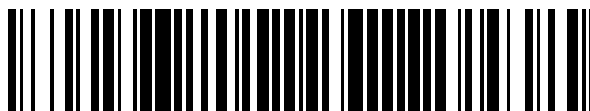


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 523 457**

51 Int. Cl.:

**A61K 39/395** (2006.01)

**C07K 16/28** (2006.01)

**C07H 21/04** (2006.01)

**C12P 1/04** (2006.01)

**A61K 39/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **18.11.2005 E 05826666 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **17.09.2014 EP 1819358**

54 Título: **Anticuerpos contra el receptor 1 del factor de crecimiento endotelial vascular**

30 Prioridad:

**18.11.2004 US 628815 P**

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

**26.11.2014**

73 Titular/es:

**IMCLONE LLC (100.0%)  
440 Route 22 East  
Bridgewater, NJ 08807 , US**

72 Inventor/es:

**WU, YAN;  
HICKLIN, DANIEL, J. y  
BOHLEN, PETER**

74 Agente/Representante:

**CARPINTERO LÓPEZ, Mario**

ES 2 523 457 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 contra el receptor 1 del factor de crecimiento endotelial vascular

**Campo de la invención**

5 La presente invención se refiere a anticuerpos que son específicos para el receptor del factor de crecimiento endotelial vascular 1 (VEGFR-1) y a procedimientos de tratamiento de enfermedades y tumores asociados con la angiogénesis con anticuerpos contra VEGFR-1.

**Antecedentes de la invención**

Es conocido que la angiogénesis, que se refiere a la formación de capilares a partir de vasos preexistentes en el embrión y el organismo adulto, es un elemento clave en el crecimiento, la supervivencia y la metástasis tumoral. Se piensa que los factores de crecimiento y sus receptores, incluyendo el factor de crecimiento epidérmico (EGF), el factor de crecimiento transformante- $\alpha$  (TGF- $\alpha$ ), factor de crecimiento transformante- $\beta$  (TGF- $\beta$ ), factor de crecimiento de fibroblastos ácido y básico (aFGF y bFGF), factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), y factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), juegan un papel en la angiogénesis tumoral. Véase Klagsbrun & D'Amore, Annual Rev. Physiol., 53: 217-239 (1991). La unión de estos factores de crecimiento a sus receptores de la superficie celular induce la activación del receptor, que inicia y modifica las rutas de señalización celular y conduce a la proliferación y diferenciación celular. El VEGF, un mitógeno celular específico endotelial, se diferencia de estos factores en que actúa como un inductor de la angiogénesis promoviendo específicamente la proliferación de células endoteliales.

La respuesta biológica del VEGF está mediada a través de sus receptores de alta afinidad, que se expresan selectivamente en las células endoteliales durante la embriogénesis (Millauer, Cell, 72: 835-846 (1993)) y durante la formación de tumores. Los receptores del VEGF (VEGFR) son típicamente tirosín quinasas de tipo receptor de clase III, que se caracterizan por tener varios bucles similares a los de las inmunoglobulinas, típicamente 5 o 7, en sus dominios amino-terminales extracelulares del receptor de unión a ligando (Kaipainen y col., J. Exp. Med., 178:2077-2088 (1993)). Las otras dos regiones incluyen una región transmembrana y un dominio catalítico carboxi-terminal intracelular interrumpido por una inserción de secuencias hidrófilas interquinasa de longitudes variables, denominado dominio de inserción de quinasas (Terman y col., Oncogene, 6:1677-1683 (1991)). Los VEGFR incluyen al receptor de tirosín quinasas similar a *flts* (flt-1), o VEGFR-1, secuenciado por Shibuya y col., Oncogene, 5: 519-524 (1990), al receptor que contiene un dominio de inserción de quinasas/quinasa hepática fetal (KDR/flk-1), o VEGFR-2, descrito en el documento WO 92/14248, presentado el 20 de febrero de 1992, y en Terman y col., Oncogene, 6: 1677-1683 (1991) y secuenciado por Matthews y col., Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU., 88: 9026-9030 (1991), aunque otros receptores, tales como la neuropilina-1 y -2, también se pueden unir al VEGF. Otro receptor de tirosín quinasas, VEGFR-3 (flt-4), se une a los homólogos de VEGF, VEGF-C y VEGF-D y es más importante en el desarrollo de los vasos linfáticos.

La importancia del VEGFR-1 en la regulación de la angiogénesis patológica se ha mostrado en modelos experimentales *in vivo*. El déficit del dominio tirosín quinasa del VEGFR-1 da como resultado la disminución de la formación de vasos sanguíneos en tumores, indicando un papel significativo de la tirosín quinasa del VEGFR-1 en la angiogénesis patológica (Hiratsuka y col., Cancer Research, 61:1207-1213 (2001)). El dominio tirosín quinasa del VEGFR-1 también se requiere para la promoción de la patogénesis y metástasis tumoral por medio de la inducción de la metaloproteasa de matriz 9 (MMP-9) en células endoteliales y macrófagos (Hiratsuka y col., Cancer Research, 61:1207-1213 (2001)). Además, se ha mostrado que el VEGFR-1 media la movilización y diferenciación de precursores procedentes de MO que responden a P1GF (Hattori y col., Nature Medicine, 8:841-849 (2002)). La inhibición del VEGFR-1 por medio de un anticuerpo anti-VEGFR-1 condujo a la reducción de la angiogénesis tumoral impidiendo la acumulación de células endoteliales procedentes de la médula ósea y progenitoras de macrófagos de la vascularización en tumores Lyden y col., Nature Medicine, 7:1194-1201 (2001)) e inhibió el crecimiento del cáncer de mama (WU, PNAS 2004, 45:694-695). El tratamiento con un anticuerpo anti-VEGFR-1 también inhibió eficazmente la angiogénesis patológica en tumores y retina isquémica en modelos animales (Lutten y col., Nature Medicine, 8:831-840 (2002)).

Además del papel del VEGFR-1 en la angiogénesis, la co-expresión del VEGF y sus receptores se encuentra con frecuencia en células neoplásicas en enfermedades hematológicas y en determinadas células de tumores sólidos (Bellamy, Cancer Research, 59:728-733 (1999); Ferrer y col., Urology, 54:567-572 (1999); Price y col., Cell Growth Differ., 12:129-135 (2001)). Se ha mostrado que el VEGF induce directamente la proliferación, supervivencia e invasividad de las células de leucemia que expresan el receptor del VEGF por medio de la activación de rutas de señalización intracelular aguas abajo a través de un bucle autocrino estimulado por ligando (Dias y col., Proc Natl Acad Sci EE.UU., 98:10857-10862 (2001); Gerber y col., J Mol Med., 81:20-31 (2003)). La estimulación del VEGF también da como resultado un incremento de la invasividad de las células de cáncer de mama que expresan el VEGFR-1 induciendo la activación de las rutas de señalización de ERK 1/2 y de la PI 3/Akt-quinasa (Price y col., Cell Growth Differ., 12:129-135 (2001)).

También, el VEGFR-1 y sus ligandos han mostrado que juegan un papel importante en trastornos inflamatorios. El

déficit del VEGF-B da como resultado la reducción de la densidad de vasos asociada a la inflamación e inflamación sinovial en modelos de artritis (Mould y col., *Arthritis Rheum.*, 48:2660-2669 (2003)). El PIGF también juega un papel crítico en el control de la inflamación cutánea por medio del agrandamiento vascular, células inflamatorias y monocitos/macrófagos, y se ha mostrado que contribuye a la modulación de la aterosclerosis y artritis reumatoide en modelos animales (Luttun y col., *Nature Medicine*, 8:831-840 (2002); Autiero & Thromb Haemost., 1:1356-1370 (2003)). El tratamiento con un anticuerpo anti-VEGFR-1 neutralizante suprimió la destrucción inflamatoria de las articulaciones en la artritis, redujo el crecimiento de la placa aterosclerótica y su vulnerabilidad.

Los efectos antiinflamatorios del anticuerpo anti-VEGFR-1 fueron atribuibles a una movilización reducida de progenitores mieloides procedentes de la médula ósea a la sangre periférica, a una activación defectuosa de las células mieloides, y a una alteración de la diferenciación y la infiltración de los leucocitos que expresan VEGFR-1 en tejidos inflamados. Por lo tanto, el VEGFR-1 también puede ser una diana terapéutica para el tratamiento de los trastornos relacionados con la inflamación.

Wu Y. y col, *Proceedings of the Annual Meeting of the American Association for Cancer Research*, 1 de marzo de 2004, vol. 45, páginas 694-695 desvelan un anticuerpo monoclonal humano contra el VEGFR-1 del que se ha descrito que es capaz de inhibir el crecimiento de los cánceres de mama humanos.

Sigue existiendo la necesidad de agentes que inhiban la actividad del receptor del VEGF, tales como anticuerpos monoclonales (Acm) completamente humanos específicos para el VEGFR-1. Los anticuerpos anti-VEGFR-1 pueden ser un nuevo antagonista terapéutico, útil para el tratamiento de las enfermedades asociadas con angiogénesis y el cáncer.

## **Sumario breve de la invención**

En una realización, la presente invención proporciona un anticuerpo monoclonal humano aislado o fragmento del mismo que se une específicamente al VEGFR-1 y que comprende

- (i) una región determinante de la complementariedad de la cadena ligera 1 (LCDR1) que tiene la secuencia SEC ID N°: 4;
- (ii) una LCDR2 que tiene la secuencia SEC ID N°:2;
- (iii) una LCDR3 que tiene la secuencia SEC ID N°:3;
- (iv) una región determinante de la complementariedad de la cadena pesada 1 (HCDR1) que tiene la secuencia SEC ID N°: 11;
- (v) una HCDR2 que tiene la secuencia SEC ID N°:12 y
- (vi) una HCDR3 que tiene la secuencia SEC ID N°:13;

En otra realización, la presente invención proporciona un polinucleótido aislado que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica un anticuerpo o fragmento del mismo de acuerdo con la reivindicación 1.

En otra realización, la presente invención proporciona un vector de expresión que comprende una secuencia de polinucleótidos de la invención y una célula huésped recombinante que comprende un vector de expresión de la invención.

En otra realización, la presente invención proporciona un procedimiento para producir un anticuerpo o fragmento del mismo que comprende cultivar una célula huésped de la invención en condiciones que permitan la expresión del anticuerpo o fragmento del mismo.

En una realización adicional, la presente invención proporciona un anticuerpo monoclonal humano o fragmento del mismo de acuerdo con la reivindicación 1 para su uso en terapia.

En otra realización, la presente invención proporciona un anticuerpo monoclonal humano o fragmento del mismo de acuerdo con la reivindicación 1 para su uso en la inhibición de la angiogénesis en un mamífero.

En otra realización, la presente invención proporciona un anticuerpo monoclonal humano o fragmento del mismo de acuerdo con la reivindicación 1 para su uso en la reducción del crecimiento tumoral en un mamífero.

## **Breve descripción de las figuras**

La **Figura 1** son las secuencias de aminoácidos de la región variable de la cadena ligera y la región variable de la cadena pesada de las realizaciones de los anticuerpos anti-VEGFR-1 de la presente invención.

La **Figura 2** son las secuencias de nucleótidos de la región variable de la cadena ligera y la región variable de la cadena pesada de las realizaciones de los anticuerpos anti-VEGFR-1 de la presente invención.

La **Figura 3** es un gráfico que representa los resultados de un ensayo de unión basado en ELISA que mide la actividad de unión *in vitro* de las realizaciones de los anticuerpos anti-VEGFR-1 de la presente invención a VEGFR-1.

La **Figura 4** es un gráfico que representa los resultados de un ensayo de bloqueo basado en ELISA que mide la competición *in vitro* de las realizaciones de los anticuerpos anti-VEGFR-1 de la presente invención con PIGF

para la unión a VEGFR-1.

La **Figura 5** es un gráfico que representa los resultados de un ensayo de bloqueo basado en ELISA que mide la competición *in vitro* de las realizaciones de los anticuerpos anti-VEGFR-1 de la presente invención con VEGF para la unión a VEGFR-1.

Las **Figuras 6A-D** son gráficos que representan los resultados de especificidad del anticuerpo anti-VEGFR-1 18F1 de la presente invención respecto a la unión con VEGFR-1 humano (**Figura 6A**), pero no con VEGFR-1 de ratón (**Figura 6B**), VEGFR-2 humano (**Figura 6C**), o VEGFR-2 de ratón (**Figura 6D**).

Las **Figuras 7A-E** son los resultados del análisis por citometría de flujo que muestran la reactividad de unión de las realizaciones de los anticuerpos anti-VEGFR-1 de la presente invención con células endoteliales de aorta porcina que expresan VEGFR-1.

Las **Figuras 8A-B** son los resultados del análisis por citometría de flujo que muestran la reactividad de unión del anticuerpo anti-VEGFR-1 18F1 de la presente invención con células endoteliales de aorta porcina que expresan VEGFR-1 (**Figura 8A**) y células DU4475 humanas de carcinoma mamario (**Figura 8B**).

La **Figura 9** es un gráfico que representa los resultados de un ensayo de bloqueo basado en células que mide la competición *in vitro* del anticuerpo anti-VEGFR-1 18F1 de la presente invención con VEGF para la unión a VEGFR-1 en células endoteliales.

La **Figura 10** es un análisis de transferencia de Western que demuestra la reducción de la fosforilación estimulada por P1GF de VEGFR-1 mediante el tratamiento con anticuerpo anti-VEGFR-1 18F1 de la presente invención en células endoteliales de aorta porcina que expresan VEGFR-1.

La **Figura 11** es un análisis de transferencia de Western que demuestra la inhibición de la fosforilación estimulada por P1GF de VEGFR-1 mediante el tratamiento con anticuerpo anti-VEGFR-1 18F1 de la presente invención en células BT474 de cáncer de mama.

La **Figura 12** es un análisis de transferencia de Western que demuestra la inhibición de la activación de la señalización aguas abajo de ERK1/2 inducida por P1GF mediante realizaciones de los anticuerpos anti-VEGFR-1 de la presente invención en células endoteliales de aorta porcina que expresan VEGFR-1.

La **Figura 13** es un análisis de transferencia de Western que demuestra la inhibición de la señalización aguas abajo de ERK1/2 inducida por VEGF mediante realizaciones de los anticuerpos anti-VEGFR-1 de la presente invención en células endoteliales de aorta porcina que expresan VEGFR-1.

Las **Figuras 14A-B** son un análisis de transferencia de Western que demuestra la inhibición de la activación de la señalización aguas abajo de ERK 1/2 inducida por PIGF (**Figura 14A**) o VEGF (**Figura 14B**) por el anticuerpo anti-VEGFR-1 18F1 de la presente invención en células endoteliales de aorta porcina que expresan VEGFR-1.

La **Figura 15** es un análisis de transferencia de Western que demuestra que el anticuerpo anti-VEGFR-1 18F1 de la presente invención bloqueó la fosforilación de Akt estimulada por P1GF o VEGF en células BT474 de cáncer de mama.

La **Figura 16** es una curva de respuesta a la dosis que muestra la inhibición de la proliferación celular estimulada por VEGF en células DU4475 de carcinoma de mama tratadas con las realizaciones de los anticuerpos anti-VEGFR-1 de la presente invención de una manera dependiente de la dosis.

La **Figura 17** es una curva de respuesta a la dosis que muestra la inhibición de la proliferación celular estimulada por P1GF en células DU4475 de carcinoma de mama tratadas con las realizaciones de los anticuerpos anti-VEGFR-1 de la presente invención de una manera dependiente de la dosis.

Las **Figuras 18 A-B** son una curva de respuesta a la dosis que muestra la inhibición de la proliferación celular estimulada por PIGF (**Figura 18A**) o VEGF (**Figura 18B**) en células DU4475 de carcinoma de mama tratadas con el anticuerpo anti-VEGFR-1 18F1 de la presente invención de una manera dependiente de la dosis.

Las **Figuras 19A y 19B** son gráficos que representan el crecimiento tumoral de tumores de mama DU4475 frente a los días después del tratamiento con las realizaciones de los anticuerpos anti-VEGFR-1 de la presente invención.

Las **Figuras 20 A-C** son gráficos que representan el crecimiento tumoral de tumores de mama DU4475 (**Figura 20A**), MDA-MB-231 (**Figura 20B**) y MDA-MB-435 (**Figura 20C**) frente a los días después del tratamiento con el anticuerpo anti-VEGFR-1 18F1 de la presente invención.

Las **Figuras 21A-B** son gráficos que representan el crecimiento tumoral de tumores de mama DU4475 (**Figura 21A**) y MDA-MB-231 (**Figura 21B**) frente a los días después del tratamiento con el anticuerpo anti-VEGFR-1 humano, 18F1 de la presente invención y el anticuerpo de VEGFR-1 anti-ratón MF1.

La **Figura 22** es un gráfico del número de colonias de células de cáncer de colon presentes después del tratamiento con el anticuerpo anti-VEGFR-1 humano 18F1 en presencia de VEGF-A y VEGF-B.

La **Figura 23A** es un gráfico del número de células tumorales que migraron después del tratamiento con el anticuerpo anti-VEGFR-1 humano 18F1 en la presencia de VEGF-A y VEGF-B.

La **Figura 23B** son microfotografías de células teñidas que migraron después del tratamiento con el anticuerpo anti-VEGFR-1 humano 18F1 en la presencia de VEGF-A y VEGF-B.

La **Figura 24A** es un gráfico del número de células tumorales que migraron a través de una capa de MATRIGEL™ después del tratamiento con el anticuerpo anti-VEGFR-1 humano 18F1 en presencia de VEGF-A y VEGF-B.

La **Figura 24B** son microfotografías de células teñidas que migraron después del tratamiento con el anticuerpo anti-VEGFR-1 humano 18F1 en la presencia de VEGF-A y VEGF-B.

La **Figura 25** es un gráfico que representa el crecimiento tumoral de tumores de mama DU4475 (**Figura 25A**), MDA-MB-231 (**Figura 25B**) y MDA-MB-435 (**Figura 25C**) frente a los días después del tratamiento con los anticuerpos anti-VEGFR-1, 18F1, 6F9 y 15F11.

La **Figura 26** es un gráfico que representa el crecimiento de las células de cáncer de colon HT-29 (**Figura 26A**), DLD-1 (**Figura 26B**) y GEO (**Figura 26C**) frente a los días después del tratamiento con dosis particulares del anticuerpo anti-VEGFR-1 humano 18F1.

La **Figura 27** son microfotografías de tumores de xenoinjerto MDS-MB-321 después del tratamiento con anticuerpo anti- VEGFR-1 -humano 18F1.

La **Figura 28** es un gráfico que representa el crecimiento tumoral frente a los días después del tratamiento con dosis particulares del anticuerpo anti-VEGFR-1 anti-humano 18F1, anticuerpo anti-VEGFR-1 anti-ratón MF1, o ambos en xenoinjertos MDA-MB-231 (**Figura 28A**) y DU4475 (**Figura 28B**).

La **Figura 29** es un gráfico que representa el crecimiento tumoral frente a los días después del tratamiento con anticuerpo anti-VEGFR-1 anti-humano 18F1 y anticuerpo anti-VEGFR-1 anti-ratón MF1 en combinación con ciclofosfamida en xenoinjertos MDS-MB-231.

Las **Figuras 30A y B** son gráficos que representan el crecimiento tumoral frente a los días después del tratamiento con 5-FU/LV o doxorubicina en combinación con anticuerpo anti-VEGFR-1 anti-humano 18F1 y anticuerpo anti-VEGFR-1 anti-ratón MF1 en xenoinjertos MDA-MB-231.

La **Figura 31** es un gráfico del recuento total de células tumorales frente a la concentración de anticuerpo de varias cantidades de 18F1 en presencia de VEGF-A (**Figura 31A**) o PIGF (**figura 31B**) después del tratamiento con desferrioxamina.

Las **Figuras 32A, B, y C** son gráficos que representan la especificidad del anticuerpo anti-VEGFR-1 anti-humano 18F1 y el anticuerpo anti-VEGPR-1 anti-ratón MF1.

## Descripción detallada de la invención

En una realización, la presente invención proporciona un anticuerpos monoclonales y fragmentos de estos que se unen específicamente a VEGFR-1 (dichos anticuerpos y fragmentos de estos se citan en el presente documento como "anticuerpos anti-VEGFR-1" a menos que se especifique lo contrario).

Las secuencias de aminoácidos de las CDR de los anticuerpos anti-VEGFR-1 preferidos de la divulgación (designados como clones "6F9," "13G12," "15F11," y "18F1" (o "IMC-18F1")) se exponen a continuación en la Tabla 1.

| Tabla 1 - Secuencias de las CDR de los anticuerpos anti-VEGFR-1 |                               |                                     |                                      |
|-----------------------------------------------------------------|-------------------------------|-------------------------------------|--------------------------------------|
| Clon                                                            | CDR1                          | CDR2                                | CDR3                                 |
| Cadena ligera                                                   |                               |                                     |                                      |
| 6F9                                                             | RASQSGSSSYLA<br>(SEC ID N°:1) | GASSRAT<br>(SEC ID N°:2)            | QQYGSSPLT<br>(SEC ID N°:3)           |
| 13G12                                                           | RASQSGSSSYLA<br>(SEC ID N°:1) | GASSRAT<br>(SEC ID N°:2)            | QQYGSSPLT<br>(SEC ID N°:3)           |
| 15F11                                                           | RASQSVSSSYLA<br>(SEC ID N°:4) | GASSRAT<br>(SEC ID N°:2)            | QQYGSSPLT<br>(SEC ID N°:3)           |
| 18F1                                                            | RASQSVSSSYLA<br>(SEC ID N°:4) | GASSRAT<br>(SEC ID N°:2)            | QQYGSSPLT<br>(SEC ID N°:3)           |
| Cadena pesada                                                   |                               |                                     |                                      |
| 6F9                                                             | GFTFSSYGMH<br>(SEC ID N°:5)   | VIWYDGSNKYYADSVKG<br>(SEC ID N°:6)  | DHFGSGAHYYYYYGM DV<br>(SEC ID N°:7)  |
| 13G12                                                           | GFTFSSYGMH<br>(SEC ID N°:5)   | VIWYDGSNKYYADSVKG<br>(SEC ID N°:6)  | DHYGSGAHYYYYYGM DV<br>(SEC ID N°:8)  |
| 15F11                                                           | GFTFSSYGMH<br>(SEC ID N°:5)   | VIWFDGSNKYYADSVKG<br>(SEC ID N°:9)  | DHYGSGAHSYYYYGLDV<br>(SEC ID N°: 10) |
| 18F1                                                            | GFAFSSYGMH<br>(SEC ID N°:11)  | VIWYDGSNKYYADSVRG<br>(SEC ID N°:12) | DHYGSGVHHYFYGLDV<br>(SEQ ID N°:13)   |

En otra realización, los anticuerpos anti-VEGFR-1 de la presente invención tienen una región variable de la cadena ligera ( $V_L$ ) de SEC ID N°:16 y/o una región variable de la cadena pesada ( $V_H$ ) de SEC ID N°:20. Las secuencias de aminoácidos de las regiones variables de la cadena ligera y pesada de los anticuerpos anti-VEGFR-1 preferidos de la presente divulgación se exponen a continuación en la Tabla 2.

| Tabla 2 -Secuencia de la región variable de los anticuerpos anti-VEGFR-1 (las porciones subrayadas representan las CDR) |                                                                                                                                                                          |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Clon                                                                                                                    | Cadena Ligera                                                                                                                                                            |
| 6F9                                                                                                                     | <u>EIVLTQSPGTLSPGERATLSCRASQSGSSSYLA</u> WYQKPQGAPRLLIYGASS<br><u>RATGIPDRFSGSGGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQOYGSSPLTFGGG</u> GTKVEIK<br>RTVAAPSVEIFP<br>SEC ID N°: 14           |
| 13G12                                                                                                                   | <u>EIVLTQSPGTLSPGERATLSCRASQSGSSSYLA</u> WYQKPQGAPRLLIYGASS<br><u>RATGIPDRFSGSGGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQOYGSSPLTFGGG</u> GTKVEIK<br>RTVAAPSVEIFP<br>SEC ID N°: 14           |
| 15F11                                                                                                                   | <u>EIVLTQSPGTLSPGERATLSCRASQSVSSSYLA</u> WYQKPQGAPRLLIYGASS<br><u>RATGIPDRFSGSGGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQOYGSSPLTFGGQ</u> TRLEIKR<br>TVAAAPSVFIFP<br>SEC ID N°: 15           |
| 18F1                                                                                                                    | <u>EIVLTQSPGTLSPGERATLSCRASQSVSSSYLA</u> WYQKPQGAPRLLIYGASS<br><u>RATGIPDRFSGSGGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQOYGSSPLTFGGG</u> GTKVEIK<br>RTVAAPSVEIFP<br>SEC ID N°: 16           |
| Clon                                                                                                                    | Cadena Pesada                                                                                                                                                            |
| 6F9                                                                                                                     | QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYGMHWVRQAPGKGLEWVAVI<br><u>WYDGSNKYYADSVKGRFTISRDNSKNTVYLQMNSLR</u> AEDTAVYHCTRDHFG<br><u>SGAHY</u> YYYYGMDYWGQGTITVTVSS<br>SEC ID N°: 17 |

| Tabla 2 -Secuencia de la región variable de los anticuerpos anti-VEGFR-1 (las porciones subrayadas representan las CDR) |                                                                                                                                                                                                                |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Clon                                                                                                                    | Cadena Ligera                                                                                                                                                                                                  |
| 13G12                                                                                                                   | <p> <u>QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTSSYGMHWVRQAPGKGLEWVAVI</u><br/> <u>WYDGSNKYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDHY</u><br/> <u>GSGAHYYYYGMDVWGQGT</u>TVTVSS<br/>           SEC ID N°: 18         </p>   |
| 15F11                                                                                                                   | <p> <u>QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTSSYGMHWVRQAPGKGLEWVAVI</u><br/> <u>WFDGSNKYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDHYG</u><br/> <u>SGAHSYYYYGLD</u>VWGQGTSTVTVSS<br/>           SEC ID N°: 19         </p> |
| 18F1                                                                                                                    | <p> <u>QAQVVESGGGVVQSGRSLRLSCAASGFAFSSYGMHWVRQAPGKGLEWVAVI</u><br/> <u>WYDGSNKYYADSVRGRFTISRDNSEN</u>TLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDHYG<br/> <u>SGVHHYFYGLD</u>VWGQGTSTVTVSS<br/>           SEC ID N°: 20         </p>  |

Los anticuerpos anti-VEGFR-1 de la presente invención son anticuerpos humanos.

- 5 Los anticuerpos anti-VEGFR-1 de la presente invención incluyen anticuerpos completos y fragmentos de anticuerpos que se unen específicamente a VEGFR-1. Los ejemplos no limitantes de tipos de anticuerpos de acuerdo con la presente invención incluyen anticuerpos de origen natural; anticuerpos monocatenarios; anticuerpos monocatenarios multivalentes tales como diacuerpos y triacuerpos; fragmentos monovalentes tales como Fab (fragmento de unión antigénica), fragmentos bivalentes, tales como los fragmentos (Fab')<sub>2</sub>; Fv (fragmento variable) o derivados de estos tales como los fragmentos monocatenarios Fv (scFv); y los anticuerpos de dominio sencillo que se unen

específicamente a VEGFR-1.

Los anticuerpos de origen natural típicamente tienen dos cadenas pesadas idénticas y dos cadenas ligeras idénticas, estando cada cadena ligera unida covalentemente a una cadena pesada mediante un enlace disulfuro intercatenario y múltiples enlaces disulfuro que además unen las dos cadenas pesadas entre sí. Las cadenas individuales pueden plegarse en dominios que tengan tamaños (110-125 aminoácidos) y estructuras similares, pero diferentes funciones. La cadena ligera puede comprender un dominio  $V_L$  y un dominio constante ( $C_L$ ). La cadena pesada también puede comprender un  $V_H$  y/o dependiendo de la clase de isotipo del anticuerpo, tres o cuatro dominios constantes ( $C_{H1}$ ,  $C_{H2}$ ,  $C_{H3}$ , y  $C_{H4}$ ). En seres humanos, los isotipos son IgA, IgD, IgE, e IgM, estando IgA e IgG subdivididos adicionalmente en subclases o subtipos (IgA<sub>1-2</sub> e IgG<sub>1-4</sub>).

Los anticuerpos monocatenarios carecen de algunos o de todos los dominios constantes del anticuerpo completo del que proceden. Los engarces peptídicos que se usan para producir los anticuerpos monocatenarios pueden ser péptidos flexibles que se seleccionan para asegurar que se da el plegamiento tridimensional apropiado de los dominios  $V_L$  y  $V_H$ . Generalmente, dicho engarce peptídico puede unir covalentemente la secuencia del extremo carboxilo de  $V_L$  o  $V_H$  con el extremo aminoacídico de una secuencia complementaria  $VH$  o  $VL$ . El engarce tiene generalmente de 10 a 50 restos de aminoácidos, preferentemente de 10 a 30 restos de aminoácidos, más preferentemente de 12 a 30 restos de aminoácidos, y más preferentemente de 15 a 25 restos de aminoácidos. Un ejemplo de dichos péptidos de engarce incluye (Gly-Gly-Gly-Gly-Ser)<sub>3</sub> (SEC ID N°: 28).

En anticuerpos monocatenarios múltiples, cada cadena sencilla que tiene un dominio  $V_H$  y un dominio  $V_L$  unidos de manera covalente por un engarce peptídico, pueden unirse de manera covalente mediante al menos uno o más engarces peptídicos para formar un anticuerpo monocatenario multivalente, que puede ser monoespecífico o multiespecífico. Cada cadena de anticuerpo monocatenario multivalente incluye un fragmento variable de cadena ligera y un fragmento variable de cadena pesada, y está unida por un engarce peptídico a al menos una otra cadena.

Se pueden combinar dos anticuerpos monocatenarios para formar un diacuerpo, también conocido como dímero trivalente. 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 se conectan con engarces que son lo suficientemente cortos como para impedir el emparejamiento entre dominios de la misma cadena, conduciendo por lo tanto el emparejamiento entre dominios complementarios en diferentes cadenas para recrear los dos sitios de unión antigénica.

Se pueden combinar tres anticuerpos monocatenarios para formar triacuerpos, también conocidos como trímeros trivalentes. Los triacuerpos se construyen con el extremo aminoacídico de un dominio  $V_L$  o  $V_H$  directamente fusionado al extremo carboxilo de un dominio  $V_L$  o  $V_H$ , es decir, sin ninguna secuencia de engarce. El triacuerpo tiene tres cabezas Fv disponiéndose los polipéptidos de un modo cíclico, de la cabeza a la cola. Una conformación posible del triacuerpo es plana localizándose los tres sitios de unión en un plano formando entre sí un ángulo de 120 grados. Los triacuerpos pueden ser monoespecíficos, biespecíficos o triespecíficos.

Los fragmentos Fab se refieren a fragmentos del anticuerpo que consisten en los dominios  $V_L C_L V_H C_{H1}$ . Aquellos que se generan por digestión con papaína se citan como "Fab" y no conservan la región bisagra de la cadena pesada. Aquellos que se generan por digestión con pepsina se citan bien como "(Fab')<sub>2</sub>", en cuyo caso los enlaces disulfuro intercatenarios están intactos, o como Fab', en cuyo caso no conservan los enlaces disulfuro. Los fragmentos bivalentes (Fab')<sub>2</sub> tienen mayor avidez por el antígeno que los fragmentos monovalentes Fab.

Los fragmentos Fv son la parte de un anticuerpo que consisten en los dominios  $V_L$  y  $V_H$  y constituyen el sitio de unión antigénica. El fragmento scFv es un fragmento de anticuerpo que contiene un dominio  $V_L$  y un dominio  $V_H$  en una cadena polipeptídica, en la que el extremo N de un dominio y el extremo C del otro dominio se unen por un engarce flexible para permitir que los dos fragmentos se asocien para formar un sitio funcional de unión antigénica (véase, por ejemplo, la patente de los EE.UU. N° 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 los fragmentos scFv en la superficie de paquetes solubles de presentación genética recombinante, tales como bacteriófagos.

Los anticuerpos de dominio sencillo tienen un dominio variable sencillo que puede unirse eficazmente con el antígeno. En la técnica se conocen ejemplos de anticuerpos en los que la afinidad y la especificidad de unión la aportan principalmente uno u otro dominio variable. Véase, por ejemplo., Jeffrey, P.D. y col., Proc. Natl. Acad. Sci. U S A 90:10310-4 (1993), que desvelan un anticuerpo anti-digoxina que se une a digoxina principalmente a través de la cadena pesada del anticuerpo. Por consiguiente, pueden identificarse dominios de anticuerpos sencillos que se unen bien a los receptores de VEGF. Se entiende que, para fabricar un anticuerpo de dominio sencillo a partir de un anticuerpo que comprende un dominio  $V_H$  y un  $V_L$ , serían deseables determinadas sustituciones de aminoácidos fuera de las regiones CDR para potenciar la unión, expresión o solubilidad. Por ejemplo, sería deseable modificar restos de aminoácidos que, de lo contrario, podrían estar ocultos en la interfaz  $V_H$ - $V_L$ .

Cada dominio de los anticuerpos anti-VEGFR-1 de la presente invención puede ser un dominio variable de cadena pesada o ligera del 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 una

de las descritas en el documento WO 93/11236 (Griffiths y col.). Por ejemplo, es posible unir conjuntamente los dominios correspondientes a los dominios variables del anticuerpo que han perdido al menos un aminoácido. El rasgo característico importante es la habilidad de cada dominio para asociarse con un dominio complementario para formar un sitio de unión antigénica. Por consiguiente, las expresiones "fragmento variable de cadena pesada/ligera" no deberían interpretarse para excluir variantes que no tengan un efecto material sobre la especificidad de unión con VEGFR-1.

Tal como se usa en el presente documento, un "anticuerpo anti-VEGFR-1" incluye modificaciones de un anticuerpo anti-VEGFR-1 de la presente invención que conserva especificidad para VEGFR-1. Dichas modificaciones incluyen, pero no se limitan a, la conjugación con una molécula efectora tal como un agente quimioterapéutico (por ejemplo, cisplatino, taxol, doxorubicina) o citotoxina (por ejemplo, una proteína, o un agente quimioterapéutico orgánico no proteico). Las modificaciones adicionales incluyen, pero no se limitan a, conjugación con fracciones indicadoras detectables. También se incluyen las modificaciones que amplían la semivida del anticuerpo (por ejemplo, pegilación).

Los agentes proteicos y no proteicos pueden conjugarse con los anticuerpos por procedimientos conocidos en la técnica. Los procedimientos de conjugación incluyen unión directa, unión por medio de engarces que se unen por unión covalente, y miembros de pares de unión específica (por ejemplo, avidina-biotina). Dichos procedimientos incluyen, por ejemplo, los descritos por Greenfield y col., *Cancer Research* 50, 6600-6607 (1990), para la conjugación de doxorubicina y los descritos por Arnon y col., *Adv. Exp. Med. Biol.* 303, 79-90 (1991) y por Kiseleva y col., *Mol. Biol. (USSR)* 25, 508-514 (1991), para la conjugación de compuestos de platino.

Los anticuerpos anti-VEGFR-1 de la presente invención también incluyen aquellos para los que se han mejorado las características de unión por mutación directa, procedimientos de maduración por afinidad, exposición a fagos, o redistribución de cadenas. La afinidad y la especificidad se pueden modificar o mejorar mutando cualquiera de las CDR de los anticuerpos de la presente invención y explorando sitios de unión antigénica que tengan las características deseadas (véase, *por ejemplo*, Yang y col., *J. Mol. Biol.*, 254: 392-403 (1995)). Las CDR se pueden mutar de diversas formas conocidas para un experto en la materia. Por ejemplo, una forma es aleatorizar restos individuales o combinaciones de restos de modo que en una población de sitios de unión antigénica de otra manera idénticos, los veinte aminoácidos se encuentren en posiciones particulares. Como alternativa, se inducen las mutaciones a lo largo de una serie de restos de CDR por procedimientos de PCR propensa a error (véase, *por ejemplo*, Hawkins y col., *J. Mol. Biol.*, 226: 889-896 (1992)).

Por ejemplo, vectores de presentación de fagos que contienen genes de la región variable de la cadena pesada y ligera se pueden propagar en cepas mutantes de *E. coli* (véase, *por ejemplo*, Low y col., *J. Mol. Biol.*, 250: 359-368 (1996)).

Los anticuerpos anti-VEGFR-1 también incluyen equivalentes funcionales que incluyen polipéptidos con secuencias de aminoácidos que son sustancialmente las mismas que la secuencia de aminoácidos de las regiones variables o hipervariables de los anticuerpos de la presente invención. "Sustancialmente la misma" secuencia de aminoácidos incluye una secuencia de aminoácidos con al menos el 70 %, preferentemente al menos el 80 %, y más preferentemente al menos el 90 % de identidad respecto a otra secuencia de aminoácidos cuando los aminoácidos de las dos secuencias se alinean óptimamente y se comparan para determinar las coincidencias exactas de aminoácidos entre las dos secuencias. "Sustancialmente la misma" secuencia de aminoácidos también incluye una secuencia de aminoácidos con al menos el 70 %, preferentemente al menos el 80 %, y más preferentemente al menos el 90 % de homología con respecto a otra secuencia de aminoácidos, tal como se determina por el procedimiento de búsqueda FASTA de acuerdo con Pearson y Lipman, *Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU.* 85, 2444-8 (1988).

Tal como se expresa anteriormente, los anticuerpos anti-VEGFR-1 de la presente invención se unen específicamente a VEGFR-1. Dichos anticuerpos pueden ser monoespecíficos o biespecíficos siempre y cuando un sitio de unión antigénica sea específico para VEGFR-1. La especificidad de anticuerpo, que se refiere al reconocimiento selectivo de un anticuerpo para un epítipo particular de un antígeno, de los anticuerpos para VEGFR-1 se puede determinar en base a la afinidad y/o avidéz. 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 (epítipo) y un sitio de unión antigénica. La avidéz es la medida de la fuerza de unión entre un anticuerpo y su antígeno. Los anticuerpos típicamente se unen con una  $K_d$  de  $10^{-5}$  a  $10^{-11}$  litros/mol. Se considera generalmente que cualquier  $K_d$  inferior a  $10^{-4}$  litros/mol indica unión no específica. A menor valor de la  $K_d$ , mayor es la fuerza de unión entre un determinante antigénico y el sitio de unión del anticuerpo.

Los anticuerpos anti-VEGF de la presente invención se unen específicamente a la región extracelular de VEGFR-1 y preferentemente neutralizan la activación de VEGFR-1 impidiendo la unión de un ligando de VEGFR-1 con el receptor. En dichas realizaciones preferentes, el anticuerpo se une a VEGFR-1 al menos con la misma fuerza que los ligandos naturales de VEGFR-1 (incluyendo VEGF (A), VEG-B y PIGF).

La activación neutralizante de VEGFR-1 incluye la disminución, inhibición, inactivación, y/o desestabilización de una o más de las actividades asociadas con la transducción de señales. Dichas actividades incluyen la dimerización del

receptor, la autofosforilación de VEGFR-1, la activación del dominio citoplasmático interno tirosín quinasa de VEGFR-1, y la iniciación de múltiples transducciones de señales y transactivación de rutas involucradas en la regulación de la síntesis de ADN (activación génica) y la progresión o división del ciclo celular.. Una medida de la neutralización de VEGFR-1 es la inhibición de la actividad tirosín quinasa de VEGFR-1. La inhibición de la tirosín quinasa se puede determinar usando procedimientos bien conocidos tales como los ensayos de fosforilación que miden el nivel de autofosforilación del receptor de quinasas recombinante, y/o la fosforilación de sustratos naturales o sintéticos. Se puede detectar la fosforilación, por ejemplo, usando un anticuerpo específico para fosfotirosina en un ensayo ELISA o en una transferencia de Western. Algunos ensayos para la actividad tirosín 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, se pueden utilizar procedimientos para la detección de la expresión de proteínas para determinar si un anticuerpo neutraliza la activación de VEGFR-1, en los que las proteínas que se miden estén reguladas por la actividad tirosín quinasa de VEGFR-1. Estos procedimientos incluyen inmunohistoquímica (IHQ) para la detección de la expresión de proteínas, hibridación fluorescente *in situ* (FISH) para la detección de la amplificación génica, ensayos de unión competitiva a radioligandos, técnicas de transferencia en matriz sólida, tales como transferencias de Northern y Southern, reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa 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).

Los ensayos *in vivo* también se pueden utilizar para detectar la neutralización de VEGFR-1. Por ejemplo, la inhibición de la tirosín quinasa receptora puede observarse por ensayos mitogénicos usando líneas celulares estimuladas con el ligando del receptor en presencia y en ausencia de inhibidor. Por ejemplo, pueden usarse células HUVEC (ATCC) estimuladas con VEGF(A) o VEGF-B para ensayar la inhibición de VEGFR-1. 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, por ejemplo, la patente de Estados Unidos N° 6.365.157 (Rockwell y col.).

Por supuesto, la presente invención no está limitada por ningún mecanismo particular de neutralización de VEGFR-1. Los anticuerpos anti-VEGFR-1 de la presente invención pueden, por ejemplo, unirse externamente a VEGFR-1, bloquear la unión de ligando a VEGFR-1 y la posterior transducción de la señalización mediada por la tirosín quinasa asociada al receptor, e impedir la fosforilación de VEGFR-1 y de otras proteínas aguas abajo en la cascada de transducción de señal. El complejo receptor-anticuerpo también puede internalizarse y degradarse, dando como resultado la regulación negativa del receptor en la superficie celular. Las metaloproteasas de la matriz, cuya función es la invasión de células tumorales y la metástasis, también pueden estar reguladas negativamente por los anticuerpos anti-VEGFR-1 de la presente invención.

Los anticuerpos anti-VEGFR-1 humanos se pueden obtener a partir de anticuerpos de origen natural, o bibliotecas de Fab o scFv construidas por exposición a fagos, por ejemplo, se pueden insertar en dichos anticuerpos anti-VEGFR-1 humanos a partir de los genes de las regiones variables de la cadena pesada y la cadena ligera y de las secuencias CDR de los anticuerpos anti-VEGFR-1 de la presente invención.

Los anticuerpos anti-VEGFR-1 humanos pueden producirse por procedimientos bien conocidos para un experto en la materia. Dichos procedimientos incluyen el procedimiento del hibridoma usando ratones transgénicos descrito por Kohler y Milstein, Nature, 256: 495-497 (1975) y la tecnología de anticuerpos monoclonales de Campbell, la producción y caracterización de hibridomas de roedores y de seres humanos, Burdon y col., Eds., Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology, Volumen 13, Elsevier Science Publishers, Amsterdam (1985), todos los cuales se incorporan por referencia en el presente documento ; así como el procedimiento del ADN recombinante descrito por Huse y col., Science, 246, 1275-1281 (1989).

Los fragmentos de anticuerpo se pueden producir por escisión de un anticuerpo completo, o mediante la expresión del ADN que codifica el fragmento. Los fragmentos de anticuerpos se pueden preparar por procedimientos descritos por Lamoyi y col., J. Immunol. Methods, 56: 235-243 (1983) y por Parham, J. Immunol. 131: 2895-2902 (1983). Dichos fragmentos pueden contener uno o ambos fragmentos Fab o el fragmento F(ab')<sub>2</sub>. Dichos fragmentos también pueden contener anticuerpos de regiones variables de fragmentos monocatenarios, es decir, scFv, u otros fragmentos de anticuerpo. Los procedimientos para producir dichos anticuerpos se desvelan en la Solicitud PCT WO 93/21319, Solicitud de Patente Europea N° 239.400; Solicitud PCT WO 89/09622; Solicitud de Patente Europea 338.745; y Solicitud de Patente Europea EP 332.424.

En otra realización, la presente invención proporciona polinucleótidos que codifican los anticuerpos anti-VEGFR-1 de la presente invención. Dichos polinucleótidos codifican la CDR2 de la cadena ligera de SEC ID N°: 2, la CDR3 de la cadena ligera de SEC ID N°: 3, y, preferentemente una o más de las otras CDR enumeradas en la Tabla 1. La tabla 3 expone las secuencias de ácidos nucleicos de los anticuerpos anti-VEGFR-1 preferidos.

| Tabla 3 –Secuencia de nucleótidos de los anticuerpos anti VEGFR-1 |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                |
|-------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Clon                                                              | Cadena Ligera                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  |
| 6F9                                                               | <p>GAAATTGTGTGACGCAGTCTCCAGGCACCCCTGTCTCTTGTCTCTCCAGGGGAA<br/> AGAGCCACCCCTCTCCTGCAAGGCCAGTCAGAGTGGTAGCAGCAGCTACTT<br/> AGCCTGGTACCAGCAGAAACCTGGCCAGGCTCCAGGCTCCTCATCTATG<br/> GTGCATCCAGCAGGCCACTGGCATCCAGACAGGTTTCAGTGGCAGTGGG<br/> TCTGGGACAGACTTCACTCTCACCATCAGCAGACTGGAGCCTGAAGATTCT<br/> GCAGTGTATTACTGTACGAGTATGGTAGCTACCGCTCACTTTCGGCGGA<br/> GGGACCAAGGTGGAGATCAACGAACTGTGGCTGCACCATCTGTCTTCAT<br/> CTTCCCG</p> <p>SEC ID N°: 21</p>  |
| 13G12                                                             | <p>GAAATTGTGTGACGCAGTCTCCAGGCACCCCTGTCTCTTGTCTCTCCAGGGGAA<br/> AGAGCCACCCCTCTCCTGCAAGGCCAGTCAGAGTGGTAGCAGCAGCTACTT<br/> AGCCTGGTACCAGCAGAAACCTGGCCAGGCTCCAGGCTCCTCATCTATG<br/> GTGCATCCAGCAGGCCACTGGCATCCAGACAGGTTTCAGTGGCAGTGGG<br/> TCTGGGACAGACTTCACTCTCACCATCAGCAGACTGGAGCCTGAAGATTCT<br/> GCAGTGTATTACTGTACGAGTATGGTAGCTACCGCTCACTTTCGGCGGA<br/> GGGACCAAGGTGGAGATCAACGAACTGTGGCTGCACCATCTGTCTTCAT<br/> CTTCCCG</p> <p>SEC ID N°: 21</p>  |
| 15F11                                                             | <p>GAAATTGTGTGACGCAGTCTCCAGGCACCCCTGTCTCTTGTCTCTCCAGGGGAA<br/> AGAGCCACCCCTCTCCTGCAAGGCCAGTCAGAGTGGTAGCAGCAGCTACTT<br/> AGCCTGGTACCAGCAGAAACCTGGCCAGGCTCCAGGCTCCTCATCTATG<br/> GTGCATCCAGCAGGCCACTGGCATCCAGACAGGTTTCAGTGGCAGTGGG<br/> TCTGGGACAGACTTCACTCTCACCATCAGCAGACTGGAGCCTGAAGATTCT<br/> GCAGTGTATTACTGTACGAGTATGGTAGCTACCGCTCACTTTCGGCGGA<br/> GGGACACGACTGGAGATTAAACGAACTGTGGCTGCACCATCTGTCTTCAT<br/> CTTCCCG</p> <p>SEC ID N°: 22</p> |

| Tabla 3 – Secuencia de nucleótidos de los anticuerpos anti VEGFR-1 |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           |
|--------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Clon                                                               | Cadena Ligera                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                             |
| 18F1                                                               | <p>GAAATTGTTGACGCAGTCTCCAGGCACCCTGTCTTTGTCTCCAGGGGAA<br/> AGAGCCACCCTCTCCTGTCAGGGCCAGTCAGAGTGTTAGCAGCAGTACTT<br/> AGCCTGGTACCAGCAGAAACCTGGCCAGGCTCCAGGCTCCTCATCTATG<br/> GTGCATCCAGCAGGGCCACTGGCATCCAGACAGGTTTCAGTGGCAGTGGG<br/> TCTGGGACAGACTTCACTCTCACCATCAGCAGACTGGAGCCTGAAGATTTT<br/> GCAGTGTATTACTGTTCAGCAGTATGGTAGTCAACCGTCACTTTCGGCGGA<br/> GGACCAAGGTGGAGATCAACGAACTGTGGCTGCCACCATCTGTCTTCAT<br/> CTTCCG</p> <p>SEC ID N°: 23</p>                 |
| Clon                                                               | Cadena Pesada                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                             |
| 6F9                                                                | <p>CAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCGTGGTCCAGCCTGGGAGGTC<br/> CCTGAGACTCTCCTGTGCAGCGTCTGGATTCACTTCAGTAGTTATGGCAT<br/> GCACTGGTCCGCCAGGCTCCAGGCAAGGGCTGGAGTGGTGGCAGTTA<br/> TATGGTATGATGGAAGTAATAATACTATGCAGACTCCGTGAAAGGCCGA<br/> TTCACCATCTCCAGAGACAATTCCAAGAACACGGTGTATCTGCAATGAA<br/> CAGCCTGAGAGCCGAGGACACGGCTGTGTATCACTGTACGAGAGATCACT<br/> TTGGTTCGGGGGCTCACTACTACTACTACGGTATGGACGTCTGGGGCC<br/> AAGGGACCAACGGTCAACCGTCTCCTCA</p> <p>SEC ID N°: 24</p> |
| 13G12                                                              | <p>CAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCGTGGTCCAGCCTGGGAGGTC<br/> CCTGAGACTCTCCTGTGCAGCGTCTGGATTCACTTCAGTAGCTATGGCAT<br/> GCACTGGTCCGCCAGGCTCCAGGCAAGGGCTGGAGTGGTGGCAGTTA<br/> TATGGTATGATGGAAGTAATAATACTATGCAGACTCCGTGAAAGGCCGA<br/> TTCACCATCTCCAGAGACAATTCCAAGAACACGGTGTATCTGCAATGAA<br/> CAGCCTGAGAGCCGAGGACACGGCTGTGTATTACTGTGCGAGAGATCACT<br/> ATGGTTCGGGGGCTCACTACTACTACTACGGTATGGACGTCTGGGGC<br/> CAAGGGACCAACGGTCAACCGTCTCCTCA</p> <p>SEC ID N°: 25</p> |

| Tabla 3 –Secuencia de nucleótidos de los anticuerpos anti VEGFR-1 |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                         |
|-------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Clon                                                              | Cadena Pesada                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           |
| 15F11                                                             | <p> CAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGGCGTGGTCCAGCCCTGGGAGGTC<br/> CCTGAGACTCTCCTGTGTCAGCGTCTGGATTACCTTCAGTAGCTATGGCAT<br/> GCACTGGGTCGGCCAGGCTCCAGGCAAGGGGCTGGAGTGGGTGGCAGTTA<br/> TATGGTTTGATGGAAGTAATAATACTATGCAGACTCCGTGAAGGCCGA<br/> TTCACCATCTCCAGAGACAAATCCAAAGAACACGCTGTATCTGCAAAATGAA<br/> CAGCCTGAGAGCCGAGGACACGGCTGTGTAATTACTGTGCGAGAGATCACT<br/> ATGGTTCGGGGGCTCACTCCTACTACTACTACGGTTTGGACGTTTGGGGCC<br/> AAGGGACCTCGGTCAACCGTCTCCTCA<br/> SEC ID N°: 26 </p>    |
| 18F1                                                              | <p> CAGGCGCAGGTGGTGGAGTCTGGGGGAGGGCGTGGTCCAGTCTGGGAGGTC<br/> CCTGAGACTCTCCTGTGTCAGCGTCTGGATTCCGCCCTTCAGTAGCTACGGCAT<br/> GCAC TGGGTCGGCCAGGCTCCAGGCAAGGGGCTGGAGTGGGTGGCAGTTA<br/> TATGGTATGATGGAAGTAATAATACTATGCAGACTCCGTGAGGGGCCGA<br/> TTCACCATCTCCAGAGACAAATCCGAGAACACGCTGTATCTGCAAAATGAA<br/> CAGCCTGAGAGCCGAGGACACCGCTGTGTAATTACTGTGCCAGAGATCACT<br/> ATGGTTCGGGGGTCACCACTATTCTACTACGGTCTGGACGTCCTGGGGCC<br/> AAGGGACCAACGGTCAACCGTCTCCTCA<br/> SEC ID N°: 27 </p> |

El ADN que codifica anticuerpos humanos se puede preparar por recombinación de ADN que codifica regiones constantes y regiones variables, que no son las CDR, procedentes sustancialmente o exclusivamente de las correspondientes regiones de anticuerpos humanos y el ADN que codifica las CDR procedentes de un humano (SEC ID N°: 1-4 para las CDR del dominio variable de la cadena ligera y SEC ID N°: 5-13 para las CDR del dominio variable de la cadena pesada.

Los polinucleótidos que codifican los anticuerpos anti-VEGFR-1 de la presente divulgación incluyen polinucleótidos con secuencias de ácidos nucleicos que son sustancialmente las mismas que las secuencias de los polinucleótidos de la presente invención. "Sustancialmente la misma" secuencia de ácidos nucleicos se define en el presente documento como una secuencia con al menos el 70 %, preferentemente al menos el 80 %, y más preferentemente al menos el 90 % de identidad respecto a otra secuencia de ácidos nucleicos cuando las dos secuencias se alinean óptimamente (con las inserciones o deleciones apropiadas) y se comparan para determinar coincidencias exactas de nucleótidos entre las dos secuencias.

Las fuentes adecuadas de ADN que codifican fragmentos de anticuerpos incluyen cualquier célula, tal como células de hibridoma y de bazo, que expresan el anticuerpo de longitud completa. Los fragmentos pueden usarse por sí mismos como equivalentes de anticuerpos, o pueden recombinarse en equivalentes, tal como se describe anteriormente. Las deleciones y recombinaciones de ADN descritas en esta sección se pueden llevar a cabo por procedimientos conocidos, tales como los que se describen en las solicitudes de patentes publicadas anteriormente enumeradas en la sección titulada "Equivalentes funcionales de Anticuerpos" y/u otras técnicas estándar de ADN recombinante, tales como aquellas que se describen más adelante. Otra fuente de ADN son los anticuerpos monocatenarios producidos a partir de una biblioteca de presentación de fagos, tal como se conoce en la técnica.

Adicionalmente, la presente invención proporciona vectores de expresión que contienen las secuencias de polinucleótidos previamente descritas unidas operativamente a una secuencia de expresión, un promotor y una secuencia potenciadora. Se han desarrollado una variedad de vectores de expresión para la síntesis eficiente de polipéptidos del anticuerpo en sistemas procariotas, tales como bacterias, y eucariotas, que incluyen pero sin limitación, sistemas de cultivos de levaduras y células de mamíferos. Los vectores de la presente invención pueden comprender segmentos de secuencias de ADN cromosómicas, no cromosómicas y sintéticas.

Se puede usar cualquier vector de expresión adecuado. Por ejemplo, los vectores de clonación procariotas incluyen plásmidos de *E. coli*, tales como *colE1*, *pCR1*, *pBR322*, *pMB9*, *pUC*, *pKSM*, y RP4. Los vectores procariotas también incluyen derivados de ADN de fagos tales como *M13* y otros fagos filamentosos de ADN monocatenario. Un ejemplo de un vector útil en levaduras es el plásmido  $2\mu$ . Los vectores adecuados para la expresión en células de mamíferos incluyen derivados bien conocidos de SV-40, adenovirus, secuencias procedentes de ADN de retrovirus y vectores lanzadera, procedentes de la combinación de vectores funcionales de mamíferos, tales como los descritos anteriormente, y ADN funcional de fagos y plásmidos.

Se conocen vectores de expresión eucariotas adicionales en la técnica (*por ejemplo*, P.J. Southern & P. Berg, J. Mol. Appl. Genet., 1:327-341 (1982); Subramani y col., Mol. Cell. Biol., 1: 854-864 (1981); Kaufmann & Sharp, "Amplification And Expression of Sequences Cotransfected with a Modular Dihydrofolate Reductase Complementary DNA Gene," J. Mol. Biol., 159:601-621 (1982); Kaufmann & Sharp, Mol. Cell. Biol., 159:601-664 (1982); Scatchell y col., "Expression And Characterization Of The Product Of A Human Immune Interferon DNA Gene In Chinese Hamster Ovary Cells," Proc. Natl Acad. Sci. EE.UU., 80:4654-4659 (1983); Urlaub & Chasin, Proc. Natl Acad. Sci. EE.UU., 77:4216-4220, (1980)).

Los vectores de expresión útiles en la presente invención contienen al menos una secuencia de control de expresión que está unida operativamente a la secuencia de ADN o fragmento a expresar. La secuencia control se inserta en el vector a fin de controlar y regular la expresión de la secuencia de ADN clonada. Los ejemplos de secuencias de control de expresión útiles son el sistema *lac*, el sistema *trp*, el sistema *tac*, el sistema *trc*, las regiones operadoras y promotoras principales del fago lambda, la región de control de la proteína de recubrimiento fd, los promotores glucolíticos de levaduras, por ejemplo, el promotor para la 3-fosfoglicerato quinasa, los promotores de la fosfatasa ácida de levaduras, por ejemplo, Pho5, los promotores de los factores de sistema de apareamiento alfa de levaduras, y promotores procedentes de poliovirus, adenovirus, retrovirus y virus de simios, por ejemplo, los promotores tempranos y tardíos o SV40, y otras secuencias que se sabe que controlan la expresión de genes de células procariotas o eucariotas y sus virus o combinaciones de estos.

La presente invención también proporciona células huésped recombinantes que contienen los vectores de expresión anteriormente mencionados. Los anticuerpos anti-VEGFR-1 de la presente invención pueden expresarse en líneas celulares que no sean hibridomas. Los ácidos nucleicos, que comprenden una secuencia que codifica un polinucleótido de acuerdo con la invención, se pueden usar para la transformación de una célula huésped de mamífero adecuada.

Las líneas celulares de preferencia particular se seleccionan en base al alto nivel de expresión, expresión constitutiva de la proteína de interés y contaminación mínima de las proteínas huésped. Las líneas celulares disponibles como huéspedes para la expresión se conocen bien en la técnica e incluyen numerosas líneas celulares inmortalizadas, tales como, pero sin limitación, , células de ovario de hámster chino (CHO), células de riñón de cría

de hámster (BHK) y muchas otras. Las células eucariotas adecuadas incluyen levaduras y otros hongos. Los huéspedes procariotas incluyen, por ejemplo, *E. coli*, tales como *E. coli* SG-936, *E. coli* HB 101, *E. coli* W3110, *E. coli* X1776, *E. coli* X2282, *E. coli* DHI, y *E. coli* MRCl, *Pseudomonas*, *Bacillus*, tales como *Bacillus subtilis*, y *Streptomyces*.

- 5 Estas células huésped recombinantes presentes se pueden usar para producir un anticuerpo cultivando las células en condiciones que permitan la expresión del anticuerpo y purificando el anticuerpo de la célula huésped o del medio que rodea a la célula huésped. El direccionamiento del anticuerpo expresado para la secreción en las células huésped recombinantes se puede facilitar mediante la inserción de una secuencia codificante de un péptido señal o líder secretor (Véase, Shokri y col., (2003) Appl Microbiol Biotechnol. 60(6):654-664, en el extremo 5' del gen codificante del anticuerpo de interés. Estos elementos peptídicos líder secretorios pueden proceder bien de secuencias procariotas o eucariotas. Por consiguiente, se usan péptidos líderes secretorios adecuados, que son aminoácidos que se unen al extremo N- terminal de un polipéptido para dirigir el movimiento del polipéptido fuera del citosol de la célula huésped y la secreción al medio.

- 15 Los anticuerpos anti-VEGFR-1 de la presente invención se pueden fusionar con restos de aminoácidos adicionales. Dichos restos de aminoácidos pueden ser una etiqueta peptídica para facilitar el aislamiento, por ejemplo. También se contemplan otros restos de aminoácidos para el retorno dirigido de los anticuerpos a órganos o tejidos específicos.

En una realización preferida, la presente invención proporciona un anticuerpo anti-VEGFR-1 de la presente invención para el uso en la reducción del crecimiento tumoral o la inhibición de la angiogénesis.

- 20 Aunque sin pretender quedar ligado a un mecanismo particular, las condiciones que pueden tratar los presentes procedimientos incluyen, por ejemplo, aquellas en las que el crecimiento tumoral o angiogénesis patógena se estimula a través de un bucle paracrina y/o autocrino de VEGFR.

- Con respecto a la reducción del crecimiento tumoral, dichos tumores incluyen tumores primarios y tumores metastásicos, así como tumores refractarios. Los tumores refractarios incluyen tumores que no responden o que son resistentes a otras formas de tratamiento, tales como el tratamiento solamente con agentes quimioterapéuticos, solamente con anticuerpos, solamente con radiación o combinaciones de estos. Los tumores refractarios también incluyen tumores que parecen estar inhibidos por el tratamiento con dichos agentes, pero recurren hasta los cinco años, a veces hasta los diez años o más después de interrumpir el tratamiento.

- 30 Los anticuerpos anti-VEGFR-1 de la presente invención son útiles para tratar tumores que expresan VEGFR-1. Dichos tumores son característicamente sensibles al VEGF presente en su entorno, y además pueden producir y estimularse por VEGF en un bucle estimulador autocrino. Este procedimiento es por lo tanto efectivo para tratar un tumor sólido o no sólido que no está vascularizado, o que no está sustancialmente vascularizado aún.

- Por consiguiente, como ejemplos de tumores sólidos que pueden tratarse se incluyen el carcinoma de mama, carcinoma pulmonar, 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 microcíticos y macrocíticos de pulmón, tumores de páncreas, tumores de tiroides, tumores de ovario y tumores de hígado. Otros ejemplos incluyen el sarcoma de Kaposi, neoplasmas del SNC, neuroblastomas, hemangioblastomas capilares, meningiomas y metástasis cerebrales, melanoma, carcinomas y sarcomas gastrointestinales y renales, rabdomiosarcoma, glioblastoma, preferentemente glioblastoma multiforme, y leiomiomasarcoma. Los ejemplos de cánceres vascularizados de piel para los cuales son efectivos los anticuerpos anti-VEGFR-1 de la presente invención incluyen el carcinoma de células escamosas, el carcinoma de células basales y cánceres de piel que se pueden tratar suprimiendo el crecimiento de queratinocitos malignos, tales como queratinocitos humanos malignos.

- 45 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), leucemia linfocítica crónica (LLC), leucemia eritrocítica o leucemia monocítica. Algunos ejemplos de linfomas incluyen linfomas de Hodgkin y no Hodgkin.

- Los respecto a la inhibición de la angiogénesis, los anticuerpos anti-VEGFR-1 de la presente invención son efectivos para tratar sujetos con tumores o neoplasmas vascularizados, o enfermedades angiogénicas que se caracterizan por angiogénesis excesiva. Dichos tumores y neoplasmas incluyen, por ejemplo, tumores malignos y neoplasmas, tales como blastomas, carcinomas o sarcomas, y tumores y neoplasmas altamente vascularizados. Los cánceres que pueden tratar los procedimientos de la presente invención incluyen, por ejemplo, cánceres del cerebro, tracto genitourinario, sistema linfático, estómago, renales, colon, laringe y pulmón y hueso. Los ejemplos no limitantes adicionales incluyen tumores epidermoides, tumores escamosos, tales como los tumores de cabeza y cuello, tumores colorrectales, tumores de próstata, tumores de mama, tumores de pulmón, incluyendo adenocarcinoma pulmonar y tumores microcíticos y macrocíticos de pulmón, tumores de páncreas, tumores de tiroides, tumores de ovario, y tumores de hígado. El procedimiento también se usa para el tratamiento de cánceres de piel vascularizados, incluyendo el carcinoma de células escamosas, carcinoma de células basales y cánceres de piel que

se pueden tratar suprimiendo el crecimiento de queratinocitos malignos, tales como queratinocitos humanos malignos. Otros cánceres que pueden tratarse incluyen el sarcoma de Kaposi, neoplasmas del SNC, neuroblastomas, hemangioblastomas capilares, meningiomas y metástasis cerebrales), melanoma, carcinomas y sarcomas gastrointestinales y renales, rhabdomyosarcoma, glioblastoma, incluyendo glioblastoma multiforme, y leiomyosarcoma.

Como ejemplos no limitantes de afecciones patológicas angiogénicas caracterizadas por angiogénesis excesiva que implican, por ejemplo, inflamación y/o vascularización, se incluyen aterosclerosis, artritis reumatoide (AR), glaucoma neovascular, retinopatía proliferativa incluyendo retinopatía proliferativa diabética, degeneración macular, hemangiomas, angiofibromas y psoriasis. Otros ejemplos no limitantes de enfermedades angiogénicas no neoplásicas son la retinopatía del prematuro (fibroplástica retrolental), rechazo de trasplante de córnea, diabetes mellitus insulino-dependiente, esclerosis múltiple, miastenia grave, enfermedad de Crohn, nefritis autoinmunitaria, cirrosis biliar primaria, psoriasis, pancreatitis aguda, rechazo a aloinjerto, inflamación alérgica, dermatitis por contacto y reacciones de hipersensibilidad retardada, enfermedad inflamatoria intestinal, choque séptico, osteoporosis, osteoartritis, defectos cognitivos inducidos por inflamación neuronal, síndrome de Osler-Weber, restinosis, e infecciones fúngicas, parasitarias y víricas, incluyendo las infecciones por citomegalovirus.

La identificación de afecciones médicas tratables por anticuerpos anti-VEGFR-1 de la presente invención está bien dentro de la habilidad y el conocimiento de un experto en la materia. Por ejemplo, los individuos humanos que bien padezcan una enfermedad neoplásica o angiogénica clínicamente significativa o que tengan riesgo de desarrollar síntomas clínicamente significativos son adecuados para la administración de los presentes anticuerpos del receptor de VEGF. Un médico experto en la materia puede detectar fácilmente, por ejemplo, mediante el uso de ensayos clínicos, examen físico e historia médica/familiar, si un individuo es un candidato para dicho tratamiento.

Los anticuerpos anti-VEGFR-1 de la presente invención se pueden administrar para tratamientos terapéuticos a un paciente que padezca 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. Progresión incluye, por ejemplo, el crecimiento, invasividad, metástasis y/o recurrencia del tumor o afección patológica. Las cantidades efectivas para este uso dependerán de la gravedad de la enfermedad y del estado general del sistema inmunitario del propio paciente. Los regímenes de dosificación también variarán con la patología y el estado del paciente, y típicamente variarán de una dosificación de un único bolo o infusión continua a administraciones múltiples diarias (por ejemplo, cada 4-6 horas), o tal como indique el médico tratante y la afección del paciente. Se debe observar, sin embargo, que la presente invención no se limita a ninguna dosis particular.

En otra realización, la presente invención proporciona un anticuerpo anti-VEGFR-1 de la presente invención en combinación con uno o más agentes distintos para uso en el tratamiento de una afección médica. Por ejemplo, una realización de la presente invención proporciona un anticuerpo anti-VEGFR-1 de la presente invención con un agente antineoplásico o antiangiogénico para su uso en el tratamiento de una afección médica. El anticuerpo anti-VEGFR-1 puede estar unido químicamente o biosintéticamente a uno o más de los agentes antineoplásicos o antiangiogénicos.

Se puede usar cualquier agente antineoplásico adecuado, tal como un agente quimioterapéutico o radiación. Los ejemplos de agentes quimioterapéuticos incluyen, pero sin limitación, cisplatino, doxorubicina, ciclofosfamida, paclitaxel, irinotecan (CPT-11), topotecan o una combinación de estos. Cuando el agente antineoplásico es radiación, la fuente de radiación puede ser bien externa (terapia de haz de radiación externa-EBRT) o interna (braquiterapia-BT) al paciente que se trata.

Además, los anticuerpos anti-VEGFR-1 de la presente invención se pueden administrar con anticuerpos que neutralicen otros receptores involucrados en el crecimiento tumoral o angiogénesis. Un ejemplo de dicho receptor es VEGFR-2/KDR. En una realización, se usa un anticuerpo anti-VEGFR-1 de la presente invención en combinación con un antagonista del receptor que se une específicamente a VEGFR-2. Particularmente preferidas son proteínas de unión antigénica que se unen al dominio extracelular de VEGFR-2 y bloquean la unión mediante uno cualquiera de sus ligandos, tales como VEGF(A), VEGF-C, VEGF-D, o VEGF-E.

Otro ejemplo de dicho receptor es VEGFR. En una realización de la presente invención, se usa un anticuerpo anti-VEGFR-1 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 de EGFR incluyen, por ejemplo, EGF, TGF- $\alpha$  anfibregulina, heparina unida a EGF (HB-EGF) y betarreculina. Se piensa que el EGF y el TGF- $\alpha$  son los ligandos endógenos principales que dan como resultado la estimulación mediada por EGFR, aunque el TGF- $\alpha$  ha mostrado ser más fuerte para promover la angiogénesis. Se debe apreciar que el antagonista de EGFR se puede unir externamente a la parte extracelular de EGFR, lo que puede o no inhibir la unión del ligando, o internamente al dominio de la tirosín quinasa. Los ejemplos de antagonistas de EGFR que se unen a EGFR incluyen, sin limitación, moléculas biológicas, tales como anticuerpos (y los equivalentes funcionales de estos) específicos para EGFR, y moléculas pequeñas, tales como inhibidores sintéticos de quinasas que actúan directamente en el dominio citoplasmático de EGFR.

Otros ejemplos de receptores de factores de crecimiento implicados en la tumorigénesis son los receptores del factor

de crecimiento derivado de plaquetas (PDGFR), el factor de crecimiento insulínico (IGFR), el factor de crecimiento nervioso (NGFR), y el factor de crecimiento de fibroblastos (FGFR).

En una realización alternativa adicional, la presente divulgación proporciona un anticuerpo anti-VEGFR-1 de la presente invención en combinación con uno o más adyuvantes adecuados, tales como, por ejemplo, citocinas (IL-10 y ML-13, por ejemplo) u otros estimuladores inmunitarios, para su uso en el tratamiento de una afección médica.

En una terapia de combinación,, el anticuerpo anti-VEGFR-1 puede administrarse antes, durante, o después de comenzar la terapia con otro agente, así como cualquier combinación de estas, es decir, antes y durante, antes y después, durante y después, o antes, durante y después de comenzar la terapia con el agente antineoplásico. Por ejemplo, un anticuerpo anti-VEGFR-1 de la presente invención puede administrarse entre 1 y 30 días antes, preferentemente 3 y 20 días, más preferentemente entre 5 y 12 días antes de comenzar la radioterapia. Sin embargo, la presente invención, no se limita a ningún régimen de administración particular. La dosis del otro agente administrado depende de numerosos factores, incluyendo, por ejemplo, el tipo de agente, el tipo y gravedad de la afección médica que se trata y la de la vía de administración del agente. Sin embargo, la presente invención no se limita a ninguna dosis en particular.

Se puede usar cualquier procedimiento o vía adecuado para administrar un anticuerpo anti-VEGFR-1 de la presente invención, y opcionalmente, co-administrar agentes antineoplásicos y/o antagonistas de otros receptores. Las vías de administración incluyen, por ejemplo, administración oral, intravenosa, intraperitoneal, subcutánea, o intramuscular. Sin embargo, cabe destacar que, la presente invención no se limita a ningún procedimiento o vía de administración particular.

Se observa que un anticuerpo anti-VEGFR-1 de la presente invención puede administrarse como un conjugado, que se une específicamente al receptor y libera una carga útil tóxica, letal, seguido de la internalización del ligando-toxina.

Se entiende que los anticuerpos anti-VEGFR-1 de la invención, que se usaron en un mamífero para el propósito de profilaxis o tratamiento, se administrarán en forma de una composición que adicionalmente comprende un transportador farmacéuticamente aceptable. Los transportadores farmacéuticamente aceptables incluyen, por ejemplo, uno o más de agua, suero salino, fosfato salino tamponado, dextrosa, glicerol, etanol y similares, así como combinaciones de estos. Los transportadores farmacéuticamente aceptables pueden comprender además cantidades menores de sustancias auxiliares tales como agentes humectantes o emulsionantes, conservantes o tampones, que potencian la semivida o efectividad de las proteínas de unión. Las composiciones de la inyección pueden, tal como se conoce en la técnica, formularse de modo que proporcionen una liberación rápida, sostenida o retardada del principio activo después de la administración al mamífero.

Aunque los anticuerpos humanos de la invención son particularmente útiles para la administración a seres humanos, pueden administrarse también a otros mamíferos. El término "mamífero" tal como se usa en el presente documento pretende incluir, pero no se limita a, seres humanos, animales de laboratorio, animales domésticos y animales de granja.

La presente invención también incluye kits para inhibir el crecimiento tumoral y/o la angiogénesis que comprenden una cantidad terapéuticamente efectiva de anticuerpo anti-VEGFR-1 de la presente invención. Los kits pueden contener además cualquier antagonista adecuado de, por ejemplo, otro receptor de factor de crecimiento implicado en tumorigénesis o angiogénesis (por ejemplo, VEGFR-2/FKDR, EGFR, PDGFR, IGFR, NGFR, FGFR, etc, tal como se describe anteriormente). Como alternativa, o adicionalmente, los kits de la presente invención pueden comprender además un agente antineoplásico. En el presente documento se han descrito ejemplos de agentes antineoplásicos adecuados en el contexto de la presente invención. Los kits de la presente invención, así como comprender además un adyuvante, ejemplos de los cuales se han descrito anteriormente.

En otra realización, la presente invención proporciona procedimientos de investigación o diagnóstico que usan anticuerpos anti-VEGFR-1 de la presente invención *in vivo* o *in vitro*. En dichos procedimientos, los anticuerpos anti-VEGFR-1 pueden estar ligados a fracciones diana o indicadoras.

### Ejemplos

Los siguientes ejemplos no incluyen descripciones detalladas de procedimientos convencionales, tales como aquellos empleados en la construcción de vectores y plásmidos, la inserción de genes codificantes de polipéptidos en dichos vectores y plásmidos, o la introducción de plásmidos en células huésped. Dichos procedimientos son bien conocidos por los expertos habituales en la materia y se describen en numerosas publicaciones incluyendo Sambrook, J., Fritsch, E.F. y Maniatis, T. (1989), A Laboratory Manual, 2ª edición, Cold Spring Harbor Laboratory Press.

### Materiales

Todos los reactivos y compuestos químicos se adquirieron en Sigma (San Luis, MO) a menos que se indique lo contrario. Las proteínas VEGF165 humana y fosfatasa alcalina de VEGFR-1 soluble recombinante humana

(rhuVEGFR-1 AP) se expresaron en células transfectadas de manera estable y se purificaron del sobrenadante del cultivo celular siguiendo los procedimientos conocidos por un experto en la técnica (Tessler, J. Biol. Chem., 269:12456-12461 (1994)). Las proteínas P1GF y VEGFR-1 Fc recombinante soluble (rhuVEGFR-1 Fc) se adquirieron en (R&D Systems Inc. Minneapolis, MN). El material de cultivo celular y las placas de ensayo se adquirieron en (BD Biosciences, Bedford, MA).

#### *Líneas celulares*

Las líneas celulares humanas de cáncer de mama DU4475, MDA-MB-231, MDA-MB-435, y las líneas celulares de mieloma de ratón P3-X63-Ag8.653 y NS0 se obtuvieron de la "American Type Tissue Culture Collection" (Manassas, VA). La línea celular transfectante P3-X63-Ag8.653 Bcl/2 se creó en el laboratorio tal como se describe anteriormente (Ray S, Diamond B. Proc Natl Acad Sci EE.UU. 91:5548-51, 1994). Las células tumorales se mantuvieron en medio RPMI1640 (Invitrogen/Life Technologies, Inc., Rockville, MD) que contenía FCS al 10% (Hyclone, Logan, UT). La línea celular endotelial de aorta porcina que expresaba VEGFR-1 la proporcionó el Dr. L. Claesson-Welsh, Uppsala University, y se cultivó en medio F12 (Invitrogen/Life Technologies, Inc., Rockville, MD) que contenía FCS al 10% (Hyclone, Logan, UT). Todas las células se mantuvieron a 37 °C, en una atmósfera humidificada, con CO<sub>2</sub> al 5%

#### **Ejemplo 1:** Generación de anticuerpos anti-VEGFR-1

Los anticuerpos monoclonales anti-VEGFR-1 humanos (citados en el presente documento como "anticuerpos anti-VEGFR-1") se generaron por medio de una tecnología de hibridoma convencional (Harlow & Lane, ed., Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor, 211-213 (1998), que se incorpora en el presente documento por referencia) usando ratones transgénicos KM (Medarex, San Jose, Calif.), que producen cadenas pesadas gamma y ligeras kappa de la inmunoglobulina humana. Los ratones KM se inmunizaron por vía subcutánea (s.c.) con el fragmento de cristalización (Fc) de VEGFR-1 en adyuvante completo de Freund. Se reforzó a los animales por vía intraperitoneal (i.p.) tres veces con la misma proteína VEGFR-1 en adyuvante incompleto de Freund antes de la infusión. Los animales descansaron durante un mes antes de recibir el último refuerzo por vía i.p. de 25 microgramos de proteína VEGFR-1 en solución de tampón fosfato salino (PBS).

Cuatro días después, se recogieron los esplenocitos del ratón inmunizado y se fusionaron con células transfectantes de plasmacitoma P3-X63-Ag8.653 Bcl-2 usando polietilenglicol (PEG; PM; 1450 KD). Después de la fusión, las células se resuspendieron en medio HAT (hipoxantina, aminopterina, timidina) complementado con suero bovino fetal (FBS) al 10% y se distribuyeron en placas de 96 pocillos a una densidad de 200 microlitros por pocillo para el establecimiento de células de hibridoma. El día 6 después de la fusión, se aspiraron 100 microlitros de medio y se reemplazaron por 100 microlitros de medio reciente.

#### **Ejemplo 2A:** Los anticuerpos Anti-VEGFR-1 del ejemplo 1 se unen a VEGFR-1 e inhiben la unión de VEGFR-1 a sus ligandos

##### *a. Ensayos de unión y bloqueo de VEGFR-1*

El día 10-12 después de la fusión, se exploró la producción de anticuerpos de los hibridomas y la actividad de unión específica del sobrenadante del cultivo con la proteína rhuVEGFR-1 en ensayos de unión y de bloqueo basados en ELISA. Los hibridomas positivos se subclonaron tres veces mediante cultivo en dilución limitante para el establecimiento de hibridomas monoclonales.

Concretamente, se diluyeron los sobrenadantes de hibridoma o anticuerpos purificados en PBS con FBS al 5% y Tween 20 al 0,05 % (tampón de ELISA) y se incubaron en placas de microtitulación de 96 pocillos recubiertas con rhuVEGFR-1 AP o AP durante 30 minutos. Las placas se lavaron con el tampón de ELISA y se incubaron con IgG de cabra anti-ratón conjugada con peroxidasa de rábano picante (HRP) (Bio-Source International, Camarillo, CA) durante 30 minutos. Se usó el sustrato TMB (3,3', 5,5'-tetra-metilbencidina) (Kierkegaard and Perry Lab, Inc., Gaitersburgo, MD) para revelar el color siguiendo las instrucciones del fabricante. Se leyó la absorbancia a 450 nanómetros nm para la cuantificación de la actividad de unión de los anticuerpos. Para la identificación de los hibridomas que producían anticuerpos anti-VEGFR-1, los sobrenadantes de los hibridomas se pre-incubaron con VEGFR-1 AP durante una hora. Las mezclas se incubaron con el tampón de ELISA en placas de microtitulación de 96 pocillos recubiertas de VEGF o P1GF durante 1 hora. Se usó el sustrato PNPP (p-nitrofenilfosfato) para AP para revelar el color siguiendo las instrucciones del fabricante. Se leyó la absorbancia a 405 nm para la cuantificación de la actividad de unión de VEGFR-1 a VEGF o P1GF. Los valores de densidad óptica (D.O.) se leyeron en un lector de placas de microtitulación (Molecular Devices Corp., Sunnyvale, CA). La DE50 y CI50 de los anticuerpos se analizaron usando el programa informático GraphPad Prism 3 (GraphPad Software, Inc., San Diego, CA).

La figura 3 muestra la actividad de unión de los anticuerpos purificados producidos a partir de los hibridomas denominados como "6F9", "13G12", "15F11," y "18F1." Estos anticuerpos presentaron una actividad de unión con una DE50 DE 0,1-0,3 nM en el ensayo de unión basado en ELISA. Las figuras 4 y 5 muestran respectivamente que los clones 6F9, 13G12, 15F11, 18F1 bloquearon eficazmente la unión de P1GF a VEGFR-1 con un valor CI50 de 0,4-0,8 nM y la unión de VEGF a VEGFR-1 con un valor CI50 de 0,7-0,8 nM. Las características de unión y bloqueo de los anticuerpos se resumen en la tabla 4.

| Tabla 4- Características de unión y bloqueo de los anticuerpos anti-VEGFR-1 |                           |                              |
|-----------------------------------------------------------------------------|---------------------------|------------------------------|
| Clon                                                                        | Actividad de unión (DE50) | Actividad de bloqueo (CI50)  |
| 6F9                                                                         | 0,1 nM                    | 0,86 nM P1GF<br>0,82 nM VEGF |
| 13G12                                                                       | 0,3 nM                    | 0,82 nM P1GF<br>0,70 nM VEGF |
| 15F11                                                                       | 0,3 nM                    | 0,49 nM P1GF<br>0,73 nM VEGF |
| 18F1                                                                        | 0,1 nM                    | 0,55 nM P1GF<br>0,84 nM VEGF |

*b. Medición de la afinidad de los anticuerpos anti-VEGFR-1*

- 5 Las afinidades de los clones de anticuerpo anti-VEGFR-1 6F9, 13G12, 15F11, 18F1 se determinaron por tecnología de resonancia de plasmón usando BIAcore 2000 (Pharmacia, Piscataway, NY) de acuerdo con los procedimientos proporcionados por el fabricante. Los análisis cinéticos de los anticuerpos se realizaron por inmovilización del dominio extracelular recombinante de VEGFR-1 en una superficie detectora a una baja densidad. Las constantes de asociación ( $k_{on}$ ) y de disociación ( $k_{off}$ ) se determinaron usando el programa informático BIAevaluation 2.1 proporcionado por el fabricante.
- 10 Los clones de anticuerpo Anti-VEGFR-1 6F9, 13G12, F11, y 18F1 presentaron una alta afinidad, con un valor  $K_D$  de 69, 121, 70, y 54 pM, respectivamente. Las cinéticas de los anticuerpos se resumen en la tabla 5.

| Tabla 5 - Cinéticas de los anticuerpos anti-VEGFR-1 humanos |          |           |        |
|-------------------------------------------------------------|----------|-----------|--------|
| Clon                                                        | Kon      | Koff      | $K_D$  |
| 6F9                                                         | 1,01e6 M | 7,38e-5 M | 69 pM  |
| 13G12                                                       | 0,95e6 M | 10,9e-5 M | 121 pM |
| 15F11                                                       | 1,02e6 M | 7,16e-5 M | 70 pM  |
| 18F1                                                        | 0,81e6 M | 4,27e-5 M | 54 pM  |

*c. Evaluación de la especificidad del anticuerpo Anti-VEGFR-1*

- 15 Para determinar la especificidad de un anticuerpo monoclonal anti-VEGFR-1 contra el VEGFR-1 humano, se ensayaron anticuerpos 18F1 purificados en un ensayo basado en ELISA. Se recubrieron placas de microtitulación de 96 pocillos con un  $\mu\text{g/ml}$  de VEGFR-1 Fc recombinante humano, de VEGFR-1 Fc de ratón, VEGFR-2 Fc de ratón, o fosfatasa alcalina de VEGFR-2 humana con PBS, toda la noche a 4 °C. Después de lavar, las placas recubiertas con receptor se bloquearon con PBS que contenía leche en polvo al 5% y Tween 20 al 0,05 %. Las placas recubiertas con receptor se incubaron con diluciones en serie de anticuerpo primario 18F1 contra VEGFR-1 humano, MF1 contra VEGFR-1 de ratón, 1C11 contra VEGFR-2 humano, o DC101 contra VEGFR-2 de ratón en durante 30 minutos.
- 20 Después de lavar se incubaron las placas con anticuerpos secundarios anti-primarios conjugados con HRP durante 30 minutos. Se lavaron las placas y se incubaron con el sustrato TMB (3,3', 5,5'-tetra-metilbencidina) para revelar el color. Se leyó la absorbancia a 450 nm como valores de D.O. para la cuantificación de la actividad de unión de los anticuerpos. Los datos se analizaron usando un programa informático GraphPad Prism.
- 25 **Las figuras 6 A-D** muestran la especificidad del anticuerpo monoclonal 18F1 contra VEGFR-1 humano (**Figura 6A**), y que el anticuerpo no tiene reactividad cruzada con el VEGFR-1 de ratón (Figura 6B), VEGFR-2 humano (Figura 6C) y VEGFR-2 de ratón (Figura 6D). Los resultados indican que el anticuerpo anti-VEGFR-1 humano 18F1 tiene una especificidad de unión estricta con su respectivo receptor.

*d. Transferencia de Western*

- 30 Se cultivaron células endoteliales de aorta porcina confluentes que expresaban VEGFR-1 (PAE-VEGFR-1) y células BT474 de carcinoma de mama humano en medio F12 reducido en suero durante 48 h. Después, las células se pre-

incubaron con el clon 18F1 de anticuerpo anti-VEGFR-1 a concentraciones que variaban de 0,1 to 30 µg/ml durante 1 hora seguido de estimulación con VEGF o P1GF durante 5 minutos a 37 °C. Después se aclararon las células con PBS enfriado en hielo y se lisaron en tampón de lisis (HEPES 50 mM, NaCl 150 mM, Triton X-100 al 1%, y glicerol al 10 % que contenía fluoruro de fenilmetilsulfonilo 1 mM, aprotina 10 µg/ml, leupeptina 10 µg/ml, y vanadato de sodio 1mM). Los lisados celulares se sometieron a SDS-PAGE y se transfirieron a membranas Inmobilon (Millipore Corp. Billerica, MA). Después de la transferencia, las manchas se incubaron con la solución de bloqueo y se analizaron con anticuerpo antifosfotirosina (PY20, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA) seguido de lavado. Los contenidos de proteína se visualizaron usando anticuerpos secundarios conjugados con peroxidasa de rábano picante seguido de un potenciador de quimioluminiscencia (Amersham Pharmacia Biotech, Piscataway, NY). Se usó un anticuerpo anti-VEGFR-1 específico para volver a transferir el VEGFR-1.

Todos los anticuerpos anti-VEGFR-1 reconocieron una molécula de proteína recombinante VEGFR-1 de 180 KD.

#### **Ejemplo 2B:** El anticuerpo anti-VEGFR-1 anti-humano es específico para el VEGFR-1 humano

Se recubrieron las placas de 96 tiras-pocillos con HuVEGFR-1-Fc, VEGFR-1-AP de ratón (ImClone Systems) o huVEGFR-2-AP (ImClone Systems) (100 ng/pocillo) y se bloquearon con leche al 5 % /PBS. La unión de 18F1 y otros anticuerpos de VEGFR-1 anti-humanos o un anticuerpo de VEGFR-1 anti-ratón, MF1 (ImClone Systems, ref. 18), a placas con VEGFR-1 o VEGFR-2 unido se evaluó como se describe anteriormente para la exploración de los sobrenadantes de los hibridomas, exceptuando que la unión del anticuerpo se detectó con un anticuerpo de cabra anti-kappa humano conjugado con HRP (BioSource International, Camarillo, CA) para 18F1 y anticuerpo anti-VEGFR-2 humano 1C11, o un anticuerpo de cabra anti-IgG-de rata conjugado con HRP (BioSource International) para MF1.

8F1 mostró una reactividad específica con VEGFR-1 humano (**Figura 32A**) pero no reactividad cruzada con VEGFR-1 de ratón (**Figura 32B**) y VEGFR-2 humano (**Figura 32C**). El anticuerpo de bloqueo de VEGFR-1 anti-ratón MF1 también demostró ser específico de especie, uniéndose al VEGFR-1 de ratón (**Figura 32B**), pero no al humano (**Figura 32A**).

#### **Ejemplo 3:** Los anticuerpos anti-VEGFR-1 se unen a VEGFR-1 nativo en células que expresan VEGFR-1

##### *a. Análisis por citometría de flujo*

Se recogieron alícuotas de  $10^6$  células PAE-VEGFR-1 de cultivos subconfluentes y se incubaron con los clones de anticuerpo anti-VEGFR-1, 6F9, 13G12, F11, y 18F1 en PBS con albúmina de suero bovino (BSA) al 1 % y azida sódica al 0,02 % (tampón de tinción) durante una hora en hielo. Se recogieron alícuotas de  $10^6$  células DU4475 de carcinoma de mama humano de cultivos subconfluentes y se incubaron con el clon de anticuerpo anti-VEGFR-1 18F1 en PBS con albúmina de suero bovino (BSA) al 1 % y azida sódica al 0,02 % (tampón de tinción) durante una hora en hielo. Se usó un isotipo IgG coincidente (Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA) como control negativo. Se lavaron las células dos veces con tampón de flujo y después se incubaron con un anticuerpo de cabra anti- IgG humana marcado con isotiocianato de fluoresceína (FITC) (Biosource Internacional, Camarillo, CA) en tampón de tinción durante 30 minutos en hielo. Se lavaron las células como se indicó anteriormente y se analizaron en un citómetro de flujo Epics XL (Beckman-Coulter, Hialeah, FL). Las células muertas y los residuos se eliminaron del análisis en base a la dispersión de la luz directa y lateral. Las unidades de intensidad de fluorescencia media (UIM) se calcularon como la media logarítmica de la fluorescencia multiplicada por el porcentaje de población positiva.

La **figura 7** muestra la reactividad de unión de los clones 6F9, 13G12, 15F11 y 18F1 con células que expresan PAE-VEGFR-1. Las **figuras 8A y 8B** muestran la reactividad de unión del clon 18F1 con células que expresan PAE-VEGFR-1 y DU4475 de carcinoma de mama humano, respectivamente. Estos resultados indican que los anticuerpos anti-VEGFR humanos se unen al VEGFR-1 nativo expresado en la superficie celular.

##### *b. Ensayo de bloqueo de VEGFR-1 en la superficie*

La unión de  $^{125}$ I-VEGF a VEGFR-1 en la superficie celular se realizó usando células que expresaban PAE-VEGFR-1. Las células crecieron en placas de cultivos celulares de plástico no recubiertas, de las que se descubrió que disminuían la unión inespecífica sin afectar la unión específica de  $^{125}$ I-VEGF. Las células confluentes se incubaron en suero y crecieron en medio Eagle modificado por Dulbecco (DMEM)/medio F-12 (Invitrogen, Carlsbad, CA) sin complemento durante 24 horas. Las células se aclararon una vez con medio DMEM/F-12 enfriado en hielo que contenía HEPES 0,025 M y 1 mg/ml de albúmina de suero bovino (BSA). A cada pocillo en la placa, se añadió una dilución en serie de anticuerpo anti-VEGFR-1 18F1 o VEGF frío a la concentración de un exceso molar de 200 veces de VEGF marcado y se incubó a 4 °C durante 1 hora. Después de lavar, se añadió  $^{125}$ I-VEGF a la concentración de 2 ng/ml y se incubó a 4 °C durante 2 horas en una plataforma de agitación. Las células se lavaron tres veces con PBS que contenía BSA 1 mg/ml y  $\text{CaCl}_2$  0,25 mM, y se incubaron durante 5 minutos en presencia de Triton X-100 al 1 %, BSA 1 mg/ml y  $\text{NaN}_3$  al 0,16 % para eliminar el VEGF unido. El contenido soluble de cada pocillo se contó en un contador gamma. Los ensayos se realizaron por triplicado en al menos tres experimentos independientes y los datos se analizaron usando el programa informático Prism GraphPad 3.03.

La **figura 9** muestra la fuerte actividad de bloqueo del anticuerpo anti-VEGFR-1 18F1 que impide drásticamente la unión del VEGFR-1 nativo al  $^{125}\text{I}$ -VEGF en las células endoteliales de aorta porcina.

**Ejemplo 4: Los anticuerpos anti-VEGFR-1 inhiben la autofosforilación de VEGFR-1 y la activación de MAPK y Akt en respuesta a VEGF y PIGF**

*a. Ensayo de fosforilación de VEGFR-1*

La autofosforilación del VEGFR-1 inducida por sus ligandos y la activación resultante de una MAPK clásica, las proteínas quinasas reguladas por la señal extracelular 1/2 (ERK 1/2) y las rutas de señalización aguas abajo de PI3K/Akt, median las respuestas biológicas celulares tales como la proliferación, motilidad, supervivencia y diferenciación. La habilidad de un anticuerpo anti-VEGFR-1 para inhibir la fosforilación de VEGFR-1 y la activación de ERK1/2 y la señalización aguas abajo de las quinasas Akt, se determinaron usando las células transfectantes PAE-VEGFR-1 y BT474 de carcinoma de mama.

Se sembraron células PAE-VEGFR-1 y BT474 a una densidad de  $5 \times 10^5$ /pocillo en placas de 100 o 150 mm<sup>2</sup> y se cultivaron en medio aséptico durante 18-48 horas. Después de reemplazar el medio de cultivo, las células se trataron a 37 °C con los clones de anticuerpos anti-VEGFR-1 6F9, 15F11, y 18F1 o el control de isotipo durante 1 hora y después se incubaron con 50 ng/ml de VEGF o 100 ng/ml de P1GF durante 10 minutos. Después de los tratamientos, los extractos de la proteína total se aislaron de las células con tampón de lisis [HEPES 20 mM (pH 7,4), MgCl<sub>2</sub> 10 mM, MnCl<sub>2</sub> 2 mM Triton X-100 al 0,05 %, y DTT 1 mM], y se inmunoprecipitaron con anticuerpo anti-VEGFR-1 (C-17, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA). La transferencia de Western del VEGFR-1 fosforilado se detectó usando anticuerpo anti-fosfo-quinasa (PY-20, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA). Las proteínas se detectaron usando un sistema de quimioluminiscencia electrogenerada (ECL), Amersham Pharmacia Biotech, Piscataway, NY), y se cuantificaron por densitometría usando formación de imágenes del NIH (National Institute of Mental Health, Bethesda, MD).

*b. Ensayo de quinasas in vitro*

Para evaluar la fosforilación de MAPK y Akt, células BT474 se sembraron a una densidad de  $5 \times 10^5$ /pocillos en placas de 12 pocillos en condiciones asépticas durante 18 horas. Las células se trataron a 37 °C con el clon de anticuerpo anti-VEGFR-1 18F1 o el control de isotipo durante 1 hora y después se incubaron con 50 ng/ml de VEGF o 100 ng/ml de P1GF durante 5-10 minutos. Se realizaron la lisis celular, el aislamiento de proteínas y la electrotransferencia. Las membranas se incubaron con anticuerpos contra MAP quinasas fosforiladas P44/p42 (Thr202/Tyr204, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA) o Akt fosforilada (Ser473, Cell Signaling Technology, Beverly, MA), a una concentración de 1 µg/ml, seguido de una incubación con una IgG secundaria conjugada con (1:5000). Para garantizar la misma carga de las muestras, las membranas se separaron y volvieron a explorarse con anticuerpos anti-p42/p44 (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA) o anti-Akt (Cell Signaling Technology, Beverly, MA).

*c. Resultados*

Tal como se muestra en las **Figuras 10-14** se indujo una fosforilación significativa de VEGFR-1 y una activación de la señalización de ERK1/2 y Akt en las células transfectantes PAE-VEGFR-1 y BT474 de cáncer de mama por estimulación con VEGF y P1GF, sugiriendo la actividad intrínseca del VEGFR-1 y el receptor asociado a las rutas de señalización aguas abajo de las quinasas tanto en células de cáncer de mama como en células endoteliales. Tal como se muestra en las **Figuras 10 y 11**, respectivamente, el tratamiento con el anticuerpo anti-VEGFR-1 18F1 redujo significativamente la fosforilación de VEGFR-1 estimulada por P1GF o VEGF en comparación con el control no tratado en células transfectantes PAE-VEGFR-1 y BT474 de cáncer de mama. Tal como se muestra en las **Figuras 12 y 13** respectivamente, el tratamiento con los anticuerpos anti-VEGFR-1 15F11 y 6F9 también inhibió drásticamente la activación de la señalización aguas abajo de ERK1/2 inducida por P1GF y VEGF en células transfectantes PAE-VEGFR-1. La activación de la proteína quinasa Akt es un importante evento de señalización intracelular que media la supervivencia celular en cáncer de mama. Tal como se muestra en las **Figuras 14A y B** respectivamente, el tratamiento con el anticuerpo anti-VEGFR-1 18F1 inhibió drásticamente la activación inducida por P1GF y VEGF de la señalización aguas abajo de ERK 1/2 inducida por P1GF y VEGF en células transfectantes PAE-VEGFR-1. Tal como se muestra en la **Figura 15**, el anticuerpo anti-VEGFR-1 18F1 bloqueó significativamente la fosforilación de Akt estimulada por P1GF en células BT474 de cáncer de mama. Estos resultados demostraron que el tratamiento con los anticuerpos anti-VEGFR-1 es efectivo para inhibir la activación del VEGFR-1 y las rutas de señalización aguas abajo de las quinasas tanto en células de cáncer de mama como en endoteliales.

**Ejemplo 5: Los anticuerpos anti-VEGFR-1 bloquean el crecimiento *in vitro* de células tumorales mamarias**

La hipoxia tumoral está asociada con potenciación de la progresión neoplásica, incremento de la agresividad y resistencia a fármacos quimioterapéuticos. Las células tumorales hipóxicas sufren respuestas biológicas que activan rutas de señalización para la supervivencia y proliferación por regulación positiva de una variedad de expresiones génicas incluyendo el VEGFR-1 (Harris AL. Nat Rev Cancer. 2:38-47, 2002).

### Ensayo de crecimiento celular

Se sembraron células de carcinoma DU4475 a una densidad  $5 \times 10^3$ /pocillo en placas de 96 pocillos en condiciones asépticas durante 18 horas, y en algún caso seguido de tratamiento con 100 mM de desferrioxamina durante 5 horas más. El efecto inhibitor del anticuerpo anti-VEGFR-1 en el crecimiento de las células tumorales se determinó incubando las células con los clones de anticuerpo anti-VEGFR-1 6F9, 13G12, 15F11, y 18F1 a dosis de 3, 10, y 30  $\mu\text{g/ml}$  en presencia de 50 ng/ml de VEGF o 200 ng/ml de P1GF durante 48 horas. Después se contaron las células viables por triplicado usando un citómetro Coulter (Coulter Electronics Ltd. Luton, Beds, Inglaterra). Cada experimento se realizó por triplicado.

La tasa de crecimiento de las células tumorales DU4475 previamente tratadas con desferrioxamina, un agente que imita las condiciones de hipoxia, aumentó aproximadamente 2 veces en respuesta a la estimulación bien con VEGF o con P1GF. Tal como se muestra en las **Figuras 16 y 17** respectivamente, el tratamiento con los anticuerpos anti-VEGFR-1 redujo eficazmente la proliferación estimulada por VEGF y P1GF de las células de carcinoma de mama DU4475, de una manera dependiente de la dosis. La **Figuras 18A y B** representan por separado la concentración del clon de anticuerpo 18F1 frente al recuento celular de la proliferación estimulada por VEGF y P1GF de las células de carcinoma de mama DU4475. La inhibición del crecimiento *in vitro* inducido por P1GF de las células DU4475 mediante los anticuerpos anti-VEGFR-1, tal como se representa en los valores de CI50, se resume en la tabla 6.

| Tabla 6 - Inhibición del crecimiento <i>in vitro</i> inducido por P1GF de células DU4475 |                                     |
|------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------|
| Clon                                                                                     | crecimiento celular <i>in vitro</i> |
| 6F9                                                                                      | CI50: 43 nM                         |
| 13G12                                                                                    | CI50: 66 nM                         |
| 15F11                                                                                    | CI50: 44 nM                         |
| 18F1                                                                                     | CI50: 24 Nm                         |

### Ejemplo 6A: Los anticuerpos anti-VEGFR-1 suprimen el crecimiento de xenoinjertos de tumores de mama

#### Tratamiento de xenoinjertos de carcinoma de mama humano

La eficacia antitumoral de los anticuerpos anti-VEGFR-1 se ensayó en los modelos de xenoinjerto de tumor humano de mama.

Ratones atímicos desnudos (Charles River Laboratories, Wilmington, MA) recibieron una inyección subcutánea en la zona del flanco izquierdo de  $2 \times 10^6$  células DU4475 o  $5 \times 10^6$  células MDA-MB-231 y MDA-MB-435 mezcladas en Matrigel (Collaborative Research Biochemicals, Bedford, MA). En los modelos DU4475 y MDA-MB-231, a los tumores se les permitió alcanzar un tamaño de aproximadamente  $200 \text{ mm}^3$  y después se los ratones se asignaron al azar en grupos de 12-16 animales por grupo. Los animales recibieron una administración i.p. de los clones de anticuerpo anti-VEGFR-1 6F9, 15F11, o 18F1 a una dosis de 0,5 mg (MDA-MB-231) o 1 mg (DU4475) tres veces a la semana. En el modelo MDA-MB-435, las células tumorales se implantaron subcutáneamente en la zona del pániculo adiposo mamario del ratón. Después de que los tumores crecieran hasta alcanzar un tamaño de aproximadamente  $200 \text{ mm}^3$  los ratones se asignaron al azar en grupos de 15 animales por grupo y recibieron 0,5 mg por dosis de anticuerpo 18F1 por vía intraperitoneal tres veces a la semana. Los ratones de los grupos control recibieron el mismo volumen de solución salina. El tratamiento de los animales fue continuado durante el experimento. Los tumores se midieron dos veces a la semana con calibres. Los volúmenes tumorales se calcularon usando la fórmula  $[\pi/6 (w1 \times w2 \times w2)]$ , en la que "w1" representa el diámetro tumoral más grande y "w2" representa el diámetro tumoral más pequeño.

Tal como se muestra en las **Figuras 19A y 19B**, la administración sistémica de los anticuerpos anti-VEGFR-1 6F9, 15F11, 13G12 y 18F1 a una dosis de 1 mg por dosis tres veces a la semana condujo a una supresión del crecimiento tumoral estadísticamente significativa del xenoinjerto DU4475 ( $p < 0,05$ ). Tal como se muestra en las **Figuras 20 A, B, y C** respectivamente, la administración sistémica de anticuerpo anti-VEGFR-1 18F1 a una dosis de 0,5 o 1 mg por dosis tres veces a la semana condujo a una supresión del crecimiento tumoral estadísticamente significativa de los xenoinjertos DU4475, MDA-MB-231, MDA-MB-435 (ANOVA  $p < 0,05$ ). Tal como se muestra en las **Figuras 21A y B**, el tratamiento con el clon de anticuerpo 18F1 contra VEGFR-1 humano para inhibir el crecimiento de las células de cáncer y el clon MF1 contra VEGFR-1 de ratón para inhibir la angiogénesis tumoral a una dosis de 20 o 40 mg/kg dos veces a la semana dio como resultado una inhibición más fuerte del crecimiento tumoral en los modelos de xenoinjerto DU4475 y MDA-MB-231 ( $P < 0,05$ ) en comparación con el anticuerpo solo. Estos resultados demuestran que el bloqueo de la función *in vivo* de VEGFR-1 en la promoción directa del crecimiento de las células de cáncer y la modulación de la vascularización del tumor por el anticuerpo anti-VEGFR-1 es efectiva para suprimir el crecimiento de los tumores de mama VEGFR-1 positivos en modelos de xenoinjerto.

**Ejemplo 6B:** Los anticuerpos anti-VEGFR-1 anti-humanos bloquean el crecimiento *in vitro* de células de cáncer de mama

Se sembraron las células de carcinoma DU4475 ( $2 \times 10^4$  por pocillo) en placas de 24 pocillos en condiciones asépticas durante 18 horas y después se trataron con desferrioxamina, un agente que imita las condiciones de hipoxia, (Sigma) durante 6 horas más. A las placas se añadió una dilución en serie del anticuerpo anti- VEGFR-1 humano, 18F1, por triplicado y se incubó en presencia de 50 ng/ml de VEGF-A (R&D Systems) o 200 ng/ml de P1GF durante 48 horas. El número total de células (unidas y en suspensión) se determinó para cada pocillo usando un contador celular Coulter (Coulter Electronics Ltd., Inglaterra).

El tratamiento de IMC-18F1 bloqueó significativamente la proliferación estimulada por VEGF-A y P1GF de las células de carcinoma de mama DU447S (**Figura 31A y 31B**, respectivamente; CI50 estimada: 30-50 nM). El anticuerpo de control de isotipo no tuvo efecto sobre la proliferación celular. Por lo tanto, 18F1 inhibió la promoción de la proliferación/supervivencia de la célula tumoral inducida por ligando de VEGFR-1.

**Ejemplo 7:** El anticuerpo anti-VEGFR-1 inhibe la formación de colonias de células de cáncer de colon estimulada por VEGF-A y VEGF-B

Un ml de medio DMEM, que contenía FBS al 10 % y agarosa al 1 % (Cambrex Corporation, East Rutherford, NY) se sembró en placas en cada pocillo de placas de seis pocillos. Se trataron células HT-29 de carcinoma de colon humano en medio aséptico con 18F1 66 nM o control de IgG durante 1 hora y seguido de tratamiento con 10 ng/ml de VEGF-A o 50 ng/ml de VEGF-B durante 4 horas más. Las células tratadas se mezclaron con 1 ml de DMEM con FBS al 10 % de que contenía agarosa al 0,5 % y los anticuerpos y/o ligandos apropiados. Un ml de esta suspensión, que contenía 250 células, se sembró en placas en cada pocillo en la parte superior de la capa de agarosa al 1 % de la base. Después de 2 días, se añadió a los pocillos más medio que contenía anticuerpos y/o ligandos para mantener la agarosa hidratada. Se permitió que las células crecieran durante 14 días a 37 °C. Después, se contaron las colonias mayores de 50  $\mu$ m de diámetro usando un microscopio de disección. El análisis estadístico se realizó usando el programa informático estadístico InStat (V2.03, GraphPad Software, San Diego, CA)

El número y tamaño de las colonias se incrementó significativamente en los pocillos en los que las células se trataron con VEGF-A o VEGF-B en comparación con las células no tratadas solamente en medio completo. Tal como se muestra en la **Figura 22**, el tratamiento con 18F1 suprimió completamente la formación de colonias inducida por ligando en comparación con la actividad basal en ausencia de estimulación con ligandos ( $p < 0,03$ ) (Figura 22). Por lo tanto, tanto para las células adherentes como para las no adherentes, 18F1 tiene la capacidad de suprimir la supervivencia y el crecimiento de células tumorales.

**Ejemplo 8:** Los anticuerpos anti-VEGFR-1 inhiben la migración y la invasión de células de cáncer de colon inducida por VEGF-A y VEGF-B

Se incubaron células HT-29 ( $2,5 \times 10^4$ ) o células SW480 ( $1,5 \times 10^4$ ) en un medio que contenía FBS al 1% con el anticuerpo anti-VEGFR-1 18F1 (66 nM) en la superficie superior de una MATRIGEL™ de 24 pocillos, revestida (HT-29) o sin revestir (SW480) con un inserto de membrana con tamaño de poro de 8,0  $\mu$ m (Becton Dickinson Labware, Bedford, MA). Los insertos se colocaron en las cámaras inferiores que contenían 10 ng/ml de VEGF-A (R&D Systems) o 50 ng/ml de VEGF-B (R&D Systems) durante 48 horas. Las células que permanecían en la cámara superior de los insertos se eliminaron con un hisopo de algodón. Las células que migraron a la cara inferior de los insertos se tiñeron con Diff-Quik (Harleco, Gibbstown, NY) y se contaron en 10 campos aleatorios a X100 aumentos. El análisis estadístico se realizó usando el programa estadístico InStat (V2.03, GraphPad Software, San Diego, CA)

Tal como se muestra en las **Figuras 23A y 23B**, VEGF-A o VEGF-B indujeron la migración de las células HT-29 hacia el ligando a través de una membrana no revestida. Tal como se muestra en la **Figuras 24A y 24B**, estos ligandos también indujeron la invasión de células SW480 a través de una membrana recubierta con MATRIGEL™. 18F1 bloqueó completamente la migración e invasión inducida por ligando de VEGFR-1 en comparación con la actividad basal en ausencia de estimulación con ligandos ( $p < 0,05$ , **Figuras 23 y 24**). Por lo tanto, además de los efectos negativos sobre la proliferación celular y la supervivencia, 18F1 puede proporcionar un medio para inhibir la invasión y metástasis posterior de células tumorales.

**Ejemplo 9:** El tratamiento con anticuerpo específico anti-VEGFR-1 suprime el crecimiento *in vivo* de tumores de xenoinjerto humano que expresan VEGFR-1

Hembras de ratones atímicos nu/nu, de 6-8 semanas de vida, recibieron una inyección por vía subcutánea en la superficie dorso lateral de un volumen de 0,4 ml de una suspensión que contenía una línea celular tumoral humana en medio, diluido 1:1 con MATRIGEL™ (BD Bio-sciences). Las líneas celulares que se usaron en modelos de xenoinjerto, con las dosis celulares indicadas entre paréntesis ( $10^6$  células/ratón), fueron: líneas celulares de carcinoma de colon humano DLD-1 (5), GEO (5) y HT-29 (5); las líneas celulares de carcinoma de mama humano DU4475 (2), MDA-MB-231 (5), MDA-MB-435 (5), y BT474 (5). Cuando los tumores alcanzaron aproximadamente 200-300 mm<sup>3</sup>, los ratones se asignaron al azar por tamaño tumoral y se dividieron en grupos de tratamiento. El crecimiento tumoral se evaluó aproximadamente dos veces a la semana, calculando el volumen tumoral como  $\pi/6 *$

(Longitud\* Anchura<sup>2</sup>), en la que Longitud = diámetro más grande y Anchura = diámetro perpendicular a la Longitud. Las dimensiones tumorales se midieron con calibres. El % de T/C se calculó como  $100 * (\text{Volumen tumoral al final del tratamiento} / \text{Volumen tumoral al inicio del tratamiento}) / (\text{Volumen tumoral del control final} / \text{Volumen tumoral del control inicial})$ .

- 5 El 18F1 se diluyó en suero salino USP al 0,9 % (Braun) o en suero salino tamponado con fosfato (PBS) y se administró por vía peritoneal a un volumen de 0,5 ml por ratón. El efecto del tratamiento sobre el crecimiento tumoral se analizó usando el análisis de varianza de medidas repetidas (RM ANOVA),  $p < 0,05$  se consideró significativo.

10 Tal como se muestra en la **Figura 25**, la administración intraperitoneal de 18F1 suprimió significativamente ( $p < 0,05$ ) el crecimiento de tumores de xenoinjerto DU4475 (**Figura 25A**), MDA-MB-231, y MDA-MB-435 (**Figura 25B**). Tal como se muestra en la **Figura 26**, también se observó un efecto antitumoral significativo de la monoterapia con VEGFR-1 contra xenoinjertos de cáncer de colon HT-29 (**Figura 26A**), DLD-1 (**Figura 26B**), y GEO (**Figura 26C**). Estos resultados demuestran que el bloqueo del VEGFR-1 humano, suprime eficazmente el crecimiento de tumores de xenoinjertos establecidos con líneas celulares tumorales humanas que expresan VEGFR-1.

15 **Ejemplo 10: El tratamiento con Anti-VEGFR-1 humano inhibe *in vivo* las rutas de señalización de proliferación y supervivencia e induce apoptosis de las células tumorales.**

20 Xenoinjertos MDA-MB-231 incluidos en parafina se evaluaron inmunohistoquímicamente para marcadores de proliferación, supervivencia y apoptosis de células tumorales. Los marcadores de proliferación y supervivencia incluyeron Ki-67 (Acp de conejo; Lab Vision Corporation, Fremont, CA), p44/42 MAPK fosfoespecíficos (Thr202/Tyr204) (Acp de conejo; Cell Signaling Technology) y Akt fosfoespecífico (Ser473) (Acp de conejo; Cell Signaling Technology). Se usó el sistema EnVision+ para anticuerpos de conejo (DAKO Cytomation, Carpintería, CA) con 3,3' diaminobencidina (DAB) como cromógeno, según las instrucciones del kit. Después de una tinción con colorante de contraste breve en hematoxilina de Mayer todas las secciones se deshidrataron, se aclararon y se montaron en portaobjetos usando un medio de montaje permanente. La apoptosis tumoral se evaluó por el ensayo TUNEL usando el kit de detección de apoptosis *in situ* con peroxidasa ApopTag® (Chemicon, Temecula, CA) según las instrucciones del kit. Las secciones teñidas se montaron en portaobjetos con Gelmount (Biomedica, Foster City, CA). Se analizó la inmunotinción positiva y la inmunofluorescencia de TUNEL positiva y se tomaron imágenes usando un microscopio óptico Axioskop con una cámara digital Axiocam (Carl Zeiss, Alemania).

30 Tal como se muestra en la **Figura 27**, un marcador para células proliferantes (Ki-67) se redujo significativamente después de 14 días de tratamiento con 18F1 a 20 mg/kg (aproximadamente 0,5 mg/dosis en hembras de ratones atímicos nu/nu), 2x/semana (número de estudio 3067-04). Además, en este momento, el tratamiento con 18F1 dio como resultado una disminución marcada de la activación de MAPK (**Figura 27**). Después de 1 semana de tratamiento con 18F1 (0,5 mg/dosis, L-X-V), también se detectó un incremento de la apoptosis (**Figura 27**) tal como se midió por los eventos positivos para TUNEL y una disminución significativa de la fosforilación de Akt en tumores de xenoinjerto MDA-MB-231.

35 **Ejemplo 11: El bloqueo *in vivo* de VEGFR-1 tanto humano como murino conduce a una mayor actividad antitumoral contra xenoinjertos de carcinoma de mama humano**

40 El anticuerpo 18F1 se usó en combinación con MF1, un anticuerpo contra VEGFR-1 de ratón. El 18F1 se diluyó en suero salino USP al 0,9% (Braun) o en suero salino tamponado con fosfato (PBS) y se administró por vía intraperitoneal a un volumen de 0,5 ml por ratón. Se analizó el efecto del tratamiento sobre el crecimiento tumoral usando análisis de varianza de medidas repetidas (RM ANOVA),  $p < 0,05$  se consideró significativo. Tal como se muestra en la **Figura 28**, tanto en los modelos de xenoinjerto MDA-MB-231 (**Figura 28A**) como en DU4475 (**Figura 28B**), la inhibición del VEGFR-1 humano expresado por el tumor con 18F1 y del VEGFR-1 endógeno de ratón con MF1, dio como resultado una inhibición significativa del crecimiento tumoral ( $p < 0,05$ ). Se ha mostrado anteriormente que el anticuerpo MF1 inhibe el crecimiento tumoral a través de una reducción en la angiogénesis tumoral. La combinación de 18F1 y MF1 dio como resultado una inhibición significativamente mayor del crecimiento tumoral que con las monoterapias ( $p < 0,05$ ). La terapia combinada con 18F1 + MF1 no se asoció con pérdida de peso corporal. Estos datos confirman una inhibición dual de la vascularización tumoral y la proliferación y supervivencia de las células tumorales con el tratamiento con 18F1 en pacientes.

**Ejemplo 12: Anticuerpo anti-VEGFR-1 en combinación con agentes quimioterapéuticos**

50 18F1 + MF1 se combinaron con terapias citotóxicas, 5-fluorouracilo, leucovorina, y paclitaxel en el modelo MDA-MB-231. El 18F1 se diluyó en suero salino USP al 0,9 % (Braun) o en suero salino tamponado con fosfato (PBS). Los tratamientos con anticuerpo que se administraron a una dosis constante por ratón, se administraron a un volumen de 0,5 ml por ratón. Los tratamientos de anticuerpo y citotóxico que se administraron a una dosis proporcional al peso corporal, se dieron a un volumen de 10  $\mu$ l por gramo de peso corporal. El 5-Fluorouracilo y la leucovorina (5-FU/LV) se diluyeron por separado en suero salino USP y se dosificaron por separado. El paclitaxel se preparó bien en alcohol bencílico al 5 %, (Sigma), Cremofor EL al 5% (Sigma), y suero salino USP al 90 % o alcohol etílico al 5% (Sigma), Cremofor EL al 5 % y suero salino USP al 90%. La ciclofosfamida y la doxorubicina se disolvieron en suero salino USP para la dosificación. Todos los tratamientos se administraron por vía i.p. El efecto de los tratamientos

sobre el crecimiento tumoral se analizó usando el análisis de varianza de medidas repetidas (RM ANOVA),  $p < 0,05$  se consideró significativo.

Tal como se muestra en la **Figura 29**, en el modelo MDA-MB-231, la adición de 18F1 + MF1 a una dosis activa de terapia con ciclofosfamida incrementó significativamente el efecto antitumoral. Tal como se muestra en la **Figura 30**, cuando se administró la quimioterapia con 5-FU/LV y doxorubicina a ciertos niveles de dosis, 18F1 + MF1 incrementaron los efectos antitumorales de estas dos quimioterapias.

En el modelo de xenoinjerto DU4475, había una tendencia para la actividad incrementada (menor % de T/C) cuando IMC-18F1 + MF1 se combinaba con 5-FU/LV, doxorubicina y paclitaxel, a pesar de que el efecto no alcanzó un significado estadístico en comparación con el IMC-18F1 + MF1 solo, o la monoterapia con el agente citotóxico. En MDA-MB-231 este fue de nuevo el caso de la doxorubicina, a pesar de que para 5-FU/LV y paclitaxel no había una tendencia del incremento de la actividad con la combinación. La falta de aditividad puede deberse a los mínimos efectos del 5-FU/LV y el paclitaxel como monoterapias a los niveles de dosis seleccionados. La combinación con ciclofosfamida también incrementó la actividad en el modelo MDA-MB-435 (% de T/C = 51) en comparación con IMC-18F1 + MF1 solo (% de T/C = 60) o monoterapia con ciclofosfamida (% de T/C = 65), a pesar de que estas diferencias no alcanzaron significado estadístico. Este fue también el caso de la doxorubicina y el paclitaxel dentro del mismo estudio. Al igual que para los datos anteriores de MDA-MB-231 y MDA-MB-435, una combinación de IMC-18F1, MF1, y ciclofosfamida mostró un incremento de la actividad antitumoral en comparación con el anticuerpo o la terapia citotóxica sola en un modelo de xenoinjerto DU4475, aunque la tendencia no alcanzó significado estadístico.

#### Análisis estadístico

Los volúmenes tumorales y el análisis del crecimiento de las células tumorales *in vitro* se analizaron usando el ensayo de la *t* de Student usando el paquete estadístico SigmaStat (v. 2.03; Jandel Scientific, San Rafael, CA). Las diferencias de  $p < 0,05$  se consideraron estadísticamente significativas.

#### Ejemplo 13: Clonación y secuenciación de las regiones VH/VL de los anticuerpos anti-VEGFR-1

Se aisló ARNm de Poli (A+) de las células de hibridoma que producían los clones 6F9, 13G12, 15F11, y 18F1 procedentes de ratones KM inmunizados con VEGFR-1 usando un kit Fat-Track (Invitrogen, Carlsbad, CA). La generación del ADNc cebado aleatoriamente fue seguida por la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) usando un kit de Clontech. Se usaron cebadores (directo: 5'-ATGGAGTTTGGGCT-GAGCTG (SEC ID N°:29) e inverso: 3'-TGCCAGGGGGAAGACCOATGG) (SEC ID N°:30) y (directo: 5'-ATG GAA ACC CCA GCG CAG CTT CTC (SEC ID N°:31) e inverso: 3'-CGGGAAGATGAAGACAGATG) (SEC ID N°:32) para unirse a las regiones variables de las cadenas pesadas y kappa ligeras, respectivamente. Las secuencias de los transcritos de la cadena pesada y kappa procedentes de la inmunoglobulina humana de los hibridomas se obtuvieron por secuenciación directa de los productos de PCR generados a partir del ARN de poli (A+) usando los cebadores anteriormente descritos. También se clonaron los productos de PCR en pCR2.1 usando un kit de clonación TA Invitrogen, Carlsbad, CA) y ambas cadenas se secuenciaron usando kits de secuenciación Prism dye-terminator y un secuenciador ABI 3730 Sequencer (GENEW-IZ, North Brunswick, NY). Todas las secuencias se analizaron por alineamientos con el programa de secuenciación de anticuerpos Kataman usando el programa informático DNASTAR.

La tabla 2, anterior, muestra secuencias de aminoácidos de las regiones variables de las cadenas ligeras y pesadas de los clones de anticuerpo anti-VEGFR-1 6F9, 13G12, 15F11, y 18F1. Las secuencias de los dominios CDR1, CDR2, y CDR3 se indican con subrayado. La tabla 3, anterior, muestra las secuencias de nucleótidos de los ADNc que codifican las regiones variables de la cadena pesada y ligera de los clones 6F9, 13G12, 15F1 1, y 18F1.

#### Ejemplo 14: Modificación con ingeniería genética y expresión de anticuerpos de IgG1 anti-VEGFR-1 humanos

Las secuencias de ADN que codifican las regiones variables de la cadena pesada y ligera de los clones de anticuerpo anti-VEGFR-1 6F9, 13G12, 15F11, y 18F1, se amplificaron por PCR para la clonación en vectores de expresión. Las regiones variables de la cadena pesada se fusionaron en fase con la región constante de la cadena pesada gamma de la inmunoglobulina humana en el vector pEEo.1 (Lonza Biologies pic, Slough, Berkshire, GB). El ADNc completo de la cadena ligera humana se clonó directamente en el vector pEE12.1 (Lonza Biologies PLC, Slough, Berkshire, GB). Los vectores de expresión de inmunoglobulinas modificados genéticamente se transfectaron de forma estable en células NSO de mieloma por electroporación y se seleccionaron en medio de selección de glutamina sintetasa. Los clones estables se exploraron con respecto a la expresión de anticuerpos mediante un ELISA de unión específico para VEGFR-2 y Anti-Fc. Los clones positivos se expandieron en medio de cultivo aséptico para la producción de anticuerpos en matraces de centrifugación o en biorreactores durante un periodo de hasta dos semanas. El anticuerpo IgG1 de longitud completa se purificó por cromatografía de afinidad a proteína A (Poros A, PerSeptive Biosystems Inc., Foster City, CA) y se eluyó en una solución salina neutra tamponada.

# REIVINDICACIONES

1. Un anticuerpo monoclonal humano aislado o fragmento del mismo que se une específicamente a VEGFR-1 que comprende:

- 5 (i) la LCDR1 que tiene la secuencia SEC ID N°: 4;
- (ii) la LCDR2 que tiene la secuencia SEC ID N°: 2;
- (iii) la LCDR3 que tiene la secuencia SEC ID N°: 3;
- (iv) la HCDR1 que tiene la secuencia SEC ID N°: 11;
- 10 (v) la HCDR2 que tiene la secuencia SEC ID N°: 12; y
- (vi) la HCDR3 que tiene la secuencia SEC ID N°: 13.

2. Un polinucleótido aislado que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica el anticuerpo o el fragmento del mismo de la reivindicación 1.

3. Un polinucleótido aislado de acuerdo con la reivindicación 2 que comprende una secuencia de nucleótidos seleccionada del grupo que consiste en SEC ID N°: 23, y SEC ID N°: 27, codificando la secuencia de nucleótidos un anticuerpo o fragmento del mismo que se une específicamente a VEGFR-1.

4. Un vector de expresión que comprende la secuencia de polinucleótidos de la reivindicación 2 unida a una secuencia de expresión.

5. Una célula huésped recombinante que comprende el vector de expresión de la reivindicación 4.

6. La célula huésped recombinante de la reivindicación 5, en la que la célula expresa el anticuerpo o fragmento del mismo de la reivindicación 1.

7. Un procedimiento de producción de un anticuerpo o fragmento del mismo que comprende cultivar la célula de la reivindicación 5 en condiciones que permitan la expresión del anticuerpo o fragmento del mismo de la reivindicación 1.

8. Un anticuerpo monoclonal humano o fragmento del mismo de acuerdo con la reivindicación 1 para su uso en terapia.

9. Un anticuerpo monoclonal humano o fragmento del mismo de acuerdo con la reivindicación 1 para su uso en la inhibición de la angiogénesis en un mamífero.

10. Un anticuerpo monoclonal humano o fragmento del mismo de acuerdo con la reivindicación 1 para su uso en la reducción del crecimiento tumoral en un mamífero.

11. El anticuerpo monoclonal humano o fragmento del mismo de acuerdo con la reivindicación 1 para su uso de acuerdo con la reivindicación 10, en la que dicho uso comprende adicionalmente administrar un agente o tratamiento antineoplásico.

12. El anticuerpo monoclonal humano o fragmento del mismo de la reivindicación 1 para su uso de acuerdo con la reivindicación 10, en el que el tumor es un tumor de mama.

Figura 1. Secuencias de aminácidos de los anticuerpos anti-VEGFR-1 humanos

**6F9-Cadena ligera**

METPAQLLFLLLLWLPESTGEIVLTQSPGTLSPGERATLSCRASQSGSSSYLAWYQQKPGQAPRLLI  
Y

GASSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQYGSSPLTFGGGTKVEIKRTVAAPSVFIFP  
CDR2 CDR1 CDR3

**6F9-Cadena pesada**

MEFGLSWVFLVALLRGVQCQVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYGMHWVRQAPGKGLEW

VAVIWYDGSNKYYADSVKGRFTISRDNSKNTVYLQMNSLRAEDTAVYHCTRDHFGSGAHYYYYYGMD  
V

CDR2 CDR3  
WGQGTITVTVSS

**13G12-Cadena ligera**

METPAQLLFLLLLWLPESTGEIVLTQSPGTLSPGERATLSCRASQSGSSSYLAWYQQKPGQAPRLLI  
Y

GASSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQYGSSPLTFGGGTKVEIKRTVAAPSVFIFP  
CDR2 CDR1 CDR3

**13G12-Cadena pesada**

MEFGLSWVFLVALLRGVQCQVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYGMHWVRQAPGKGLEW

VAVIWYDGSNKYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDHYGSGAHYYYYYGMD  
V

CDR2 CDR3  
WGQGTITVTVSS

**15F11-Cadena ligera**

MEAPAQLLFLLLLWLPTDTGEIVLTQSPGTLSPGERATLSCRASQSVSSSYLAWYQQKPGQAPRLLIY

GASSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQYGSSPLTFGGGTRLEIKRTVAAPSVFIFP  
CDR2 CDR1 CDR3

**15F11-Cadena pesada**

MEFGLSWVFLVALLRGVQCQVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYGMHWVRQAPGKGLEW

VAVIWFDGSNKYYADSVKGRFTISRDN  
CDR2 SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDHYGSGAHYYYYGLDV  
CDR3

WGQGTITVTVSS

**18F1-Cadena ligera**

METPAQLLFLLLLWLPTDTGEIVLTQSPGTLSPGERATLSCRASQSVSSSYLAWYQQKPGQAPRLLIY

GASSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQYGSSPLTFGGGTKVEIKRTVAAPSVFIFP  
CDR2 CDR1 CDR3

**18F1-Cadena pesada**

MEFGLSWVFLVALLRGVQCQAVVESGGGVVQSGRSLRLSCAASGFAFSSYGMHWVRQAPGKGLEW

VAVIWYDGSNKYYADSVRGRFTISRDNSENTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDHYGSGVHHYFYGLDV  
CDR2 CDR1 CDR3

WGQGTITVTVSS

**Figura 2. Secuencias de nucleótidos de los anticuerpos anti-VEGFR-1 humanos**

6F9-Cadena ligera

ATGGAAACCCAGCGCAGCTTCTCTTCTCTCTGCTACTCTGGCTCCCAGAAAGCACCGGAGAAATTGTGTGACGC  
AGTCTCCAGGCACCTGTCTCTGTCTCCAGGGGAAGAGCCACCTCTCTCTCAGGGCCAGTCAGAGTGGTAGCAG  
CAGCTACTTAGCCTGGTACCAGCAGAAACCTGGCCAGGCTCCCAGGCTCCTCATCTATGGTGCATCCAGCAGGGCC  
ACTGGCATCCCAGAGAGTTTCAGTGGCAGTGGGTCTGGGCACAGACTTCACTCTCACCATCAGCAGACTGGAGCCTG  
AAGATTTTCAGTGTATGTGTGACGAGTATGGTAGCTCACCGCTCACTTTCGGCGGAGGACCAGGTGGAGAT  
CAAAACGAACTGTGGCTGCACCATCTGTCTTCATCTTCCCG

6F9 - Cadena pesada

ATGGAGTTTGGGCTGAGCTGGGTTTTCCTCGTTGCTCTTTTAAGAGGTGTCCAGTGT CAGGTGCAGCTGGTGGAGT  
CTGGGGGAGGCGTGTGTC CAGCCTGGGAGGTCCCTGAGACTCTCTGTGCAGCGTCTGGATTACCTTCAGTAGTTA  
TGGCATGCACTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGCAAGGGGCTGGAGTGGGTGGCAGTTATATGGTATGATGGAAGTAAT  
AAATACATCTGCAGACTCCGTGAAGGGCCGATTACCATTCTCCAGAGACAATCCAAGAACACGGTGTATCTGCAA  
TGAAACAGCTGAGAGCCGAGGACACGGCTGTGTATCACTGTACAGAGAGATCACTTTGGTTCGGGGGCTCACTACTA  
CTACTACTACGGTATGGACGTCTGGGGCCAAgGACCACGGTCAACCGTCTCTCTCA

13G12-Cadena ligera

ATGGAACCCAGCGCAGCTTCTCTCTCTCTGCTACTCTGGCTCCCAGAAAGCACCGGAGAAATTGTGTGACGC  
AGTCTCCAGGCACCGTGTCTTGTCTCCAGGGGAAAGAGCCACCGTCTCTGTCAGGGCCAGTCAGAGTGGTAGCAG  
CAGCTACTTAGCCTGGTACCAGCAGAAACCTGGCCAGGCTCCCAGGCTCCTCATCTATGGTGCATCCAGCAGGGCC  
ACTGGCATCCCAGACAGGTTTCAGTGGCAGTGGGTCTGGGACAGACTTCACCTCTACCATCAGCAGACTGGAGCCTG  
AAGATTGTTCAGTGTATTACTGTCAAGCAGTATGTAGCTACCCGCTCACTTTCGGCGGAGGACCAAGGTGGAGAT  
CAACCGTAATCTGGGCTGCACCATCTGCTCTTATCTCTCCCG

13G12-Cadena pesada

ATGGAGTTTGGGCTGAGCTGGGTTTTCTCGTTGCTCTTTTAAGAGGTGTCCAGTGTCCAGGTGCAGCTGGTGGAGT  
CTGGGGGAGGCGTGGTCCAGCCTGGGAGGTCCCTGAGACTCTCTGTGCAGCGTCTGGATTACCTTCAGTAGCTA  
TGGCATGCACTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGCAAGGGGCTGGAGTGGGTGGCAGTTATATGGTATGATGGAAGTAAT  
AAATACTATGCAGACTCCGTGAAGGGCCGATTACCATTCTCCAGAGACAATCCAAGAACACGCTGTATCTGCAA  
TGAACAGCTCTGAGAGCCGAGGACACGGCTGTGTATTACTGTGCGAGAGATCACTATGTTCTGGGGGCTCACTACTA  
CTACTACTACGGTATGAGCGTCTGGGGCCAAGGGACCACgGTCCACCGTCTCTCA

**15F11-Cadena ligera**

ATGGAAGCCCCAGCGCAGCCTTCTCTTCTCTCTGCTACTCTGGCTCCAGATACCACCGGAGAAATTGTGTTGACGC  
AGTCTCCAGGCACCCCTGTCTTTGTCTCCAGGGGAAGAGGCCACCCCTCTCTGTCAGGGCCAGTCAGAGTGTTAGCAG  
CAGCTACTTAGCCTGGTACCAGCAGAAACCTGGCCAGGCTCCAGGGCTCCTCATCTATGGTGCATCCAGCAGGGCC  
ACTGGCATCCAGACAGGTTTCAGTGGCAGTGGGTCTGGGACAGACTTCACCTCTACCATCAGCAGACTGGAGCCTG  
AAGATTTTGCAGTGTATTACTGTCAAGCATATGTTAGCTCACCTCTCACCTTCGGCCCAAGGGACACGACTGGAGAT  
TAACCGAACTCTGGGCTGCACCATCTCTTTCATCTTCCCCG

15F11-Cadena pesada

ATGGAGTTTGGGCTGAGCTGGGTTTTCCTCGTTGCTCTTTTAAGAGGTGTCCAGTGT CAGGTGCAGCTGGTGGAGT  
CTGGGGGAGGCGTGGTCCAGCCTGGGAGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCGTCTGGATTACCTTCAGTAGCTA  
TGGCATGCACTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGCAAGGGGCTGGAGTGGGTGGCAATTATATGTTTGTATGGAAGTAAT  
AAATACTATGCAGACTCCGTGAAGGGCCGATTACCATTCTCCAGAGACAATTCCAAGAACACGCTGTATCTGCAA  
TGAACAGCCTGAGAGCGGAGGACCGGTGTGTATTACTGTGCGAGAGATCACTATGTTCCGGGGGCTCACTCCTA  
CTACTACTACGGTTTGGACGTTTGGGGCCAAGGACCTCGGTGCACCGTCTCTCTCA

**18F1-Cadena ligera**

ATGGAAACCCAGCGCAGCTTCTCTTCTCTGCTACTCTGGCTCCCAGATACCACCGGAGAAATTGTGTTGACGC  
AGTCTCCAGGCACCCCTGTCTTTGTCTCCAGGGGAAAGAGCCACCCCTCTCCTGCAGGGCCAGTCAGAGTGTTAGCAG  
CAGCTACTTAGCCTGGTACCAGCAGAAACCTGGCCAGGCTCCCAGGCTCCTCATCTATGGTGATCCAGCAGGGCC  
ACTGGCATCCCAGACAGGTTCAGTGGCAGTGGGTCCTGGGACAGACTTCACTCTCACCATCAGCAGACTGGAGCCTG  
AAGATTTTGCAGTGTAATTACTGTCAAGCATCTGTAGTGCATACCCGCTCACTTTCGGCGGAGGGACCAAGGTGGAGAT  
CAAAACGAATCTGGGCTGCACCATCTGCTTCACTCTTCCG

**18F1-Cadena pesada**

ATGGAGTTTGGGCTGAGCTGGGTTTTCTCGTTGCTCTTTTAAGAGGTGTCCAGTGTACGGCGCAGGTGGTGGAGT  
CTGGGGGAGGCGTGGTCCAGTCTGGGAGGTCCCTGAGACTCTCTGTGCAGCGTCTGGATTGCGCTTCAGTAGCTA  
CGGCATGCACTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGCAAGGGGCTGGAGTGGGTGGCAGTTATATGTTATGATGGAAGTAAT  
AAATACTATGCAGACTCCGTGAGGGGCCGATTCCACTCTCCAGAGACAATCCCGAGAACACGCTGTATCTGCAA  
TGAACAGCTTGAGAGCCGAGACACCGTCTATATTACTGTGCCAGAGATCATATGGTTCCGGGGGTGCACCACTA  
TTTCTACTACGGTCTGGAGCGTCTGGGGCCAAGGACCAAGTACCGTCTCTCTCA

Figura 3

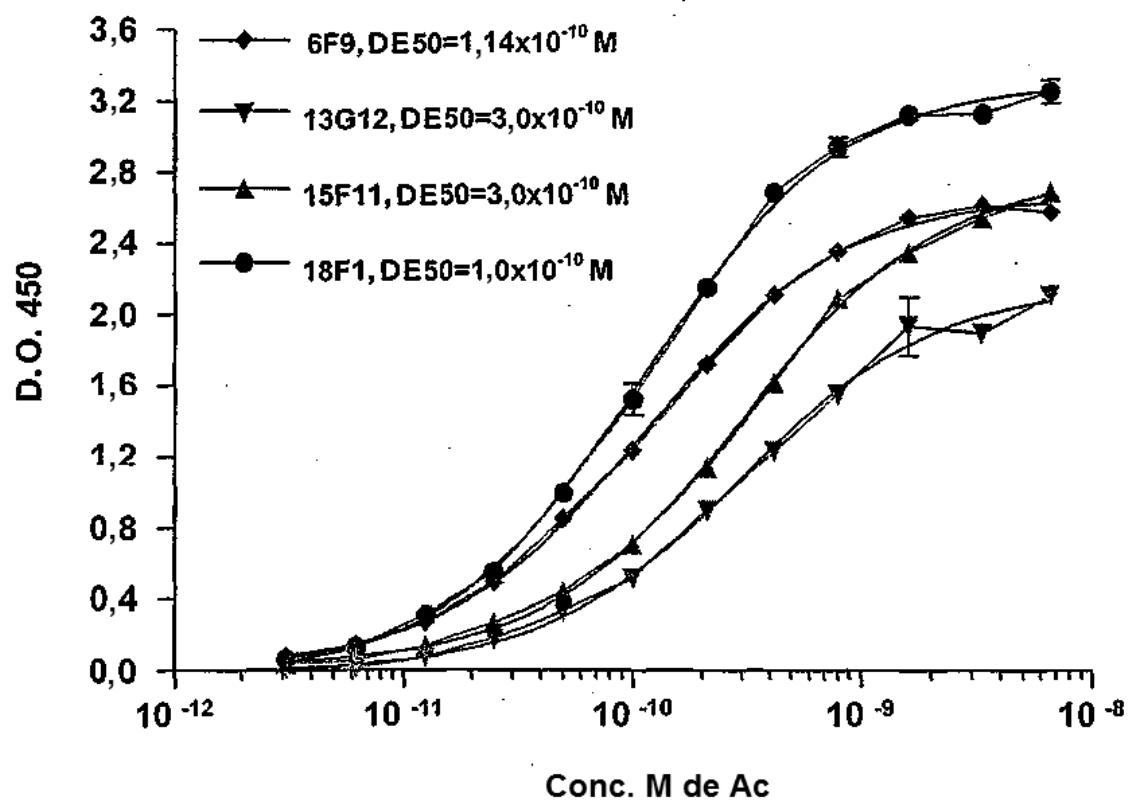


Figura 4

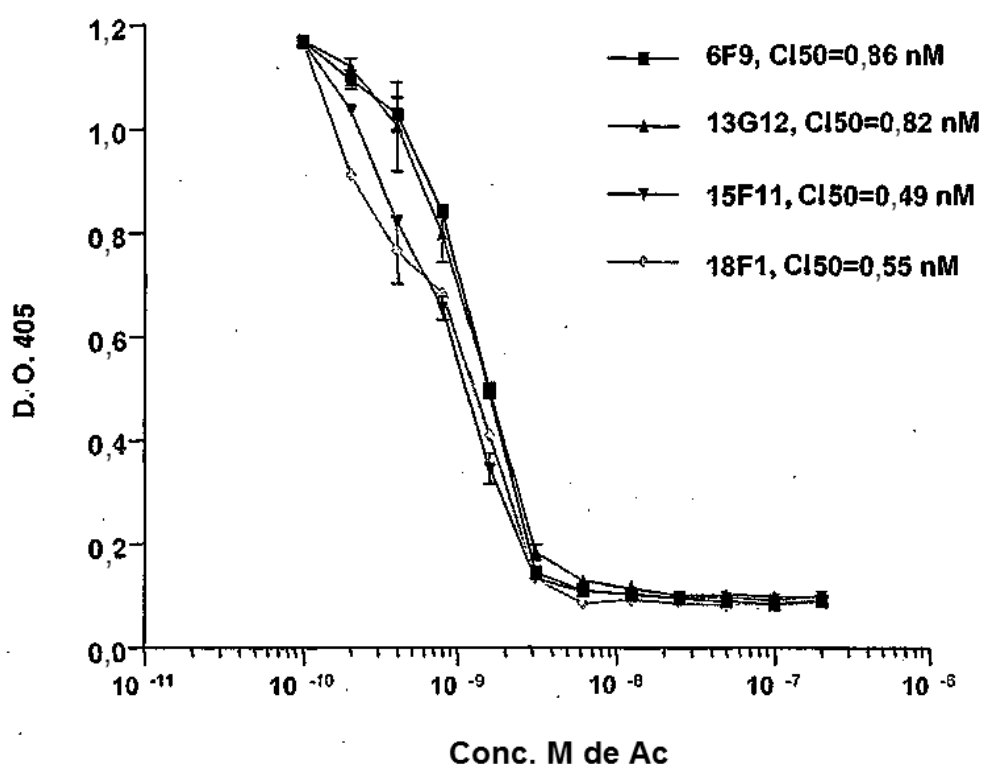


Figura 5

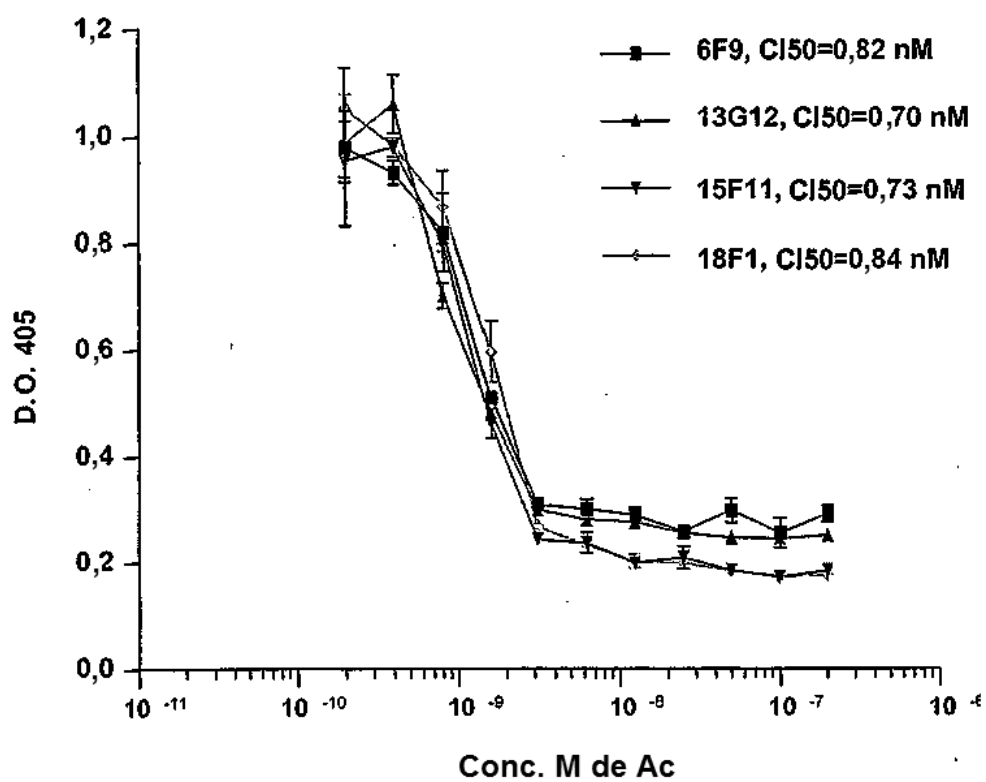


Figura 6

Figura 6A

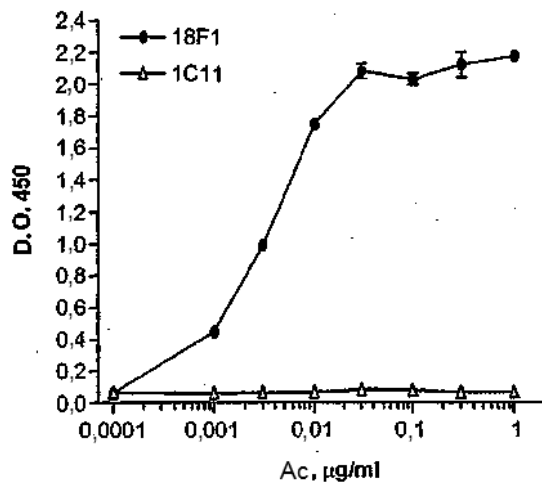


Figura 6B

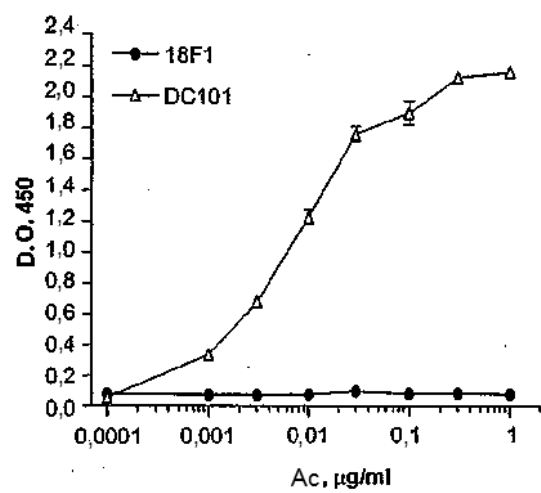
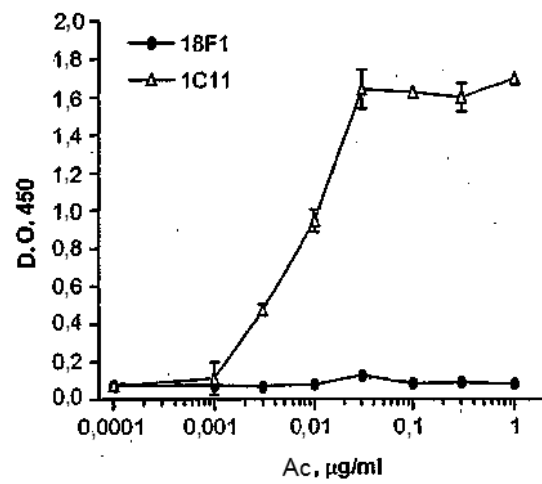
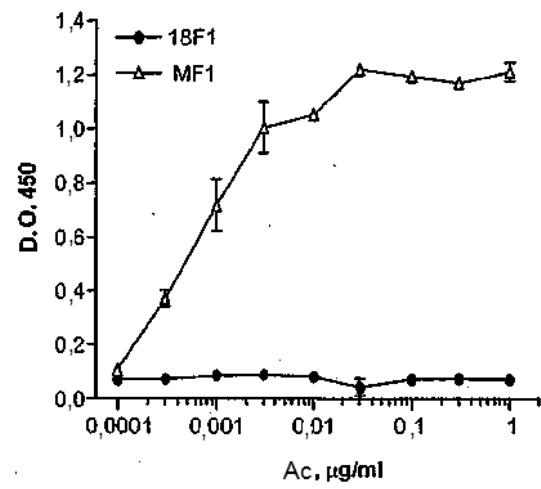


Figura 6C

Figura 6D

Figura 7

Figura 7A

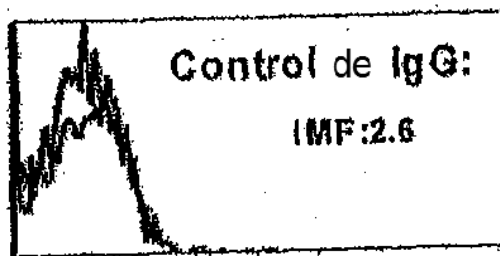


Figura 7B

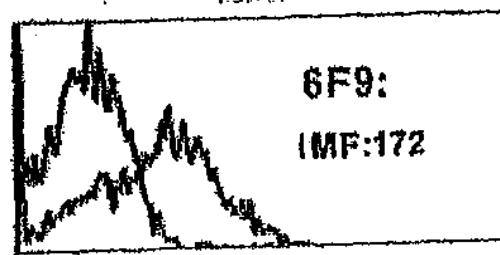


Figura 7C

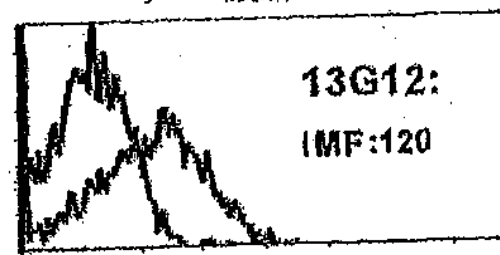


Figura 7D

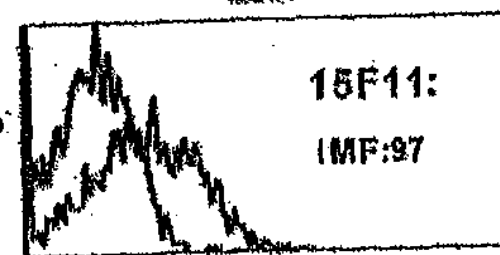


Figura 7E

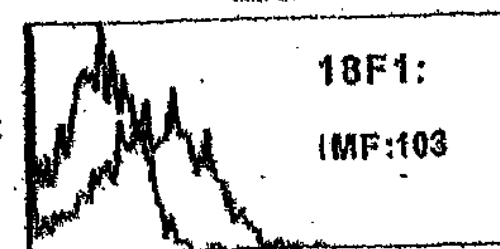
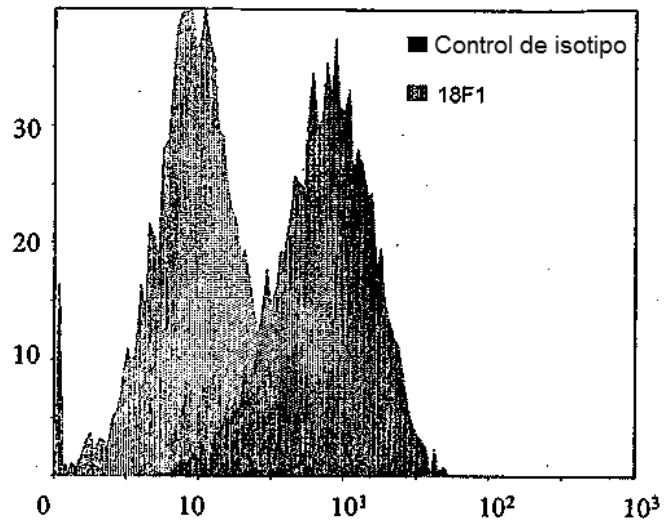


Figura 8

Células PAE-VEGFR-1

Figura de superposición 1

Figura 8A



Células tumorales DU4475

Figura de superposición 1

Figura 8B

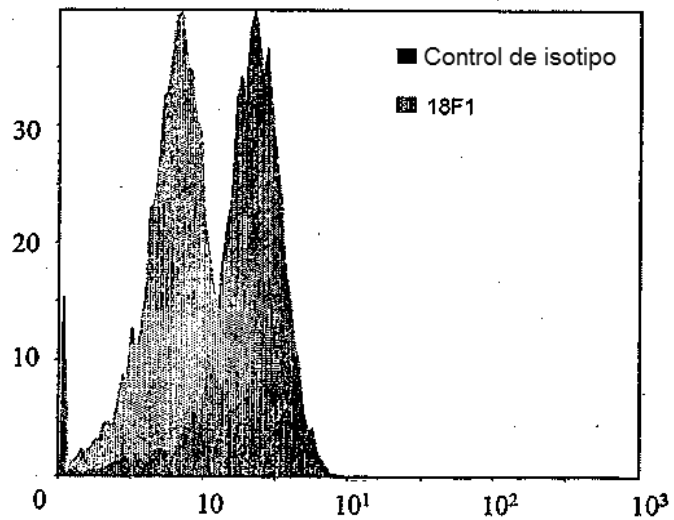


Figura 9

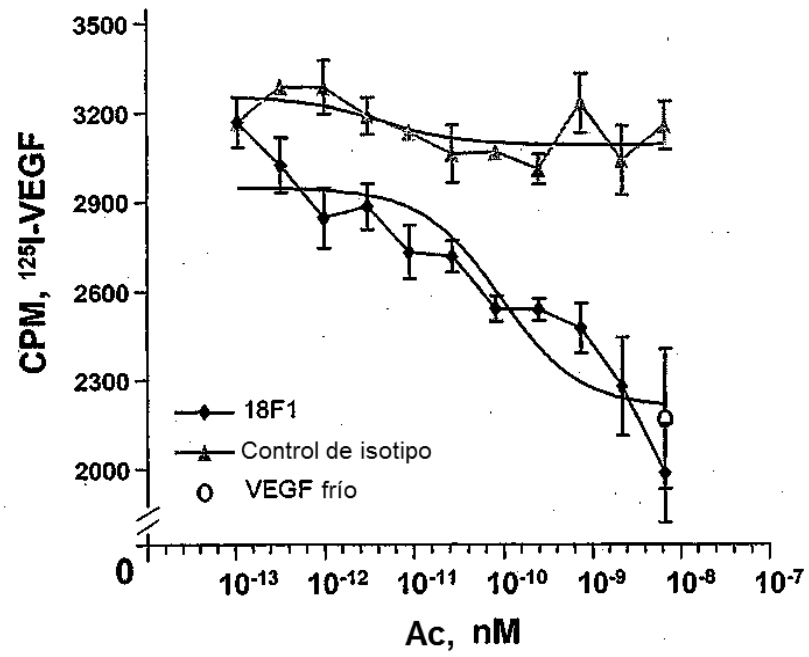


Figura 10

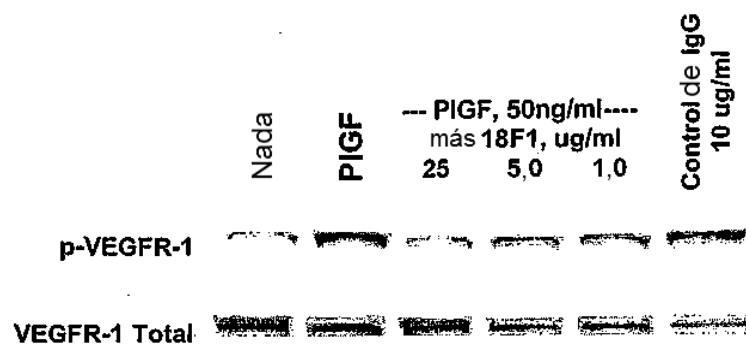


Figura 11

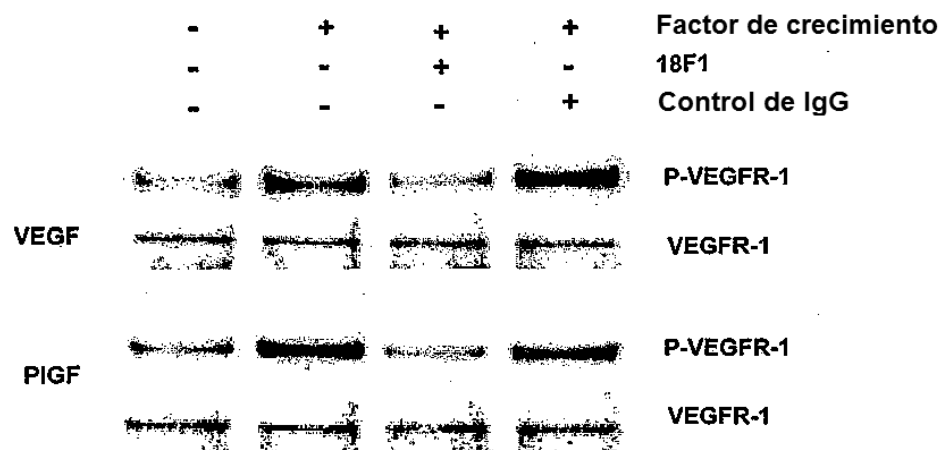


Figura 12

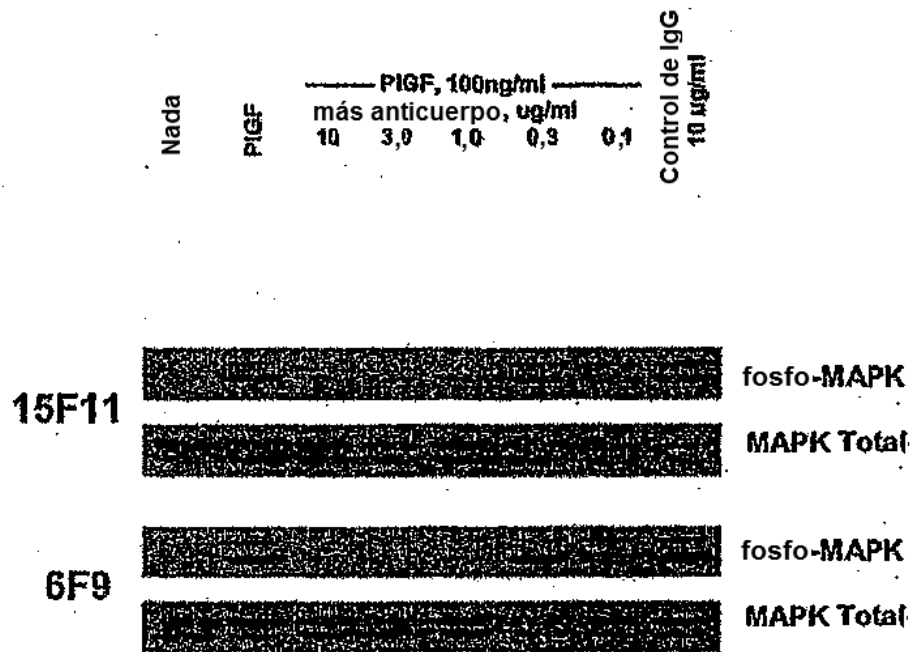
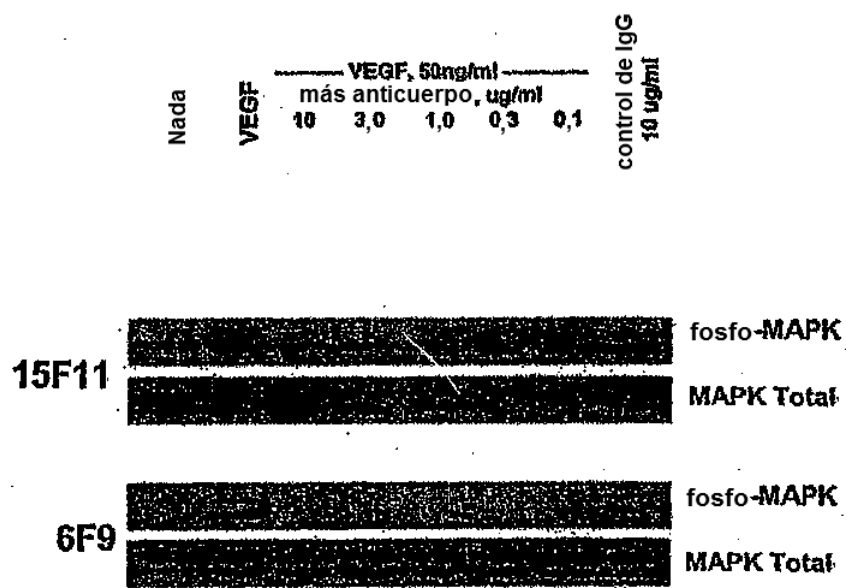


Figura 13



**Figura 14**

Figura 14A

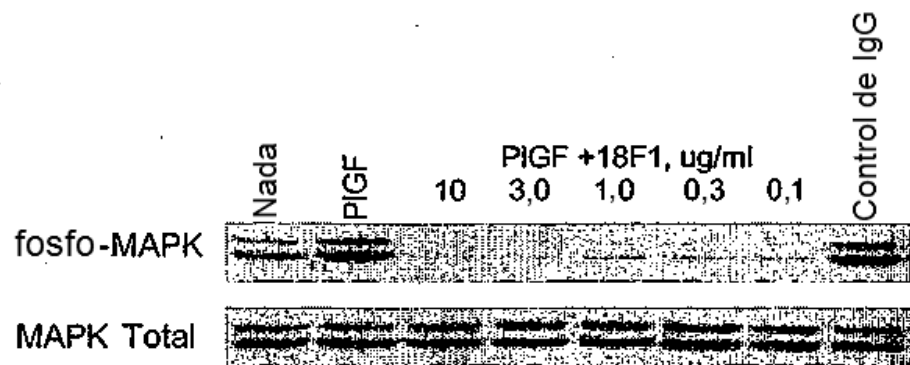
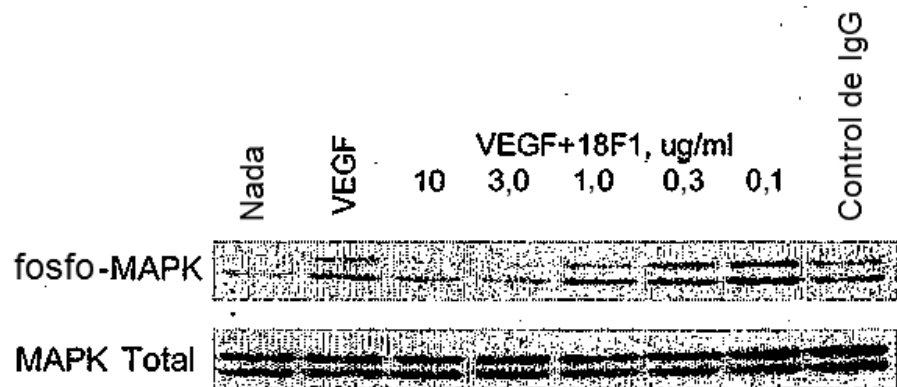


Figura 14B



**Figura 15**

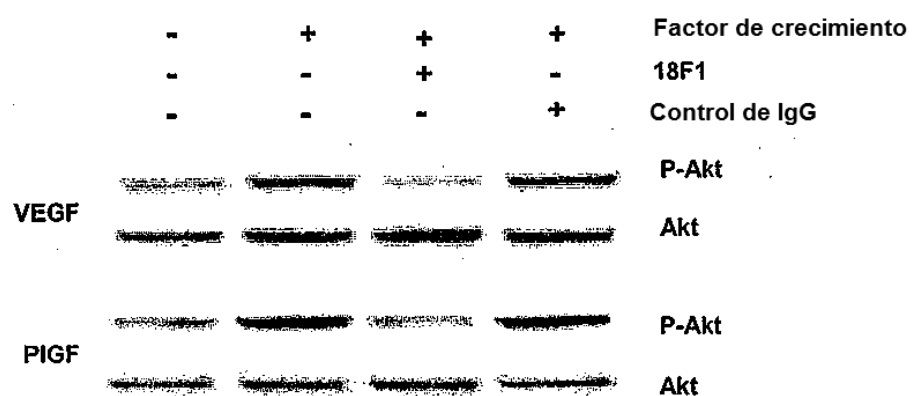


Figura 16

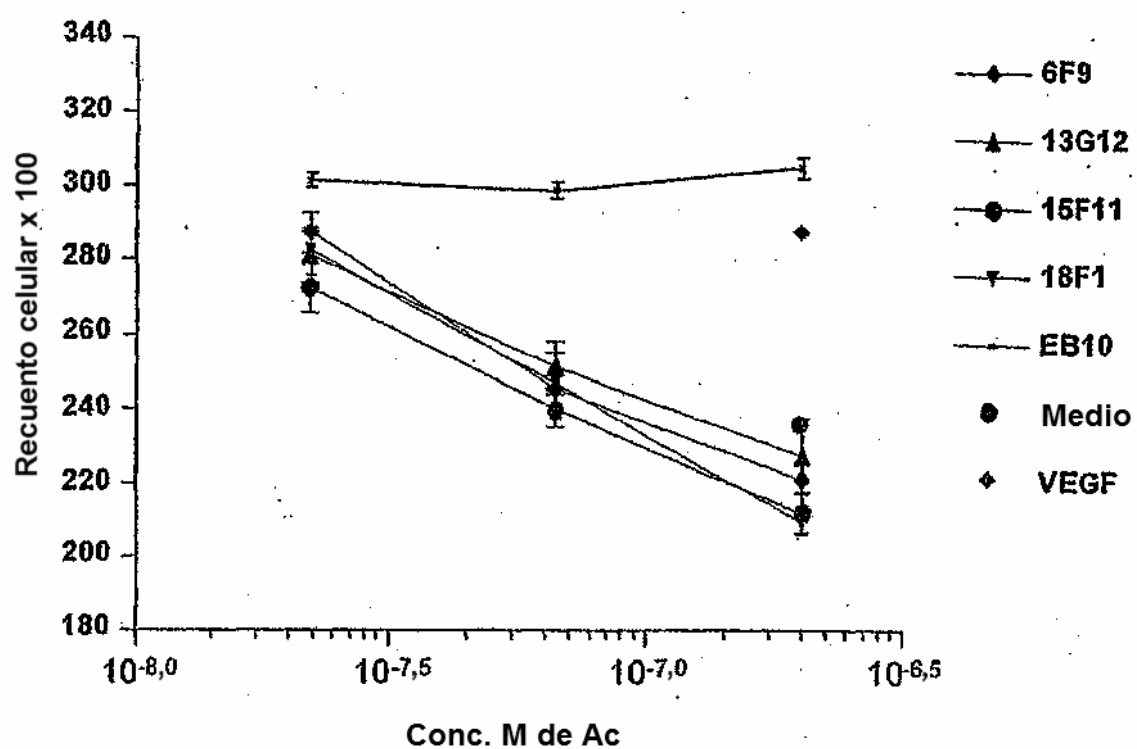
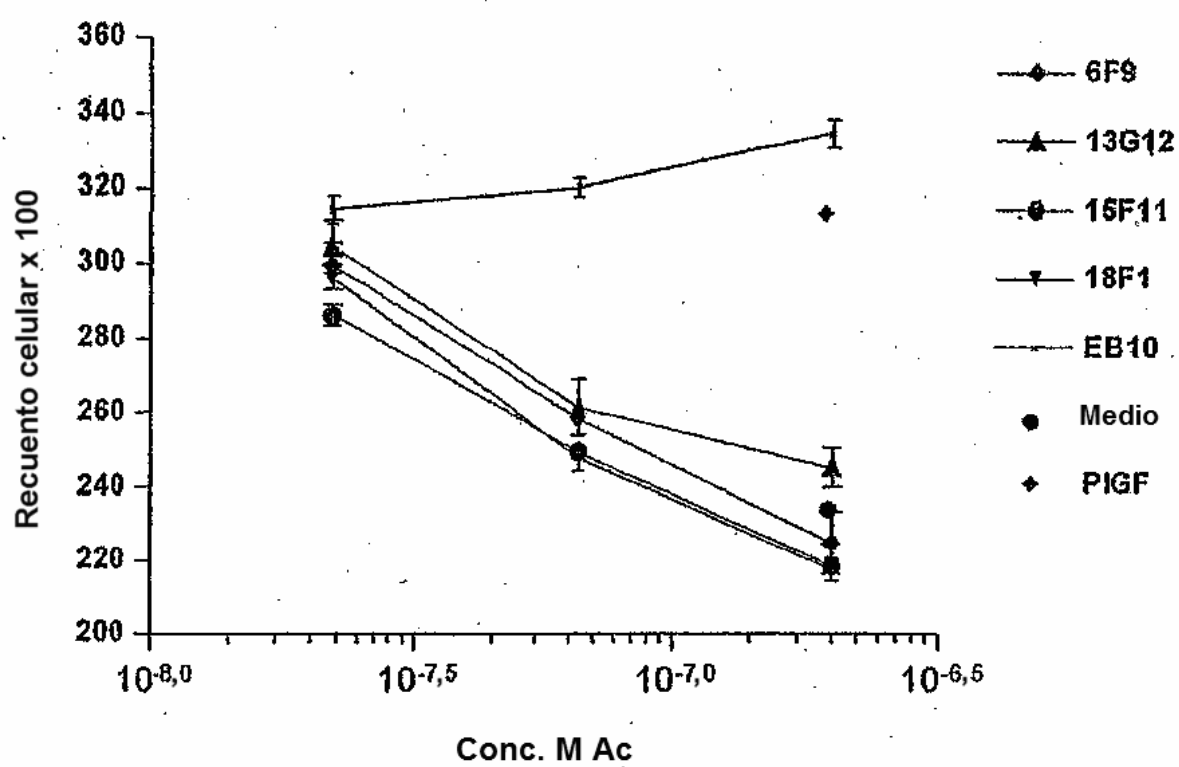


Figura 17



**Figura 18**

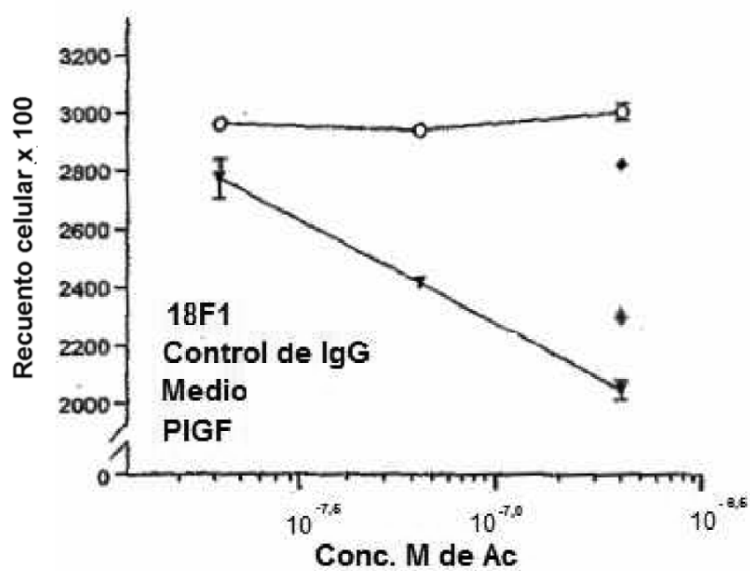
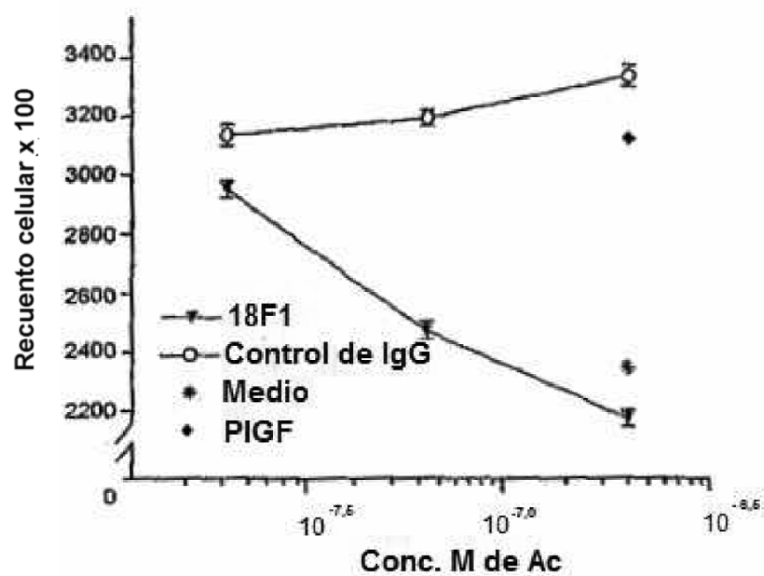


Figura 19A

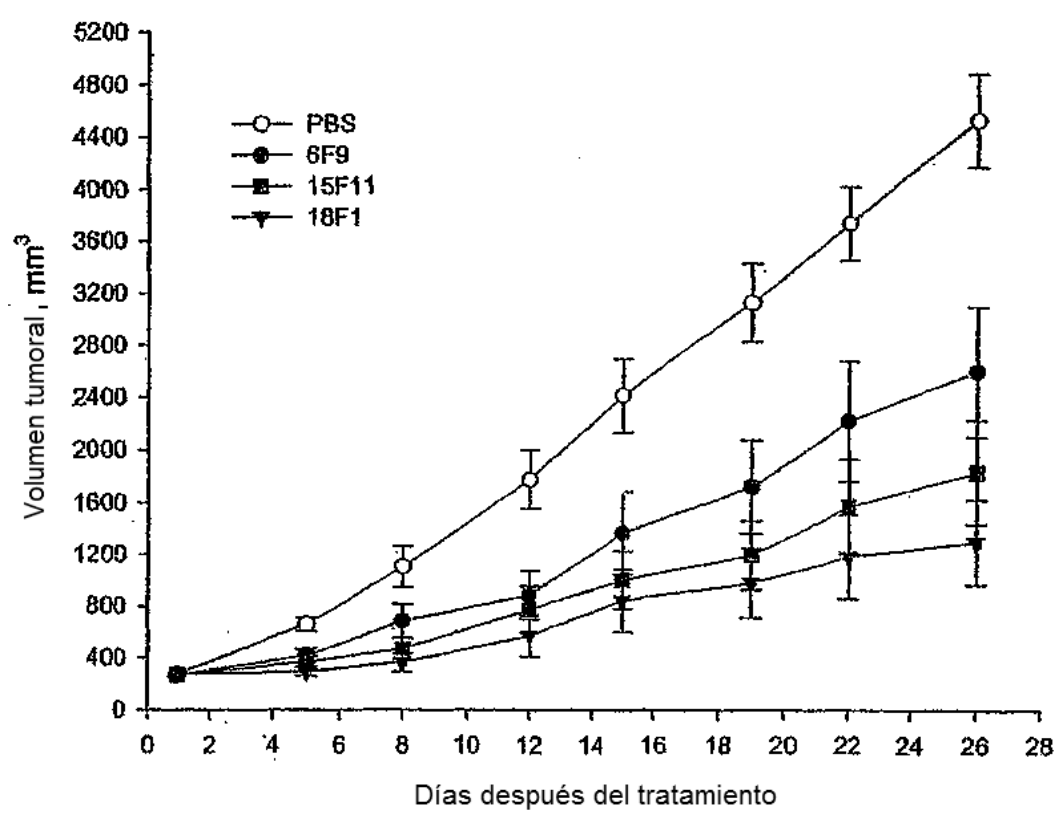


Figura 19B

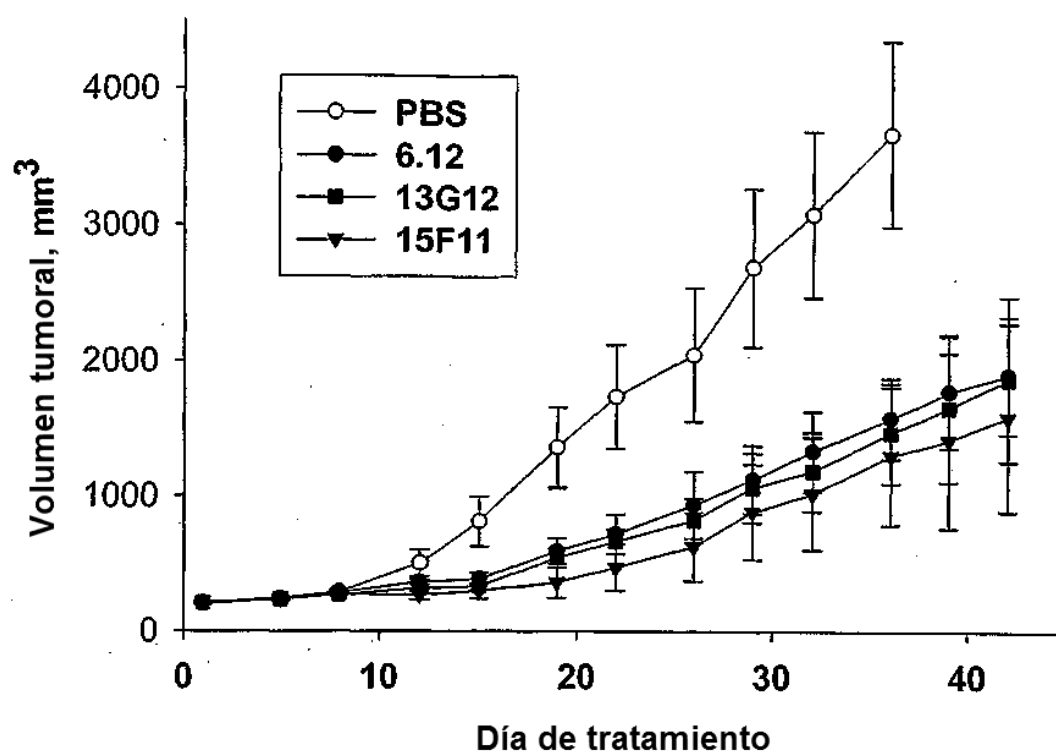


Figura 20

Figura 20A

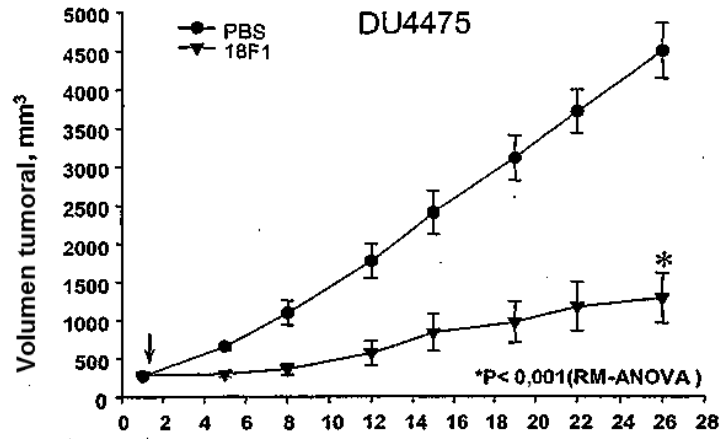


Figura 20B

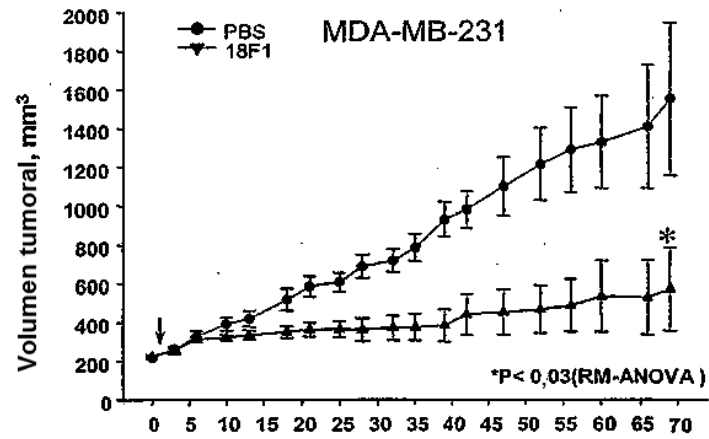


Figura 20C

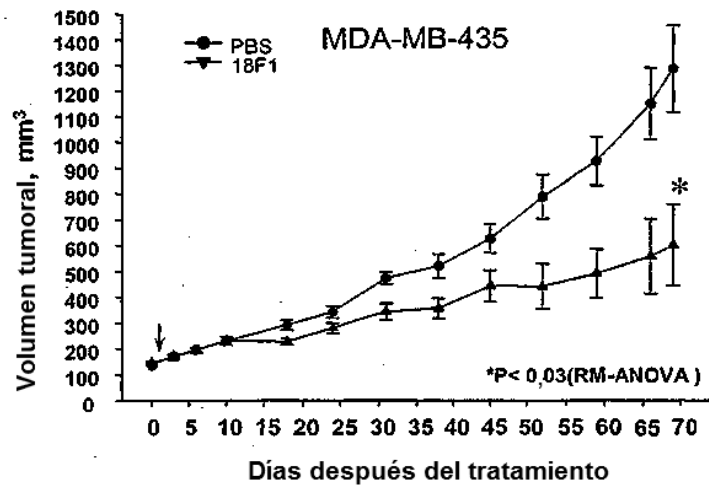


Figura 21

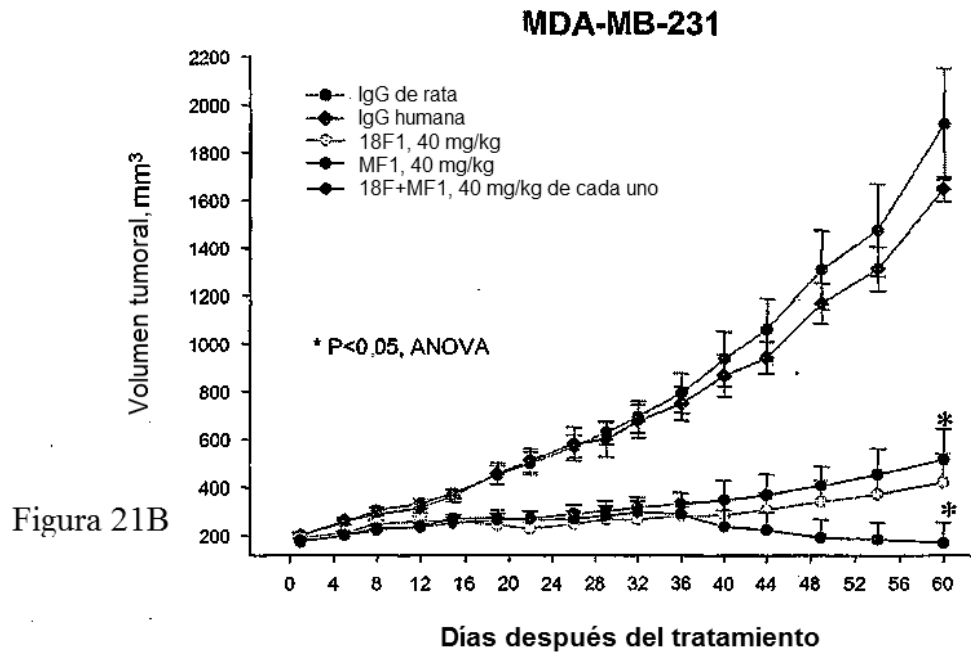
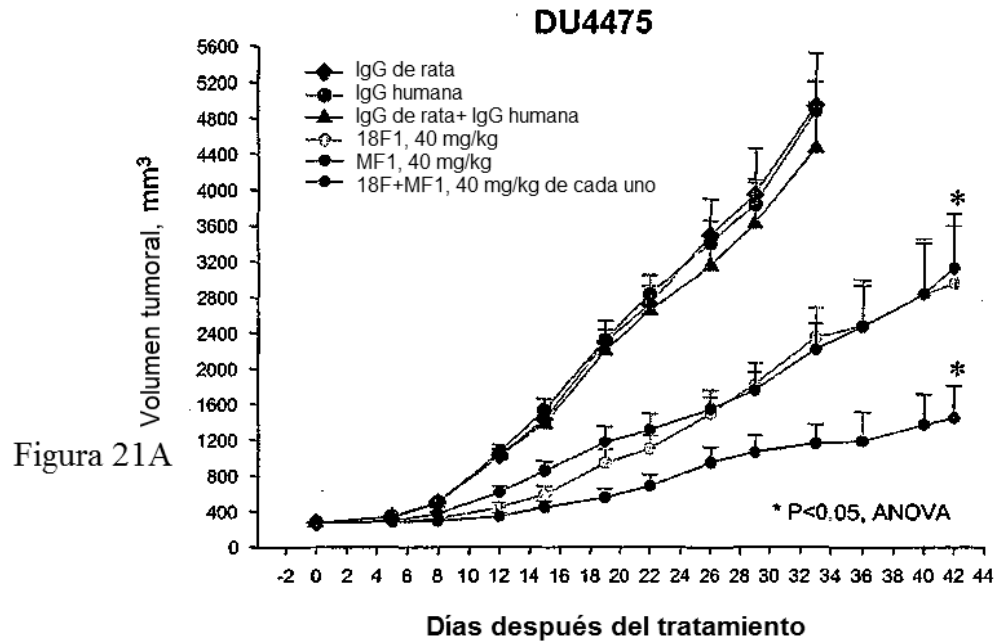
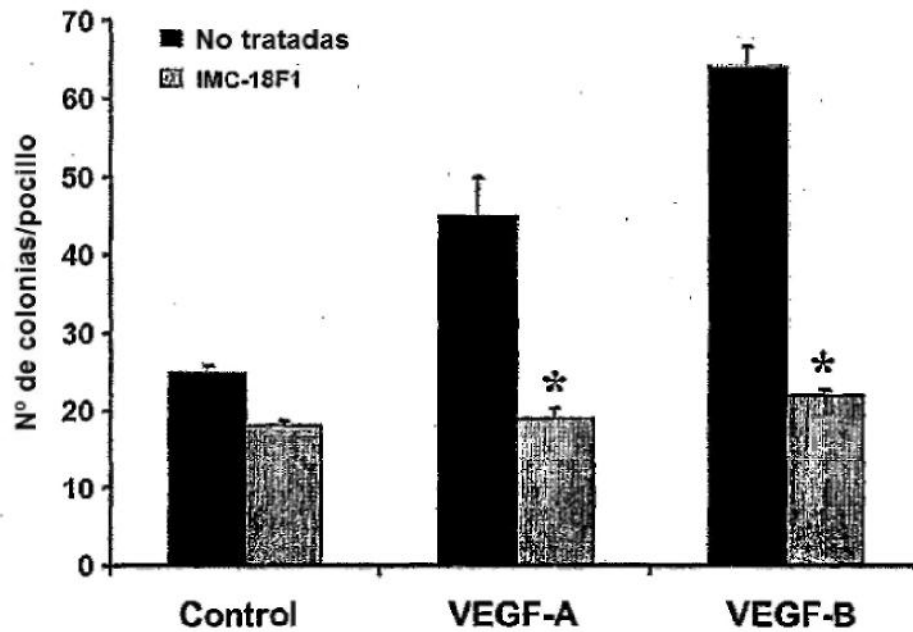


Figura 22



**Figura 22:** Inhibición de la formación de colonias de células tumorales. Se sembraron células tumorales HT29 en medio que contenía agar blando con o sin 18F1 en presencia de VEGF-A o VEGF-B y se incubó durante 14 días. Se contaron las colonias al microscopio. El tratamiento con 18F1 disminuyó la formación de colonias inducida por los ligandos de VEGF (\* $P < 0,03$ ). Las barras indican el ETM. Datos de Pavco y col; Clin. Cancer Res. 2000, 6: 2094-103

Figura 23

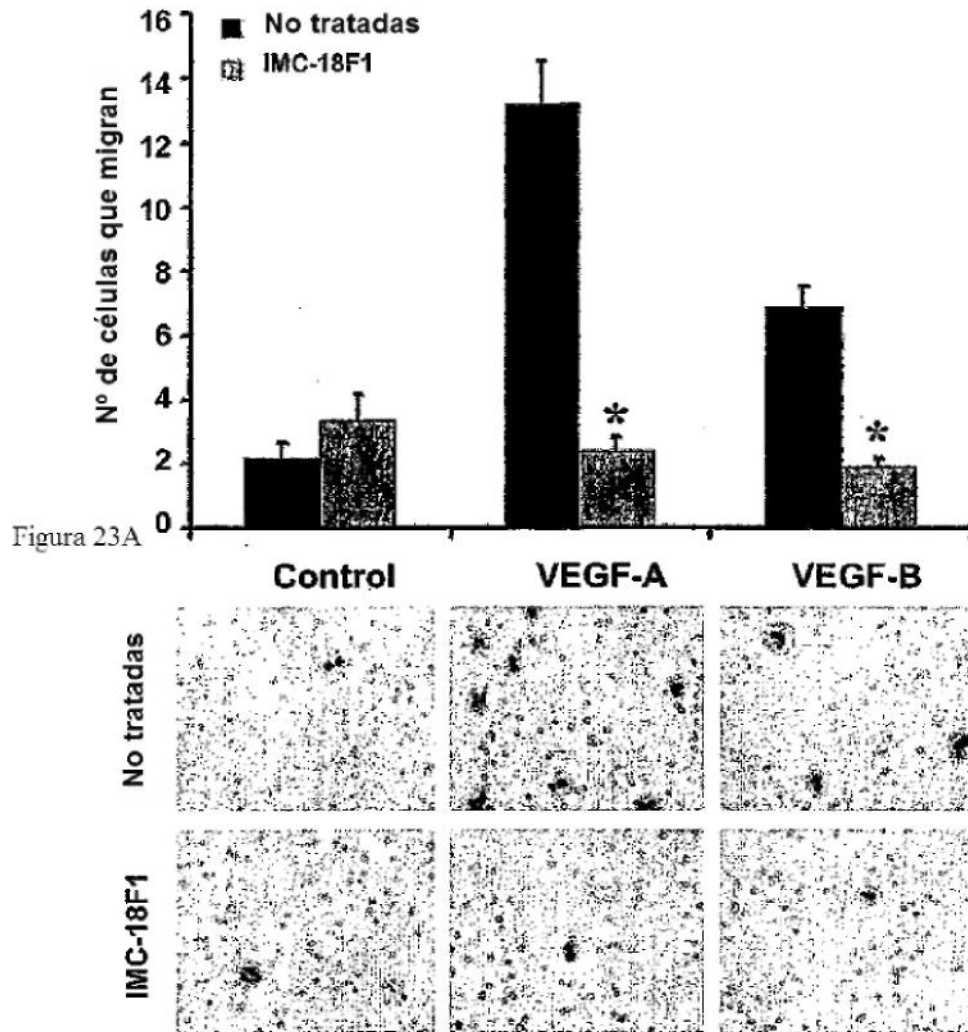


Figura 23B

**Figuras 23A y B:** Inhibición de la migración de células tumorales. (A) Durante 48 h se trataron células tumorales HT-29 con 18F1 en presencia de VEGF-A o VEGF-B. La migración celular a través de una capa de Matrigel se representa como Media + ETM (\* $P < 0,0001$ ). (B) Microfotografías de las células que migran teñidas con Diff-Quik. Datos de Pavco y col; Clin. Cancer Res. 2000; 6: 2094-103.

**Figura 24**

Figura 24A

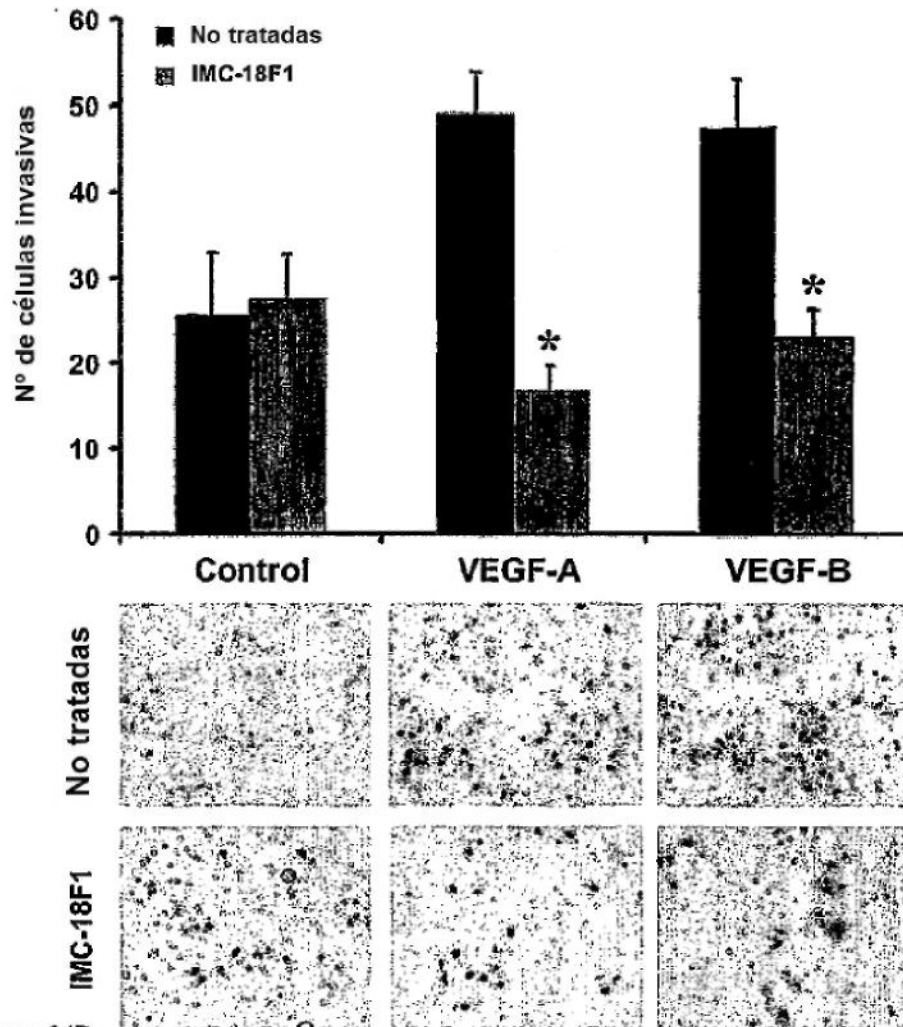


Figura 24B

**Figura 24 A y B:** Inhibición de la invasión de células tumorales. (A) Durante 48 horas se trataron células tumorales SW480 con 18F1 en presencia de VEGF-A o VEGF-B. La migración celular a través de una capa de Matrigel se representa como Media  $\pm$  ETM (\* $P < 0,0001$ ). (B) Microfotografías de las células que migran teñidas con Diff-Quik. Datos de Pavcoj; y col; Clin Cancer Res. 2000; 6: 2094-103.

Figura 25

Figura 25A

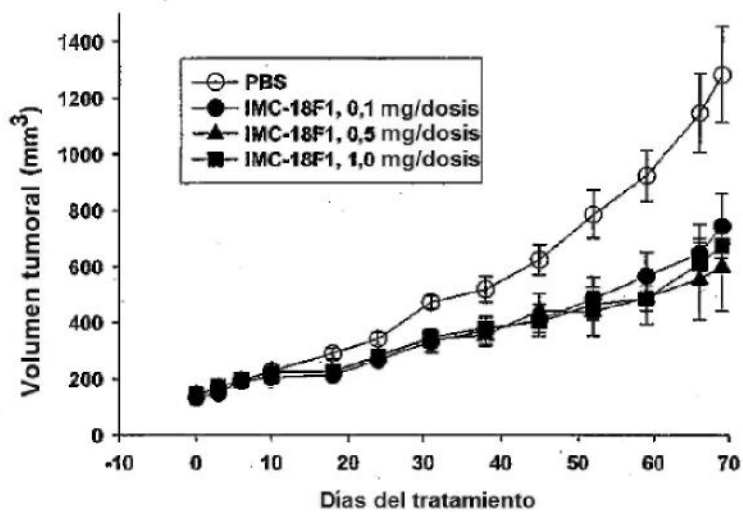
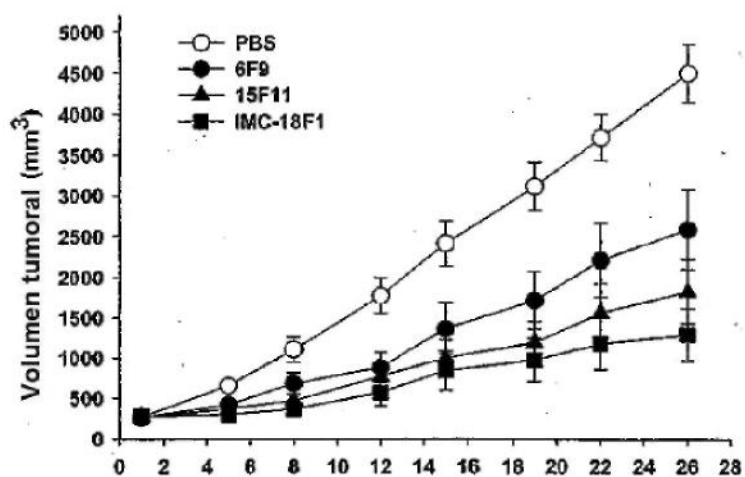


Figura 25B

**Figura 25A y B:** Efecto de la monoterapia con 18F1 en xenoinjertos de cáncer de mama. (A) Ratones con xenoinjertos DU4475 se trataron con los anticuerpos 18F1, 6F9, o 15F11 contra VEGFR-1, a 1,0 mg/dosis, L-X-V. (B) Ratones con xenoinjertos MDA-MB-435 se trataron con 18F1 a las dosificaciones indicadas o con PBS a 0,5 mg/dosis, L-X-V. Se representa el volumen tumoral medio  $\pm$  ETM para  $n = 12$  por grupo.

Figura 26

Figura 26A

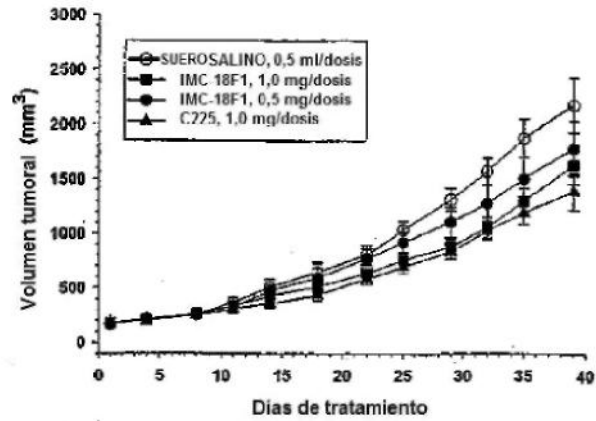


Figura 26B

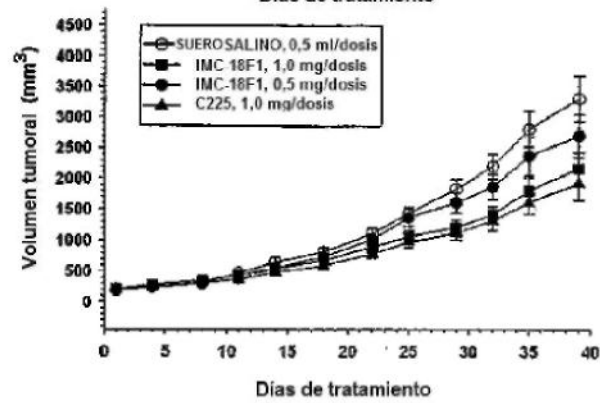
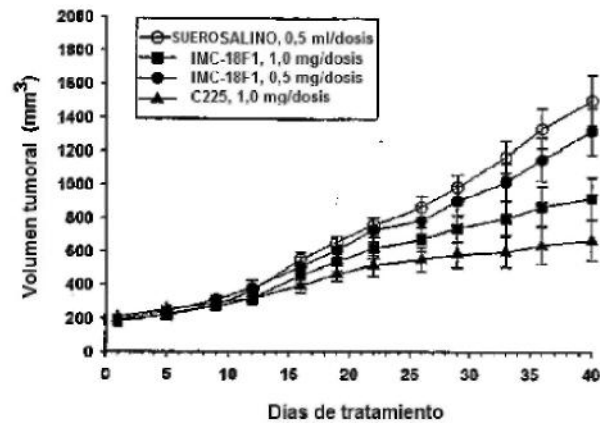
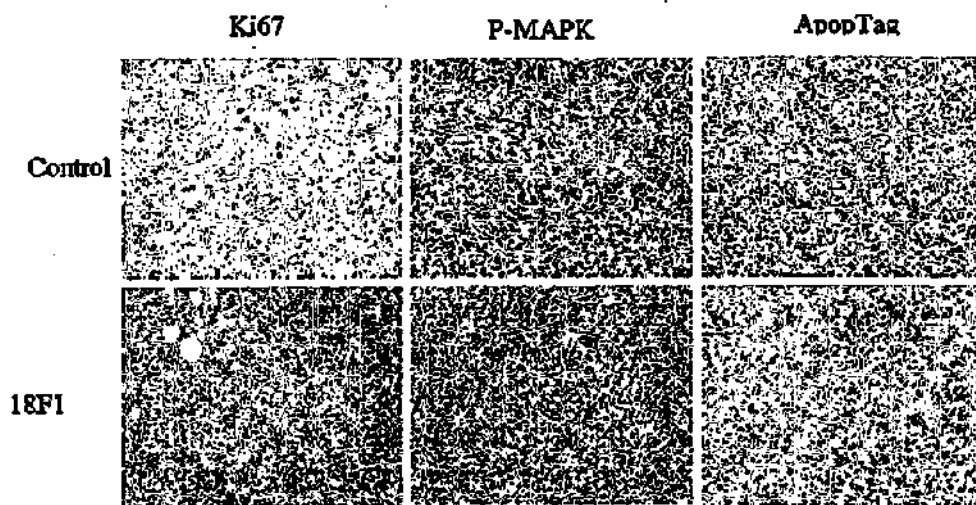


Figura 26C

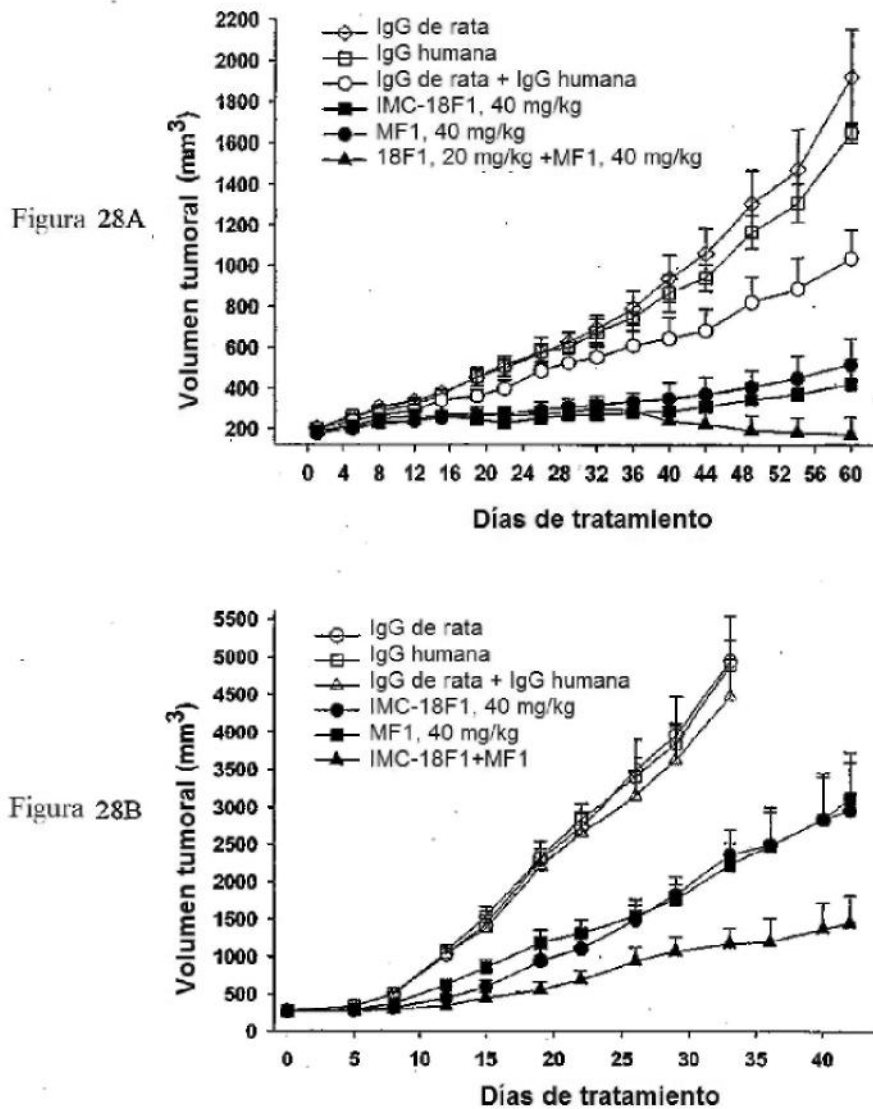


**Figura 26A, B y C:** Efecto de la monoterapia con 18F1 en xenoinjertos de cáncer de colon. Ratones con xenoinjertos HT-29 (A), DLD-1 (B), y GEO (C) se trataron con 18F1 a las dosificaciones indicadas, L-X-V. Se representa el volumen tumoral medio  $\pm$  ETM para  $n = 10$  por grupo.

**Figura 27**

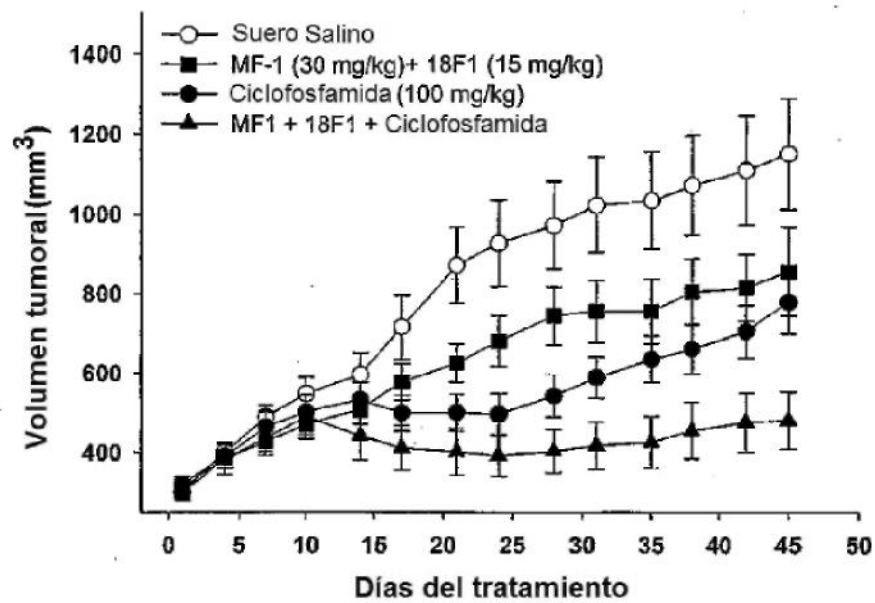
**Figura 27:** Tinción de Ki-67, MAPK fosforilada (P-MAPK) y TUNEL (ApopTag) en tumores de xenoinjerto MDA-MB-231. Las secciones tumorales se tiñeron para Ki67, P-MAPK (14 días de tratamiento con 18F1 a 20 mg/kg, 2x/semana), o ApopTag (7 días de tratamiento con 18F1 a 0,5 mg/dosis, 3x/semana). Se muestran secciones tumorales representativas. El control indica la dosis coincidente de IgG humana.

Figura 28



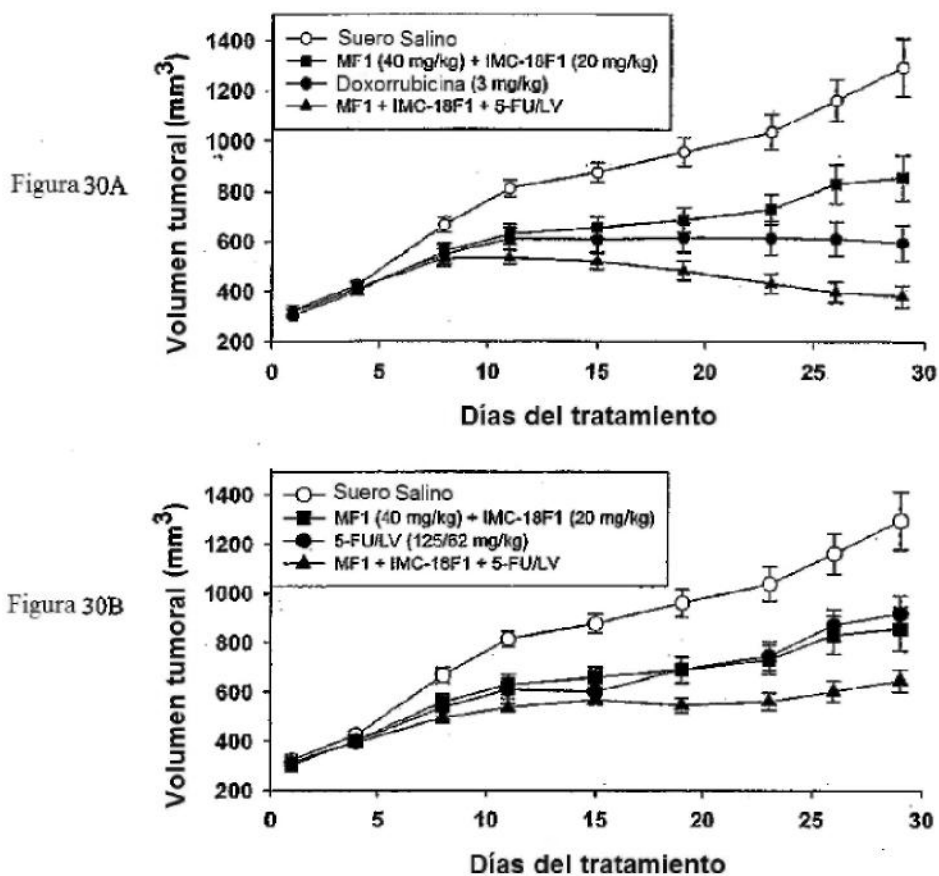
**Figura 28A y B:** Efecto de la inhibición combinada de VEGFR-1 de ratón y de ser humano sobre el crecimiento de xenoinjertos. Ratones con xenoinjertos MDA-MB-231 (A) o DU4475 (B) se trataron con 18F1, MF1 o la combinación, a las dosificaciones indicadas (2x/semana para 18F1 y 3x/semana para MF1). Se representa el volumen tumoral medio  $\pm$  ETM para  $n = 16-18$  por grupo.

Figura 29

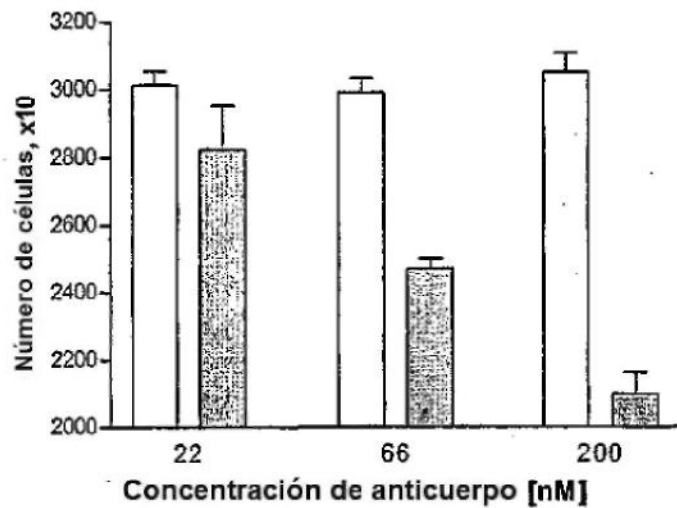
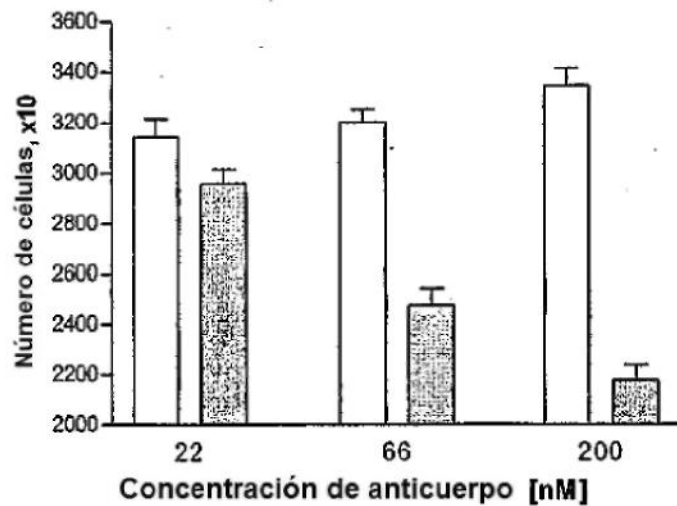


**Figura 29:** Efecto del tratamiento con ciclofosfamida en combinación con anticuerpos anti-VEGFR-1 de ratón y de ser humano sobre el crecimiento de xenoinjertos MDA-MB-231. Ratones con xenoinjertos MDA-MB-231 se trataron con 18F1 + MF1 solo (2x/semana), monoterapia de ciclofosfamida (c7d), o la combinación, a las dosificaciones indicadas. Se representa el volumen tumoral medio  $\pm$  ETM para  $n = 12$  por grupo.

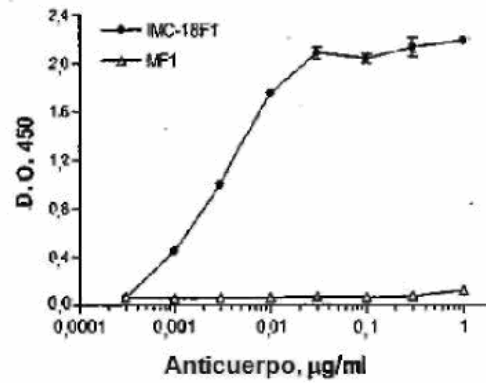
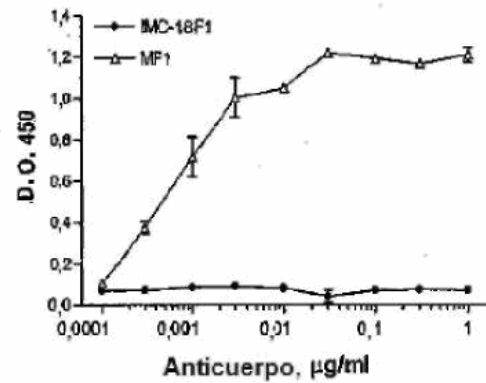
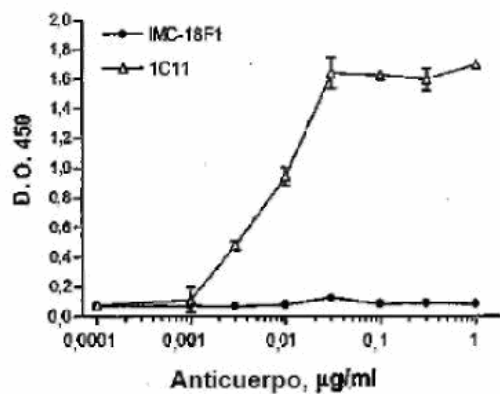
Figura 30



**Figura 30A y B:** Efecto del tratamiento con 5-FU/LV o Doxorubicina en combinación con anticuerpos anti-VEGFR-1 de ratón y de ser humano sobre el crecimiento de xenoinjertos MDA-MB-231. Ratones con xenoinjertos MDA-MB-231 se trataron con 18F1 + MF1 solo (3x/semana), monoterapia de 5-FU/LV (c7d) (A), doxorubicina (2x/semana) (B) o una combinación de anticuerpos más quimioterapia, a las dosificaciones indicadas. Se representa el volumen tumoral medio  $\pm$  ETM para  $n = 12$  por grupo

**Figura 31****Figura 31A****Figura 31B**

**Figura 31A y B:** Inhibición de la proliferación de células tumorales. Durante una noche se privó de suero a  $2 \times 10^4$  células DU4475 seguido de tratamiento con desferrioxamina, después se incubaron con diversas cantidades de  $^{18}\text{F}$ 1 (barra sombreada) o control de isotipo de IgG (barra blanca) en presencia de VEGF-A (A) o PlGF (B). Después de 2 días de incubación, se determinó el número de células totales usando un contador celular Coulter. Los resultados se muestran como valor medio con error típico.

**Figura 32****Figura 32A****Figura 32B****Figura 32C**

**Figura 32A, B, y C:** Especificidad de 18F1 y del anticuerpo anti-VEGFR-1 de ratón, MF1. 18F1 tiene actividad de unión con VEGFR-1 humano recombinante inmovilizado (A) pero no con VEGFR-1 de ratón (B) ni con VEGFR-2 humano (C) en comparación con el control positivo MF1 o con el anticuerpo específico de VEGFR-2, 1C11. El anticuerpo anti-VEGFR-1 de ratón, MF1 no se unió al VEGFR-1 humano recombinante inmovilizado (A). 18F1 se usó como control positivo en el ensayo de unión en fase sólida.