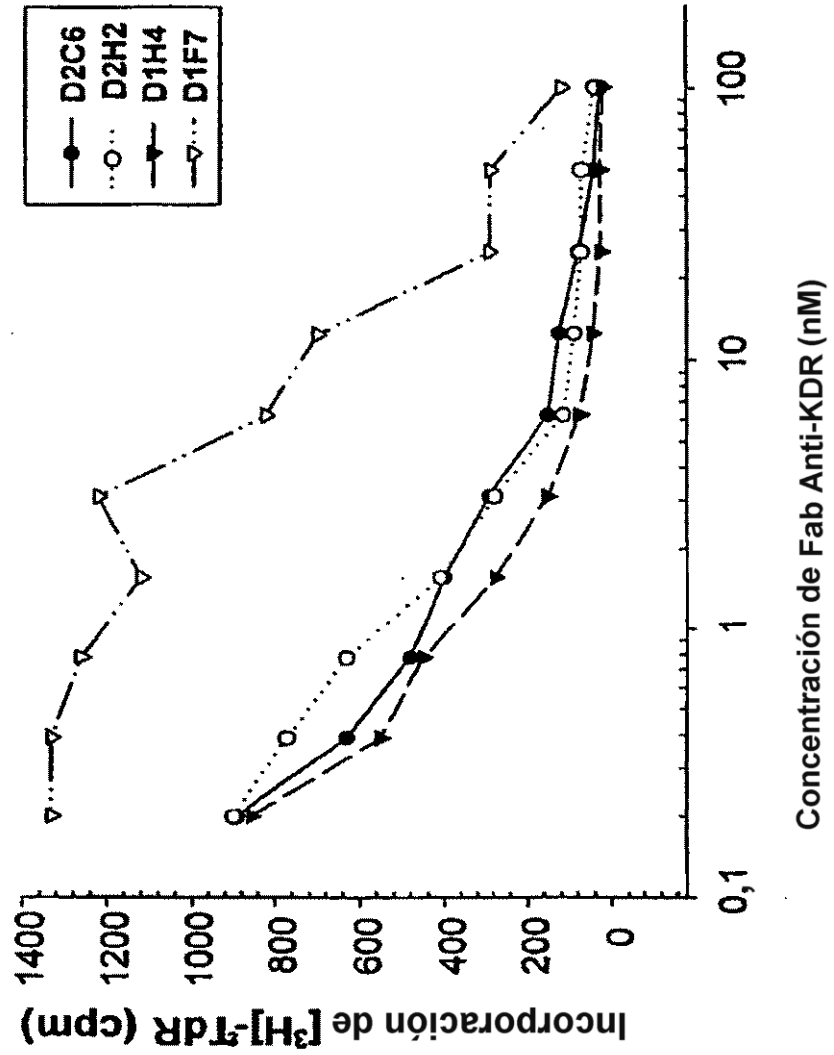
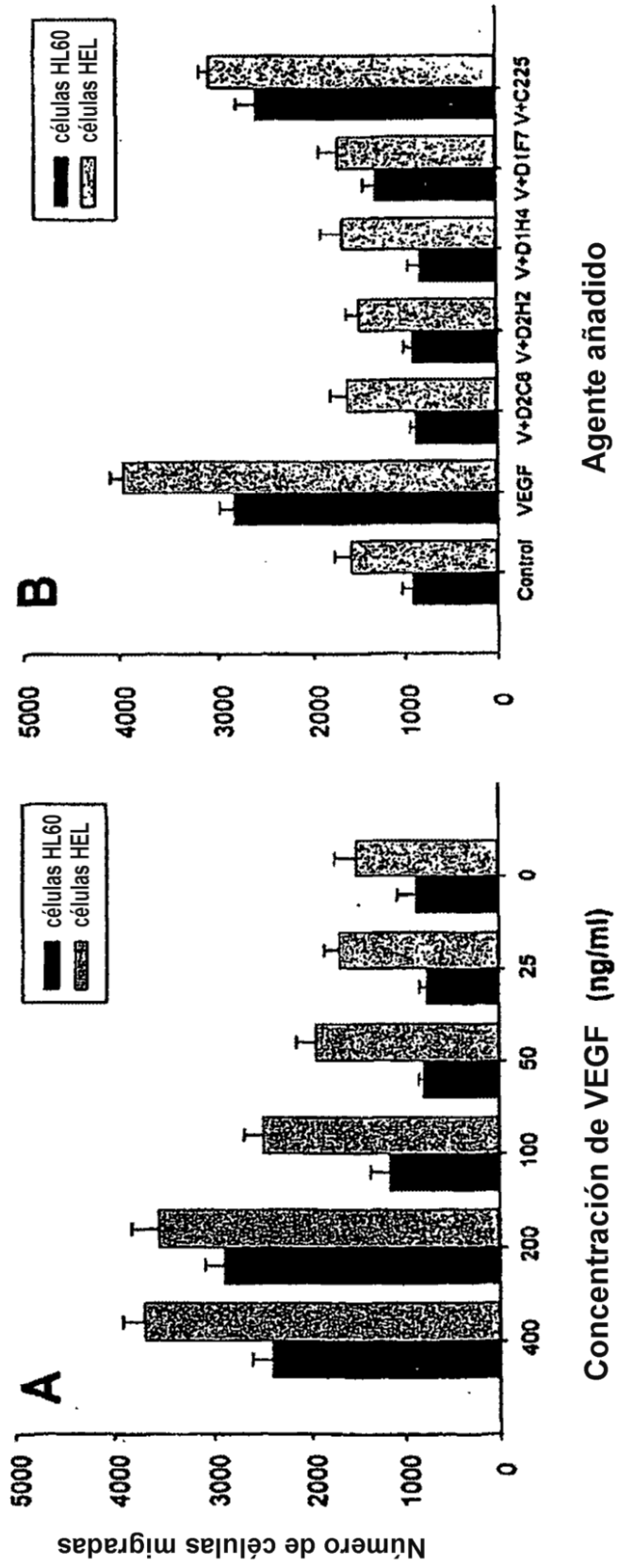


Figura 5



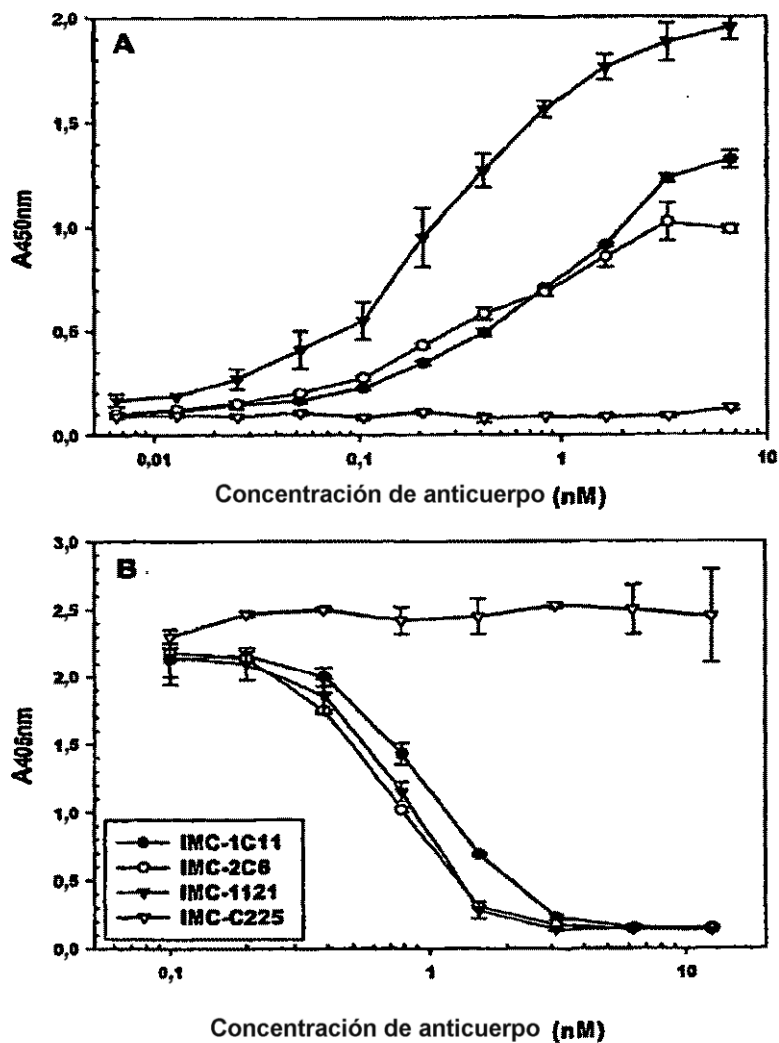


Fig. 6

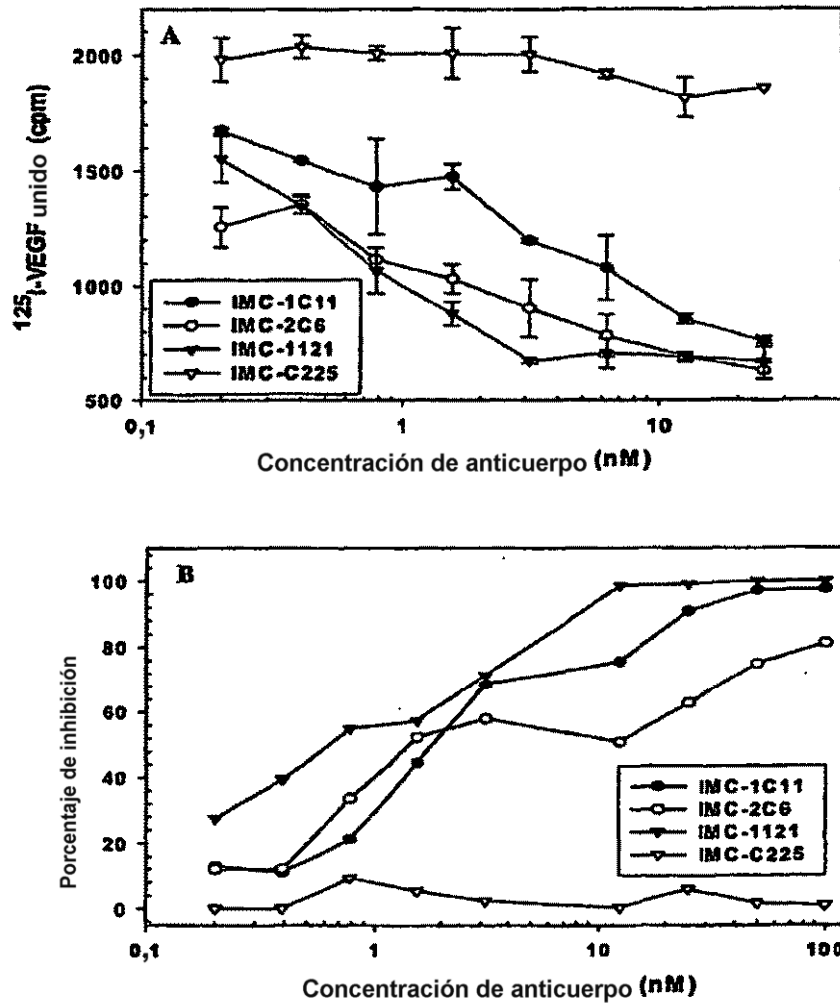
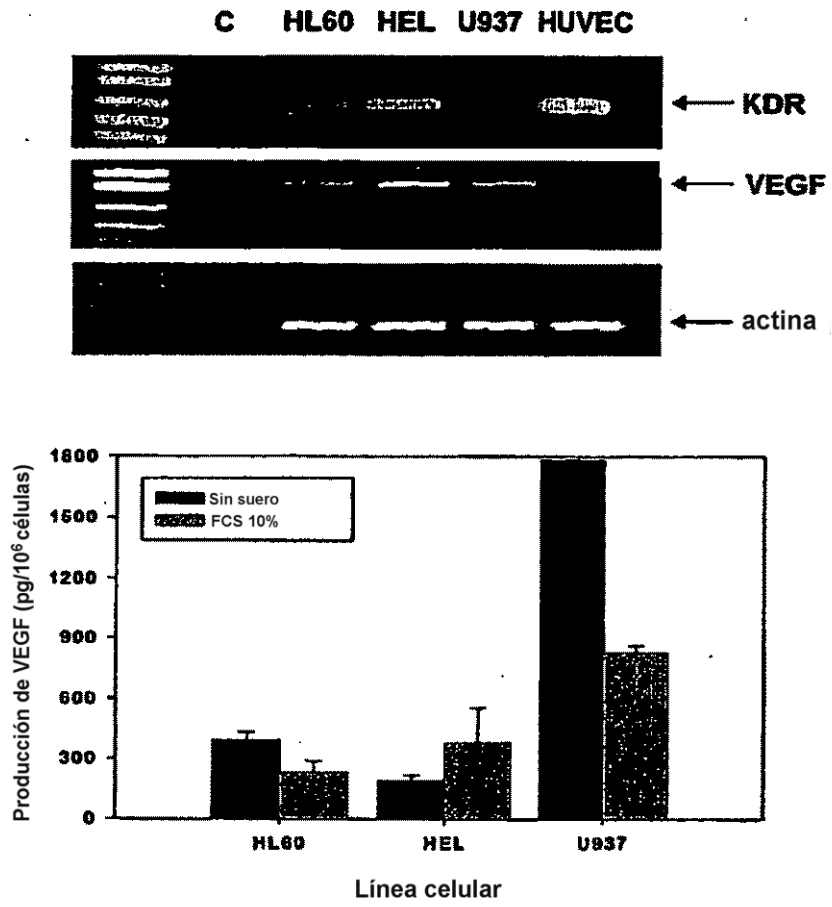


Fig. 7



**Fig. 8**

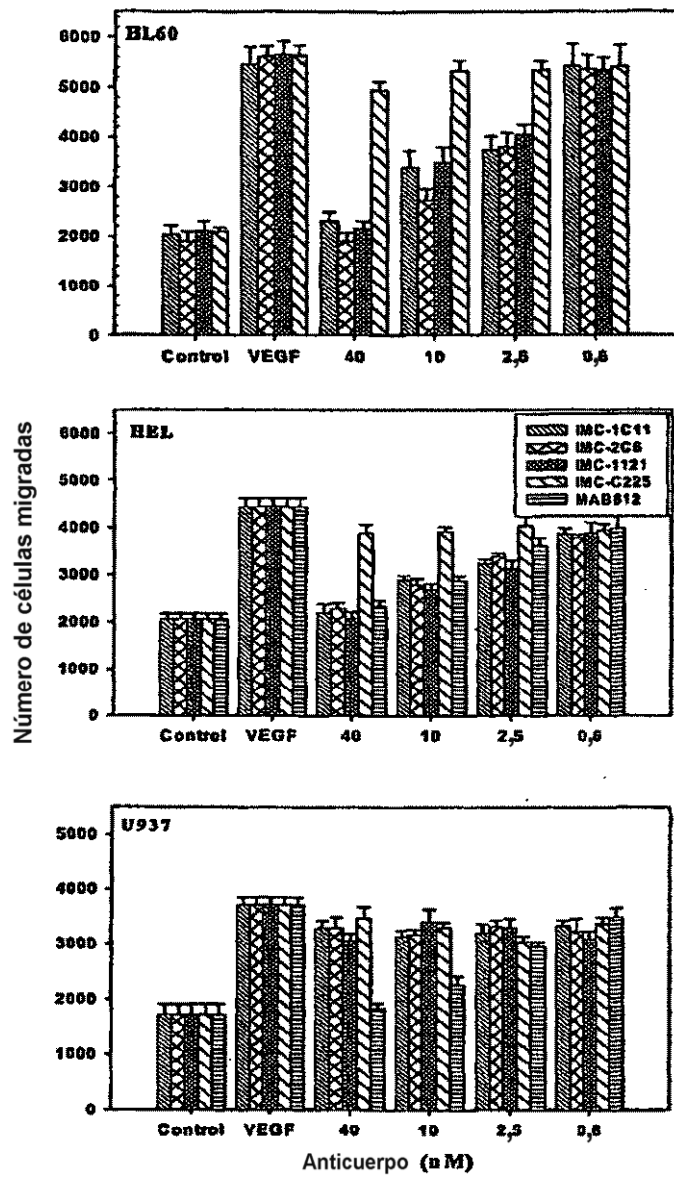


Fig. 9

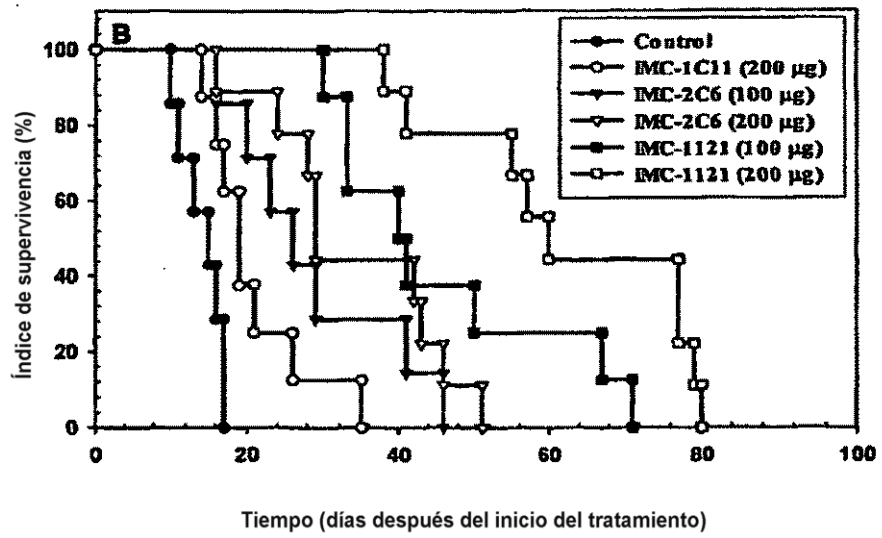


Fig. 10