

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 534 905**

51 Int. Cl.:

**C07K 16/00** (2006.01)

**C07K 16/22** (2006.01)

**C07K 16/32** (2006.01)

**A61K 39/395** (2006.01)

**A61P 35/00** (2006.01)

**C12N 15/13** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **01.12.2008 E 08857287 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **14.01.2015 EP 2220114**

54 Título: **Anticuerpos anti-VEGF**

30 Prioridad:

**30.11.2007 US 991302 P**

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

**30.04.2015**

73 Titular/es:

**GENENTECH, INC. (100.0%)  
1 DNA WAY  
SOUTH SAN FRANCISCO, CA 94080-4990, US**

72 Inventor/es:

**FUH, GERMAINE y  
LEE, CHINGWEI, V.**

74 Agente/Representante:

**VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro**

**ES 2 534 905 T3**

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

## DESCRIPCIÓN

Anticuerpos anti-VEGF

### 5 Campo de la invención

La presente invención se refiere generalmente a secuencias de polipéptido seleccionadas y anticuerpos anti-VEGF con propiedades para fines de investigación, terapéuticos y diagnósticos.

### 10 Antecedentes de la invención

El desarrollo de un sistema vascular es un requisito fundamental para numerosos procesos fisiológicos y patológicos. Los tejidos de crecimiento activo tales como embriones y tumores requieren un suministro adecuado de sangre. Estos satisfacen esta necesidad produciendo factores proangiogénicos, que estimulan la formación de nuevos vasos sanguíneos a través de un proceso denominado angiogénesis. La formación de tubos vasculares es un suceso biológico complejo pero ordenado que implica la totalidad o gran parte de las siguientes etapas: a) las células endoteliales (EC) proliferan a partir de EC existentes o se diferencian a partir de células progenitoras; b) las EC migran y coalescen para formar estructuras de tipo cordón; c) los cordones vasculares experimentan una continuación tubulogénesis para formar vasos con un lumen central; b) los cordones o los vasos existentes emiten brotes para formar vasos secundarios; e) el plexo vascular primitivo experimenta remodelación y reforma adicionales; y f) se reclutan células periendotheliales para revestir los tubos endoteliales, proporcionando funciones de mantenimiento y moduladoras a los vasos; incluyendo tales células pericitos para capilares pequeños, células de músculo liso para capilares más grandes, y células de miocardio en el corazón. Hanahan, D. *Science* 277:48-50 (1997); Hogan, B. L. & Kolodziej, P. A. *Nature Reviews Genetics*. 3:513-23 (2002); Lubarsky, B. & Krasnow, M. A. *Cell*. 112:19-28 (2003).

Está bien establecido que la angiogénesis está implicada en la patogénesis de diversos trastornos. Estos incluyen tumores y metástasis sólidos, aterosclerosis, fibroplasia retrolental, hemangiomas, inflamación crónica, enfermedades neovasculares intraoculares tales como retinopatías proliferativas, por ejemplo, retinopatía diabética, degeneración vascular relacionada con la edad (AMD), glaucoma neovascular, rechazo inmune de tejido corneal trasplantado y otros tejidos, artritis reumatoide, y psoriasis. Folkman *et al.*, *J. Biol. Chem.*, 267:10931-10934 (1992); Klagsbrun *et al.*, *Annu. Rev. Physiol.* 53:217-239 (1991); y Garner A., "Vascular diseases," en: *Pathobiology of Ocular Disease. A Dynamic Approach*, Garner A., Klintworth GK, eds., 2ª edición (Marcel Dekker, NY, 1994), pp 1625-1710.

El caso de crecimiento tumoral, la angiogénesis parece ser crucial para la transición desde hiperplasia a neoplasia, y para proporcionar alimento para el crecimiento y la metástasis del tumor. Folkman *et al.*, *Nature* 339:58 (1989). La neovascularización permite que las células del tumor adquieran un crecimiento aventajado y autonomía proliferativa en comparación con las células normales. Un tumor comienza habitualmente como una célula anómala individual, que puede proliferar solo hasta un tamaño de unos pocos milímetros cúbicos debido a la distancia a los lechos capilares disponibles, y puede permanecer "latente" sin crecimiento adicional ni diseminación durante un período de tiempo prolongado. Algunas células tumorales cambian entonces al fenotipo angiogénico para activar células endoteliales, que proliferan y maduran en nuevos vasos sanguíneos capilares. Estos vasos sanguíneos recién formados no solo permiten el crecimiento continuado del tumor principal, sino también la diseminación y recolonización de células tumorales metastásicas. En este sentido, se ha observado una correlación entre la densidad de microvasos en las secciones tumorales y la supervivencia del paciente en cáncer de mama así como en otros tumores diversos. Weidner *et al.*, *N. Engl. J. Med* 324:1-6 (1991); Horak *et al.*, *Lancet* 340:1120-1124 (1992); Macchiarini *et al.*, *Lancet* 340:145-146 (1992). Los mecanismos precisos que controlan el cambio angiogénico no se comprenden bien, pero se cree que la neovascularización de la masa tumoral da como resultado del balance neto de una multitud de estimuladores e inhibidores de la angiogénesis (Folkman, *Nat Med* 1(1):27-31 (1995)).

El proceso de desarrollo vascular está regulado de forma estricta. Hasta la fecha, se ha mostrado que un considerable número de moléculas, la mayoría factores secretados producidos por células circundantes, regulan la diferenciación, proliferación, migración y coalescencia de las EC en estructuras de tipo cordón. Por ejemplo, se ha identificado el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) como el factor clave implicado en la estimulación de la angiogénesis y en la inducción de la permeabilidad vascular. Ferrara *et al.*, *Endocr. Rev.* 18:4-25 (1997). El descubrimiento de que la pérdida de incluso un solo alelo de VEGF da como resultado la letalidad embrionaria indica el papel irremplazable desempeñado por este factor en el desarrollo y la diferenciación del sistema vascular. Además, se ha mostrado que el VEGF es un mediador clave de la neovascularización asociada con tumores y trastornos intraoculares. Ferrara *et al.*, *Endocr. Rev.*, citado anteriormente. El ARNm de VEGF se sobreexpresa en la mayoría de los tumores humanos examinados. Berkman *et al.*, *J. Clin. Invest.* 91:153-159 (1993); Brown *et al.*, *Human Pathol.* 26:86-91 (1995); Brown *et al.*, *Cancer Res.* 53:4727-4735 (1993); Mattern *et al.*, *Brit. J. Cancer* 73:931-934 (1996); Dvorak *et al.*, *Am. J. Pathol.* 146:1029-1039 (1995).

Además, los niveles de concentración de VEGF en fluidos oculares correlaciona altamente con la presencia de

proliferación activa de vasos sanguíneos en pacientes con retinopatía diabética y otras retinopatías relacionadas con isquemia. Aiello *et al.*, N. Engl. J. Med. 331:1480-1487 (1994). Además, los estudios han demostrado la localización de VEGF en membranas neovasculares coroidales en pacientes afectados por AMD. Lopez *et al.*, Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. 37:855-868 (1996).

5 Los anticuerpos neutralizantes anti-VEGF suprimen el crecimiento de diversas líneas celulares tumorales humanas en ratones desnudos (Kim *et al.*, Nature 362:841-844 (1993); Warren *et al.*, J. Clin. Invest. 95:1789-1797 (1995); Borgström *et al.*, Cancer Res. 56:4032-4039 (1996); Melnyk *et al.*, Cancer Res. 56:921-924 (1996)) y también inhiben la angiogénesis intraocular en modelos de trastornos isquémicos de la retina. Adamis *et al.*, Arch. Ophthalmol. 114:66-71 (1996). Por lo tanto, los anticuerpos monoclonales anti-VEGF u otros inhibidores de la acción de VEGF son candidatos prometedores para el tratamiento de tumores y diversos trastornos neovasculares intraoculares. Tales anticuerpos se describen, por ejemplo, en el documento de Patente EP 817,648 publicado el 14 de enero de 1998; y en los documentos de Patente WO98/45331 y WO98/45332, ambos publicados el 15 de octubre de 1998. Uno de los anticuerpos anti-VEGF, bevacizumab, ha sido aprobado por la FDA para su uso en combinación con un régimen de quimioterapia para tratar cáncer colorrectal metastásico (CRC) y cáncer de pulmón no microcítico (NSCLC). Y el bevacizumab se está investigando en numerosos ensayos clínicos en curso para tratar diversas indicaciones de cáncer.

20 También se conocen otros anticuerpos anti-VEGF, los anticuerpos anti-Nrp1 y anti-Nrp2, y se describen, por ejemplo, en Liang *et al.*, J Mol Biol 366, 815-829 (2007) y Liang *et al.*, J Biol Chem 281, 951-961 (2006), el documento de Publicación PCT N° WO2007/056470 y el documento de Solicitud PCT N° PCT/US2007/069179.

### Sumario de la invención

25 La invención proporcionar nuevos anticuerpos anti-VEGF y usos de los mismos, como se define en las reivindicaciones.

En una realización, se proporciona un anticuerpo que se une a VEGF o un fragmento del mismo, en la que el anticuerpo comprende:

- 30
- (1) una HVR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID N°: 1;
  - (2) una HVR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID N°: 2;
  - (3) una HVR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID N°: 3
  - (4) una HVR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID N°: 4;
  - 35 (5) una HVR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID N°: 6; y
  - (6) una HVR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID N°: 7.

En otra realización, se proporciona un anticuerpo que se une a VEGF o un fragmento del mismo, en la que el anticuerpo comprende:

- 40
- (1) una HVR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID N°: 1;
  - (2) una HVR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID N°: 2;
  - (3) una HVR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID N°: 3
  - (4) una HVR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID N°: 5;
  - 45 (5) una HVR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID N°: 6; y
  - (6) una HVR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID N°: 7.

En otra realización, se proporciona un anticuerpo que se une a VEGF o un fragmento del mismo, en la que el dominio variable de cadena ligera comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID N°: 44 o SEC ID N°: 45.

50 En otra realización, se proporciona un anticuerpo que se une a VEGF o un fragmento del mismo, en el que el anticuerpo anti-VEGF comprende el dominio variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID N°: 43, y el dominio variable de cadena ligera comprende la secuencia de aminoácidos SEC ID N°: 44 o 45. En aún otra realización, el anticuerpo anti-VEGF comprende el dominio variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID N°: 43, y el dominio variable de cadena ligera comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID N°: 44. En aún otra realización, el anticuerpo anti-VEGF comprende el dominio variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID N°: 43, y el dominio variable de cadena ligera comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID N°: 45.

60 En ciertas realizaciones, cualquiera de los anticuerpos anteriores es un anticuerpo monoclonal. En una realización, el anticuerpo es un fragmento de anticuerpo seleccionado entre un fragmento Fab, Fab'-SH, Fv, scFv, o F(ab')<sub>2</sub>. En una realización, el anticuerpo es humanizado. En una realización, el anticuerpo es humano. En aún otra realización, al menos una parte de la secuencia de marco es una secuencia de marco de consenso humana.

65 Se proporcionan los polinucleótidos que codifican cualquiera de los anticuerpos anteriores, así como los vectores que comprenden los polinucleótidos y las células anfitrionas que comprenden los vectores de la invención. En una

realización, la célula anfitriona es eucariota. En otra realización, la célula anfitriona es una célula CHO. También se proporciona un método para preparar un anticuerpo anti-VEGF. Por ejemplo, un método comprende cultivar la célula anfitriona en condiciones adecuadas para la expresión del polinucleótido que codifica el anticuerpo, y aislar el anticuerpo.

5 En un aspecto, se proporciona un método de detección de la presencia de VEGF en una muestra biológica, comprendiendo el método poner en contacto la muestra biológica con un anticuerpo de la invención en condiciones permisivas para la unión del anticuerpo a VEGF, y detectar si se forma o no un complejo entre el anticuerpo y VEGF. En una realización, el método comprende detectar el complejo VEGF-anticuerpo anti-VEGF en una muestra biológica en el que la secuencia de aminoácidos del anticuerpo anti-VEGF comprende un dominio variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID N°: 43, y un dominio variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID N°: 44 o 45. En aún otra realización, el método comprende detectar el complejo VEGF-anticuerpo anti-VEGF en una muestra biológica en el que la secuencia de aminoácidos del anticuerpo anti-VEGF comprende un dominio variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID N°: 43, y un dominio variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID N°: 44. En aún otra realización, el método comprende detectar el complejo VEGF-anticuerpo anti-VEGF en una muestra biológica en el que la secuencia de aminoácidos del anticuerpo anti-VEGF comprende un dominio variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID N°: 43, y un dominio variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID N°: 45. En aún otra realización, el anticuerpo anti-VEGF está marcado de forma detectable.

También se proporcionan composiciones farmacéuticas así como métodos de tratamiento. En un aspecto, se proporciona una composición farmacéutica que comprende un anticuerpo de la invención y un vehículo farmacéuticamente aceptable. En otro aspecto, se proporciona un método de tratamiento de cáncer, comprendiendo el método, por ejemplo, administrar a un individuo la composición farmacéutica que comprende cualquiera de los anticuerpos anteriores. Los cánceres tratados por los métodos de la invención incluyen, pero no se limitan a, cáncer de células escamosas, cáncer de pulmón microcítico, cáncer de pulmón no microcítico, adenocarcinoma de pulmón, carcinoma escamoso de pulmón, cáncer de peritoneo, cáncer hepatocelular, cáncer gástrico, cáncer gastrointestinal, cáncer de estroma gastrointestinal, cáncer pancreático, glioblastoma, cáncer de cuello uterino, cáncer de ovario, 30 cáncer de hígado, cáncer de vejiga, hepatoma, cáncer de mama, cáncer de colon, cáncer colorrectal, carcinoma endometrial o uterino, carcinoma de las glándulas salivales, cáncer de riñón o renal, cáncer de hígado, cáncer de próstata, cáncer de vulva, cáncer de tiroides, carcinoma hepático y diversos tipos de cáncer de cabeza y cuello, melanoma, melanoma de extensión superficial, melanoma léntigo maligno, melanomas lentiginosos acrales, melanomas nodulares, linfoma de linfocitos B, leucemia linfocítica crónica (CLL); leucemia linfoblástica aguda (ALL); 35 leucemia de células pilosas; leucemia mieloblástica crónica; trastorno linfoproliferativo posterior al trasplante (PTLD), proliferación vascular anómala asociada con facomatosis, edema asociado con tumores cerebrales, o síndrome de Meigs. En ciertas realizaciones, el tumor, el cáncer o el trastorno proliferativo celular que se trata es cáncer de colon, cáncer de pulmón, cáncer de mama o glioblastoma. En aún otra realización, el sujeto que se trata es un ser humano.

40 La invención proporciona además inmunocombinados que comprenden un anticuerpo conjugado a un agente, tal como un fármaco o un agente citotóxico.

#### 45 Breve descripción de las figuras

Figura 1: secuencias de lazo de HVR de cadena pesada y cadena ligera de anticuerpos anti-VEGF. Las figuras muestran las secuencias de HVR de cadena pesada, H1, H2, y H3, y las secuencias de HVR de cadena ligera, L1, L2, y L3. La numeración de la secuencia es como sigue a continuación: clon B20-4.1.1 (HVR-H1 es SEC ID N°: 1; HVR-H2 es SEC ID N°: 2; HVR-H3 es SEC ID N°: 3; HVR-L1 es SEC ID N°: 4; HVR-L2 es SEC ID N°: 6; HVR-L3 es SEC ID N°: 7); y clon B20-4.1.1RR (HVR-H1 es SEC ID N°: 1; HVR-H2 es SEC ID N°: 2; HVR-H3 es SEC ID N°: 3; HVR-L1 es SEC ID N°: 5; HVR-L2 es SEC ID N°: 6; HVR-L3 es SEC ID N°: 7).

Las posiciones de los aminoácidos se numeran de acuerdo con el sistema de numeración de Kabat como se describe posteriormente.

55 **Figuras 2a y 2b:** representan secuencias de marco de consenso humanasceptoras a modo de ejemplo para su uso en la práctica de la presente invención con los identificadores de secuencia que siguen a continuación:

#### Marcos de consenso de dominios pesados variables (VH)

marco de consenso de subgrupo I de VH humano menos los CDR Kabat (SEC ID N°: 8)

60 marco de consenso de subgrupo I de VH humano menos las regiones hipervariables extendidas (SEC ID N°: 9-11)

marco de consenso de subgrupo II de VH humano menos los CDR Kabat (SEC ID N°: 12)

marco de consenso de subgrupo II de VH humano menos las regiones hipervariables extendidas (SEC ID N°: 13-15)

marco de consenso de subgrupo II de VH humano menos extendido

65 marco de consenso de subgrupo III de VH humano menos los CDR Kabat (SEC ID N°: 16)

marco de consenso de subgrupo III de VH humano menos las regiones hipervariables extendidas (SEC ID

N<sup>os</sup>: 17-19)

marco aceptor de VH humano menos los CDR Kabat (SEC ID N<sup>o</sup>: 20)

marco aceptor de VH humano menos las regiones hipervariables extendidas (SEC ID N<sup>os</sup>: 21-22)

marco aceptor 2 de VH humano menos los CDR Kabat (SEC ID N<sup>o</sup>: 23)

marco aceptor 2 de VH humano menos las regiones hipervariables extendidas (SEC ID N<sup>os</sup>: 24-26).

Las posiciones de los aminoácidos se numeran de acuerdo con el sistema de numeración de Kabat como se describe posteriormente.

**Figura 3:** representa secuencias de marco de consenso humano aceptor a modo de ejemplo para su uso en la práctica de la presente invención con los identificadores de secuencia que siguen a continuación:

Marco de consenso de dominio ligero variable (VL)

marco de consenso de subgrupo I de VL kappa humano (SEC ID N<sup>o</sup>: 27)

marco de consenso de subgrupo II de VL kappa humano (SEC ID N<sup>o</sup>: 28)

marco de consenso de subgrupo III de VL kappa humano (SEC ID N<sup>o</sup>: 29)

marco de consenso de subgrupo IV de VL kappa humano (SEC ID N<sup>o</sup>: 30).

**Figura 4:** representa las secuencias de las regiones de marco de las cadenas pesada y ligera de huMAb4D5-8. Los números en superíndice/negrita indican las posiciones de los aminoácidos de acuerdo con Kabat.

**Figura 5:** representa las secuencias de las regiones de marco modificado/variante de las cadenas pesada y ligera de huMAb4D5-8. Los números en superíndice/negrita indican las posiciones de los aminoácidos de acuerdo con Kabat.

**Figura 6:** secuencias de aminoácidos de las secuencias de HVR de cadena ligera L1, L2 y L3 para los anticuerpos anti-VEGF B20-4.1.1 y B20-4.1.1RR.

**Figura 7:** secuencias de aminoácidos de las secuencias de HVR de cadena pesada H1, H2, y H3 para los anticuerpos anti-VEGF B20-4.1.1 y B20-4.1.1RR.

**Figura 8:** representa las regiones variables de cadena ligera de los clones de anticuerpo B20-4.1.1 (SEC ID N<sup>o</sup>: 44) y B20-4.1.1 RR (SEC ID N<sup>o</sup>: 45).

**Figura 9:** representa las regiones variables de cadena pesada de los clones de anticuerpo B20-4.1.1 y B20-4.1.1 RR (SEC ID N<sup>o</sup>: 43).

**Figura 10:** tabla que resume la medida de la cinética de afinidad de unión de las IgG variantes de B20 con respecto al VEGF humano y al VEGF murino. El VEGF humano o murino se inmoviliza para conseguir aproximadamente 60 unidades de respuesta.

**Figura 11:** tabla que resume la medida de la cinética de afinidad de unión de las IgG variantes de B20 con respecto al VEGF humano y al VEGF murino. El VEGF humano o murino se inmoviliza para conseguir aproximadamente 1000 unidades de respuesta.

**Figura 12:** ensayo de incorporación de timidina en HUVEC, que muestra que las variantes de B20 pueden inhibir eficazmente la proliferación celular de HUVEC.

**Figura 13:** representa el efecto de B20-4.1.1 en la proliferación de BRME inducida por VEGF.

**Figura 14:** representa el efecto de B20-4.1.1 en el crecimiento tumoral en ratones desnudos con células tumorales humanas xenoinjertadas (células A549), según se mide mediante los volúmenes del tumor con respecto al número de días de tratamiento.

**Figura 15:** representa el efecto de B20-4.1.1 en el crecimiento tumoral en ratones desnudos con células tumorales humanas xenoinjertadas (células MDA-MB231), según se mide mediante los volúmenes del tumor con respecto al número de días de tratamiento.

**Figura 16:** representa el efecto del anticuerpo avastina en la proliferación de BRME inducida por VEGF. No se observó inhibición de mVEGF a una concentración de hasta 1500 nM del anticuerpo avastina.

### Descripción detallada de la invención

La invención proporciona en el presente documento anticuerpos aislados que se unen a VEGF y los usos de los mismos. También se proporcionan composiciones farmacéuticas así como métodos de tratamiento.

La invención proporciona además métodos de preparación de anticuerpos anti-VEGF, y los polinucleótidos que codifican los anticuerpos anti-VEGF.

### Técnicas generales

Las técnicas y los procedimientos que se describen o a los que se hace referencia el presente documento son generalmente metodologías convencionales de uso bien comprendidas y empleadas habitualmente por los expertos en la materia, tales como, por ejemplo, las metodologías ampliamente utilizadas descritas en Sambrook *et al.*, Molecular Cloning: A Laboratory Manual 3<sup>a</sup> edición (2001) Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. CURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY (F. M. Ausubel, *et al.* eds., (2003)); la serie METHODS IN ENZYMOLOGY (Academic Press, Inc.): PCR 2: A PRACTICAL APPROACH (M. J. MacPherson, B. D. Hames y G. R. Taylor eds. (1995)), Harlow y Lane, eds. (1988) ANTIBODIES, A LABORATORY MANUAL, and ANIMAL CELL CULTURE (R. I. Freshney, ed. (1987)); Oligonucleotide Synthesis (M. J. Gait, ed., 1984); Methods in Molecular

Biology, Humana Press; Cell Biology: A Laboratory Notebook (J. E. Cellis, ed., 1998) Academic Press; Animal Cell Culture (R. I. Freshney), ed., 1987); Introduction to Cell and Tissue Culture (J. P. Mather y P. E. Roberts, 1998) Plenum Press; Cell and Tissue Culture: Laboratory Procedures (A. Doyle, J. B. Griffiths, y D. G. Newell, eds., 1993-8) J. Wiley & Sons; Handbook of Experimental Immunology (D. M. Weir y C. C. Blackwell, eds.); Gene Transfer Vectors for Mammalian Cells (J. M. Miller y M. P. Calos, eds., 1987); PCR: The Polymerase Chain Reaction, (Mullis *et al.*, eds., 1994); Current Protocols in Immunology (J. E. Coligan *et al.*, eds., 1991); Short Protocols in Molecular Biology (Wiley & Sons, 1999); Immunobiology (C. A. Janeway y P. Travers, 1997); Antibodies (P. Finch, 1997); Antibodies: A Practical Approach (D. Catty., ed., IRL Press, 1988-1989); Monoclonal Antibodies: A Practical Approach (P. Shepherd y C. Dean, eds., Oxford University Press, 2000); Using Antibodies: A Laboratory Manual (E. Harlow y D. Lane (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1999); The Antibodies (M. Zanetti y J. D. Capra, eds., Harwood Academic Publishers, 1995); y Cancer: Principles and Practice of Oncology (V. T. DeVita *et al.*, eds., J.B. Lippincott Company, 1993).

### Definiciones

Con el fin de interpretar la presente memoria descriptiva, se aplicarán las siguientes definiciones y, cuando sea apropiado, los términos usados en singular también incluirán el plural y viceversa. En el caso de que cualquier definición expuesta posteriormente entre en conflicto con cualquier documento citado en el presente documento, prevalecerá la definición expuesta posteriormente.

El término "anticuerpo" se usa en su sentido más amplio y cubre específicamente anticuerpos monoclonales (incluyendo anticuerpos monoclonales de longitud completa), anticuerpos policlonales, anticuerpos multiespecíficos (por ejemplo, anticuerpos biespecíficos), y fragmentos de anticuerpos siempre que exhiban la actividad biológica deseada.

La expresión "anticuerpo monoclonal", como se usa el presente documento, se refiere a un anticuerpo obtenido a partir de una población básicamente homogénea de anticuerpos, es decir, los anticuerpos individuales que comprenden la población son idénticos excepto por posibles mutaciones, por ejemplo, mutaciones de origen natural, que pueden estar presentes en cantidades minoritarias. De ese modo, el modificador "monoclonal" indica que el carácter del anticuerpo no es una mezcla de anticuerpos discretos. En ciertas realizaciones, tal anticuerpo monoclonal incluye por lo general un anticuerpo que comprende una secuencia de polipéptidos que se une a una diana, en el que la secuencia de polipéptidos de unión a la diana se obtuvo mediante un proceso que incluye la selección de una secuencia individual de polipéptidos de unión a una diana a partir de una pluralidad de secuencias de polipéptidos. Por ejemplo, el proceso de selección puede ser la selección de un único clon a partir de una pluralidad de clones, tal como una mezcla de clones de hibridoma, clones de fago, o clones de ADN recombinante. Se debería entender que una secuencia de unión a una diana seleccionada se puede alterar adicionalmente, por ejemplo, para mejorar la afinidad por la diana, para humanizar la secuencia de unión a la diana, para mejorar su producción en un cultivo celular, para reducir su inmunogenicidad *in vivo*, para crear un anticuerpo multiespecífico, etc., y que un anticuerpo que comprende la secuencia alterada de unión a una diana es también un anticuerpo monoclonal de la presente invención. A diferencia de las preparaciones de anticuerpos policlonales, que incluyen por lo general diferentes anticuerpos dirigidos a diferentes determinantes (epítomos), cada anticuerpo monoclonal de una preparación de anticuerpos monoclonales está dirigido a un determinante individual en un antígeno. Además de su especificidad, las preparaciones de anticuerpos monoclonales son ventajosas en el sentido de que, por lo general, están sin contaminar con otras inmunoglobulinas.

El modificador "monoclonal" indica que el carácter del anticuerpo se obtiene a partir de una población básicamente homogénea de anticuerpos, y no se pretende que sea necesaria la producción del anticuerpo mediante cualquier método en particular. Por ejemplo, los anticuerpos monoclonales que se usan de acuerdo con la presente invención se pueden preparar mediante diversas técnicas que incluyen, por ejemplo, el método del hibridoma (por ejemplo, Kohler y Milstein, Nature, 256:495-97 (1975); Hongo *et al.*, Hybridoma, 14 (3): 253-260 (1995), Harlow *et al.*, Antibodies: A Laboratory Manual, (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2ª ed. 1988); Hammerling *et al.*, en: Monoclonal Antibodies and T-Cell Hybridomas 563-681 (Elsevier, N.Y., 1981)), métodos de ADN recombinante (véase, por ejemplo, el documento de Patente de Estados Unidos N° 4.816.567), tecnologías de exposición a fagos (véanse, por ejemplo, Clackson *et al.*, Nature, 352: 624-628 (1991); Marks *et al.*, J. Mol. Biol. 222: 581-597 (1992); Sidhu *et al.*, J. Mol. Biol. 338(2): 299-310 (2004); Lee *et al.*, J. Mol. Biol. 340(5): 1073-1093 (2004); Fellouse, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 101(34): 12467-12472 (2004); y Lee *et al.*, J. Immunol. Methods 284(1-2): 119-132 (2004)), y tecnologías para producir anticuerpos humanos o de tipo humano en animales que tienen parte o la totalidad de los lugares o genes de las inmunoglobulinas humanas que codifican las secuencias de las inmunoglobulinas humanas (véanse, por ejemplo, los documentos de Patente WO 1998/24893; WO 1996/34096; WO 1996/33735; WO 1991/10741; Jakobovits *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90: 2551 (1993); Jakobovits *et al.*, Nature 362: 255-258 (1993); Bruggemann *et al.*, Year in Immunol. 7:33 (1993); los documentos de Patente de Estados Unidos con números 5.545.807; 5.545.806; 5.569.825; 5.625.126; 5.633.425; y 5.661.016; Marks *et al.*, Bio/Technology 10: 779-783 (1992); Lonberg *et al.*, Nature 368: 856-859 (1994); Morrison, Nature 368: 812-813 (1994); Fishwild *et al.*, Nature Biotechnol. 14: 845-851 (1996); Neuberger, Nature Bio-technol. 14: 826 (1996); y Lonberg y Huszar, Intern. Rev. Immunol. 13: 65-93 (1995).

En el presente documento, los anticuerpos monoclonales incluyen específicamente anticuerpos "quiméricos" en los que una parte de la cadena pesada y/o ligera es idéntica u homóloga a las secuencias correspondientes de los anticuerpos derivados de una especie particular o perteneciente a una clase o subclase de anticuerpo particular, mientras que el resto de la cadena o cadenas es idéntico u homólogo a las secuencias correspondientes de los anticuerpos derivados de otras especies o perteneciente a otra clase o subclase de anticuerpos, así como los fragmentos de tales anticuerpos, siempre que exhiban la actividad biológica deseada (véanse, por ejemplo, el documento de Patente de Estados Unidos N° 4.816.567; y Morrison *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81:6851-6855 (1984)). Los anticuerpos quiméricos incluyen anticuerpos PRIMATIZED® (primatizados) en los que la región de unión a antígeno del anticuerpo deriva de un anticuerpo producido, por ejemplo, por monos macacos inmunizados con el antígeno de interés.

Las formas "humanizadas" de anticuerpos no humanos (por ejemplo, murinos) son anticuerpos quiméricos que contienen una secuencia mínima derivada de la inmunoglobulina no humana. En una realización, un anticuerpo humanizado es una inmunoglobulina humana (anticuerpo receptor) en la que están reemplazados restos de una HVR del receptor por restos de una HVR de una especie no humana (anticuerpo donante) tal como ratón, rata, conejo, o primate no humano, que tienen la especificidad, afinidad, y/o capacidad deseadas. En algunos casos, están reemplazados restos de la FR de la inmunoglobulina humana por los correspondientes restos no humanos. Además, los anticuerpos humanizados pueden comprender restos que no se encuentran en el anticuerpo receptor o en el anticuerpo donador. Se pueden hacer estas modificaciones para refinar más el rendimiento del anticuerpo. En general, un anticuerpo humanizado comprenderá básicamente la totalidad de al menos uno, y por lo general dos, dominios variables, en los que todos o básicamente todos los lazos hipervariables corresponden a los de una inmunoglobulina no humana, y todas o básicamente todas las FR son las de una secuencia de inmunoglobulina humana. El anticuerpo humanizado también comprenderá opcionalmente al menos una parte de una región constante de la inmunoglobulina (Fc), por lo general de una inmunoglobulina humana. Para detalles adicionales, véanse, por ejemplo, Jones *et al.*, Nature 321:522-525 (1986); Riechmann *et al.*, Nature 332:323-329 (1988); y Presta, Curr. Op. Struct. Biol. 2:593-596 (1992). Véanse también, por ejemplo, Vaswani y Hamilton, Ann. Allergy, Asthma & Immunol. 1:105-115 (1998); Harris, Biochem. Soc. Transactions 23:1035-1038 (1995); Hurlle y Gross, Curr. Op. Biotech. 5:428-433 (1994); y los documentos de Patente de Estados Unidos con números 6.982.321 y 7.087.409.

Un "anticuerpo humano" es el que posee una secuencia de aminoácidos que corresponde a la de un anticuerpo producido por un ser humano y/o se ha preparado usando cualquiera de las técnicas para preparar anticuerpos humanos que se desvelan en el presente documento. Esta definición de anticuerpo humano excluye específicamente un anticuerpo humanizado que comprende restos de unión a antígeno no humanos. Los anticuerpos humanos se pueden producir usando diversas técnicas conocidas en la técnica, incluyendo librerías de exposición a fagos. Hoogenboom y Winter, J. Mol. Biol., 227:381 (1991); Marks *et al.*, J. Mol. Biol., 222:581 (1991). También están disponibles para la preparación de anticuerpos monoclonales humanos los métodos que se describen en Cole *et al.*, Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy, Alan R. Liss, p. 77 (1985); Boerner *et al.*, J. Immunol., 147(1):86-95 (1991). Véase también van Dijk y van de Winkel, Curr. Opin. Pharmacol., 5: 368-74 (2001). Los anticuerpos humanos se pueden preparar por administración del antígeno a un animal transgénico que se ha modificado para producir tales anticuerpos en respuesta al desafío antigénico, pero cuyos lugares endógenos se han deshabitado, por ejemplo, xenorratones inmunizados (véanse, por ejemplo, los documentos de Patente de Estados Unidos con números 6.075.181 y 6.150.584 con respecto a la tecnología XENOMOUSE™). Véase también, por ejemplo, Li *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 103:3557-3562 (2006) con respecto a anticuerpos humanos generados a través de tecnología de hibridoma de linfocitos B humanos.

Un "anticuerpo dependiente de especie" es el que tiene una mayor afinidad de unión por un antígeno de una primera especie de mamífero que la que tiene por un homólogo de ese antígeno de una segunda especie de mamífero. Normalmente, el anticuerpo dependiente de especie se "une específicamente" a un antígeno humano (es decir, tiene un valor de afinidad de unión ( $K_d$ ) de no más de aproximadamente  $1 \times 10^{-7}$  M, preferentemente no más de aproximadamente  $1 \times 10^{-8}$  M y lo más preferentemente no más de aproximadamente  $1 \times 10^{-9}$  M), pero tiene una afinidad de unión por el homólogo del antígeno de la segunda especie de mamífero no humana que es al menos aproximadamente 50 veces, o al menos aproximadamente 500 veces, o al menos aproximadamente 1000 veces, más débil que su afinidad de unión por el antígeno humano. El anticuerpo dependiente de especie puede ser cualquiera de los diversos tipos de anticuerpos que se han definido anteriormente, pero es preferentemente un anticuerpo humanizado o humano.

Como se usa en el presente documento, "anticuerpo mutante" o "variante de anticuerpo" se refiere a una variante de la secuencia de aminoácidos del anticuerpo dependiente de especie en la que se han modificado uno o más de los restos de aminoácidos del anticuerpo dependiente de especie. Tales mutantes tienen necesariamente menos de un 100% de identidad o similitud de secuencia con el anticuerpo dependiente de especie. En una realización, el anticuerpo mutante tendrá una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 75% de identidad o similitud de secuencia de aminoácidos con la secuencia de aminoácidos del dominio variable de cadena pesada o ligera del anticuerpo dependiente de especie, en otra realización al menos un 80%, en otra realización al menos un 85%, en otra realización al menos un 90%, y aún en otra realización al menos un 95%. La identidad o similitud con respecto a esta secuencia se define en el presente documento como el porcentaje de restos de aminoácido en la secuencia

candidata que son idénticos (es decir, mismo resto) o similares (es decir, resto de aminoácido del mismo grupo basándose en las propiedades comunes de la cadena lateral, véase posteriormente) a los restos del anticuerpo dependiente de especie, después de alinear las secuencias e introducir espacios, si fuera necesario, para conseguir el máximo porcentaje de identidad de secuencia. Se pretende que no afecte a la identidad o similitud de secuencia ninguno de los extremos N-terminal, C-terminal, o extensiones, supresiones, o inserciones internas en la secuencia del anticuerpo fuera del dominio variable.

Un anticuerpo "aislado" es el que se ha identificado y separado y/o recuperado de un componente de su entorno natural. Los componentes contaminantes de su entorno natural son materiales que interferirían con los usos de investigación, diagnósticos o terapéuticos del anticuerpo, y pueden incluir enzimas, hormonas, y otros solutos proteínicos o no proteínicos. En algunas realizaciones, un anticuerpo se purifica (1) hasta más de un 95% en peso del anticuerpo según se determina, por ejemplo, mediante el método de Lowry y, en algunas realizaciones, hasta más de un 99% en peso; (2) hasta un grado suficiente para obtener al menos 15 restos de la secuencia de aminoácidos N-terminal o interna mediante el uso, por ejemplo, de un secuenciador de copa giratoria, o (3) hasta homogeneidad mediante SDS-PAGE usando condiciones reductoras o no reductoras, por ejemplo, tinción de azul Coomassie o plata. Los anticuerpos aislados incluyen el anticuerpo *in situ* en células recombinantes dado que no estará presente al menos un componente del entorno natural del anticuerpo. Sin embargo, habitualmente, el anticuerpo aislado se prepara mediante menos una etapa de purificación.

Los "anticuerpos nativos" son habitualmente glicoproteínas heterotetraméricas de aproximadamente 150.000 daltons, compuestas por dos cadenas ligeras (L) idénticas y dos cadenas pesadas (H) idénticas. Cada cadena ligera está unida a una cadena pesada mediante un enlace covalente disulfuro, aunque el número de uniones disulfuro varía entre las cadenas pesadas de los diferentes isotipos de inmunoglobulina. Cada cadena pesada y ligera también tiene puentes disulfuro entre las cadenas espaciados regularmente. Cada cadena pesada tiene en un extremo un dominio variable ( $V_H$ ) seguido por un número de dominios constantes. Cada cadena ligera tiene un dominio variable en un extremo ( $V_L$ ) y un dominio constante en el otro extremo; el dominio constante de la cadena ligera se alinea con el primer dominio constante de la cadena pesada, y el dominio variable de la cadena ligera se alinea con el dominio variable de la cadena pesada. Se cree que restos de aminoácido particulares forman una interfase entre los dominios variables de la cadena ligera y la cadena pesada.

La "región variable" o el "dominio variable" de un anticuerpo se refiere a los dominios amino terminal de la cadena pesada o ligera del anticuerpo. El dominio variable de la cadena pesada se puede denominar " $V_H$ ". El dominio variable de la cadena ligera se puede denominar " $V_L$ ". Estos dominios son generalmente las partes más variables de un anticuerpo y contienen los sitios de unión a antígeno.

El término "variable" se refiere al hecho de que ciertas partes de los dominios variables difieren ampliamente en la secuencia entre los aminoácidos y se usan en la unión y la especificidad de cada anticuerpo particular por su antígeno particular. Sin embargo, la variabilidad no se distribuye uniformemente a través de los dominios variables de los anticuerpos. Esta se concentra en tres segmentos denominados regiones hipervariables (HVR) en los dominios variables tanto de la cadena ligera como de la cadena pesada. Las partes más altamente conservadas de los dominios variables se denominan regiones de marco (FR). Los dominios variables de las cadenas ligera y pesada nativas comprenden cada uno 4 regiones FR, que adoptan en mayor medida una configuración de lámina beta, conectadas mediante tres HVR, que forman lazos que conectan, y en algunos casos forman parte de, la estructura de lámina beta. Los HVR de cada cadena se mantienen juntos muy próximos entre sí mediante las regiones FR y, con los HVR de la otra cadena, contribuyen a la formación del sitio de unión a antígeno de los anticuerpos (véase Kabat *et al.*, Sequences of Proteins of Immunological Interest, quinta edición, National Institute of Health, Bethesda, MD (1991)). Los dominios constantes no están implicados directamente en la unión de un anticuerpo a un antígeno, sino que exhiben diversas funciones efectoras, tales como la participación del anticuerpo en la toxicidad celular dependiente de anticuerpo.

Las "cadenas ligeras" de los anticuerpos (inmunoglobulinas) de cualquier especie de vertebrados se pueden asignar a uno de dos tipos claramente distintos, denominados kappa ( $\kappa$ ) y lambda ( $\lambda$ ), basándose en las secuencias de aminoácidos de sus dominios constantes.

Dependiendo de las secuencias de aminoácidos de los dominios constantes de sus cadenas pesadas, los anticuerpos (inmunoglobulinas) se pueden asignar a sus diferentes clases. Existen cinco clases principales de inmunoglobulinas: IgA, IgD, IgE, IgG, IgM, y varias de estas se pueden dividir además en subclases (isotipos), por ejemplo, IgG<sub>1</sub>, IgG<sub>2</sub>, IgG<sub>3</sub>, IgG<sub>4</sub>, IgA<sub>1</sub>, e IgA<sub>2</sub>. Los dominios constantes de la cadena pesada que corresponden a las diferentes clases de inmunoglobulinas se denominan  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\epsilon$ ,  $\gamma$ , y  $\mu$ , respectivamente. Las estructuras y las configuraciones tridimensionales de las subunidades de las diferentes clases de inmunoglobulinas se conocen bien y se describen en general, por ejemplo, en Abbas *et al.*, Cellular and Mol. Immunology, 4<sup>a</sup> ed. (W.B. Saunders, Co., 2000). Un anticuerpo puede ser parte de una molécula de fusión mayor, formada por asociación covalente o no covalente del anticuerpo con una o más proteínas o péptidos diferentes.

Las expresiones "anticuerpo de longitud completa", "anticuerpo intacto" y "anticuerpo completo" se usan en el presente documento de forma intercambiable y se refieren a un anticuerpo que está en forma básicamente intacta,



no de fragmentos de anticuerpo como se definen en el presente documento. Las expresiones se refieren particularmente a un anticuerpo con cadenas pesadas que contienen una región Fc.

Para los fines del presente documento, un "anticuerpo desnudo" es un anticuerpo que no está conjugado con un resto citotóxico o radiomarcador.

5 Los "fragmentos de anticuerpos" comprenden una parte de un anticuerpo intacto, que comprende preferentemente la región de unión a antígeno del mismo. Algunos ejemplos de fragmentos de anticuerpo incluyen los fragmentos Fab, Fab', F(ab')<sub>2</sub>, y Fv; dianticuerpos; anticuerpos lineales; moléculas de anticuerpo de cadena individual; y anticuerpos multiespecíficos formados a partir de fragmentos de anticuerpo.

10 La digestión con papaína de los anticuerpos produce dos fragmentos de unión a antígeno idénticos, denominados fragmentos "Fab", cada uno con un sitio individual de unión a antígeno, y un fragmento "Fc" residual, cuyo nombre refleja su capacidad para cristalizar fácilmente. El tratamiento con pepsina proporciona un fragmento F(ab')<sub>2</sub> que tiene dos sitios de combinación a antígeno y aún es capaz de reticularse con el antígeno.

15 "Fv" es el mínimo fragmento de anticuerpo que contiene un sitio de unión a antígeno completo. En una realización, una especie Fv de doble cadena consiste en un dímero de un dominio variable de cadena pesada y un dominio variable de cadena ligera en asociación ajustada, no covalente. En una especie Fv de cadena sencilla (scFv), un dominio variable de cadena pesada y un dominio variable de cadena ligera pueden estar unidos covalentemente  
20 mediante un conector peptídico flexible de modo que en las cadenas ligera y pesada se puedan asociar en una estructura "dimérica" análoga a la de una especie Fv de cadena doble. Es en esta configuración en la que los tres HVR de cada dominio variable interactúan para definir un sitio de unión a antígeno en la superficie del dímero VH-VL. Colectivamente, los seis HVR confieren al anticuerpo especificidad de unión a antígeno. Sin embargo, incluso un dominio variable individual (o la mitad de un Fv que comprende solo los tres HVR específicos para un antígeno) tiene  
25 la capacidad de reconocer y unirse a un antígeno, aunque con una menor afinidad que el sitio completo de unión.

El fragmento Fab contiene los dominios variables de cadena pesada y ligera y también contiene el dominio constante de la cadena ligera y el primer dominio constante (CH1) de la cadena pesada. Los fragmentos Fab' difieren de los  
30 fragmentos Fab en la adición de unos pocos restos en el extremo carboxi terminal del dominio CH1 de la cadena pesada incluyendo una o más cisteínas de la región bisagra del anticuerpo. Fab'-SH es la denominación en el presente documento para un Fab' en el que el resto o restos de cisteína de los dominios constantes portan un grupo tiol libre. Los fragmentos de anticuerpo F(ab')<sub>2</sub> se produjeron originalmente como pares de fragmentos Fab' que tienen cisteínas bisagra entre los mismos. También se conocen otros acoplamientos químicos de fragmentos de anticuerpo.

35 Los fragmentos de anticuerpo "Fv de cadena sencilla" o "scFv" comprenden los dominios VH y VL del anticuerpo, en los que estos dominios están presentes en una cadena polipeptídica sencilla. Generalmente, el polipéptido scFv comprende además un conector polipeptídico entre los dominios VH y VL que permite que el scFv forme la estructura deseada para la unión a antígeno. Para una revisión de los scFv véase, por ejemplo, Pluckthun, en *The Pharmacology of Monoclonal Antibodies*, vol. 113, Rosenberg y Moore eds., (Springer-Verlag, Nueva York, 1994), pp. 269-315.

45 El término "dianticuerpos" se refiere a fragmentos de anticuerpo con dos sitios de unión a antígeno, comprendiendo los fragmentos un dominio variable de cadena pesada (VH) conectado a un dominio variable de cadena ligera (VL) en la misma cadena polipeptídica (VH-VL). Mediante el uso de un conector que es demasiado corto para permitir el emparejamiento entre los dos dominios en la misma cadena, los dominios se ven obligados a aparearse con los dominios complementarios de otra cadena y crean dos sitios de unión a antígeno. Los dianticuerpos pueden ser divalentes o biespecíficos. Los dianticuerpos se describen con mayor detalle, por ejemplo, en el documento de Patente EP 404,097; el documento de Patente WO 1993/01161; Hudson *et al.*, *Nat. Med.* 9:129-134 (2003); y Hollinger *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90: 6444-6448 (1993). También se describen trianticuerpos y tetraanticuerpos en Hudson *et al.*, *Nat. Med.* 9:129-134 (2003).

55 La expresión "región hipervariable", o los términos "HVR", o "HV", cuando se usan en el presente documento, se refieren a las regiones de un dominio variable del anticuerpo que son hipervariables en secuencia y/o forman lazos estructuralmente definidos. Generalmente, los anticuerpos comprenden seis HVR; tres en la VH (H1, H2, H3) y tres en la VL (L1, L2, L3). En los anticuerpos nativos, H3 y L3 presentan la mayor diversidad de los seis HVR, y se cree que en particular H3 desempeña un papel único en conferir una especificidad ajustada a los anticuerpos. Véanse, por ejemplo, Xu *et al.*, *Immunity* 13:37-45 (2000); Johnson y Wu, en *Methods in Molecular Biology* 248:1-25 (Lo, ed., Human Press, Totowa, NJ, 2003). De hecho, los anticuerpos de camélidos de origen natural que consisten en una  
60 sola cadena pesada son funcionales y estables en ausencia de la cadena ligera. Véanse, por ejemplo, Hamers-Casterman *et al.*, *Nature* 363:446-448 (1993); Sheriff *et al.*, *Nature Struct. Biol.* 3:733-736 (1996).

Se encuentran en uso numerosas delimitaciones de HVR y se incluyen en el presente documento. Las Regiones Determinantes de la Complementariedad de Kabat (CDR) se basan en la variabilidad de secuencia y son las que se usan con mayor frecuencia (Kabat *et al.*, *Sequence of Proteins of Immunological Interest*, 5ª ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD. (1991)). Chothia se refiere en su lugar a la localización de los

lazos estructurales (Chothia y Lesk, J. Mol. Biol. 196:901-917 (1987)). Las HVR de AbM representan un compromiso entre las HVR de Kabat y los lazos estructurales de Chothia, y las usa el software de modelado de anticuerpos Oxford Molecular's AbM. Las HVR de "contacto" se basan en un análisis de las estructuras cristalinas complejas disponibles. A continuación se indican los restos de cada una de estas HVR.

5

| Lazo | Kabat                   | AbM      | Chothia  | Contacto |
|------|-------------------------|----------|----------|----------|
| L1   | L24-L34                 | L24-L34  | L26-L32  | L30-L36  |
| L2   | L50-L56                 | L50-L56  | L50-L52  | L46-L55  |
| L3   | L89-L97                 | L89-L97  | L91-L96  | L89-L96  |
| H1   | H31-H35B                | H26-H35B | H26-H32  | H30-H35B |
|      | (Numeración de Kabat)   |          |          |          |
| H1   | H31-H35                 | H26-H35  | H26-H32  | H30-H35  |
|      | (Numeración de Chothia) |          |          |          |
| H2   | H50-H65                 | H50-H58  | H53-H55  | H47-H58  |
| H3   | H95-H102                | H95-H102 | H96-H101 | H93-H101 |

Los HVR pueden comprender "HVR extendidos" como sigue a continuación: 24-36 o 24-34 (L1), 46-56 o 50-56 (L2) y 89-97 o 89-96 (L3) en la VL y 26-35 (H1), 50-65 o 49-65 (H2) y 93-102, 94-102, o 95-102 (H3) en la VH. Los restos de los dominios variables se enumeran de acuerdo con Kabat *et al.*, citado anteriormente, para cada una de estas definiciones.

10

Los restos de "marco" o "FR" son los restos del dominio variable distintos de los restos de HVR como se definen en el presente documento.

15

Las expresiones "numeración de resto de dominio variable según Kabat" o "numeración de la posición de los aminoácidos según Kabat", y las variaciones de las mismas, se refieren al sistema de numeración usado para los dominios variables de cadena pesada o los dominios variables de cadena ligera de la compilación de anticuerpos de Kabat *et al.*, citado anteriormente. Mediante el uso de este sistema de numeración, la secuencia de aminoácidos lineal real puede contener una cantidad menor de aminoácidos o aminoácidos adicionales que corresponden a un acortamiento de, o a la inserción en, una FR o HVR del dominio variable. Por ejemplo, un dominio variable de cadena pesada puede incluir una inserción individual de un aminoácido (resto 52a de acuerdo con Kabat) después del resto 52 de H2 y restos insertados (por ejemplo, los restos 82a, 82b, y 82c, etc. de acuerdo con Kabat) después del resto 82 de la FR de la cadena pesada. La numeración de Kabat de restos se puede determinar para un anticuerpo determinado mediante la alineación de regiones de homología de secuencia de un anticuerpo con una secuencia "patrón" numerada de Kabat.

20

25

El sistema de numeración de Kabat se usa generalmente cuando se hace referencia a un resto en el dominio variable (aproximadamente los restos 1-107 de la cadena ligera y los restos 1-113 de la cadena pesada) (por ejemplo, Kabat *et al.*, Sequences of Immunological Interest. 5ª ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1991)). El "sistema de numeración EU" o "índice EU" se usa generalmente cuando se hace referencia a un resto en una región constante de la cadena pesada de una inmunoglobulina (por ejemplo, el índice EU informado en Kabat *et al.*, citado anteriormente). El "índice EU según Kabat" se refiere a la numeración de restos del anticuerpo EU IgG1 humano. A menos que se indique otra cosa en el presente documento, las referencias a los números de restos en el dominio variable de los anticuerpos incluyen la numeración de restos mediante el sistema de numeración de Kabat. A menos que se indique otra cosa en el presente documento, las referencias a números de restos en el dominio constante de los anticuerpos incluyen la numeración de restos mediante el sistema de numeración EU (véase, por ejemplo, el documento de Solicitud Provisional de Patente de Estados Unidos N° 60/640,323, Figuras para la numeración EU).

30

35

40

Un anticuerpo "madurado por afinidad" es uno con una o más alteraciones en uno o más HVR del mismo que dan como resultado una mejora en la afinidad del anticuerpo por el antígeno, en comparación con un anticuerpo precursor que no posee tal alteración o alteraciones. En una realización, un anticuerpo madurado por afinidad tiene una afinidad nanomolar o incluso picomolar por el antígeno diana. Los anticuerpos madurados por afinidad se pueden producir usando ciertos procedimientos conocidos en la técnica. Por ejemplo, Marks *et al.*, Bio/Technology 10:779-783 (1992) describen la maduración por afinidad mediante redistribución de los dominios VH y VL. La mutagénesis aleatoria de los restos de HVR y/o marco se describe, por ejemplo, en Barbas *et al.*, Proc Nat. Acad. Sci. USA 91:3809-3813 (1994); Schier *et al.*, Gene 169:147-155 (1995); Yelton *et al.*, J. Immunol. 155:1994-2004 (1995); Jackson *et al.*, J. Immunol. 154(7):3310-9 (1995); y Hawkins *et al.*, J. Mol. Biol. 226:889-896 (1992).

45

50

Un anticuerpo "bloqueante" o un anticuerpo "antagonista" es el que inhibe o reduce la actividad biológica del

antígeno al que se une. Ciertos anticuerpos bloqueantes o anticuerpos antagonistas inhiben básica o completamente la actividad biológica del antígeno.

Un "anticuerpo agonista", como se usa en el presente documento, es un anticuerpo que mimetiza parcial o completamente al menos una de las actividades funcionales de un polipéptido de interés.

5 Los anticuerpos "inhibidores de crecimiento" son los que evitan o reducen la proliferación de una célula que expresa un antígeno al que se une el anticuerpo.

10 Las "funciones efectoras" de anticuerpo se refieren a las actividades biológicas atribuibles a la región Fc (una región Fc de secuencia nativa o una región Fc variante de la secuencia de aminoácidos) de un anticuerpo, y varían con el isotipo de anticuerpo. Algunos ejemplos de funciones efectoras de anticuerpo incluyen: unión a C1q y citotoxicidad dependiente de complemento (CDC); unión al receptor de Fc; citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpo (ADCC); fagocitosis; regulación negativa de receptores de la superficie celular (por ejemplo, receptor de linfocitos B); y activación de linfocitos B.

15 La expresión "región Fc" se usa en el presente documento para definir una región C-terminal de una cadena pesada de inmunoglobulina, que incluye las regiones Fc de secuencia nativa y las regiones Fc variantes. Aunque los límites de la región Fc de una cadena pesada de inmunoglobulina podrían variar, la región Fc de cadena pesada de IgG humana se define habitualmente como la que se extiende desde un resto de aminoácido de la posición Cys226, o desde Pro230, hasta el extremo carboxi terminal de la misma. La lisina C-terminal (resto 447 de acuerdo con el sistema de numeración EU) de la región Fc se puede retirar, por ejemplo, durante la producción o purificación del anticuerpo, o mediante ingeniería recombinante de los ácidos nucleicos que codifican la cadena pesada del anticuerpo. En consecuencia, una composición de anticuerpos intactos puede comprender poblaciones de anticuerpos con todos los restos K447 retirados, poblaciones de anticuerpos con ningún resto K447 retirado, y poblaciones de anticuerpos que tienen una mezcla de anticuerpos con y sin el resto K447.

20 Una "región Fc funcional" posee una "función efectora" de una región Fc de secuencia nativa. Algunas "funciones efectoras" a modo de ejemplo incluyen unión a C1q; CDC; unión al receptor de Fc; ADCC; fagocitosis; regulación negativa de receptores de la superficie celular (por ejemplo, receptor de linfocitos B; BCR), etc. Tales funciones efectoras requieren generalmente que la región Fc se combine con un dominio de unión (por ejemplo, un dominio variable de anticuerpo) y se pueden evaluar usando diversos ensayos como se desvela, por ejemplo, en las definiciones en el presente documento.

30 Una "región Fc de secuencia nativa" comprende una secuencia de aminoácidos idéntica a la secuencia de aminoácidos de una región Fc encontrada en la naturaleza. Las regiones Fc humanas de secuencia nativa incluyen una región Fc de IgG1 humana de secuencia nativa (alotipos no A y A); una región Fc de IgG2 humana de secuencia nativa; una región Fc de IgG3 humana de secuencia nativa; y una región Fc de IgG4 humana de secuencia nativa, así como variantes de origen natural de las mismas.

40 Una "región Fc variante" comprende una secuencia de aminoácidos que difiere de la de una región Fc de secuencia nativa en virtud de al menos una modificación de aminoácido, preferentemente una o más sustituciones de aminoácido. Preferentemente, la región Fc variante tiene al menos una sustitución de aminoácido en comparación con la región Fc de secuencia nativa o con la región Fc de un polipéptido precursor, por ejemplo, de aproximadamente una a aproximadamente diez sustituciones de aminoácido, y preferentemente de aproximadamente una a aproximadamente cinco sustituciones de aminoácido en una región Fc de secuencia nativa o en la región Fc del polipéptido precursor. La región Fc variante en el presente documento poseerá preferentemente al menos aproximadamente un 80% de homología con una región Fc de secuencia nativa y/o con una región Fc de un polipéptido precursor, y lo más preferente al menos aproximadamente un 90% de homología con las mismas, más preferentemente al menos aproximadamente un 95% de homología con las mismas.

50 Un "receptor de Fc" o "FcR" describe un receptor que se une a la región Fc de un anticuerpo. En algunas realizaciones, un FcR es un FcR humano nativo. En algunas realizaciones, un FcR es el que une un anticuerpo IgG (un receptor gamma) e incluye los receptores de las subclases FcγRI, FcγRII, y FcγRIII, incluyendo variantes alélicas y formas de corte y empalme alternativo de estos receptores. Los receptores FcγRII incluyen FcγRIIA (un "receptor activante") y FcγRIIB (un "receptor inhibidor"), que tienen secuencias de aminoácidos similares que difieren principalmente en los dominios citoplasmáticos de las mismas. El receptor activante FcγRIIA contiene un motivo de activación de inmunorreceptor basado en tirosina (ITAM) en su dominio citoplasmático. El receptor inhibidor FcγRIIB contiene un motivo de inhibición de inmunorreceptor basado en tirosina (ITIM) en su dominio citoplasmático. (Véase, por ejemplo, Daëron, *Annu. Rev. Immunol.* 15:203-234 (1997)). Los FcR se revisan, por ejemplo, en Ravetch y Kinet, *Annu. Rev. Immunol.* 9:457-92 (1991); Capel *et al.*, *Immunomethods* 4:25-34 (1994); y de Haas *et al.*, *J. Lab. Clin. Med.* 126:330-41 (1995)). Otros FcR, incluyendo los que se identificarán en el futuro, se incluyen en el término "FcR" en el presente documento.

65 La expresión "receptor de Fc" o el término "FcR" también incluyen el receptor neonatal, FcRn, que es responsable de la transferencia de las IgG maternas al feto (Guyer *et al.*, *J. Immunol.* 117:587 (1976) y Kim *et al.*, *J. Immunol.* 24:249 (1994)) y de la regulación de la homeostasis de las inmunoglobulinas. Se conocen métodos de medición de

la unión a FcRn (véanse, por ejemplo, Ghetie y Ward, *Immunol. Today* 18(12):592-598 (1997); Ghetie *et al.*, *Nature Biotechnology*, 15(7):637-640 (1997); Hinton *et al.*, *J. Biol. Chem.* 279(8):6213-6216 (2004); documento de Patente WO 2004/92219 (Hinton *et al.*)).

5 La unión a FcRn humano *in vivo* y la semivida en suero de los polipéptidos de unión de alta afinidad a FcRn humano se pueden evaluar, por ejemplo, en ratones transgénicos o líneas celulares humanas transfectadas que expresan FcRn humano, o en primates a los que se administran polipéptidos con una región Fc variante. El documento de Patente WO 2000/42072 (Presta) describe variantes de anticuerpos con una unión mejorada o disminuida a los FcR. Véase también, por ejemplo, Shields *et al.*, *J. Biol. Chem.* 9(2):6591-6604 (2001).

10 Las "células efectoras humanas" son leucocitos que expresan uno o más FcR y realizan funciones efectoras. En ciertas realizaciones, las células expresan al menos FcγRIII y realizan la función o funciones efectoras de ADCC. Algunos ejemplos de leucocitos humanos que median la ADCC incluyen células mononucleares de sangre periférica (PBMC), linfocitos citotóxicos naturales (NK), monocitos, linfocitos T citotóxicos, y neutrófilos. Las células efectoras se pueden aislar a partir de fuentes nativas, por ejemplo, a partir de la sangre.

"Citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpo" o "ADCC" se refiere a una forma de citotoxicidad en la que la Ig segregada unida a los receptores de Fc (FcR) presentes en ciertas células citotóxicas (por ejemplo, linfocitos NK, neutrófilos, y macrófagos) permiten que estas células efectoras citotóxicas se unan específicamente a una célula diana que porta un antígeno y eliminen posteriormente la célula diana con citotoxinas. Las células principales que median la ADCC, los linfocitos NK, expresan solo FcγRIII, mientras que los monocitos expresan FcγRI, FcγRII, y FcγRIII. La expresión de FcR en células hematopoyéticas se resume en la Tabla 3 de la página 464 de Ravetch y Kinet, *Annu. Rev. Immunol.* 9:457-92 (1991). Para evaluar la actividad de la ADCC de una molécula de interés, se puede llevar a cabo un ensayo de ADCC *in vitro*, tal como se describe en el documento de Patente de Estados Unidos N° 5.500.362 o 5.821.337 o en el documento de Patente de Estados Unidos N° 6.737.056 (Presta). Las células efectoras útiles para tales ensayos incluyen PBMC y linfocitos NK. Alternativamente, o además, la actividad de la ADCC de la molécula de interés se puede evaluar *in vivo*, por ejemplo, en un modelo animal tal como el que se desvela en Clynes *et al.*, *PNAS (USA)* 95:652-656 (1998).

30 "Citotoxicidad dependiente de complemento" o "CDC" se refiere a la lisis de una célula diana en presencia de complemento. La activación de la ruta clásica de complemento se inicia mediante la unión del primer componente del sistema de complemento (C1q) a anticuerpos (de la subclase apropiada), que se unen a su antígeno cognado. Para evaluar la activación del complemento, se puede llevar a cabo un ensayo de CDC, por ejemplo, como se describe en Gazzano-Santoro *et al.*, *J. Immunol. Methods* 202:163 (1996). Se describen variantes de polipéptidos con secuencias de aminoácidos alteradas de la región Fc (polipéptidos con una región Fc variante) y capacidad de unión a C1q aumentada o disminuida, por ejemplo, en el documento de Patente de Estados Unidos N° 6.194.551 B1 y el documento de Patente WO 1999/51642. Véase también, por ejemplo, Idusogie *et al.*, *J. Immunol.* 164: 4178-4184 (2000).

40 La expresión "anticuerpo que comprende la región Fc" se refiere un anticuerpo que comprende una región Fc. La lisina C-terminal (resto 447 de acuerdo con el sistema de numeración EU) de la región Fc se puede retirar, por ejemplo, durante la purificación del anticuerpo o mediante ingeniería recombinante de los ácidos nucleicos que codifican el anticuerpo. En consecuencia, una composición que comprende un anticuerpo que tiene una región Fc de acuerdo con la presente invención puede comprender un anticuerpo con K447, con todos los K447 retirados, o una mezcla de anticuerpos con y sin el resto K447.

"Afinidad de unión" se refiere generalmente a la fuerza de la suma total de las interacciones no covalentes entre un sitio de unión individual de una molécula (por ejemplo, un anticuerpo) y su compañero de unión (por ejemplo, un antígeno). A menos que se indique otra cosa, como se usa en el presente documento, "afinidad de unión" se refiere a la afinidad de unión intrínseca que refleja una interacción 1:1 entre los miembros de una pareja de unión (por ejemplo, anticuerpo y antígeno). La afinidad de una molécula X por su compañera Y se puede representar generalmente mediante la constante de disociación (Kd). La afinidad se puede medir mediante métodos comunes conocidos en la técnica, incluyendo los que se describen en el presente documento. Los anticuerpos de baja afinidad se unen generalmente al antígeno lentamente y tienden a disociarse fácilmente, mientras que los anticuerpos de alta afinidad se unen generalmente al antígeno más rápidamente y tienden a permanecer unidos más tiempo. Se conoce en la técnica diversos métodos de medición de la afinidad de unión, cualquiera de los cuales se puede usar para los fines de la presente invención. En lo sucesivo se describen realizaciones específicas ilustrativas y a modo de ejemplo para medir la afinidad de unión.

60 En una realización, la "Kd" o el "valor de Kd" de acuerdo con la presente invención se mide mediante un ensayo de unión a antígeno radiomarcado (RIA) realizado con la versión Fab de un anticuerpo de interés y su antígeno como se describe en el siguiente ensayo. La afinidad de unión en solución de los Fab por un antígeno se mide equilibrando el Fab con una concentración mínima de antígeno marcado con <sup>125</sup>I en presencia de una serie de titulación del antígeno sin marcar, y capturando a continuación el antígeno unido con una placa revestida con un anticuerpo anti-Fab (véase, por ejemplo, Chen *et al.*, *J. Mol. Biol.* 293:865-881(1999)). Para establecer las condiciones del ensayo, se revisten placas MICROTITER® de múltiples pocillos (Thermo Scientific) durante una noche con 5 µg/ml de un

anticuerpo anti-Fab de captura (Cappel Labs) en carbonato sódico 50 mM (pH 9,6), y posteriormente se bloquean con albúmina de suero bovino al 2% (p/v) en PBS durante dos a cinco horas a temperatura ambiente (aproximadamente 23 °C). En una placa no adsorbente (Nunc N° 269620), se mezcla antígeno- $^{125}\text{I}$  100 pM o 26 pM con diluciones seriadas de un Fab de interés (por ejemplo, consistente con la evaluación del anticuerpo anti-VEGF, Fab-12, en Presta *et al.*, Cancer Res. 57:4593-4599 (1997)). El Fab de interés se incuba a continuación durante una noche; sin embargo, la incubación puede continuar durante un periodo de tiempo más largo (por ejemplo, aproximadamente 65 horas) para asegurar que se alcanza el equilibrio. Después de esto, las mezclas se transfieren a la placa de captura para incubación a temperatura ambiente (por ejemplo, durante una hora). La solución se retira a continuación y la placa se lava ocho veces con TWEEN-20™ al 0,1% en PBS. Cuando se han secado las placas, se añaden 150  $\mu\text{l}$ /pocillo de agente de centelleo (MICROSCINT-20™; Packard), y las placas se cuentan en un contador gamma TOP-COUNT™ (Packard) durante diez minutos. Se seleccionan las concentraciones de cada Fab que dan menos o igual que un 20% de la unión máxima para su uso en los ensayos de unión competitiva.

De acuerdo con otra realización, la  $K_d$  o el valor de  $K_d$  se mide mediante el uso de ensayos de resonancia de plasmones de superficie usando un equipo BIACORE®-2000 o BIACORE®-3000 (BIAcore, Inc., Piscataway, NJ) a 25 °C con chips CM5 de antígeno inmovilizado a  $\sim 10$  unidades de respuesta (RU). En resumen, los chips biosensores de dextrano carboximetilado (CM5, BIACORE, Inc.) se activan con clorhidrato de *N*-etil-*N'*-(3-dimetilaminopropil)-carbodiimida (EDC) y *N*-hidroxisuccinimida (NHS) de acuerdo con las instrucciones del proveedor. Se diluye el antígeno con acetato sódico 10 mM, pH 4,8, hasta 5  $\mu\text{g}/\text{ml}$  ( $\sim 0,2$  mM) antes de la inyección de un caudal de 5  $\mu\text{l}/\text{minuto}$  para conseguir aproximadamente 10 unidades de respuesta (RU) de proteína acoplada. Después de la inyección del antígeno, se inyecta etanolamina 1 M para bloquear los grupos sin reaccionar. Para las medidas de cinética, se inyectan diluciones seriadas dobles de Fab (0,78 nM a 500 nM) en PBS con tensioactivo TWEEN-20™ al 0,05% (PBST) a 25 °C con un caudal de aproximadamente 25  $\mu\text{l}/\text{min}$ . Se calculan las velocidades de asociación ( $k_{on}$ ) y las velocidades de disociación ( $k_{off}$ ) usando un modelo de unión de Langmuir individual 1:1 (software de evaluación BIACORE® versión 3.2) mediante ajuste simultáneo de los sensorgramas de asociación y disociación. La constante de disociación de equilibrio ( $K_d$ ) se calcula como la proporción  $k_{off}/k_{on}$ . Véase, por ejemplo, Chen *et al.*, J. Mol. Biol. 293:865-881 (1999). Si la velocidad de asociación excede de  $106 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$  mediante el ensayo de resonancia de plasmones de superficie anterior, entonces la velocidad de asociación se puede determinar usando una técnica de inactivación de fluorescencia que mide el aumento o la disminución de la intensidad de emisión de fluorescencia (excitación = 295 nm; emisión 340 nm, paso de banda de 16 nm) a 25 °C de un anticuerpo anti-antígeno 20 nM (forma Fab) en PBS, pH 7,2, en presencia de concentraciones en aumento de antígeno según se mide en un espectrómetro, tal como un espectrómetro equipado con detención de flujo (Aviv Instruments) o un espectrofotómetro de la serie 8000 de SLM-AMINCO™ (ThermoSpectronic) con una cubeta agitada.

La "velocidad *on*", "velocidad de asociación", "velocidad asociativa", o " $k_{on}$ " de acuerdo con la presente invención también se puede determinar como se ha descrito anteriormente usando un sistema BIACORE®-2000 o BIACORE®-3000 (BIAcore, Inc., Piscataway, NJ).

La expresión "básicamente similar" o "básicamente igual", como se usa en el presente documento, indica un grado suficientemente alto de similitud entre dos valores numéricos (por ejemplo, uno asociado con el anticuerpo de la invención y el otro asociado con un anticuerpo de referencia/comparación), de modo que un experto en la materia consideraría que la diferencia entre los dos valores tendría poca o ninguna significación biológica y/o estadística en el contexto de la característica biológica medida por dichos valores (por ejemplo, valores de  $K_d$ ). La diferencia entre dicho los dos valores es, por ejemplo, menos de aproximadamente un 50%, menos de aproximadamente un 40%, menos de aproximadamente un 30%, menos de aproximadamente un 20%, y/o menos de aproximadamente un 10% en función del valor de referencia/comparación.

La expresión "básicamente reducido" o "básicamente diferente", como se usa en el presente documento, indica un grado suficientemente alto de diferencia entre dos valores numéricos (generalmente, uno asociado con una molécula y el otro asociado con una molécula de referencia/comparación) de modo que un experto en la materia consideraría que la diferencia entre los dos valores sería de significación estadística en el contexto de la característica biológica medida por dichos valores (por ejemplo, valores de  $K_d$ ). La diferencia entre dichos dos valores es, por ejemplo, mayor de aproximadamente un 10%, mayor de aproximadamente un 20%, mayor de aproximadamente un 30%, mayor de aproximadamente un 40%, y/o mayor de aproximadamente un 50% en función del valor para la molécula de referencia/comparación.

Un "marco humano aceptor", para los fines del presente documento, es un marco que comprende la secuencia de aminoácidos de un marco de VL o VH que deriva de un marco de inmunoglobulina humana o de un marco de consenso humano. Un marco humano aceptor "derivado de" un marco de inmunoglobulina humana o de un marco de consenso humano puede comprender la misma secuencia de aminoácidos que los mismos, o puede contener cambios preexistentes en la secuencia de aminoácidos. En algunas realizaciones, el número de cambios de aminoácidos preexistentes es 10 o menos, 9 o menos, 8 o menos, 7 o menos, 6 o menos, 5 o menos, 4 o menos, 3 o menos, o 2 o menos. Cuando los cambios de aminoácidos preexistentes están presentes en una VH, estos cambios se producen preferentemente en solo tres, dos, o una de las posiciones 71H, 73H y 78H; por ejemplo, los restos de aminoácidos en estas posiciones pueden ser 71A, 73T y/o 78A. En una realización, el marco humano aceptor de VL es idéntico en secuencia a la secuencia de marco de inmunoglobulina humana o a la secuencia de marco de

consenso humano de VL.

Un "marco de consenso humano" es un marco que representa los restos de aminoácidos que aparecen de forma más frecuente en una selección de las secuencias de marco de VL o VH de inmunoglobulina humana. Generalmente, la selección de las secuencias de VL o VH de inmunoglobulina humana se hace a partir de un subgrupo de secuencias de dominio variable. Generalmente, el subgrupo de las secuencias es un subgrupo según Kabat *et al.*, citado anteriormente. En una realización, para el VL, el subgrupo es un subgrupo kappa I según Kabat *et al.*, citado anteriormente. En una realización, para el VH, el subgrupo es un subgrupo III según Kabat *et al.*, citado anteriormente.

Un "marco de consenso de subgrupo III de VH" comprende la secuencia de consenso obtenida a partir de las secuencias de aminoácidos del subgrupo III de cadena pesada de Kabat *et al.* En una realización, la secuencia de aminoácidos del marco de consenso del subgrupo III de VH comprende al menos una parte o la totalidad de cada una de las siguientes secuencias: EVQLVESG-GGLVQPGGSLRLSCAAS (SEC ID N°: 31)-H1-WVRQAPGKGLEWV (SEC ID N°: 32)-H2-RFTISADTSKNT-LYLQMNLSRAEDTAVYYC (SEC ID N°: 33)-H3-WGQGTLTVSS (SEC ID N°: 34). Véase la Figura 4.

Un "marco de consenso de subgrupo I de VL" comprende la secuencia de consenso obtenida a partir de las secuencias de aminoácidos del subgrupo I de cadena ligera kappa de Kabat *et al.* En una realización, la secuencia de aminoácidos del marco de consenso del subgrupo I de VH comprende al menos una parte o la totalidad de cada una de las siguientes secuencias: DIQMTQSPSSLSAS-VGDRVITTC (SEC ID N°: 35)-L1-WYQQKPGKAPKLLIY (SEC ID N°: 36)-L2-GVPSRFSGSGSDFTLTISLQPED-FATYYC (SEC ID N°: 37)-L3-FGQGTKVEIK (SEC ID N°: 38). Véase la Figura 5.

Como se usa en el presente documento, "conjunto codón" se refiere un conjunto de secuencias de tripletes de nucleótidos diferentes usado para codificar aminoácidos variantes deseados. Se puede sintetizar un conjunto de oligonucleótidos, por ejemplo, mediante síntesis en fase sólida, incluyendo las secuencias que representan todas las posibles combinaciones de tripletes de nucleótidos proporcionados por el conjunto codón y que codifican el grupo deseado de aminoácidos. Una forma convencional para denominar los codones es mediante el código IUB, que se conoce en la técnica y se describe en el presente documento. Un conjunto codón se representa por lo general mediante 3 letras mayúsculas en cursiva, por ejemplo, *NNK*, *NNS*, *XYZ*, *DVK* y similares. Un "conjunto codón no aleatorio", como se usa en el presente documento, se refiere de ese modo a un conjunto codón que codifica aminoácidos seleccionados que cumplen parcialmente, de forma preferente completamente, los criterios para la selección de aminoácidos que se describen en el presente documento. La síntesis de oligonucleótidos con "degeneración" de nucleótidos seleccionada en ciertas posiciones se conoce bien en la técnica, por ejemplo, el enfoque TRIM (Knappek *et al.* (1999) *J. Mol. Biol.* 296:57-86; Garrard & Henner (1993) *Gene* 128:103). Tales conjuntos de oligonucleótidos que tienen ciertos conjuntos codón se pueden sintetizar usando sintetizadores de ácidos nucleicos comerciales (disponibles, por ejemplo, en Applied Biosystems, Foster City, CA), o se pueden obtener en el mercado (por ejemplo, en Life Technologies, Rockville, MD). Por lo tanto, un conjunto de oligonucleótidos sintetizados que tienen un conjunto codón particular incluirán por lo general una pluralidad de oligonucleótidos con diferentes secuencias, estableciéndose las diferencias por el conjunto codón en la secuencia global. Los oligonucleótidos, como se usa de acuerdo con la presente invención, tienen secuencias que permiten la hibridación en una plantilla de ácidos nucleicos de dominio variable y también pueden, pero no es necesario, incluir sitios de restricción de enzimas útiles, por ejemplo, para fines de clonación.

La expresión "anticuerpos lineales" se refiere a los anticuerpos que se describen en Zapata *et al.* (1995 *Protein Eng.* 8(10):1057-1062). En resumen, estos anticuerpos comprenden una pareja de segmentos Fd en tándem ( $V_{H-C_{H1}}-V_{H-C_{H1}}$ ) que, junto con los polipéptidos de cadena ligera complementarios, forman una pareja de regiones de unión a antígeno. Los anticuerpos lineales pueden ser biespecíficos o mono-específicos.

Como se usa en el presente documento, "librería" se refiere a una pluralidad de anticuerpos o de secuencias de fragmentos de anticuerpo (por ejemplo, polipéptidos de la invención), o a los ácidos nucleicos que codifican estas secuencias, siendo las secuencias diferentes en la combinación de aminoácidos variantes que se introducen en estas secuencias de acuerdo con los métodos de la invención.

"Exposición a fagos" es una técnica mediante la cual se exponen polipéptidos variantes en forma de proteínas de fusión al menos a una parte de una proteína de revestimiento de la superficie de un fago, por ejemplo, partículas de fago filamentoso. Una utilidad de la exposición a fagos reside en el hecho de que se pueden ordenar de forma rápida y eficaz grandes librerías de variantes de proteína randomizadas para las secuencias que se unen a un antígeno diana con alta afinidad. La exposición de librerías de péptidos y proteínas a fagos se ha usado para la identificación sistemática de millones de polipéptidos para encontrar aquellos con propiedades de unión específica. Los métodos de exposición a fagos polivalentes se han usado para exponer péptidos aleatorios pequeños y proteínas pequeñas a través de fusiones en el gen III o el gen IV de fagos filamentosos. Wells y Lowman (1992) *Curr. Opin. Struct. Biol.* 3:355-362, y las referencias citadas en el mismo. En una exposición a un fago monovalente, una librería de proteínas o péptidos se fusiona con un gen III o una parte del mismo, y se expresa a bajos niveles en presencia de proteína del gen III de tipo silvestre de modo que las partículas de fago exponen una copia, o ninguna, de las

proteínas de fusión. Los efectos de avidéz se reducen con respecto al fago polivalente de modo que la ordenación se hace basándose en la afinidad intrínseca del ligando, y se usan vectores fagémidos, que simplifican las manipulaciones del ADN. Lowman y Wells (1991) *Methods: A companion to Methods in Enzymology* 3:205-0216.

5 Un "fagémido" es un vector plásmido que tiene un origen bacteriano de replicación, por ejemplo, Co1E1, y una copia de una región intergénica de un bacteriófago. El fagémidos se puede usar en cualquier bacteriófago conocido, incluyendo bacteriófago filamentoso y bacteriófago lambdaoide. El plásmido también contendrá generalmente un  
10 marcador seleccionable para resistencia a antibióticos. Los segmentos de ADN clonados en estos vectores se pueden propagar en forma de plásmidos. Cuando las células que albergan estos vectores se proporcionan con todos los genes necesarios para la producción de las partículas de fago, el modo de replicación del plásmido cambia a replicación en círculo rodante para generar copias de cadena individual del ADN de plásmido y empaquetar las partículas de fago. El fagémido puede formar partículas de fago infecciosas o no infecciosas. Este término incluye fagémidos que contienen un gen de proteína de revestimiento de fago o un fragmento del mismo unido a un gen de polipéptido heterólogo en forma de una fusión génica de modo que el polipéptido heterólogo se expone en la  
15 superficie de la partícula de fago.

La expresión "vector de fago" significa una forma replicativa de doble cadena de un bacteriófago que contiene un gen heterólogo y capaz de replicación. El vector de fago tiene un origen de replicación del fago que permite la replicación del fago y la formación de partículas de fago. El fago es preferentemente un bacteriófago filamentoso, tal como un fago M13, fl, fd, Pf3 o un derivado del mismo, o un fago lambdaoide, tal como lambda, 21, phi80, phi81, 82, 424, 434, etc., o un derivado del mismo.

Como se usa en el presente documento, "posición accesible a disolvente" se refiere una posición de un resto de aminoácidos en las regiones variables de las cadenas pesadas y ligeras de un anticuerpo fuente o un fragmento de  
25 unión a antígeno que se determina, basándose en la estructura, conjunto de estructuras y/o estructura modelada del anticuerpo o fragmento de unión a antígeno, que es potencialmente disponible para el acceso y/o contacto de disolvente con una molécula, tal como un antígeno específico de anticuerpo. Estas posiciones se encuentran por lo general en los CDR y en el exterior de la proteína. Las posiciones accesibles a disolvente de un anticuerpo o un fragmento de unión antígeno, como se definen en el presente documento, se pueden determinar usando cualquiera de diversos algoritmos conocidos en la técnica. En una realización, las posiciones accesibles a disolvente se determinan usando coordinados de un modelo tridimensional de un anticuerpo, usando preferentemente un programa de ordenador tal como al programa InsightII (Accelrys, San Diego, CA). Las posiciones accesibles a disolvente también se pueden determinar usando algoritmos conocidos en la técnica (por ejemplo, Lee y Richards (1971) *J. Mol. Biol.* 55, 379 y Connolly (1983) *J. Appl. Cryst.* 16, 548). La determinación de las posiciones accesibles a disolvente se puede llevar a cabo usando software adecuado para el modelado de proteínas y la información estructural tridimensional obtenida a partir de un anticuerpo. El software que se puede utilizar para estos fines incluye el software SYBYL Biopolymer Module (Tripos Associates). Generalmente, cuando un algoritmo (programa) requiere que un usuario introduzca un parámetro de tamaño, el "tamaño" de la sonda que se usa en el cálculo se ajusta a un radio de aproximadamente 1,4 Angstrom o inferior. Además, se han descrito métodos de determinación de las regiones y áreas accesibles a disolvente que usan software para ordenadores personales en Pacios (1994) *Comput. Chem.* 18(4): 377-386.

Un "factor o agente angiogénico" es un factor de crecimiento que estimula el desarrollo de los vasos sanguíneos, por ejemplo, estimula la angiogénesis, el crecimiento de células endoteliales, la estabilidad de los vasos sanguíneos, y/o la vasculogénesis, etc. Por ejemplo, algunos factores angiogénicos incluyen, pero no se limitan, por ejemplo, VEGF y miembros de la familia VEGF, P1GF, familia PDGF, familia de los factores de crecimiento de fibroblastos (FGF), ligandos TIE (Angiopoyetinas), efrinas, ligando de tipo Delta 4 (DLL4), Del-1, factores de crecimiento de fibroblastos ácidos (aFGF) y básicos (bFGF), Folistatina, factor estimulante de colonias de granulocitos (G-CSF), factor de crecimiento hepático (HGF) /factor de dispersión (SF), interleuquina-8 (IL-8), Leptina, Midquina, neuropilinas, factor de crecimiento placentario, factor de crecimiento de células endoteliales derivado de plaquetas (PD-ECGF), factor de crecimiento derivado de plaquetas, especialmente PDGF-BB o PDGFR-beta, Pleiotrofina (PTN), Progranulina, Proliferina, factor de crecimiento transformante alfa (TGF-alfa), factor de crecimiento transformante beta (TGF-beta), factor de necrosis tumoral alfa (TNF-alfa), etc. También incluiría factores que aceleran la curación de heridas, tales como hormona de crecimiento, factor de crecimiento de tipo insulina I (IGF-I), VIGF, factor de crecimiento epidérmico (EGF), CTGF y miembros de su familia, y TGF-alfa y TGF-beta. Véase, por ejemplo, Klagsbrun y D'Amore (1991) *Annu. Rev. Physiol.* 53:217-39; Streit y Detmar (2003) *Oncogene* 22:3172-3179; Ferrara y Alitalo (1999) *Nature Medicine* 5(12):1359-1364; Tonini *et al.* (2003) *Oncogene* 22:6549-6556 (por ejemplo, Tabla 1 que enumera los factores angiogénicos conocidos); y, Sato (2003) *Int. J. Clin. Oncol.* 8:200-206.

60 Un "agente antiangiogénico" o "inhibidor de la angiogénesis" se refiere a una sustancia de bajo peso molecular, un polinucleótido (incluyendo, por ejemplo, un ARN inhibitorio (ARNi o ARNip)), un polipéptido, una proteína aislada, una proteína recombinante, un anticuerpo, o conjugados o proteínas de fusión de las mismas, que inhibe la angiogénesis, vasculogénesis, o permeabilidad vascular indeseable, directa o indirectamente. Se debería entender que el agente antiangiogénico incluye los agentes que se unen y bloquean la actividad angiogénica del factor angiogénico o su receptor. Por ejemplo, un agente antiangiogénico es un anticuerpo u otro antagonista de un agente angiogénico que se ha definido anteriormente, por ejemplo, anticuerpos frente a VEGF-A o el receptor de VEGF-A  
65

(por ejemplo, el receptor de KDR o el receptor de Flt-1), inhibidores de anti-PDGFR tales como Gleevec™ (Mesilato de Imatinib), moléculas pequeñas que bloquean la señalización del receptor de VEGF (por ejemplo, PTK787/ZK2284, SU6668, SUTENT®/SU11248 (malato de sunitinib), AMG706, o las que se describen, por ejemplo, en el documento de solicitud de Patente Internacional WO 2004/113304). Los agentes antiangiogénicos también incluyen inhibidores de la angiogénesis nativos, por ejemplo, angiostatina, endostatina, etc. Véanse, por ejemplo, Klagsbrun y D'Amore (1991) *Annu. Rev. Physiol.* 53:217-39; Streit y Detmar (2003) *Oncogene* 22:3172-3179 (por ejemplo, la Tabla 3 que enumera la terapia antiangiogénica en melanoma maligno); Ferrara y Alitalo (1999) *Nature Medicine* 5(12):1359-1364; Tonini *et al.* (2003) *Oncogene* 22:6549-6556 (por ejemplo, la Tabla 2 que enumera los factores antiangiogénicos conocidos); y, Sato (2003) *Int. J. Clin. Oncol.* 8:200-206 (por ejemplo, la Tabla 1 que enumera los agentes antiangiogénicos usados en ensayos clínicos).

El término "VEGF" o "VEGF-A", como se usa en el presente documento, se refiere al factor de crecimiento celular endotelial vascular humano de 165 aminoácidos y a los factores de crecimiento celular endotelial vascular humano de 121, 189, y 206 aminoácidos relacionados, como se describe en Leung *et al.* (1989) *Science* 246:1306, y Houck *et al.* (1991) *Mol. Endocrin.* 5:1806, junto con las formas alélicas de origen natural y procesadas de los mismos. El término "VEGF" también se refiere a los VEGF de especies no humanas tales como ratón, rata, o primate. En ocasiones, el VEGF de una especie específica se indica mediante términos tales como hVEGF para el VEGF humano, mVEGF para el VEGF murino, etc. El término "VEGF" también se usa para referirse a formas truncadas de los polipéptidos que comprenden los aminoácidos 8 a 109 o 1 a 109 del factor de crecimiento celular endotelial vascular humano de 165 aminoácidos. La referencia a cualquiera de tales formas de VEGF se puede identificar en la presente solicitud, por ejemplo, mediante "VEGF (8-109)", "VEGF (1-109)" o "VEGF<sub>165</sub>". Las posiciones de los aminoácidos para una VEGF nativa "truncada" se numeran como se indica en la secuencia de VEGF nativa. Por ejemplo, la posición del aminoácido 17 (metionina) en el VEGF nativo truncado es también la posición 17 (metionina) en el VEGF nativo. El VEGF nativo truncado tiene una afinidad de unión por los receptores de KDR y Flt-1 comparable al VEGF nativo.

Un "anticuerpo anti-VEGF" es un anticuerpo que se une a VEGF con la suficiente afinidad y especificidad. En una realización, el anticuerpo anti-VEGF de la invención es un anticuerpo B20-4.1.1. En aún otra realización, el anticuerpo anti-VEGF de la invención es un anticuerpo B20-4.1.1RR. En aún otra realización, el anticuerpo anti-VEGF de la invención se puede usar como agente terapéutico en la dirección y la interferencia con enfermedades y afecciones en las que está implicada la actividad de VEGF. El anticuerpo anti-VEGF no se unirá habitualmente a otros homólogos de VEGF tales como VEGF-B o VEGF-C, ni a otros factores de crecimiento tales como P1GF, PDGF o bFGF.

El anticuerpo anti-VEGF "Bevacizumab (BV)", también conocido como "rhuMAb VEGF" o "AVASTIN®", es un anticuerpo monoclonal anti-VEGF humanizado generado de acuerdo con Presta *et al.* (1997) *Cancer Res.* 57:4593-4599. Comprende regiones de marco de IgG1 humana mutadas y las regiones determinantes de la complementariedad de unión a antígeno del anticuerpo monoclonal anti-hVEGF murino A.4.6.1 que bloquean la unión del VEGF humano a sus receptores. Aproximadamente un 93% de la secuencia de aminoácidos de Bevacizumab, incluyendo la mayoría de las regiones de marco, deriva de IgG1 humana, y aproximadamente un 7% de la secuencia deriva del anticuerpo murino A4.6.1. Bevacizumab tiene una masa molecular de aproximadamente 149.000 daltons y está glicosilado.

La expresión "polipéptido de la serie B20", como se usa en el presente documento, se refiere un polipéptido, que incluye un anticuerpo que se une a VEGF. Los polipéptidos de la serie B20 incluyen, pero no se limitan a, los anticuerpos derivados de una secuencia del anticuerpo B20 o de un anticuerpo derivado de B20 que se describen en el documento de Publicación de Patente de Estados Unidos N° 20060280747, el documento de Publicación de Patente de Estados Unidos N° 20070141065 y/o el documento de Publicación de Patente de Estados Unidos N° 20070020267. En una realización, el polipéptido de la serie B20 es B20-4.1 como se describe en el documento de Publicación de Patente de Estados Unidos N° 20060280747, el documento de Publicación de Patente de Estados Unidos N° 20070141065 y/o el documento de Publicación de Patente de Estados Unidos N° 20070020267.

El término "B20-4.1.1", como se usa en el presente documento, se refiere a un anticuerpo que se une a VEGF y comprende un anticuerpo en el que HVR-H1 es SEC ID N°: 1; HVR-H2 es SEC ID N°: 2; HVR-H3 es SEC ID N°: 3; HVR-L1 es SEC ID N°: 4; HVR-L2 es SEC ID N°: 6; HVR-L3 es SEC ID N°: 7.

El término "B20-4.1.1RR", como se usa en el presente documento, se refiere a un anticuerpo que se une a VEGF y comprende un anticuerpo de que HVR-H1 es SEC ID N°: 1; HVR-H2 es SEC ID N°: 2; HVR-H3 es SEC ID N°: 3; HVR-L1 es SEC ID N°: 5; HVR-L2 es SEC ID N°: 6; HVR-L3 es SEC ID N°: 7.

El término "G6-31", como se usa en el presente documento, es uno de los polipéptidos de la serie G-6 como se describe en el documento de Publicación de Patente de Estados Unidos N° 20060280747, el documento de Publicación de Patente de Estados Unidos N° 20070141065 y/o el documento de Publicación de Patente de Estados Unidos N° 20070020267. Otros polipéptidos de la serie G-6, como se describe en el documento de Publicación de Patente de Estados Unidos N° 20060280747, el documento de Publicación de Patente de Estados Unidos N° 20070141065 y/o el documento de Publicación de Patente de Estados Unidos N° 20070020267 incluyen, pero no se



limitan a, G6-8 y G6-23.

Las expresiones "actividad biológica" y "biológicamente activo", con respecto a un polipéptido de VEGF, se refieren a las propiedades físicas/químicas y a las funciones biológicas asociadas con VEGF.

5 Un "antagonista de VEGF" se refiere una molécula capaz de neutralizar, bloquear, inhibir, anular, reducir o interferir con las actividades de VEGF que incluyen, pero no se limitan a, su unión a uno o más receptores de VEGF. Los antagonistas de VEGF incluyen, sin limitación, anticuerpos anti-VEGF y fragmentos de unión a antígeno de los mismos, moléculas y derivados de receptor que se unen específicamente a VEGF secuestrando de ese modo su unión a uno o más receptores, anticuerpos anti-receptor de VEGF y antagonistas del receptor de VEGF tales como inhibidores de molécula pequeña de las tirosina quinasas de VEGFR. La expresión "antagonista de VEGF", como se usa en el presente documento, incluye específicamente moléculas, incluyendo anticuerpos, fragmentos de anticuerpos, otros polipéptidos de unión, péptidos, y moléculas pequeñas no peptídicas, que se unen a VEGF y son capaces de neutralizar, bloquear, inhibir, anular, reducir o interferir con las actividades de VEGF. De ese modo, la expresión "actividades de VEGF" incluye específicamente actividades biológicas mediadas por VEGF (como se han definido anteriormente en el presente documento) de VEGF. En una realización, el antagonista de VEGF es un anticuerpo anti-VEGF B20-4.1.1. En aún otra realización, el antagonista de VEGF es un anticuerpo anti-VEGF B20-4.1.1RR.

20 Como se usa en el presente documento, "tratamiento" (y variantes tales como "tratar" o "que trata") se refiere a la intervención clínica en un intento de alterar el curso natural del individuo o la célula que se trata, y se puede llevar a cabo para profilaxis o durante el curso de una patología clínica. Los efectos deseables del tratamiento incluyen prevenir la aparición o la reaparición de la enfermedad, aliviar los síntomas, disminuir cualquier consecuencia patológica directa o indirecta de la enfermedad, prevenir la metástasis, disminuir la velocidad de desarrollo de la enfermedad, mejorar o paliar el estado de la enfermedad, y remitir o mejorar la prognosis. En algunas realizaciones, los anticuerpos de la invención se usan para retrasar el desarrollo de una enfermedad o trastorno o para ralentizar el progreso de una enfermedad o trastorno.

30 Administración "crónica" se refiere a la administración del agente o agentes de un modo continuo a diferencia de un modo agudo, de modo que mantenga el efecto terapéutico inicial (actividad) durante un período de tiempo prolongado. Administración "intermitente" es el tratamiento que no se realiza consecutivamente sin interrupción, sino que es de naturaleza cíclica.

35 Un "trastorno" es cualquier afección que podría beneficiarse del tratamiento (por ejemplo, mamíferos que padecen o necesitan profilaxis frente a una angiogénesis anómala (angiogénesis excesiva, inapropiada o incontrolada) o permeabilidad vascular). Esto incluye trastornos o enfermedades crónicas y agudas incluyendo las afecciones patológicas que predisponen al mamífero al trastorno en cuestión. Algunos ejemplos no limitantes de trastornos que se tratan en el presente documento incluyen tumores malignos y benignos; cánceres linfoides y no leucemias; y, en particular, metástasis de tumores (por ejemplo, cáncer).

40 Las expresiones "trastorno proliferativo celular" y "trastorno proliferativo" se refieren a trastornos que están asociados a cierto grado de proliferación celular anómala. En una realización, el trastorno proliferativo celular es cáncer.

45 "Tumor", como se describe en el presente documento, se refiere cualquier crecimiento celular neoplásico y proliferación, tanto si es maligno como benigno, y a todas las células y tejidos precancerosos y cancerosos. Los términos "cáncer", "canceroso" y "tumor", y las expresiones "trastorno proliferativo celular", y "trastorno proliferativo" no se excluyen mutuamente como se hace referencia en el presente documento.

50 Los términos "cáncer" y "canceroso" se refieren a, o describen, la afección fisiológica en mamíferos que se caracteriza por lo general por un crecimiento celular no regulado. Algunos ejemplos de cáncer incluyen, pero no se limitan a, carcinoma, linfoma, blastoma, sarcoma, y leucemia. Algunos ejemplos más particulares de tales cánceres incluyen, pero no se limitan a, cáncer de células escamosas, cáncer de pulmón (incluyendo cáncer de pulmón microcítico, cáncer de pulmón no microcítico, adenocarcinoma de pulmón, y carcinoma escamoso de pulmón), cáncer de peritoneo, cáncer hepatocelular, cáncer gástrico o de estómago (incluyendo cáncer gastrointestinal y cáncer del estroma gastrointestinal), cáncer pancreático, glioblastoma, cáncer de cuello uterino, cáncer de ovario, cáncer de hígado, cáncer de vejiga, hepatoma, cáncer de mama, cáncer de colon, cáncer colorrectal, cáncer de endometrio o uterino, carcinoma de glándula salivar, cáncer de riñón o renal, cáncer de hígado, cáncer de próstata, cáncer de vulva, cáncer de tiroides, carcinoma hepático y diversos tipos de cáncer de la cabeza y el cuello, melanoma, melanoma de extensión superficial, melanoma léntigo maligno, melanomas lentiginosos acrales, melanomas nodulares, así como linfoma de linfocitos B (incluyendo linfoma no Hodgkin de bajo grado/folicular (NHL); NHL linfocítico microcítico (SL); NHL de grado intermedio/folicular; NHL difuso de grado intermedio; NHL inmunoblástico de alto grado; NHL linfoblástico de alto grado; NHL microcítico no escindido de alto grado; NHL de enfermedad voluminosa; linfoma de células del manto; linfoma relacionado con SIDA; y Macroglobulinemia de Waldenström); leucemia linfocítica crónica (CLL); leucemia linfoblástica aguda (ALL); leucemia de células pilosas; leucemia mieloblástica crónica; y trastorno linfoproliferativo posterior al trasplante (PTLD), así como proliferación vascular

anómala asociada con facomatosis, edema (tal como el asociado con los tumores cerebrales), y síndrome de Meigs.

Un "individuo", "sujeto", o "paciente" es un vertebrado. En ciertas realizaciones, el vertebrado es un mamífero. Los mamíferos incluyen, pero no se limitan a, animales de granja (tales como vacas), animales deportivos, mascotas, tales como gatos, perros, y caballos), primates, ratones y ratas. En ciertas realizaciones, un mamífero es un ser humano.

La expresión "formulación farmacéutica" se refiere a una preparación que está en una forma tal que permite que la actividad biológica del ingrediente activo sea eficaz, y que no contiene ningún componente adicional que sea inaceptablemente tóxico para el sujeto al que se administraría la formulación. Tales formulaciones pueden ser estériles.

Una formulación "estéril" es una forma aséptica o exenta de todo microorganismo viviente y sus esporas.

Una "cantidad eficaz" se refiere a una cantidad eficaz, en las dosificaciones y durante los períodos de tiempo necesarios, para conseguir el resultado terapéutico o profiláctico deseado.

Una "cantidad terapéuticamente eficaz" de una sustancia/molécula de la invención puede variar de acuerdo con factores tales como el estado de la enfermedad, la edad, sexo, y peso del individuo, y la capacidad de la sustancia/molécula para provocar la respuesta deseada en el individuo. Una cantidad terapéuticamente eficaz incluye una cantidad en la que cualquier efecto tóxico o perjudicial de la sustancia/molecular se ve superado por los efectos terapéuticamente beneficiosos. Una "cantidad profilácticamente eficaz" se refiere a una cantidad eficaz, en las dosificaciones y durante los períodos de tiempo necesarios, para conseguir el resultado profiláctico deseado. Por lo general, pero no necesariamente, dado que una dosis profiláctica se usa en los sujetos antes, o en un estadio temprano, de la enfermedad, la cantidad profilácticamente eficaz podría ser menor que la cantidad terapéuticamente eficaz.

La administración "en combinación con" uno o más agentes terapéuticos adicionales incluye la administración simultánea (concurrente) y consecutiva en cualquier orden.

Los "vehículos", como se usan en el presente documento, incluyen vehículos, excipientes, o estabilizantes farmacéuticamente aceptables que no son tóxicos para la célula o el mamífero que se expone a los mismos en las dosificaciones y concentraciones empleadas. A menudo, el vehículo fisiológicamente aceptable es una solución acuosa de pH tamponado. Algunos ejemplos de vehículos fisiológicamente aceptables incluyen tampones tales como fosfato, citrato, y otros ácidos orgánicos; antioxidantes incluyendo ácido ascórbico; polipéptidos de bajo peso molecular (menos de aproximadamente 10 restos); proteínas, tales como albúmina de suero, gelatina, o inmunoglobulinas; polímeros hidrofílicos tales como polivinilpirrolidona; aminoácidos tales como glicina, glutamina, asparagina, arginina o lisina; monosacáridos, disacáridos, y otros carbohidratos incluyendo glucosa, manosa, o dextrina; agentes quelantes tales como AEDT; alcoholes azúcares tales como manitol o sorbitol; contraiones formadores de sales tales como sodio; y/o tensioactivos no iónicos tales como TWEEN™, polietilenglicol (PEG), y PLURONICS™.

Un "liposoma" es una vesícula pequeña compuesta por varios tipos de lípidos, fosfolípidos y/o tensioactivos que es útil para suministrar un fármaco (tal como un polipéptido de VEGF o un anticuerpo frente al mismo) a un mamífero. Los componentes del liposoma se disponen habitualmente en una formación bicapa, similar a la disposición de los lípidos de las membranas biológicas.

La expresión "composición antineoplásica" se refiere a una composición útil en el tratamiento del cáncer que comprende al menos un agente terapéutico activo, por ejemplo, un "agente anticancerígeno". Algunos ejemplos de agentes terapéuticos (agentes anticancerígenos) incluyen, pero no se limitan a, por ejemplo, agentes quimioterapéuticos, agentes inhibidores del crecimiento, agentes citotóxicos, agentes usados en terapia de radiación, agentes antiangiogénicos, agentes apoptóticos, agentes antitubulina, y otros agentes para tratar cáncer, tales como anticuerpos anti-HER-2, anticuerpos anti-CD20, un antagonista del receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR) (por ejemplo, un inhibidor de tirosina quinasa), inhibidores de HER1/EGFR (por ejemplo, erlotinib (Tarceva™), inhibidores de factores de crecimiento derivados de plaquetas (por ejemplo, Gleevec™ (Mesilato de Imatinib)), un inhibidor de la COX-2 (por ejemplo, celecoxib), interferones, citoquinas, antagonistas (por ejemplo, anticuerpos neutralizantes) que se unen a una o más de las siguientes dianas: ErbB2, ErbB3, ErbB4, PDGFR-beta, BlyS, APRIL, BCMA o receptor o receptores de VEGF, TRAIL/Apo2, y otros agentes químicos bioactivos y orgánicos, etc. También se incluyen en la invención las combinaciones de los mismos.

La expresión "agente citotóxico", como se usa en el presente documento, se refiere a una sustancia que inhibe o previene una función celular y/o causa muerte o destrucción celular. Se pretende que el término incluya isótopos radiactivos (por ejemplo, At<sup>211</sup>, I<sup>131</sup>, I<sup>125</sup>, Y<sup>90</sup>, Re<sup>186</sup>, Re<sup>188</sup>, Sm<sup>153</sup>, Bi<sup>212</sup>, P<sup>32</sup>, Pb<sup>212</sup> y los isótopos radiactivos del Lu), agentes quimioterapéuticos (por ejemplo, metotrexato, adriamicina, alcaloides de la vinca (vincristina, vinblastina, etopósido), doxorubicina, melfalán, mitomicina C, clorambucilo, daunorrubicina u otros agentes intercalantes, enzimas y fragmentos de los mismos tales como enzimas nucleolíticas, antibióticos, y toxinas tales como toxinas de

molécula pequeña o toxinas enzimáticamente activas de origen bacteriano, fúngico, planta o animal, incluyendo fragmentos y/o variantes de las mismas, y los diversos agentes antitumorales o anticancerígenos que se desvelan posteriormente. Posteriormente se describen otros agentes citotóxicos. Un agente tumoricida causa la destrucción de células tumorales.

5 Una "toxina" es cualquier sustancia capaz de tener un efecto perjudicial en el crecimiento o la proliferación de una célula.

10 Un "agente quimioterapéutico" es un compuesto químico útil en el tratamiento del cáncer. Algunos ejemplos de agentes quimioterapéuticos incluyen agentes alquilantes tales como tiotepa y ciclofosfamida (CYTOXAN®); sulfonatos dialquilo tales como busulfán, improsulfán y piposulfán; aziridinas tales como benzodopa, carbocouona, meturedopa, y uredopa; etileniminas y metilamelaminas incluyendo altretamina, trietilenmelamina, trietilenfosforamida, trietilfosforamida y trimetilomelamina; acetogeninas (especialmente bulatacina y bulatacinona); delta-9-tetrahidrocannabinol (dronabinol, MARINOL®); beta-lapacona; lapacol; colchicinas; ácido betulínico; una camptotecina (incluyendo el análogo sintético topotecán (HYCAMTIN®), CPT-11 (irinotecán, CAMPTOSAR®), acetilcamptotecina, escopolectina, y 9-aminocamptotecina); briostatina; calistatina; CC-1065 (incluyendo sus análogos sintéticos adozelesina, carzelesina y bizelesina); podofilotoxina; ácido podofilínico; tenipósido; criptoficinas (particularmente criptoficina 1 y criptoficina 8); dolastatina; duocarmicina (incluyendo los análogos sintéticos, KW-2189 y CB1-TM1); eleuterobina; pancratistatina; una sarcodictina; espongiastatina; mostazas nitrogenadas tales como clorambucilo, clornafazina, clorofosfamida, estramustina, ifosfamida, mecloretamina, clorhidrato de óxido de mecloretamina, melfalán, novembicina, fenesterina, prednimustina, ftofosfamida, mostaza de uracilo; nitrosoureas tales como carmustina, clorozotocina, fotemustina, lomustina, lomustina, nimustina, y ranimustina; antibióticos tales como los antibióticos de enediina (por ejemplo, caliqueamicina, especialmente caliqueamicina gamma 11 y caliqueamicina omegall (véase, por ejemplo, Nicolaou *et al.*, *Angew. Chem Intl. Ed. Engl.*, 33: 183-186 (1994)); CDP323, un inhibidor de integrina alfa-4 oral; dinemicina, incluyendo dinemicina A; una esperamicina; así como cromóforo de neocarzinostatina y cromóforos antibióticos de cromoproteína enediina relacionados), aclacinomisinas, actinomicina, autramicina, azaserina, bleomicinas, cactinomicina, carabicina, carminomicina, carzinofilina, cromomicinas, dactinomicina, daunorrubicina, detorrubicina, 6-diazo-5-oxo-L-norleucina, doxorubicina (incluyendo ADRIAMYCIN®, morfolino-doxorrubicina, cianomorfolino-doxorrubicina, 2-pirrolino-doxorrubicina, inyección de liposomas de doxorubicina HCl (DOXIL®), doxorubicina liposomal TLC D-99 (MYOCET®), doxorubicina liposomal pegilada (CAELYX®), y desoxidoxorrubicina), epirubicina, esorrubicina, idarrubicina, marcelomicina, mitomicinas tales como mitomicina C, ácido micofenólico, nogalamicina, olivomicinas, peplomicina, porfiromicina, puromicina, quelamicina, rodorrubicina, estreptonigrina, estreptozocina, tubercidina, ubenimex, zinostatina, zorrubicina; antimetabolitos tales como metotrexato, gemcitabina (GEMZAR®), tegafur (UFTORAL®), capecitabina (XELO-DA®), una epotilona, y 5-fluorouracilo (5-FU); combretastatina; análogos de ácido fólico tales como denopterina, metotrexato, pteropterina, trimetrexato; análogos de purina tales como fludarabina, 6-mercaptapurina, tiamiprina, tioguanina; análogos de pirimidina tales como ancitabina, azacitidina, 6-azauridina, carmofur, citarabina, didesoxiuridina, doxifluridina, enocitabina, floxuridina; andrógenos tales como calusterona, propionato de dromostanolona, epitioestanol, mepitioestano, testolactona; antiadrenales tales como aminoglutetimida, mitotano, trilostano; reforzador de ácido fólico tal como ácido frofínico; aceglatona; glucósido de aldofosfamida; ácido aminolevulínico; eniluracilo; amsacrina; bestrabucilo; bisantreno; edatraxato; defofamina; demecolcina; diaziouona; elfornitina; acetato de eliptinio; una epotilona; etoglúcido; nitrato de galio; hidroxurea; lentinano; lonidainina; maitansinoides tales como maitansina y ansamitocinas; mitoguazona; mitoxantrona; mopidanmol; mopiaerina; pentostatina; fenamet; pirarrubicina; losoxantrona; 2-etilhidrazida; procarbazona; complejo de polisacáridos PSK® (JHS Natural Products, Eugene, OR); razoxano; rizoxina; sizofirano; espirogermanio; ácido tenuazónico; triaziquona; 2,2',2''-triclorotrietilamina; tricotecenos (especialmente toxina T-2, verracurina A, roridina A y anguidina); uretano; vindesina (ELDISINE®, FILDESIN®); dacarbazina; manomustina; mitobronitol; mitolactol; pipobromán; gacitosina; arabinósido ("Ara-C"); tiotepa; taxoides, por ejemplo, paclitaxel (TAXOL®), formulación de nanopartículas obtenidas por ingeniería de albúmina de paclitaxel (ABRAXANE™), y docetaxel (TAXOTERE®); clorambucilo; 6-tioguanina; mercaptopurina; metotrexato; agentes de platino tales como cisplatino, oxaliplatino (por ejemplo, ELOXATIN®), y carboplatino; vincas, que previenen la polimerización de tubulina de la formación de microtúbulos, incluyendo vinblastina (VELBAN®), vincristina (ONCOVIN®), vindesina (ELDISINE®, FILDESIN®), y vinorelbina (NAVELBINE®); etopósido (VP-16); ifosfamida; mitoxantrona; leucovorina; novantrona; edatrexato; daunomicina; aminopterina; ibandronato; inhibidor de la topoisomerasa RFS 2000; difluorometilornitina (DMFO); retinoides tales como ácido retinoico, incluyendo bexaroteno (TARGRETIN®); bisfosfonatos tales como clodronato (por ejemplo, BONEFOS® u OSTAC®), etidronato (DIDROCAL®), NE-58095, ácido zoledrónico/zoledronato (ZOMETA®), alendronato (FOSA-MAX®), pamidronato (ARELIA®), tiludronato (SKELID®), o risedronato (ACTONEL®); troxacitabina (un análogo de 1,3-dioxolano nucleósido citosina); oligonucleótidos antisentido, particularmente los que inhiben la expresión de los genes de las rutas de señalización implicadas en la proliferación celular aberrante, tales como, por ejemplo, PKC-alfa, Raf, H-Ras, y receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGF-R) (por ejemplo, erlotinib (Tarceva™)); y VEGF-A que reduce la proliferación celular; vacunas tales como vacuna THERATOPE® y vacunas de terapia génica, por ejemplo, vacuna ALLOVECTIN®, vacuna LEUVECTIN®, y vacuna VAXID®; inhibidor de la topoisomerasa 1 (por ejemplo, LURTOTECAN®); rmRH (por ejemplo, ABARELIX®); BAY439006 (sorafenib; Bayer); SU-11248 (sunitinib, SUTENT®, Pfizer); perifosina, inhibidores de la COX-2 (por ejemplo, celecoxib o etoricoxib), inhibidor del proteosoma (por ejemplo, PS341); bortezomib (VELCADE®); CCI-779; tipifarnib (R11577); orafenib, ABT510; inhibidores de Bcl-2 tales como oblimersen sódico (GENASENSE®); pixantrona; inhibidores del

EGFR; inhibidores de tirosina quinasa; inhibidores de serina-treonina quinasa tales como rapamicina (sirolimus, RAPAMUNE®); inhibidores de la farnesiltransferasa tales como lonafarnib (SCH 6636, SARAS-AR™); y sales, ácidos o derivados farmacéuticamente aceptables de cualquiera de los anteriores; así como las combinaciones de dos o más de los anteriores tales como CHOP, una abreviatura de una terapia combinada de ciclofosfamida, doxorubicina, vincristina, y prednisolona; y FOLFOX, una abreviatura para un régimen de tratamiento con oxaliplatino (ELOXATIN™) combinado con 5-FU y leucovorina, y sales, ácidos o derivados farmacéuticamente aceptables de cualquiera de los anteriores; así como las combinaciones de dos o más de los anteriores.

Los agentes quimioterapéuticos como se definen en el presente documento incluyen "agentes antihormonales" o "agentes terapéuticos endocrinos" que actúan para regular, reducir, bloquear, o inhibir los efectos de hormonas que pueden estimular el crecimiento del cáncer. Estos pueden ser hormonas propiamente dichas, que incluyen, pero no se limitan a: antiestrógenos y moduladores selectivos de los receptores estrogénicos (SERM), que incluyen, por ejemplo, tamoxifeno (incluyendo tamoxifeno NOLVADEX®), raloxifeno, droloxifeno, 4-hidroxitamoxifeno, trioxifeno, keoxifeno, LY117018, onapristona, y toremifeno FARESTON; inhibidores de aromatasas que inhiben la enzima aromatasas, que regula la producción de estrógenos en las glándulas adrenales, tales como, por ejemplo, 4(5)-imidazoles, aminoglutetimida, acetato de megestrol MEGASE®, exemestano AROMASIN®, formestano, fadrozol, vorozol RIVISOR®, letrozol FEMARA®, y anastrozol ARIMIDEX®; y antiandrógenos tales como flutamida, nilutamida, bicalutamida, leuprolide, y goserelina; así como troxacitabina (un análogo de 1,3-dioxolano nucleósido citosina); oligonucleótidos antisentido, particularmente los que inhiben la expresión de genes en las rutas de señalización implicadas en la proliferación celular aberrante, tales como, por ejemplo, PKC-alfa, Raf y H-Ras; ribozimas tales como un inhibidor de la expresión de VEGF (por ejemplo, ribozima ANGIOZYME®) y un inhibidor de la expresión de HER2; vacunas tales como vacunas de terapia génica, por ejemplo, vacuna ALLOVECTIN®, vacuna LEUVECTIN®, y vacuna VAXID®; rIL-2 PROLEUKIN®; inhibidor de la topoisomerasa 1 LURTOTECAN®; rmRH ABARELIX®; Vinorelbina y Esperamicinas (véase el documento de Patente de Estados Unidos N° 4.675.187), y sales, ácidos o derivados farmacéuticamente aceptables de cualquiera de los anteriores; así como las combinaciones de dos o más de los anteriores.

Un "agente inhibidor del crecimiento", cuando se usa en el presente documento, se refiere a un compuesto o composición que inhibe el crecimiento de una célula (tal como una célula que expresa VEGF), *in vitro* o *in vivo*. De ese modo, el agente inhibidor del crecimiento puede ser el que reduce considerablemente el porcentaje de células (tal como una célula que expresa VEGF) en fase S. Algunos ejemplos de agentes inhibidores del crecimiento incluyen agentes que bloquean el desarrollo del ciclo celular (en un lugar distinto de la fase S), tales como agentes que inducen la detención G1 y la detención de la fase M. Los bloqueantes de la fase M clásicos incluyen las vincas (vincristina y vinblastina), taxanos, e inhibidores de la topoisomerasa II tales como doxorubicina, epirubicina, daunorubicina, etopósido, y bleomicina. Los agentes que detienen G1 también influyen en la detención de la fase S, por ejemplo, agentes alquilantes del ADN tales como tamoxifeno, prednisona, dacarbazina, mecloretamina, cisplatino, metotrexato, 5-fluorouracilo, y ara-C. Se puede encontrar información adicional en Mendelsohn e Israel, eds., *The Molecular Basis of Cancer*, capítulo 1, titulado "Regulación del ciclo celular, oncogenes, y fármacos antineoplásicos" de Murakami *et al.* (W.B. Saunders, Philadelphia, 1995), por ejemplo, p. 13. Los taxanos (paclitaxel y docetaxel) son fármacos anticancerígenos derivados ambos del tejo. Docetaxel (TAXOTERE®, Rhone-Poulenc Rorer), derivado tejo común, es un análogo semisintético de paclitaxel (TAXOL®, Bristol-Myers Squibb). Paclitaxel y docetaxel estimulan el ensamblaje de los microtúbulos a partir de los dímeros de tubulina y estabiliza los microtúbulos evitando la despolimerización, lo que da como resultado la inhibición de la mitosis en las células.

La "patología" de una enfermedad incluye todos los fenómenos que comprometen el bienestar del paciente. Para el cáncer, esto incluye, sin limitación, crecimiento celular anómalo o incontrolable, metástasis, interferencia con el funcionamiento normal de las células vecinas, liberación de citoquinas u otros productos secretorios en niveles anómalos, supresión o agravamiento de la respuesta inflamatoria o inmunológica, etc.

El término "profármaco", como se usa en la presente solicitud, se refiere a un precursor o forma derivada de una sustancia farmacéuticamente activa que es menos tóxico para las células tumorales en comparación con el fármaco precursor y es capaz de activarse enzimáticamente o convertirse en la forma precursora más activa. Véanse, por ejemplo, Wilman (1986) "Prodrugs in Cancer Chemotherapy" *Biochemical Society Transactions*, 14, pp. 375-382, 615<sup>o</sup> Meeting Belfast y Stella *et al.* (1985). "Prodrugs: A Chemical Approach to Targeted Drug Delivery," *Directed Drug Delivery*, Borchardt *et al.*, (ed.), pp. 247-267, Humana Press. Los profármacos de la presente invención incluyen, pero no se limitan a, profármacos que contienen fosfato, profármacos que contienen tiofosfato, profármacos que contienen sulfato, profármacos que contienen péptidos, profármacos modificados con D-aminoácidos, profármacos glicosilados, profármacos que contienen β-lactamas, profármacos que contienen fenoxiacetamida opcionalmente sustituida o profármacos que contienen fenilacetamida opcionalmente sustituida, profármacos de 5-fluorocitosina y otros profármacos de 5-fluorouridina, que se pueden convertir en el fármaco libre citotóxico más activo. Algunos ejemplos de fármacos citotóxicos que se pueden derivatizar en una forma de profármaco para su uso en la presente invención incluyen, pero no se limitan a, los agentes quimioterapéuticos descritos anteriormente.

Una "molécula pequeña" se define en el presente documento como la que tiene un peso molecular inferior a aproximadamente 500 daltons.

"Purificado" significa que una molécula está presente en una muestra en una concentración de al menos un 95% en peso, o al menos un 98% en peso de la muestra en la que está contenida.

5 Una molécula de ácido nucleico "aislada" es una molécula de ácido nucleico que está separada de al menos una molécula de ácido nucleico distinta con la que está habitualmente asociada, por ejemplo, en su ambiente natural. Una molécula de ácido nucleico aislada incluye además una molécula de ácido nucleico contenida en las células que expresan habitualmente la molécula de ácido nucleico, pero la molécula de ácido nucleico está presente extracromosómicamente o en una ubicación cromosómica que es diferente de su ubicación cromosómica natural.

10 El término "vector", como se usa en el presente documento, pretende referirse a una molécula de ácido nucleico capaz de transportar otro ácido nucleico al que se ha unido. Un tipo de vector es un "plásmido", que se refiere a ADN circular de doble cadena en el que se pueden ligar segmentos de ADN adicionales. Otro tipo de vector es un vector de fago. Otro tipo de vector es un vector viral, en el que se pueden ligar segmentos de ADN adicionales en el genoma viral. Ciertos vectores son capaces de replicación autónoma en una célula anfitriona en la que se introducen  
 15 (por ejemplo, vectores bacterianos que tienen un origen bacteriano de replicación y vectores de mamíferos episomales). Se pueden integrar otros vectores (por ejemplo, vectores de mamíferos no episomales) en el genoma de una célula anfitriona tras la introducción en la célula anfitriona, y de ese modo se replican junto con el genoma anfitrión. Además, ciertos vectores son capaces de dirigir la expresión de los genes a los que se unen operativamente. Tales vectores se denominan en el presente documento "vectores de expresión recombinante" o, simplemente, "vectores de expresión". En general, los vectores de expresión de utilidad en las técnicas de ADN recombinante se encuentran a menudo en forma de plásmidos. En la presente memoria descriptiva, "plásmido" y "vector" se pueden usar de forma intercambiable ya que el plásmido es la forma usada más habitualmente de un vector.

25 "Polinucleótido" o "ácido nucleico", como se usan de forma intercambiable en el presente documento, se refieren a polímeros de nucleótidos de cualquier longitud, e incluyen ADN y ARN. Los nucleótidos puede ser desoxirribonucleótidos, ribonucleótidos, nucleótidos o bases modificados, y/o sus análogos, o cualquier sustrato que se pueda incorporar a un polímero mediante ADN o ARN polimerasa o mediante una reacción sintética. Un polinucleótido puede comprender nucleótidos modificados, tales como nucleótidos metilados y sus análogos. Si  
 30 estuviera presente, la modificación en la estructura del nucleótido se puede impartir antes o después del montaje del polímero. Las secuencias de nucleótidos pueden estar interrumpidas con componentes no nucleotídicos. Un polinucleótido puede comprender modificaciones hechas después de la síntesis, tal como conjugación a un marcador. Otros tipos de modificaciones incluyen, por ejemplo, "protección", sustitución de uno o más de los nucleótidos de origen natural con un análogo, modificaciones internucleótido tales como, por ejemplo, las que tienen uniones sin carga (por ejemplo, metil fosfonatos, fosfotriésteres, fosfoamidatos, carbamatos, etc.) y las que tienen uniones con carga (por ejemplo, fosforotioatos, fosforoditioatos, etc.), las que contienen restos colgantes, tales como, por ejemplo, proteínas (por ejemplo, nucleasas, toxinas, anticuerpos, péptidos de señal, ply-L-lisina, etc.), las que contienen intercaladores (por ejemplo, acridina, psoraleno, etc.), las que contienen quelantes (por ejemplo, metales, metales radiactivos, boro, metales oxidativos, etc.), las que contienen alquilantes, las que contienen uniones modificadas (por ejemplo, ácidos nucleicos alfa anoméricos, etc.), así como las formas sin modificar del polinucleótido o polinucleótidos. Además, cualquiera de los grupos hidroxilo presentes habitualmente en los azúcares se pueden reemplazar, por ejemplo, por grupos fosfonato, grupos fosfato, grupos protegidos mediante  
 40 protección convencional, o activar para preparar uniones adicionales a nucleótidos adicionales, o se pueden conjugar a soportes sólidos o semisólidos. Los OH 5' y 3' terminales se pueden fosforilar o sustituir con aminas o restos de grupos orgánicos de protección de 1 a 20 átomos de carbono. También se pueden derivatizar otros hidroxilos en grupos protectores convencionales. Los polinucleótidos también pueden contener formas análogas de los azúcares ribosa o desoxirribosa que se conoce generalmente en la técnica, incluyendo, por ejemplo, 2'-O-metil-, 2'-O-alil-, 2'-fluoro- o 2'-azido-ribosa, análogos de azúcar carbocíclicos, azúcares  $\alpha$ -anoméricos, azúcares epiméricos tales como arabinosa, xilosas o lixosas, azúcares de piranosa, azúcares de furanosa, sedoheptulosas, análogos acíclicos, y análogos de nucleósido básicos tales como metil ribosida. Se pueden reemplazar una o más uniones fosfodiéster con grupos de unión alternativos. Estos grupos de unión alternativos incluyen, pero no se limitan a, realizaciones en las que el fosfato está reemplazado por P(O)S ("tioato"), P(S)S ("ditioato"), (O)NR<sub>2</sub> ("amidato"), P(O)R, P(O)OR', CO, o CH<sub>2</sub> ("formacetal"), en los que cada R o R' es independientemente H o alquilo (C 1-20) sustituido o sin sustituir que contiene opcionalmente una unión éter (-O-), arilo, alqueno, cicloalquilo, cicloalqueno  
 45 o araldilo. No todas las uniones de un polinucleótido necesitan ser idénticas. La descripción precedente se aplica a todos los polinucleótidos a los que se hace referencia en el presente documento, incluyendo ARN y ADN.

60 "Oligonucleótido", como se usa en el presente documento, se refiere generalmente a polinucleótidos cortos, generalmente de cadena sencilla, generalmente sintéticos, que tienen generalmente, pero no necesariamente, menos de aproximadamente 200 nucleótidos de longitud. Los términos "oligonucleótido" y "polinucleótido" son mutuamente excluyentes. La descripción anterior para los polinucleótidos es igual y completamente aplicable a los oligonucleótidos.

65 El "porcentaje (%) de identidad de secuencia de aminoácidos" con respecto a una secuencia polipeptídica de referencia se define como el porcentaje de restos de aminoácidos de una secuencia candidata que son idénticos a los restos de aminoácidos de la secuencia polipeptídica de referencia, después de alinear las secuencias e introducir

espacios, si fuera necesario, para conseguir el porcentaje máximo de identidad de secuencia, y no considerando ninguna sustitución conservativa como parte de la identidad de secuencia. La alineación, con el fin de determinar el porcentaje de identidad de secuencia de aminoácidos, se puede conseguir de varias maneras que están dentro de las habilidades en la técnica, por ejemplo, usando software de ordenador disponible públicamente tal como software BLAST, BLAST-2, ALIGN o Megalign (DNAS-TAR). Los expertos en la materia pueden determinar los parámetros apropiados para la alineación de secuencias, incluyendo cualquier algoritmo necesario para conseguir la alineación máxima de la longitud completa de las secuencias a comparar. Para los fines del presente documento, sin embargo, los valores del porcentaje de identidad de secuencia de aminoácidos se generan usando el programa de ordenador de comparación de secuencia ALIGN-2. El programa de ordenador de comparación de secuencia ALIGN-2 fue escrito por Genentech, Inc., y el código fuente se ha presentado con la documentación de usuario en la Oficina de Copyright de Estados Unidos, Washington D.C., 20559, donde se registra con el N° de Registro de Copyright de Estados Unidos TXU510087. El programa ALIGN-2 está disponible públicamente en Genentech, Inc., South San Francisco, California, o se puede compilar a partir del código fuente. El programa ALIGN-2 se debería compilar para su uso en un sistema operativo UNIX, preferentemente UNIX digital V4.0D. Todos los parámetros de comparación de secuencia se ajustan mediante el programa ALIGN-2 y no varían.

En las situaciones en las que se emplea ALIGN-2 para las comparaciones de la secuencia de aminoácidos, el porcentaje de identidad de secuencia de aminoácidos de una secuencia de aminoácidos determinada A en, con, o frente a una secuencia de aminoácidos determinada B (que se puede expresar alternativamente como una secuencia de aminoácidos determinada A que tiene o comprende un cierto porcentaje de identidad de secuencia de aminoácidos en, con, o frente a una secuencia de aminoácidos determinada B) se calcula como sigue a continuación:

**100 veces la fracción X/Y**

donde X es el número de restos de aminoácido conseguidos como coincidencias idénticas mediante el programa de alineación de secuencia ALIGN-2 en esa alineación de programa de A y B, y donde Y es el número total de restos de aminoácido en B. Se entenderá que cuando la longitud de la secuencia de aminoácidos A no es igual a la longitud de la secuencia de aminoácidos B, el porcentaje de identidad de secuencia de aminoácidos de A con respecto a B no igualará el porcentaje de identidad de secuencia de aminoácidos de B con respecto a A. A menos que se indique específicamente otra cosa, todos los valores de porcentaje de identidad de secuencia de aminoácidos que se usan en el presente documento se obtienen como se describe en el párrafo inmediatamente precedente acusando el programa de ordenador ALIGN-2.

La expresión "secuencias de control" se refiere a las secuencias de ADN necesarias para la expresión de una secuencia codificadora unida operativamente en un organismo anfitrión particular. Las secuencias de control que son adecuadas para procariontes incluyen, por ejemplo, un promotor, opcionalmente una secuencia operadora, y un sitio de unión de ribosoma. Se conoce que las células eucariotas utilizan promotores, señales de poliadenilación, y potenciadores.

Un ácido nucleico está "unido operativamente" cuando está colocado en relación funcional con otra secuencia de ácido nucleico. Por ejemplo, el ADN para una presecuencia o líder secretorio está unido operativamente a ADN para un polipéptido si está expresado como una preproteína que participa en la secreción del polipéptido; un promotor o potenciador está unido operativamente a una secuencia codificante si afecta a la transcripción de la secuencia; o un sitio de unión a ribosoma está unido operativamente a una secuencia codificante si está ubicado de modo que facilita la traducción. Generalmente, "unido operativamente" significa que las secuencias de ADN que se unen son contiguas y, en el caso de un líder secretorio, contiguas y en fase de lectura. Sin embargo, los potenciadores no tienen que ser contiguos. La unión se consigue mediante ligadura en sitios de restricción convenientes. Si tales sitios no existen, se usan adaptadores o conectores de oligonucleótido sintético de acuerdo con la práctica convencional.

Como se usa en el presente documento, las expresiones "célula", "línea celular", y "cultivo celular" se usan de forma intercambiable y la totalidad de tales designaciones incluyen progenie. De ese modo, el término "transformantes" y la expresión "células transformadas" incluyen la célula sujeto primaria y los cultivos derivados de la misma con independencia del número de transferencias. También se entiende que toda la progenie puede no ser exactamente idéntica en el contenido de ADN, debido a mutaciones deliberadas o inadvertidas. Se incluye la progenie mutante que tiene la misma función o actividad biológica que se identifica sistemáticamente en la célula transformada originalmente. Cuando se expresan denominaciones distintas, serán evidentes a partir del contexto.

El término "simultáneamente" se usa en el presente documento para referirse a la administración de dos o más agentes terapéuticos, donde al menos parte de la administración se superpone el tiempo. En consecuencia, la administración simultánea incluye un régimen de dosificación en el que la administración de uno o más agentes continúa después de discontinuar la administración de uno o más agentes distintos.

"Reparación de cáncer" se refiere en el presente documento al regreso del cáncer después de tratamiento. En una realización, la reparación de cáncer incluye el regreso del cáncer en la mama, así como la reparación distante, cuando el cáncer regresa desde fuera de la mama.

**Composiciones de la invención**

La invención incluye realizaciones de polinucleótido y anticuerpo aislado. En una realización, un anticuerpo anti-VEGF está purificado.

La presente invención también incluye composiciones, incluyendo composiciones farmacéuticas, que comprenden un anticuerpo anti-VEGF; y polinucleótidos que comprenden secuencias que codifican un anticuerpo anti-VEGF. Como se usa en el presente documento, las composiciones comprenden uno o más anticuerpos que se unen a VEGF, y/o uno o más polinucleótidos que comprenden secuencias que codifican uno o más anticuerpos que se unen a VEGF. Estas composiciones pueden comprender además vehículos adecuados, tales como excipientes farmacéuticamente aceptables incluyendo tampones, que se conocen bien en la técnica.

En una realización, los anticuerpos anti-VEGF de la invención son monoclonales. En aún otra realización, los anticuerpos anti-VEGF son policlonales. También se incluyen dentro del alcance de la invención los fragmentos Fab, Fab', Fab'-SH y F(ab')<sub>2</sub> de los anticuerpos anti-VEGF que se proporcionan en el presente documento. Estos fragmentos de anticuerpos se pueden crear mediante medios tradicionales, tales como digestión enzimática, o se pueden generar mediante técnicas recombinantes. Tales fragmentos de anticuerpo pueden ser quiméricos o humanizados. Estos fragmentos son útiles para el diagnóstico y para los fines que se exponen posteriormente. En una realización, un anticuerpo anti-VEGF es un anticuerpo quimérico, humanizado, o humano.

Los anticuerpos monoclonales se obtienen a partir de una población de anticuerpos básicamente homogénea, es decir, los anticuerpos individuales que comprende la población son idénticos excepto por las posibles mutaciones de origen natural que pudieran estar presentes en cantidades minoritarias. De ese modo, el modificador "monoclonal" indica que el carácter del anticuerpo no es una mezcla de anticuerpos discretos.

En el presente documento se proporcionan anticuerpos monoclonales a modo de ejemplo derivados de una librería de fagos y se describen en el Ejemplo 1. Estos anticuerpos se denominan B20-4.1.1 y B20-4.1.1 RR. Las secuencias de los dominios variables de cadena pesada y ligera de B20-4.1.1 y B20-4.1.1 RR se muestran en las Figuras 1 y 6-9.

Para identificar sistemáticamente los anticuerpos que se unen a un epítipo particular en el antígeno de interés, se puede llevar a cabo un ensayo de rutina de bloqueo cruzado como el que se describe en *Antibodies, A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, Ed Harlow y David Lane (1988). Alternativamente, se puede llevar a cabo el mapeado de epítopos como se describe, por ejemplo, en Champe *et al.* (1995) *J. Biol. Chem.* 270:1388-1394, para determinar si el anticuerpo se une al epítipo de interés. Posteriormente se proporcionan otras realizaciones a modo de ejemplo de anticuerpos anti-VEGF.

**Realizaciones específicas de anticuerpos anti-VEGF**

En una realización, la invención proporciona un anticuerpo que comprende:

- (i) una secuencia de HVR-H1 que comprende la secuencia de SEC ID N<sup>o</sup>: 1;
- (ii) una secuencia de HVR-H2 que comprende la secuencia de SEC ID N<sup>o</sup>: 2;
- (iii) una secuencia de HVR-H3 que comprende la secuencia de SEC ID N<sup>o</sup>: 3.
- (iv) una secuencia de HVR-L1 que comprende la secuencia de SEC ID N<sup>o</sup>: 4.
- (v) una secuencia de HVR-L2 que comprende la secuencia de SEC ID N<sup>o</sup>: 6.
- (vi) una secuencia de HVR-L3 que comprende la secuencia de SEC ID N<sup>o</sup>: 7.

En otra realización, la invención proporciona un anticuerpo que comprende:

- (i) una secuencia de HVR-H1 que comprende la secuencia de SEC ID N<sup>o</sup>: 1;
- (ii) una secuencia de HVR-H2 que comprende la secuencia de SEC ID N<sup>o</sup>: 2;
- (iii) una secuencia de HVR-H3 que comprende la secuencia de SEC ID N<sup>o</sup>: 3.
- (iv) una secuencia de HVR-L1 que comprende la secuencia de SEC ID N<sup>o</sup>: 5.
- (v) una secuencia de HVR-L2 que comprende la secuencia de SEC ID N<sup>o</sup>: 6.
- (vi) una secuencia de HVR-L3 que comprende la secuencia de SEC ID N<sup>o</sup>: 7.

Las secuencias de aminoácidos de las SEC ID N<sup>os</sup>: 1 a 7 se numeran con respecto a la HVR individual (es decir, H1, H2 o H3) como se indica en la Figura 1, siendo consistente la numeración con el sistema de numeración de Kabat como se describe en el presente documento.

En un aspecto, la invención proporciona anticuerpos que comprenden secuencias de HVR de cadena pesada como se representan en la Figura 1.

Algunas realizaciones de los anticuerpos de la invención comprenden un dominio variable de cadena ligera del anticuerpo 4D5 humanizado (huMAb4D5-8) (HERCEPTIN<sup>®</sup>, Genentech, Inc., South San Francisco, CA, USA) (al que

también se hace referencia en el documento de Patente de Estados Unidos Nº 6.407.213 y Lee *et al.*, J. Mol. Biol. (2004), 340(5):1073-93) como se representa a continuación en SEC ID Nº: 39.

5 <sup>1</sup>Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Val **Asn** Thr Ala Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Ser Ala Ser Phe Leu Tyr Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser **Arg** Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln **His** Tyr Thr Thr Pro Pro Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys<sup>107</sup> (SEC ID Nº: 39) (los restos de la HVR están subrayados).

10 En una realización, la secuencia del dominio variable de cadena ligera de huMAB4D5-8 se modifica en una o más de las posiciones 30, 66 y 91 (Asn, Arg y His que se han indicado anteriormente en negrita/cursiva, respectivamente). En una realización, la secuencia de huMAB4D5-8 modificada comprende Ser en la posición 30, Gly en la posición 66 y/o Ser en la posición 91. En consecuencia, en una realización, un anticuerpo de la invención comprenden un dominio variable de cadena ligera que comprende la secuencia que se representa a continuación en SEC ID Nº: 40:

15 <sup>1</sup>Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Val **Ser** Thr Ala Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Ser Ala Ser Phe Leu Tyr Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser **Gly** Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln **Ser** Tyr Thr Thr Pro Pro Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys<sup>107</sup> (SEC ID Nº: 40) (los restos de la HVR están subrayados)

Los restos sustituidos con respecto a huMAB4D5-8 se han indicado anteriormente en negrita/cursiva.

25 Los anticuerpos de la invención pueden comprender cualquier secuencia de dominio variable de marco adecuado, siempre que la actividad de unión a VEGF se retenga básicamente. Por ejemplo, en algunas realizaciones, los anticuerpos de la invención comprenden una secuencia de consenso de marco de cadena pesada de subgrupo III humana. En una realización de estos anticuerpos, la secuencia de consenso de marco comprende la sustitución en la posición 71, 73 y/o 78. En algunas realizaciones de estos anticuerpos, la posición 71 es A, 73 es T y/o 78 es A. En una realización, estos anticuerpos comprenden secuencias de marco de dominio variable de cadena pesada de huMAB4D5-8 (HERCEPTIN<sup>®</sup>, Genentech, Inc., South San Francisco, CA, USA) (al que también se hace referencia en los documentos de Patente de Estados Unidos con números 6.407.213 y 5.821.337, y Lee *et al.*, J. Mol. Biol. (2004), 340(5):1073-93). En una realización, estos anticuerpos comprenden además una secuencia de consenso de marco de cadena ligera de huMAB4D5-8 como se describe en los documentos de Patente de Estados Unidos con números 6.407.213 y 5.821.337). En una realización, estos anticuerpos comprenden las secuencias de dominio variable de

30 huMAB4D5-8 (HERCEPTIN<sup>®</sup>, Genentech, Inc., South San Francisco, CA, USA) (al que también se hace referencia en los documentos de Patente de Estados Unidos con números 6.407.213 y 5.821.337, y Lee *et al.*, J. Mol. Biol. (2004), 340(5):1073-93). En una realización, un anticuerpo de la invención comprende un dominio variable de cadena pesada, en el que la secuencia de marco comprende las secuencias de SEC ID Nºs: 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, y/o 26 (Figuras 2a y 2b), y las secuencias de las HVR H1, H2 y H3 son SEC ID Nºs: 1, 2 y/o 3, respectivamente. En una realización, un anticuerpo de la invención comprende un dominio variable de cadena ligera, en el que la secuencia de marco comprende las secuencias de SEC ID Nºs: 27, 28, 29 y/o 30 (Figura 3), la secuencia de HVR L1 es SEC ID Nºs: 4 o 5, la secuencia de HVR L2 es SEC ID Nº: 6, y la secuencia de HVR L3 es SEC ID Nº: 7.

35 En una realización, un anticuerpo de la invención comprende un dominio variable de cadena pesada que comprende la secuencia de SEC ID Nº: 43. En una realización, un anticuerpo de la invención comprende un dominio variable de cadena ligera que comprende la secuencia de SEC ID Nº: 44 o 45. En una realización, un anticuerpo de la invención comprende un dominio variable de cadena pesada que comprende la secuencia de SEC ID Nº: 43 y un dominio variable de cadena ligera que comprende la secuencia de SEC ID Nº: 45. En aún otra realización, un anticuerpo de la invención comprende un dominio variable de cadena pesada que comprende la secuencia de SEC ID Nº: 44 y un dominio variable de cadena ligera que comprende la secuencia de SEC ID Nº: 45.

50 En un aspecto, la invención proporciona un anticuerpo que se completa con cualquiera de los anticuerpos mencionados anteriormente para unión a VEGF. En un aspecto, la invención proporciona un anticuerpo que se une al mismo epítipo de VEGF que cualquiera de los anticuerpos mencionados anteriormente.

#### 60 **Fragmentos de anticuerpo**

La presente invención incluye fragmentos de anticuerpo. Los fragmentos de anticuerpo se pueden generar mediante medios tradicionales, tales como digestión enzimática, o mediante técnicas recombinantes. En ciertas circunstancias existen ventajas del uso de fragmentos de anticuerpo, en lugar de los anticuerpos completos. El menor tamaño de los fragmentos permite un rápido aclarado, y puede conducir a un acceso mejorado a tumores sólidos. Para una revisión de ciertos fragmentos de anticuerpo, véase Hudson *et al.* (2003) Nat. Med. 9:129-134.



Se han desarrollado diversas técnicas para la producción de fragmentos de anticuerpo. Tradicionalmente, estos fragmentos derivan de la digestión proteolítica de anticuerpos intactos (véanse, por ejemplo, Morimoto *et al.*, Journal of Biochemical and Biophysical Methods 24:107-117 (1992); y Brennan *et al.*, Science, 229:81 (1985)). Sin embargo, estos fragmentos se pueden producir en la actualidad directamente mediante células anfitrionas recombinantes. Los fragmentos de anticuerpo Fab, Fv y scFv se pueden expresar todos en, y secretarse de, *E. coli*, permitiendo de este modo la fácil producción de grandes cantidades de estos fragmentos. Los fragmentos de anticuerpo se pueden aislar de las librerías de fagos de anticuerpos que se han discutido anteriormente. Alternativamente, los fragmentos Fab'-SH se pueden recuperar directamente de *E. coli* y acoplarse químicamente para formar los fragmentos F(ab')<sub>2</sub> (Carter *et al.*, Bio/Technology 10:163-167 (1992)). De acuerdo con otro enfoque, los fragmentos F(ab')<sub>2</sub> se pueden aislar directamente del cultivo de células anfitrionas recombinantes. Los fragmentos Fab y F(ab')<sub>2</sub> con una semivida *in vivo* aumentada que comprenden los restos del epítipo de unión al receptor salvaje se describen en el documento de Patente de Estados Unidos N° 5.869.046. Otras técnicas para la producción de fragmentos de anticuerpo serán evidentes para los practicantes expertos. En ciertas realizaciones, un anticuerpo es un fragmento Fv de cadena sencilla (scFv). Véanse el documento de Patente WO 93/16185; y los documentos de Patente de Estados Unidos con números 5.571.894; y 5.587.458. Fv y scFv son las únicas especies con sitios de combinación intactos que están desprovistas de regiones constantes; de ese modo, pueden ser adecuados para unión no específica reducida durante uso *in vivo*. Se pueden construir proteínas de fusión de scFv para proporcionar la fusión de una proteína efectora en los extremos amino o carboxi terminal de un scFv. Véase *Antibody Engineering*, ed. Borrebaeck, citado anteriormente. El fragmento de anticuerpo también puede ser un "anticuerpo lineal", por ejemplo, como se describe en el documento de Patente de Estados Unidos N° 5.641.870, por ejemplo. Tales anticuerpos lineales pueden ser monoespecíficos o biespecíficos.

#### **Anticuerpos humanizados**

La presente invención incluye anticuerpos humanizados. Se conocen en la técnica diversos métodos para humanizar anticuerpos no humanos. Por ejemplo, un anticuerpo humanizado puede tener uno o más restos de aminoácido introducidos en el mismo a partir de una fuente que no es humana. Estos restos de aminoácido no humanos se denominan a menudo restos "importados", que se toman por lo general de un dominio variable "importado". La humanización se puede llevar a cabo básicamente siguiendo el método de Winter y colaboradores (Jones *et al.* (1986) Nature 321:522-525; Riechmann *et al.* (1988) Nature 332:323-327; Verhoeyen *et al.* (1988) Science 239:1534-1536), por sustitución de las secuencias de la región hipervariable por las correspondientes secuencias de un anticuerpo humano. En consecuencia, tales anticuerpos "humanizados" son anticuerpos quiméricos (documento de Patente de Estados Unidos N° 4.816.567) en los que básicamente se ha sustituido menos de un dominio variable humano intacto por la correspondiente secuencia de una especie no humana. En la práctica, los anticuerpos humanizados son por lo general anticuerpos humanos en los que se sustituyen algunos restos de la región hipervariable y posiblemente algunos restos de la FR por restos de los sitios análogos de anticuerpos de roedor.

La selección de dominios variables humanos, tanto ligeros como pesados, para usarse en la preparación de anticuerpos humanizados puede ser importante para reducir la antigenicidad. De acuerdo con el denominado método de "mejor ajuste", la secuencia del dominio variable de un anticuerpo de roedor se identifica sistemáticamente frente a una librería completa de secuencias de dominio variable humanas conocidas. A continuación, se acepta la secuencia humana que es más cercana a la del roedor como el marco humano para el anticuerpo humanizado. Véanse, por ejemplo, Sims *et al.* (1993) J. Immunol. 151:2296; Chothia *et al.* (1987) J. Mol. Biol. 196:901. Otro método usa un marco particular derivado de la secuencia de consenso de todos los anticuerpos humanos de un subgrupo particular de cadenas ligeras o pesadas. Se puede usar el mismo marco para varios anticuerpos humanizados diferentes. Véanse, por ejemplo, Carter *et al.* (1992) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89:4285; Presta *et al.* (1993) J. Immunol., 151:2623.

Además, generalmente es deseable que los anticuerpos se humanicen con retención de la alta afinidad por el antígeno y de otras propiedades biológicas favorables. Para conseguir este objetivo, de acuerdo con un método, los anticuerpos humanizados se preparan mediante un proceso de análisis de las secuencias precursoras y de diversos productos humanizados conceptuales que usan modelos tridimensionales de las secuencias precursoras y humanizadas. Los modelos tridimensionales de inmunoglobulina están disponibles habitualmente y son familiares para los expertos en la materia. También están disponibles programas de ordenador que ilustran y presentan las estructuras conformacionales tridimensionales probables de las secuencias de inmunoglobulina candidata seleccionada. La inspección de estas presentaciones permite el análisis del probable rol de los restos en el funcionamiento de la secuencia de la inmunoglobulina candidata, es decir, el análisis de los restos que tienen influencia en la capacidad de la inmunoglobulina candidata para unirse a su antígeno. De este modo, se pueden seleccionar y combinar restos de FR a partir del receptor e importar secuencias de modo que se consigan las características deseadas de anticuerpo, tales como la afinidad aumentada por el antígeno o antígenos diana. En general, los restos de la región hipervariable son los directa y más básicamente implicados en la influencia de unión a antígeno.

**Anticuerpos humanos**

Los anticuerpos humanos de la inversión se pueden construir por combinación de secuencias de dominio variable de clon Fv seleccionadas de librerías de exposición a fagos derivadas de humanos con secuencias de dominio constante humanas conocidas como se ha descrito anteriormente. Alternativamente, los anticuerpos monoclonales humanos de la invención se pueden preparar mediante el método del hibridoma. Se han descrito líneas celulares de mieloma humano y heteromieloma ratón-humano para la producción de anticuerpos monoclonales humanos, por ejemplo, en Kozbor, J. *Immunol.*, 133: 3001 (1984); Brodeur *et al.*, *Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications*, pp. 51-63 (Marcel Dekker, Inc., New York, 1987); y Boerner *et al.*, *J. Immunol.*, 147: 86 (1991).

En la actualidad es posible producir animales transgénicos (por ejemplo, ratones) que sean capaces, tras inmunización, de producir un repertorio completo de anticuerpos humanos en ausencia de producción de inmunoglobulina endógena. Por ejemplo, se ha descrito que la supresión homocigótica del gen de la región de unión (JH) de cadena pesada de anticuerpo en ratones mutantes quiméricos y de línea germinal da como resultado la inhibición completa de la producción de anticuerpos endógenos. La transferencia del conjunto de genes de inmunoglobulina de línea germinal humana en tales ratones mutantes de línea germinal da como resultado la producción de anticuerpos humanos tras desafío antigénico. Véanse, por ejemplo, Jakobovits *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 90: 2551 (1993); Jakobovits *et al.*, *Nature*, 362: 255 (1993); Bruggermann *et al.*, *Year in Immunol.*, 7: 33 (1993).

También se puede usar la redistribución de genes para obtener anticuerpos humanos a partir de anticuerpos no humanos, por ejemplo de roedor, donde el anticuerpo humano tiene afinidades y especificidades similares a las del anticuerpo no humano de partida. De acuerdo con este método, que también se denomina "marca de epítipo", la región variable de cadena pesada o ligera de un fragmento de anticuerpo no humano obtenido mediante técnicas de exposición a fagos como se describe en el presente documento se reemplaza con un repertorio de genes de dominio V humano, creando una población de quimeras scFv o Fab de cadena no humana/cadena humana. La selección con antígeno da como resultado el aislamiento de scFv o Fab quiméricos de cadena no humana/cadena humana en los que las cadenas humanas restauran el sitio de unión a antígeno destruido tras la retirada de la correspondiente cadena no humana del clon de exposición a fago primario, es decir, el epítipo gobierna (marca) la selección del compañero de cadena humana. Cuando el proceso se repite con el fin de reemplazar la cadena no humana restante, se obtiene un anticuerpo humano (véase el documento de patente PCT WO 93/06213 publicado el 1 de abril de 1993). A diferencia de la humanización tradicional de anticuerpos no humanos mediante injerto de CDR, esta técnica proporciona anticuerpos completamente humanos, que no tienen ningún resto de FR o de CDR de origen no humano.

**Anticuerpos biespecíficos**

Los anticuerpos biespecíficos son anticuerpos monoclonales que tienen especificidades de unión por al menos dos antígenos diferentes. En ciertas realizaciones, los anticuerpos biespecíficos son anticuerpos humanos o humanizados. En ciertas realizaciones, una de las especificidades de unión es por VEGF y la otra es por cualquier otro antígeno. En ciertas realizaciones, los anticuerpos biespecíficos pueden unirse a dos epítopos diferentes de VEGF. Los anticuerpos biespecíficos también se pueden usar para localizar agentes citotóxicos en las células que expresan VEGF. Estos anticuerpos poseen un brazo de unión a VEGF y un brazo que se une a un agente citotóxico, tal como, por ejemplo, saporina, anti-interferón- $\alpha$ , un alcaloide de la vinca, una cadena de ricina A, metotrexato o hapteno con isótopo radiactivo. Los anticuerpos biespecíficos se pueden preparar en forma de anticuerpos de longitud completa o de fragmentos de anticuerpo (por ejemplo, anticuerpos biespecíficos F(ab')<sub>2</sub>).

Los métodos para preparar anticuerpos biespecíficos se conocen en la técnica. Tradicionalmente, la producción recombinante de anticuerpos biespecíficos se basa en la expresión conjunta de dos pares de cadena ligera-cadena pesada de inmunoglobulina, donde las dos cadenas pesadas tienen diferentes especificidades (Milstein y Cuello, *Nature*, 305: 537 (1983)). Debido a la selección aleatoria de las cadenas pesadas y ligeras de la inmunoglobulina, estos hibridomas (cuadromas) producen una mezcla potencial de 10 moléculas diferentes de anticuerpo, de las cuales solo una tiene la estructura biespecífica correcta. La purificación de la molécula correcta, que se realiza habitualmente mediante etapas de cromatografía de afinidad, es bastante incómoda, y los rendimientos de producto son bajos. Se desvelan procedimientos similares en el documento de Patente WO 93/08829 publicado el 13 de mayo de 1993, y en Traunecker *et al.*, *EMBO J.*, 10: 3655 (1991).

De acuerdo con un enfoque diferente, los dominios variables del anticuerpo con las especificidades de unión deseadas (sitios de combinación anticuerpo-antígeno) se fusionan en secuencias de dominio constante de inmunoglobulina. La fusión, por ejemplo, es con un dominio constante de cadena pesada de inmunoglobulina, que comprende al menos parte de la bisagra, y las regiones CH<sub>2</sub>, y CH<sub>3</sub>. En ciertas realizaciones, la primera región constante de cadena pesada (CH<sub>1</sub>), que contiene el sitio necesario para la unión de la cadena ligera, está presente en al menos una de las fusiones. Los ADN que codifican las fusiones de cadena pesada de inmunoglobulina y, si se desea, la cadena ligera de inmunoglobulina, se insertan en vectores de expresión separados, y se transfectan conjuntamente en un organismo anfitrión adecuado. Esto proporciona una gran flexibilidad en el ajuste de las proporciones mutuas de los tres fragmentos de polipéptido en las realizaciones, cuando las proporciones desiguales

de las tres cadenas de polipéptido usadas en la construcción proporcionan los rendimientos óptimos. Sin embargo, es posible insertar las secuencias de codificación para dos o las tres cadenas de polipéptido en un vector de expresión cuando la expresión de al menos dos cadenas de polipéptido en proporciones iguales da como resultado alto rendimientos o cuando las proporciones no son de particular significación.

5 En una realización de este enfoque, los anticuerpos biespecíficos están compuestos por una cadena pesada de inmunoglobulina híbrida con una primera especificidad de unión en un brazo, y una pareja de cadena pesada-cadena ligera de inmunoglobulina híbrida (que proporciona una segunda especificidad de unión) en el otro brazo. Se ha descubierto que esta estructura asimétrica facilita la separación del compuesto biespecífico deseado de las combinaciones no deseadas de cadenas de inmunoglobulina, ya que la presencia de una cadena ligera de inmunoglobulina en solo la mitad de la molécula biespecífica proporciona una fácil vía de separación. Este enfoque se desvela en el documento de Patente WO 94/04690. Para detalles adicionales en la generación de anticuerpos biespecíficos véase, por ejemplo, Suresh *et al.*, *Methods in Enzymology*, 121:210 (1986).

15 De acuerdo con otro enfoque, la interfase entre una pareja de moléculas de anticuerpo se puede someter a ingeniería para maximizar el porcentaje de heterodímeros que se recuperan de un cultivo celular recombinante. La interfase comprende al menos una parte del dominio C<sub>H</sub>3 de un dominio constante de anticuerpo. En este método, una o más cadenas laterales pequeñas de aminoácidos de la interfase de la primera molécula de anticuerpo se reemplazan con cadenas laterales más grandes (por ejemplo, tirosina o triptófano). Se crean "cavidades" compensatorias de tamaño idéntico o similar al de la cadena o cadenas laterales grandes de la interfase de la segunda molécula de anticuerpo mediante el reemplazo de cadenas laterales grandes de aminoácido con otras más pequeñas (por ejemplo, alanina o treonina). Esto proporciona un mecanismo para aumentar el rendimiento del heterodímero sobre los demás productos finales no deseados tales como homodímeros.

25 Los anticuerpos biespecíficos incluyen anticuerpos reticulados o "heteroconjugados". Por ejemplo, uno de los anticuerpos del heteroconjugado se puede acoplar a avidina, y el otro a biotina. Se han propuesto tales anticuerpos, por ejemplo, para dirigir células del sistema inmune a células no deseadas (documento de Patente de Estados Unidos N° 4.676.980), y para el tratamiento de infección por VIH (documentos de Patente WO 91/00360, WO 92/00373, y EP 03089). Los anticuerpos heteroconjugados se pueden preparar usando cualquier método de reticulación conveniente. Se conocen en la técnica agentes de reticulación adecuados, y se desvelan en el documento de Patente de Estados Unidos N° 4.676.980, junto con diversas técnicas de reticulación.

También se han descrito en la literatura técnicas para generar anticuerpos biespecíficos a partir de fragmentos de anticuerpo. Por ejemplo, los anticuerpos biespecíficos se pueden preparar usando unión química. Brennan *et al.*, *Science*, 229: 81 (1985) describen un procedimiento en el que se escinden proteolíticamente anticuerpos intactos para generar fragmentos F(ab')<sub>2</sub>. Estos fragmentos se reducen en presencia del agente complejante de ditioles arsenito sódico para estabilizar ditioles vecinales y evitar la formación de enlaces disulfuro intermoleculares. Los fragmentos Fab' generados se convierten a continuación en derivados de tionitrobenzoato (TNB). Uno de los derivados Fab'-TNB se reconvierte a continuación en el Fab'-tiol por reducción con mercaptoetilamina y se mezcla con una cantidad equimolar del otro derivado Fab'-TNB para formar el anticuerpo biespecífico. Los anticuerpos biespecíficos producidos se pueden usar como agentes para la inmovilización selectiva de enzimas.

Los progresos recientes han facilitado la recuperación directa de fragmentos Fab'-SH de *E. coli*, que se pueden acoplar químicamente para formar anticuerpos biespecíficos. Shalaby *et al.*, *J. Exp. Med.*, 175: 217-225 (1992) describen la producción de una molécula de F(ab')<sub>2</sub> de anticuerpo biespecífico completamente humanizado. Cada fragmento Fab' se secretó de *E. coli* por separado y se sometió a acoplamiento químico dirigido *in vitro* para formar el anticuerpo biespecífico. El anticuerpo biespecífico formado de ese modo fue capaz de unirse a células que sobreexpresan el receptor de HER2 y a linfocitos T humanos normales, así como disparar la actividad lítica de los linfocitos citotóxicos humanos frente a dianas de tumor de mama humano.

50 También se han descrito diversas técnicas para preparar y aislar fragmentos de anticuerpo biespecífico directamente a partir de cultivos celulares recombinantes. Por ejemplo, se han producido anticuerpos biespecíficos que usan cremalleras de leucina. Kostelny *et al.*, *J. Immunol.*, 148(5):1547-1553 (1992). Los péptidos de cremallera de leucina de las proteínas Fos y Jun se unieron a las partes Fab' de dos anticuerpos diferentes mediante fusión génica. Los homodímeros del anticuerpo se redujeron en la región bisagra para formar monómeros y a continuación se oxidaron nuevamente para formar los heterodímeros del anticuerpo. Este método también se puede utilizar para la producción de homodímeros del anticuerpo. La tecnología de "dianticuerpo" descrita por Hollinger *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 90:6444-6448 (1993) ha proporcionado un mecanismo alternativo para preparar fragmentos de anticuerpo biespecífico. Los fragmentos comprenden un dominio variable de cadena pesada (VH) conectado a un dominio variable de cadena ligera (VL) mediante un conector que es demasiado corto para permitir el emparejamiento entre los dos dominios en la misma cadena. En consecuencia, los dominios VH y VL de un fragmento se obligan a emparejarse con los dominios VL y VH complementarios de otro fragmento, formando de ese modo dos sitios de unión a antígeno. También se ha informado de otra estrategia para preparar fragmentos de anticuerpo biespecífico mediante el uso de dímeros de Fv de cadena sencilla (scFv). Véase Gruber *et al.*, *J. Immunol.*, 152:5368 (1994).

65

Se contemplan anticuerpos con más de dos valencias. Por ejemplo, se pueden preparar anticuerpos trispecíficos. Tutt *et al.* J. Immunol. 147: 60 (1991).

### **Anticuerpos multivalentes**

5 Un anticuerpo multivalente se puede internalizar (y/o catabolizar) más rápido que un anticuerpo divalente mediante una célula que expresa un antígeno al que se une el anticuerpo. Los anticuerpos de la presente invención puede ser anticuerpos multivalentes (que pueden ser distintos de la clase IgM) con tres o más sitios de unión a antígeno (por ejemplo, anticuerpos tetravalentes), que se pueden producir fácilmente mediante expresión recombinante de los  
10 ácidos nucleicos que codifican las cadenas de polipéptido del anticuerpo. El anticuerpo multivalente puede comprender un dominio de dimerización y tres o más sitios de unión a antígeno. En ciertas realizaciones, el dominio de dimerización comprende (o consiste en) una región Fc o una región bisagra. En este escenario, el anticuerpo comprenderá una región Fc y tres o más sitios de unión a antígeno amino terminales a la región Fc. En ciertas realizaciones, un anticuerpo multivalente comprende (o consiste en) de tres a aproximadamente ocho sitios de unión  
15 a antígeno. En una de tales realizaciones, un anticuerpo multivalente comprende (o consiste en) cuatro sitios de unión antígeno. El anticuerpo multivalente comprende al menos una cadena polipeptídica (por ejemplo, dos cadenas polipeptídica), en el que la cadena o cadenas polipeptídicas comprenden dos o más dominios variables. Por ejemplo, la cadena o cadenas polipeptídicas pueden comprender VD1-(X1)<sub>n</sub> -VD2-(X2)<sub>n</sub> -Fc, en la que VD1 es un primer dominio variable, VD2 es un segundo dominio variable, Fc es una cadena polipeptídica de una región Fc, X1 y X2  
20 representan un aminoácido o polipéptido, y n es 0 o 1. Por ejemplo, la cadena o cadenas polipeptídicas pueden comprender: VH-CH1-conector flexible-VH-CH1-cadena de región Fc; o VH-CH1-VH-CH1-cadena de región Fc. En el presente documento, el anticuerpo multivalente puede comprender además al menos dos (por ejemplo, cuatro) polipéptidos de dominio variable de cadena ligera. En el presente documento, el anticuerpo multivalente puede comprender, por ejemplo, de aproximadamente dos a aproximadamente ocho polipéptidos de dominio variable de  
25 cadena ligera. Los polipéptidos de dominio variable de cadena ligera contemplados aquí comprenden un dominio variable de cadena ligera y, opcionalmente, comprenden además un dominio CL.

### **Anticuerpos de dominio individual**

30 En algunas realizaciones, un anticuerpo de la invención es un anticuerpo de dominio individual. Un anticuerpo de dominio individual es una cadena polipeptídica individual que comprende la totalidad o una parte del dominio variable de cadena pesada o la totalidad o una parte del dominio variable de cadena ligera del anticuerpo. En ciertas realizaciones, un anticuerpo de dominio individual es un anticuerpo de dominio individual humano (Domantis, Inc., Waltham, MA; véase, por ejemplo, el documento de Patente de Estados Unidos N° 6.248.516 B1). En una  
35 realización, un anticuerpo de dominio individual consiste en la totalidad o una parte del dominio variable de cadena pesada de un anticuerpo.

### **Variantes de anticuerpos**

40 En algunas realizaciones, se contempla la modificación o modificaciones de la secuencia de aminoácidos de los anticuerpos que se describen en el presente documento. Por ejemplo, puede ser deseable mejorar la afinidad de unión y/o otras propiedades biológicas del anticuerpo. Las variantes de la secuencia de aminoácidos del anticuerpo se pueden preparar introduciendo los cambios apropiados en la secuencia de nucleótidos que codifican el anticuerpo, o mediante síntesis peptídica. Tales modificaciones incluyen, por ejemplo, supresiones de, y/o  
45 inserciones en y/o sustituciones de, restos de las secuencias de aminoácidos del anticuerpo. Se puede realizar cualquier combinación de supresión, inserción, y sustitución para llegar al constructo final, siempre que el constructor final posea las características deseadas. Las alteraciones de los aminoácidos se pueden introducir en la secuencia de aminoácidos del anticuerpo objeto en el momento en que se prepara la secuencia.

50 Un método útil para la identificación de ciertos restos o regiones del anticuerpo que son localizaciones preferentes para la mutagénesis se denomina "mutagénesis de barrido de alanina" como se describe en Cunningham y Wells (1989) Science, 244:1081-1085. Aquí, se identifica un resto o un grupo de restos diana (por ejemplo, restos con carga tales como Arg, Asp, His, Lys, y Glu) y se reemplazan con un aminoácido neutro o cargado negativamente (por ejemplo, alanina o polialanina) para afectar a la interacción de los aminoácidos con el antígeno. A continuación,  
55 estas localizaciones de aminoácidos que demuestran sensibilidad funcional a las sustituciones se refinan introduciendo variantes adicionales o distintas en, o para, los sitios de sustitución. De ese modo, aunque el sitio para introducir una variación de la secuencia de aminoácidos esté predeterminado, la naturaleza de la mutación por sí misma no necesita estar predeterminada. Por ejemplo, para analizar el rendimiento de la mutación en un sitio determinado, se lleva a cabo mutagénesis de barrido de alanina o aleatoria en el codón o la región diana y se  
60 identifican sistemáticamente las inmunoglobulinas expresadas para la actividad deseada.

Las inserciones en la secuencia de aminoácidos incluyen las fusiones amino y/o carboxi terminales que varían en longitud de un resto a polipéptidos que contienen cien o más restos, así como inserciones intrasecuencia de restos de aminoácido individuales múltiples. Algunos ejemplos de inserciones terminales incluyen un anticuerpo con un  
65 resto metionilo N-terminal. Otras variantes de las inserciones de la molécula de anticuerpo incluyen la fusión en N o C-terminal del anticuerpo a una enzima (por ejemplo, para ADEPT) o un polipéptido que aumenta la semivida en

suero del anticuerpo.

En ciertas realizaciones, un anticuerpo de la invención se altera para aumentar o disminuir el grado en que se glicosila el anticuerpo. Por lo general, la glicosilación de polipéptidos es por unión a N o por unión O. La unión a N se refiere a la unión de un resto de carbohidrato a la cadena lateral de un resto de asparagina. Las secuencias de tripéptido asparagina-X-serina y asparagina-X-treonina, en las que X es un aminoácido excepto prolina, son las secuencias de reconocimiento para la unión enzimática del resto de carbohidrato a la cadena lateral de asparagina. De ese modo, la presencia de estas secuencias de tripéptido en un polipéptido crea un sitio de glicosilación potencial. La glicosilación por unión a O se refiere a la unión de uno de los azúcares N-acetilgalactosamina, galactosa, o xilosa a un hidroxiaminoácido, lo más habitual serina o treonina, aunque también se puede usar 5-hidroxi prolina o 5-hidroxi lisina.

La adición o supresión de sitios de glicosilación al anticuerpo se consigue convenientemente alterando la secuencia de aminoácidos de modo que se creen o se eliminen una o más de las secuencias de tripéptido descritas anteriormente (para los sitios de glicosilación por unión a N). La alteración también se puede realizar mediante la adición, supresión, o sustitución de uno o más restos de serina o treonina a la secuencia del anticuerpo original (para los sitios de glicosilación por unión a O).

Cuando el anticuerpo comprende una región Fc, el carbohidrato unido al mismo se puede alterar. Los anticuerpos nativos producidos mediante células de mamífero comprenden por lo general un oligosacárido ramificado con estructura de doble antena que está unido generalmente mediante una unión a N en Asn297 del dominio CH2 de la región Fc. Véase, por ejemplo, Wright *et al.* (1997) TIBTECH 15:26-32. El oligosacárido puede incluir diversos carbohidratos, por ejemplo, manosa, N-acetil glucosamina (GlcNAc), galactosa, y ácido siálico, así como una fucosa unida a un GlcNAc en la "desviación" de la estructura de doble antena del oligosacárido. En algunas realizaciones, se pueden realizar las modificaciones del oligosacárido en un anticuerpo de la invención con el fin de crear variantes de anticuerpo con ciertas propiedades mejoradas.

Por ejemplo, se proporcionan variantes de anticuerpo que tienen una estructura de carbohidrato que carece de la fucosa unida (directa o indirectamente) a una región Fc. Tales variantes pueden tener una función de ADCC mejorada. Véanse, por ejemplo, los documentos de Patente de Estados Unidos con números US 2003/0157108 (Presta, L.); US 2004/0093621 (Kyowa Hakko Kogyo Co., Ltd). Algunos ejemplos de publicaciones relacionadas con variantes de anticuerpo "defucosiladas" o "deficientes en fucosa" incluyen: los documentos de Patente US 2003/0157108; WO 2000/61739; WO 2001/29246; US 2003/0115614; US 2002/0164328; US 2004/0093621; US 2004/0132140; US 2004/0110704; US 2004/0110282; US 2004/0109865; WO 2003/085119; WO 2003/084570; WO 2005/035586; WO 2005/035778; WO2005/053742; WO2002/031140; y Okazaki *et al.* J. Mol. Biol. 336:1239-1249 (2004); Yamane-Ohnuki *et al.* Biotech. Bioeng. 87: 614 (2004). Algunos ejemplos de líneas celulares capaces de producir anticuerpos defucosilados incluyen células CHO Lec13 deficientes en fucosilación de proteínas (Ripka *et al.* Arch. Biochem. Biophys. 249:533-545 (1986); documento de Patente US 2003/0157108 A1, Presta, L; y documento de Patente WO 2004/056312 A1, Adams *et al.*, especialmente en el Ejemplo 11), y líneas celulares *knockout*, tales como líneas celulares CHO que carecen (*knockout*) del gen alfa-1,6-fucosiltransferasa, *FUT8* (véase, por ejemplo, Yamane-Ohnuki *et al.* Biotech. Bioeng. 87: 614 (2004); Kanda, Y. *et al.*, Biotechnol. Bioeng., 94(4):680-688 (2006); y el documento de Patente WO2003/085107).

Además, se proporcionan variantes de anticuerpos con oligosacáridos bisecados, por ejemplo, en los que un oligosacárido con estructura de doble antena unido a la región Fc del anticuerpo está bisecado por GlcNAc. Tales variantes de anticuerpo pueden tener una función de fucosilación reducida y/o de ADCC mejorada. Algunos ejemplos de tales variantes anticuerpo se describen, por ejemplo, en el documento de Patente WO 2003/011878 (Jean-Mairet *et al.*); el documento de Patente de Estados Unidos N° 6.602.684 (Umana *et al.*); y el documento de Patente US 2005/0123546 (Umana *et al.*). También se proporcionan variantes de anticuerpo con al menos un resto de galactosa en el oligosacárido unido a la región Fc. Tales variantes de anticuerpo pueden tener una función de CDC mejorada. Tales variantes de anticuerpo se describen, por ejemplo, en el documento de Patente WO 1997/30087 (Patel *et al.*); el documento de Patente WO 1998/58964 (Raju, S.); y el documento de Patente WO 1999/22764 (Raju, S.).

En ciertas realizaciones, una variante de anticuerpo comprende una región Fc con una o más sustituciones de aminoácidos que mejoran adicionalmente la ADCC, por ejemplo, sustituciones en las posiciones 298, 333, y/o 334 de la región Fc (numeración EU de restos). Tales sustituciones se pueden producir en combinación con cualquiera de las variaciones que se han descrito anteriormente.

En ciertas realizaciones, la invención contempla una variante de anticuerpo que posee algunas, pero no todas, las funciones efectoras, que lo hace un candidato deseable para numerosas aplicaciones en las que la semivida del anticuerpo *in vivo* es importante pero ciertas funciones efectoras (tales como complemento y la ADCC) son innecesarias o perjudiciales. En ciertas realizaciones, se miden las actividades de Fc del anticuerpo para asegurar que solo se mantengan las propiedades deseadas. Se pueden llevar a cabo ensayos de citotoxicidad *in vitro* y/o *in vivo* para confirmar la reducción/eliminación de las actividades de CDC y/o ADCC. Por ejemplo, se pueden llevar a cabo ensayos de unión al receptor de Fc (FcR) para asegurar que el anticuerpo carece de unión a FcγR (y por lo

tanto carezca probablemente de actividad de ADCC), pero conserve la capacidad de unión a FcRn. Las células principales que median la ADCC, los linfocitos NK, expresan solamente FcγRIII, mientras que los monocitos expresan FcγRI, FcγRII y FcγRIII. La expresión de FcR en células hematopoyéticas se resume en la Tabla 3 de la página 464 de Ravetch y Kinet, *Annu. Rev. Immunol.* 9:457-92 (1991). Algunos ejemplos no limitantes de ensayos *in vitro* para evaluar la actividad de ADCC de una molécula de interés se describen en el documento de Patente de Estados Unidos N° 5.500.362 (véanse, por ejemplo, Hellstrom, I., *et al.* *Proc. Nat'l Acad. Sci. USA* 83:7059-7063 (1986)) y Hellstrom, I *et al.*, *Proc. Nat'l Acad. Sci. USA* 82:1499-1502 (1985); 5.821.337 (véase Bruggemann, M. *et al.*, *J. Exp. Med.* 166:1351-1361 (1987)). Alternativamente, se pueden emplear métodos de ensayo no radiactivos (véanse, por ejemplo, el ensayo de citotoxicidad no radiactivo ACTI™ para citometría de flujo (CellTechnology, Inc. Mountain View, CA; y el ensayo de citotoxicidad no radiactivo CytoTox 96® (Promega, Madison, WI)). Las células efectoras útiles para tales ensayos incluyen células mononucleares sanguíneas periféricas (PBMc) y linfocitos citolíticos naturales (NK). Además, o alternativamente, la actividad de ADCC de la molécula de interés se puede evaluar *in vivo*, por ejemplo, en un modelo animal tal como el que se desvela en Clynes *et al.* *Proc. Nat'l Acad. Sci. USA* 95:652-656 (1998). También se pueden llevar a cabo ensayos de unión a C1q para confirmar que el anticuerpo es incapaz de unirse a C1q y por lo tanto carece de actividad de CDC. Para evaluar la activación del complemento, se puede llevar a cabo un ensayo de CDC (véanse, por ejemplo, Gazzano-Santoro *et al.*, *J. Immunol. Methods* 202:163 (1996); Cragg, M.S. *et al.*, *Blood* 101:1045-1052 (2003); y Cragg, M.S. y M.J. Glennie, *Blood* 103:2738-2743 (2004)). También se pueden llevar a cabo las determinaciones de unión a FcRn y aclaramiento/semivida *in vivo* usando métodos conocidos en la técnica (véase, por ejemplo, Petkova, S.B. *et al.*, *Int'l. Immunol.* 18(12):1759-1769 (2006)).

Se proporcionan otras variantes de anticuerpo que tienen uno o más sustituciones de aminoácidos. Los sitios de interés para la mutagénesis por sustitución incluyen las regiones hipervariables, pero también se contemplan alteraciones de la FR. En la Tabla 1 se muestran sustituciones conservativas bajo el encabezamiento "sustituciones preferentes". En la Tabla 1 se proporcionan cambios más sustanciales, denominados "sustituciones a modo de ejemplo", o como además se describe posteriormente por referencia a las clases de aminoácidos. Se pueden introducir sustituciones de aminoácidos en un anticuerpo de interés e identificar sistemáticamente los productos, por ejemplo, para una actividad deseada, tal como unión a antígeno mejorada, inmunogenicidad disminuida, ADCC o CDC mejoradas, etc.

**TABLA 1**

| Resto original | Sustituciones a modo de ejemplo     | Sustituciones preferentes |
|----------------|-------------------------------------|---------------------------|
| Ala (A)        | Val; Leu; Ile                       | Val                       |
| Arg (R)        | Lys; Gln; Asn                       | Lys                       |
| Asn (N)        | Gln; His; Asp, Lys; Arg             | Gln                       |
| Asp (D)        | Glu; Asn                            | Glu                       |
| Cys (C)        | Ser; Ala                            | Ser                       |
| Gln (Q)        | Asn; Glu                            | Asn                       |
| Glu (E)        | Asp; Gln                            | Asp                       |
| Gly (G)        | Ala                                 | Ala                       |
| His (H)        | Asn; Gln; Lys; Arg                  | Arg                       |
| Ile (I)        | Leu; Val; Met; Ala; Phe; Norleucina | Leu                       |
| Leu (L)        | Norleucina; Ile; Val; Met; Ala; Phe | Ile                       |
| Lys (K)        | Arg; Gln; Asn                       | Arg                       |
| Met (M)        | Leu; Phe; Ile                       | Leu                       |
| Phe (F)        | Trp; Leu; Val; Ile; Ala; Tyr        | Tyr                       |
| Pro (P)        | Ala                                 | Ala                       |
| Ser (S)        | Thr                                 | Thr                       |
| Thr (T)        | Val; Ser                            | Ser                       |
| Trp (W)        | Tyr; Phe                            | Tyr                       |
| Tyr (Y)        | Trp; Phe; Thr; Ser                  | Phe                       |
| Val (V)        | Ile; Leu; Met; Phe; Ala; Norleucina | Leu                       |

Las modificaciones de las propiedades biológicas del anticuerpo se pueden conseguir mediante una selección de sustituciones que afectan a (a) la estructura de la cadena principal del polipéptido en el área de la sustitución tal como, por ejemplo, una lámina o confirmación helicoidal, (b) el cambio de hidrofobicidad de la molécula en el sitio diana, o (c) el volumen de la cadena principal. Los aminoácidos se pueden agrupar de acuerdo con las similitudes de las propiedades de sus cadenas laterales en (A. L. Lehninger, en *Biochemistry*, segunda ed., pp. 73-75, Worth Publishers, Nueva York (1975)):

- (1) no polares: Ala (A), Val (V), Leu (L), Ile (I), Pro (P), Phe (F), Trp (W), Met (M)
- (2) polares sin carga: Gly (G), Ser (S), Thr (T), Cys (C), Tyr (Y), Asn (N), Gln (Q)
- (3) ácidos: Asp (D), Glu (E)
- (4) básicos: Lys (K), Arg (R), His(H).

Alternativamente, los restos de origen natural se pueden dividir en grupos basados en las propiedades comunes de las cadenas laterales:

- (1) hidrofóbicos: Norleucina, Met, Ala, Val, Leu, Ile;
- (2) hidrofílicos neutros: Cys, Ser, Thr, Asn, Gln;
- (3) ácidos: Asp, Glu;
- (4) básicos: His, Lys, Arg;
- (5) restos que influyen en la orientación de la cadena: Gly, Pro;
- (6) aromáticos: Trp, Tyr, Phe.

Las sustituciones no conservativas suponen el intercambio de un miembro de estas clases por otra clase. Tales restos sustituidos también se pueden introducir en los sitios de sustitución conservativos o, en los sitios restantes (por ejemplo, no conservados).

Un tipo de variante sustitucional implica la sustitución de uno o más restos de la región hipervariable de un anticuerpo precursor (por ejemplo, un anticuerpo humanizado o humano). Generalmente, la variante o variantes resultantes seleccionadas por desarrollo adicional modificarán (por ejemplo, mejorarán) las propiedades biológicas con respecto al anticuerpo precursor a partir del que se generan. Una variante sustitucional a modo de ejemplo es un anticuerpo madurado por afinidad, que se puede generar convenientemente usando técnicas de maduración por afinidad basadas en exposición a fagos. En resumen, se mutan varios sitios de la región hipervariable (por ejemplo, 6-7 sitios) para generar todas las posibles sustituciones de aminoácidos en cada sitio. Los anticuerpos generados de ese modo se exponen a partículas de fago filamentosos en forma de fusiones en al menos parte de una proteína de revestimiento del fago (por ejemplo, el gen III producto de M13) empaquetadas en cada partícula. A continuación, las variantes de exposición a fago se identifican sistemáticamente para su actividad biológica (por ejemplo, afinidad de unión). Con el fin de identificar los sitios de la región hipervariable candidatos para la modificación, se puede llevar a cabo mutagénesis de barrido (por ejemplo, barrido de alanina) para densificar los restos de la región hipervariable que contribuyen significativamente a la unión al antígeno. Además, o alternativamente, puede ser beneficioso analizar la estructura cristalina del complejo antígeno-anticuerpo para identificar los puntos de contacto entre el anticuerpo y el antígeno. Tales restos de contacto y los restos vecinos son candidatos para la sustitución de acuerdo con técnicas conocidas en la técnica, que incluyen las que se elaboran en el presente documento. Una vez se han generado tales variantes, el panel de variantes se somete a identificación sistemática usando técnicas conocidas en la técnica, que incluyen las que se describen en el presente documento, y se pueden seleccionar para desarrollo adicional las variantes con propiedades superiores en uno o más ensayos relevantes.

Las moléculas de ácidos nucleicos que codifican las variantes de la secuencia de aminoácidos del anticuerpo se preparan mediante diversos métodos conocidos en la técnica. Estos métodos incluyen, pero no se limitan a, aislamiento de una fuente natural (en el caso de variantes de secuencias de aminoácidos de origen natural) o preparación mediante mutagénesis mediada por oligonucleótidos (o dirigida al sitio), mutagénesis por PCR, y mutagénesis de casete de una variante preparada anteriormente o una versión no variante del anticuerpo.

Puede ser deseable introducir una o más modificaciones de aminoácidos en una región Fc de los anticuerpos de la invención, generando de ese modo una variante de la región Fc. La variante de la región Fc puede comprender una secuencia de región Fc humana (por ejemplo, una región Fc de IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4 humana) que comprende una modificación de aminoácidos (por ejemplo, una sustitución) en una o más posiciones de aminoácidos incluyendo las de la cisteína de la bisagra.

De acuerdo con la presente descripción y las enseñanzas de la técnica, se contempla que en algunas realizaciones, un anticuerpo de la invención puede comprender una o más alteraciones en comparación con el anticuerpo contrapartida de tipo salvaje, por ejemplo, en la región Fc. No obstante, estos anticuerpos podrían retener básicamente las mismas características requeridas para su utilidad terapéutica en comparación con su contrapartida de tipo salvaje. Por ejemplo, se piensa que se pueden realizar ciertas alteraciones en la región Fc que darían como resultado una unión a C1q y/o una citotoxicidad dependiente de complemento (CDC) alteradas (es decir, mejoradas o disminuidas), como se describe, por ejemplo, en el documento de Patente WO99/51642. Véanse también Duncan y Winter, *Nature* 322:738-40 (1988); el documento de Patente de Estados Unidos N° 5.648.260; el documento de

Patente de Estados Unidos N° 5.624.821; y el documento de Patente WO94/29351 en lo concerniente a otros ejemplos de variantes de la región Fc. Los documentos de Patente WO00/42072 (Presta) y WO 2004/056312 (Lowman) describen variantes de anticuerpo con una unión a los FcR mejorada o disminuida. Véase, además, Shields *et al.*, J. Biol. Chem. 9(2): 6591-6604 (2001). Se describen anticuerpos con semividas aumentadas y unión  
 5 aumentada al receptor de Fc neonatal (FcRn), que es responsable de la transferencia de las IgG maternas al feto (Guyer *et al.*, J. Immunol. 117:587 (1976) y Kim *et al.*, J. Immunol. 24:249 (1994)), en el documento de Patente US2005/0014934A1 (Hinton *et al.*). Estos anticuerpos comprenden una región Fc con una o más sustituciones en la misma que mejoran la unión en la región de Fc al FcRn. Se describen variantes de polipéptidos con las secuencias de aminoácidos de la región Fc alteradas y una capacidad de unión a C1q aumentada o disminuida en el documento  
 10 de Patente de Estados Unidos N° 6.194.551B1, y el documento de Patente WO99/51642. Véase, además, Idusogie *et al.*, J. Immunol. 164: 4178-4184 (2000).

En otro aspecto, la invención proporciona anticuerpos que comprenden modificaciones en la interfase de los polipéptidos de Fc que comprenden la región Fc, en los que las modificaciones facilitan y/o estimulan la heterodimerización. Estas modificaciones comprenden la introducción de una protuberancia en un primer polipéptido  
 15 de Fc y una cavidad en un segundo polipéptido de Fc, en las que la protuberancia se puede posicionar en la cavidad de modo que estimule la formación de un complejo del primer y el segundo polipéptidos de Fc. Se conocen en la técnica métodos para generar anticuerpos con estas modificaciones y se describen, por ejemplo, en el documento de Patente de Estados Unidos N° 5.731.168.

En aún otro aspecto, puede ser deseable crear anticuerpos por ingeniería de cisteína, por ejemplo, "tioMAb", en los que uno o más restos de un anticuerpo están sustituidos con restos de cisteína. En realizaciones particulares, los restos sustituidos aparecen en sitios accesibles del anticuerpo. Mediante la sustitución de estos restos con cisteína, los grupos tiol reactivos se posicionan de ese modo en sitios accesibles del anticuerpo y se pueden usar para  
 25 conjugar el anticuerpo a otros restos, tales como restos de fármaco o restos de conector-fármaco, como se describe adicionalmente el presente documento. En ciertas realizaciones, uno cualquiera o más de los siguientes restos se puede sustituir con cisteína: V205 (numeración de Kabat) de la cadena ligera; A118 (numeración EU) de la cadena pesada; y S400 (numeración EU) de la región Fc de la cadena pesada.

### 30 **Derivados de anticuerpo**

Los anticuerpos de la presente invención se pueden modificar adicionalmente para contener restos adicionales no proteínicos que se conocen en la técnica y están fácilmente disponibles. Preferentemente, los restos adecuados para la derivatización del anticuerpo son polímeros solubles en agua. Algunos ejemplos no limitantes de polímeros  
 35 solubles en agua incluyen, pero no se limitan a, polietilenglicol (PEG), copolímeros de etilenglicol/propilenglicol, carboximetilcelulosa, dextrano, alcohol polivinílico, polivinilpirrolidona, poli-1,3-dioxolano, poli-1,3,6-trioxano, copolímeros de etileno/anhídrido maleico, poliaminoácidos (homopolímeros o copolímeros aleatorios), y dextrano o poli(n-vinilpirrolidona)polietilenglicol, homopolímeros de propilenglicol, copolímeros de óxido de propileno/óxido de etileno, polioles polioxiethylados (por ejemplo, glicerol), alcohol polivinílico, y las mezclas de los mismos. El polietilenglicol propionaldehído puede tener ventajas en la fabricación debido a su estabilidad en agua. El polímero puede tener cualquier peso molecular, y puede ser ramificado o no ramificado. El número de polímeros unidos al anticuerpo puede variar y, si está unido más de un polímero, pueden ser moléculas iguales o diferentes. En general, el número y/o el tipo de polímeros usados para la derivatización se pueden determinar basándose en consideraciones que incluyen, pero no se limitan a, las propiedades o funciones particulares del anticuerpo a  
 45 mejorar, si el derivado de anticuerpo se podrá usar en una terapia en unas condiciones definidas, etc.

En otra realización, se proporcionan conjugados de un anticuerpo y restos no proteínicos que se pueden calentar selectivamente mediante exposición a radiación. En una realización, el resto no proteínico es un nanotubo de carbono (Kam *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 102: 11600-11605 (2005)). La radiación puede ser de cualquier longitud de onda, e incluye, pero no se limita a, longitudes de onda que no dañan a las células ordinarias, pero que calientan el resto proteínico a una temperatura a la cual se eliminan las células próximas al anticuerpo-resto no  
 50 proteínico.

### 55 **Inmunoconjugados**

La invención también proporciona inmunoconjugados (a los que se denomina de forma intercambiable "conjugados anticuerpo-fármaco", o "ADC") que comprenden un anticuerpo conjugado con uno o más agentes citotóxicos, tal como una gente quimioterapéutico, un fármaco, un agente inhibidor del crecimiento, una toxina (por ejemplo, una toxina proteica, una toxina enzimáticamente activa de origen bacteriano, fúngico, planta, o animal, o fragmentos de la misma), o un isótopo radiactivo (es decir, o un radioconjugado).  
 60

Los inmunoconjugados se han usado para el suministro local de agentes citotóxicos, es decir, fármacos que eliminan o inhiben el crecimiento o la proliferación de las células, en el tratamiento del cáncer (Lambert, J. (2005) Curr. Opin in Pharmacology 5:543-549; Wu *et al.* (2005) Nature Biotechnology 23(9):1137-1146; Payne, G. (2003) i  
 65 3:207-212; Syrigos y Epenetos (1999) Anticancer Research 19:605-614; Niculescu-Duvaz y Springer (1997) Adv. Drug Deliv. Rev. 26:151-172; documento de Patente de Estados Unidos N° 4.975.278). Los inmunoconjugados



5 permiten el suministro dirigido de un resto de fármaco a un tumor, y la acumulación intracelular en el mismo, cuando la administración sistémica de los fármacos sin conjugar puede dar como resultado niveles inaceptables de toxicidad en las células normales además de las células que se busca eliminar (Baldwin *et al.*, Lancet (Mar. 15, 1986) pp. 603-05; Thorpe (1985) "Antibody Carriers Of Cytotoxic Agents In Cancer Therapy: A Review," en Monoclonal Antibodies '84: Biological And Clinical Applications (A. Pinchera *et al.*, eds) pp. 475-506. Se han informado tanto anticuerpos policlonales como anticuerpos monoclonales que son útiles en estas estrategias (Rowland *et al.*, (1986) Cancer Immunol. Immunother. 21:183-87). Los fármacos usados en estos métodos incluyen daunomicina, doxorubicina, metotrexato y vindesina (Rowland *et al.*, (1986) citado anteriormente). Las toxinas usadas en los conjugados anticuerpo-toxina incluyen toxinas bacterianas tales como la toxina de la difteria, toxinas de plantas tales como ricino, toxinas de molécula pequeña tales como geldanamicina (Mandler *et al.* (2000) J. Nat. Cancer Inst. 92(19):1573-1581; Mandler *et al.* (2000) Bioorganic & Med. Chem. Letters 10:1025-1028; Mandler *et al.* (2002) Bioconjugate Chem. 13:786-791), maitansinoides (documento de Patente EP 1391213; Liu *et al.*, (1996) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93:8618-8623), y calicheamicina (Lode *et al.* (1998) Cancer Res. 58:2928; Hinman *et al.* (1993) Cancer Res. 53:3336-3342). Las toxinas pueden ejercer sus efectos citotóxicos mediante mecanismos que incluyen unión a tubulina, unión a ADN, o inhibición de la topoisomerasa. Algunos fármacos citotóxicos tienden a ser inactivos o menos activos cuando se conjugan con anticuerpos o ligandos de receptores de proteína grandes.

20 ZEVALIN® (ibritumomab tiuxetano, Biogen/Idec) es un conjugado anticuerpo-radioisótopo compuesto por un anticuerpo monoclonal murino IgG1 kappa frente al antígeno CD20 encontrado en la superficie de linfocitos B normales y malignos y unido al radioisótopo <sup>111</sup>In o <sup>90</sup>Y mediante un conector-quelante de tiourea (Wiseman *et al.* (2000) Eur. Jour. Nucl. Med. 27(7):766-77; Wiseman *et al.* (2002) Blood 99(12):4336-42; Witzig *et al.* (2002) J. Clin. Oncol. 20(10):2453-63; Witzig *et al.* (2002) J. Clin. Oncol. 20(15):3262-69). Aunque ZEVALIN posee actividad frente al linfoma no Hodgkin de linfocitos B (NHL), su administración da como resultado citopenias graves y prolongadas en la mayoría de los pacientes. MYLOTARG™ (gemtuzumab ozogamicina, Wyeth Pharmaceuticals), un conjugado anticuerpo-fármaco compuesto por un anticuerpo huCD33 unido a calicheamicina, se aprobó en el año 2000 para el tratamiento de leucemia mieloide aguda mediante inyección (Drugs of the Future (2000) 25(7):686; documentos de Patente de Estados Unidos con números 4970198; 5079233; 5585089; 5606040; 5693762; 5739116; 5767285; 5773001). Cantuzumab mertansina (Immunogen, Inc.), un conjugado anticuerpo-fármaco compuesto por el anticuerpo huC242 unido a través del conector disulfuro SPP al resto de fármaco maitansinoide, DM1, ha avanzado a ensayo clínico en Fase II para el tratamiento de cánceres que expresan CanAg, tales como cánceres de colon, pancreáticos, gástricos, y otros. MLN-2704 (Millennium Pharm., BZL Biologics, Immunogen Inc.), un conjugado anticuerpo-fármaco compuesto por el anticuerpo monoclonal anti-antígeno prostático específico de membrana (PSMA) unido al resto de fármaco maitansinoide, DM1, se encuentra en desarrollo para el tratamiento potencial de tumores de próstata. Los péptidos de auristatina, auristatina E (AE) y monometilauristatina (MMAE), análogos sintéticos de la dolastatina, se conjugaron a anticuerpos monoclonales quiméricos cBR96 (específicos de Lewis Y en carcinomas) y cAC10 (específicos de CD30 en tumores malignos hematológicos) (Doronina *et al.* (2003) Nature Biotechnol. 21 (7):778-784) y se encuentran en desarrollo terapéutico.

40 En ciertas realizaciones, un inmunoconjugado comprende un anticuerpo y un agente quimioterapéutico u otra toxina. Los agentes quimioterapéuticos útiles en la generación de inmunoconjugados se describen en el presente documento (por ejemplo, anteriormente). Las toxinas enzimáticamente activas y los fragmentos de las mismas que se pueden usar incluyen cadena A de difteria, fragmentos activos de no unión de la toxina de la difteria, cadena A de exotoxina (de *Pseudomonas aeruginosa*) cadena A de ricina, cadena A de abrina, cadena A de modicina, alfarsarina, proteínas de *Aleurites fordii*, proteínas de diantina, proteínas de *Phytolaca americana* (PAPI, PAPII, y PAP-S), inhibidor de *Momordica charantia*, curcina, crotina, inhibidor de *Sapaonaria officinalis*, gelonina, mitogelina, restrictocina, fenomicina, enomicina, y los tricotecenos. Véase, por ejemplo, el documento de Patente WO 93/21232 publicado el 28 de octubre de 1993. Está disponible diversos radionúclidos para la producción de anticuerpos radioconjugados. Algunos ejemplos incluyen <sup>212</sup>Bi, <sup>131</sup>I, <sup>131</sup>In, <sup>90</sup>Y, y <sup>186</sup>Re. Los conjugados del anticuerpo y el agente citotóxico se preparan usando diversos agentes de acoplamiento a proteína difuncionales tales como propionato de N-succinimidil-3-(2-piridilditiol) (SPDP), iminotiolano (IT), derivados difuncionales de imidoésteres (tales como adipimidato de dimetilo HCl), ésteres activos (tales como suberato de disuccinimidilo), aldehídos (tales como glutaraldehído), compuestos bis-azido (tales como bis(p-azidobenzoil) hexanodiamina), derivados de bis-diazonio (tales como bis(p-diazoniobenzoil)-etilendiamina), diisocianatos (tales como 2,6-diisocianato de tolueno), y compuestos con bis-flúor activo (tales como 1,5-difluoro-2,4-dinitrobenzeno). Por ejemplo, se puede preparar una inmunotoxina de ricina como se describe en Vitetta *et al.*, Science, 238: 1098 (1987). El ácido 1-isotiocianatobencil-3-metildietilentríaminopentaacético marcado con carbono 14 (MX-DTPA) es un agente quelante a modo de ejemplo para la conjugación de radionucleótidos al anticuerpo. Véase el documento de Patente WO94/11026.

60 También se contemplan en el presente documento conjugados de un anticuerpo y una o más toxinas de molécula pequeña, tales como una calicheamicina, maitansinoides, dolastatinas, aurostatinas, un tricoteceno, y CC1065, y los derivados de estas toxinas que tienen actividad de toxina.

**Maitansina y maitansinoides**

En algunas realizaciones, el inmunocombinado comprende un anticuerpo (de longitud completa o fragmento) combinado con una o más moléculas maitansinoides.

5 Los maitansinoides son inhibidores mitóticos que actúan inhibiendo la polimerización de la tubulina. La maitansina se aisló por primera vez del arbusto del este de África *Maytenus serrata* (documento de Patente de Estados Unidos Nº 3.896.111). Posteriormente, se descubrió que ciertos microbios también producen maitansinoides, tales como maitansinol y ésteres C-3 de maitansinol (documento de Patente de Estados Unidos Nº 4.151.042). El maitansinol sintético y los derivados y análogos del mismo se desvelan, por ejemplo, en los documentos de Patente de Estados Unidos con números 4.137.230; 4.248.870; 4.256.746; 4.260.608; 4.265.814; 4.294.757; 4.307.016; 4.308.268; 4.308.269; 4.309.428; 4.313.946; 4.315.929; 4.317.821; 4.322.348; 4.331.598; 4.361.650; 4.364.866; 4.424.219; 4.450.254; 4.362.663; y 4.371.533.

15 Los restos de fármacos maitansinoides son restos de fármacos atractivos en los combinados anticuerpo-fármaco debido a que son: (i) relativamente accesibles para preparar por fermentación o modificación química, y derivatización de productos de fermentación, (ii) susceptibles de derivatización con grupos funcionales adecuados para la combinación a través de conectores no disulfuro con anticuerpos, (iii) estables en plasma, y (iv) eficaces frente a diversas líneas de células tumorales.

20 Se desvelan inmunocombinados que contienen maitansinoides, métodos para preparar los mismos, y sus usos terapéuticos, por ejemplo, en los documentos de Patente de Estados Unidos con números 5.208.020, 5.416.064 y en el documento de Patente Europea EP 0 425 235 B1.

25 Liu *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93:8618-8623 (1996) describen inmunocombinados que comprenden un maitansinoide denominado DMI unido al anticuerpo monoclonal C242 dirigido frente a cáncer colorrectal humano. Se encontró que el combinado es altamente tóxico frente a las células de cáncer de colon cultivadas, y mostró actividad tumoral en un ensayo de crecimiento tumoral *in vivo*. Chari *et al.*, Cancer Research 52:127-131 (1992) describen inmunocombinados en los que se combina un maitansinoide a través de un conector disulfuro con el anticuerpo murino A7 que se une a un antígeno en líneas celulares de cáncer de colon humano, o con otro anticuerpo monoclonal murino TA.1 que se une al oncogén HER-2/neu. La citotoxicidad del combinado TA.1-maitansinoide se sometió a la ensayo *in vitro* en la línea celular de cáncer de mama humano SK-BR-3, que expresa  $3 \times 10^5$  antígenos de superficie HER-2 por célula. El fármaco combinado consiguió un grado de citotoxicidad similar al fármaco maitansinoide libre, que se podría aumentar al aumentar el número de moléculas de maitansinoide por molécula de anticuerpo. El combinado A7-maitansinoide mostró baja toxicidad sistémica en ratones.

Los combinados anticuerpo-maitansinoide se preparan por unión química de un anticuerpo a una molécula de maitansinoide sin disminuir significativamente la actividad biológica del anticuerpo o de la molécula de maitansinoide. Véase, por ejemplo, el documento de Patente de Estados Unidos Nº 5.208.020. Un promedio de 3-4 moléculas de maitansinoide combinadas por molécula de anticuerpo ha mostrado eficacia en el aumento de citotoxicidad de las células diana sin afectar negativamente la función o la solubilidad del anticuerpo, aunque se podría esperar que incluso una molécula de toxina/anticuerpo aumente la citotoxicidad con respecto al uso del anticuerpo desnudo. Los maitansinoides se conocen bien en la técnica y se pueden sintetizar mediante técnicas conocidas o aislar de fuentes naturales. Se desvelan maitansinoides adecuados, por ejemplo, en el documento de Patente de Estados Unidos Nº 5.208.020 y en otras publicaciones de patente y de no patente a las que se ha hecho referencia anteriormente en el presente documento. Los maitansinoides preferentes son maitansinol y análogos de maitansinol modificados en el anillo aromático o en otras posiciones de la molécula de maitansinol, tales como diversos ésteres de maitansinol.

50 Existen numerosos grupos de unión conocidos en la técnica para preparar combinados anticuerpo-maitansinoide, incluyendo, por ejemplo, los que se desvelan en el documento de Patente de Estados Unidos Nº 5.208.020 o el documento de Patente EP 0 425 235 B1, Chari *et al.*, Cancer Research 52:127-131 (1992), y el documento de Solicitud de Patente de Estados Unidos Nº 10/960,602, presentado el 8 de octubre de 2004. Los combinados anticuerpo-maitansinoide que comprenden el componente conector SMCC se pueden preparar como se desvela en el documento de Solicitud de Patente de Estados Unidos Nº 10/960,602, presentado el 8 de octubre de 2004. Los grupos de unión incluyen grupos disulfuro, grupos tioéter, grupos lábiles frente a ácidos, grupos fotolábiles, grupos lábiles frente a peptidasa, o grupos lábiles frente a esterasa, como se desvela en las patentes identificadas anteriormente, siendo preferentes los grupos disulfuro y tioéter. En el presente documento, se describen y se muestran a modo de ejemplo grupos de unión adicionales.

60 Los combinados del anticuerpo y el maitansinoide se pueden preparar usando diversos agentes de acoplamiento a proteína difuncionales tales como propionato de N-succinimidil-3-(2-piridilditiol) (SPDP), ciclohexano-1-carboxilato de succinimidil-4-(N-maleimidometilo) (SMCC), iminotiolano (IT), derivados difuncionales de imidoésteres (tales como adipimidato de dimetilo HCl), ésteres activos (tales como suberato de disuccinimidilo), aldehídos (tales como glutaraldehído), compuestos bis-azido (tales como bis(p-azidobenzoil) hexanodiamina), derivados de bis-diazonio (tales como bis-(p-diazoniobenzoil)-etilendiamina), diisocianatos (tales como 2,6-diisocianato de tolueno), y compuestos con bis-flúor activo (tales como 1,5-difluoro-2,4-dinitrobenzoceno). Los agentes de acoplamiento

65

particularmente preferentes incluyen propionato de N-succinimidil-3-(2-piridilditiol) (SPDP) (Carlsson *et al.*, Biochem. J. 173:723-737 (1978)) y pentanoato de N-succinimidil-4-(2-piridilditiol) (SPP) para proporcionar una unión disulfuro.

El conector se puede unir a la molécula de maitansinoide en diversas posiciones, dependiendo del tipo de unión. Por ejemplo, se puede formar una unión externa por reacción con un grupo hidroxilo usando técnicas de acoplamiento convencionales. La reacción se puede producir en la posición C-3 que tiene un grupo hidroxilo, la posición C-14 modificada con hidroximetilo, la posición C-15 modificada con un grupo hidroxilo, y la posición C-20 que tiene un grupo hidroxilo. En una realización preferente, la unión se forma en la posición C-3 de un maitansinol o un análogo de maitansinol.

### **Auristatinas y dolastatinas**

En algunas realizaciones, el inmunoconjugado comprende un anticuerpo conjugado con dolastatinas o con análogos y derivados peptídicos de dolastatina, las auristatinas (documentos de Patente de Estados Unidos con números 5.635.483; 5.780.588). Se ha mostrado que las dolastatinas y las auristatinas interfieren con la dinámica de microtúbulos, hidrólisis de GTP, y división nuclear y celular (Woyke *et al.* (2001) Antimicrob. Agents and Chemother. 45(12):3580-3584) y tienen actividad anticancerígena (documento de Patente de Estados Unidos N° 5.663.149) y antifúngica (Pettit *et al.* (1998) Antimicrob. Agents Chemother. 42:2961-2965). El resto de fármaco de dolastatina o auristatina se puede unir al anticuerpo a través del extremo N (amino) terminal o C (carboxilo) terminal del resto de fármaco peptídico (documento de Patente WO 02/088172).

Las realizaciones de auristatina a modo de ejemplo incluyen los restos de fármaco de monometilauristatina unidos en N-terminal DE y DF, que se desvelan en "Monomethylvaline Compounds Capable of Conjugation to Ligands," documento de Patente de Estados Unidos N° de Serie 10/983,340, presentado el 5 de noviembre 2004.

Por lo general, los restos de fármaco basados en dipéptidos se pueden preparar formando un enlace peptídico entre dos o más aminoácidos y/o fragmentos de péptidos. Tales enlaces peptídicos se pueden preparar, por ejemplo, de acuerdo con el método de síntesis en fase líquida (véase E. Schröder y K. Lübke, "The Peptides," volumen 1, pp 76-136, 1965, Academic Press) que se conoce bien en el campo de la química de péptidos. Los restos de fármaco de auristatina/dolastatina se pueden preparar de acuerdo con los métodos de: documento de Patente US 5.635.483; documento de Patente US 5.780.588; Pettit *et al.* (1989) J. Am. Chem. Soc. 111:5463-5465; Pettit *et al.* (1998) Anti-Cancer Drug Design 13:243-277; Pettit, G.R., *et al.* Synthesis, 1996, 719-725; y Pettit *et al.* (1996) J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1 5:859-863. Véanse también Doronina (2003) Nat Biotechnol 21(7):778-784; "Monomethylvaline Compounds Capable of Conjugation to Ligands," documento de Patente de Estados Unidos N° de Serie 10/983,340, presentado el 5 de noviembre de 2004 (que desvela, por ejemplo, conectores y métodos de preparación de compuestos de monometilvalina tales como MMAE y MMAF conjugados con conectores).

### **Calicheamicina**

En otras realizaciones, el inmunoconjugado comprende un anticuerpo conjugado con una o más moléculas de calicheamicina. La familia de antibióticos de la calicheamicina es capaz de producir rupturas del ADN de doble cadena a concentraciones subpicomolares. Para la preparación de conjugados de la familia de calicheamicina, véanse los documentos de Patente de Estados Unidos con números 5.712.374, 5.714.586, 5.739.116, 5.767.285, 5.770.701, 5.770.710, 5.773.001, 5.877.296 (todos de American Cyanamid Company). Los análogos estructurales de calicheamicina que se pueden usar incluyen, pero no se limitan a,  $\gamma$ 11,  $\alpha$ 2I,  $\alpha$ 3I, N-acetil- $\gamma$ 11, PSAG y  $\theta$ 11 (Hinman *et al.*, Cancer Research 53:3336-3342 (1993), Lode *et al.*, Cancer Research 58:2925-2928 (1998) y los documentos de Patente de Estados Unidos mencionados anteriormente de American Cyanamid). Otro agente antitumoral al que se puede conjugar el anticuerpo es QFA que es un antifolato. Tanto calicheamicina como QFA poseen sitios intracelulares de acción y no cruzan fácilmente la membrana plasmática. Por lo tanto, la captación celular de estos agentes a través de la internalización mediada por anticuerpo mejora en gran medida sus efectos citotóxicos.

### **Otros agentes citotóxicos**

Otros agentes antitumorales que se pueden conjugar con los anticuerpos incluyen BCNU, estreptoamicina, vincristina y 5-fluorouracilo, la familia de agentes conocidos colectivamente como complejo LL-E33288 que se describen en los documentos de Patente de Estados Unidos con números 5.053.394, 5.770.710, así como esperamicinas (documento de Patente de Estados Unidos N° 5.877.296).

Las toxinas enzimáticamente activas y los fragmentos de las mismas que se pueden usar incluyen cadena A de difteria, fragmentos activos de no unión de la toxina de la difteria, cadena A de exotoxina (de *Pseudomonas aeruginosa*) cadena A de ricina, cadena A de abrina, cadena A de modecina, alfa-sarcina, proteínas de *Aleurites fordii*, proteínas de diantina, proteínas de *Phytolaca americana* (PAPI, PAPII, y PAP-S), inhibidor de *Momordica charantia*, curcina, crotina, inhibidor de *Sapaonaria officinalis*, gelonina, mitogelina, restrictocina, fenomicina, enomicina, y los tricotecenos. Véase, por ejemplo, el documento de Patente WO 93/21232 publicado el 28 de octubre de 1993.

La presente invención contempla además un inmunoconjugado formado entre un anticuerpo y un compuesto con

actividad nucleolítica (por ejemplo, una ribonucleasa o una endonucleasa de ADN tal como una desoxirribonucleasa; ADNasa).

5 Para la destrucción selectiva del tumor, el anticuerpo puede comprender un átomo altamente radiactivo. Está disponible diversos isótopos radiactivos para la producción de anticuerpos radioconjugados. Algunos ejemplos incluyen At<sup>211</sup>, I<sup>131</sup>, I<sup>125</sup>, Y<sup>90</sup>, Re<sup>186</sup>, Re<sup>188</sup>, Sm<sup>153</sup>, Bi<sup>212</sup>, P<sup>32</sup>, Pb<sup>212</sup> y los isótopos radiactivos del Lu. Cuando el conjugado se usa para detección, puede comprender un átomo radiactivo para estudios centelleográficos, por ejemplo tc<sup>99m</sup> o I<sup>123</sup>, o un marcador de espín para la formación de imágenes por resonancia magnética nuclear (RMN) (también conocida como formación de imágenes por resonancia magnética, mri), tal como yodo-123 de nuevo, yodo-131, indio-111, flúor-19, carbono-13, nitrógeno-15, oxígeno-17, gadolinio, manganeso o hierro.

15 Los radiomarcadores u otros marcadores se pueden incorporar en el conjugado de formas conocidas. Por ejemplo, el péptido se puede biosintetizar o se puede sintetizar mediante síntesis química de aminoácidos usando precursores de aminoácido adecuados que implican, por ejemplo, flúor-19 en lugar de hidrógeno. Se pueden unir marcadores tales como tc<sup>99m</sup> o I<sup>123</sup>, Re<sup>186</sup>, Re<sup>188</sup> e In<sup>111</sup> a través de un resto de cisteína del péptido. Se puede unir itrio-90 a través de un resto de lisina. El método IODOGEN (Fraker *et al.* (1978) Biochem. Biophys. Res. Commun. 80: 49-57) se puede usar para incorporar yodo-123. "Monoclonal Antibodies in Immunoscintigraphy" (Chatal, CRC Press 1989) describe otros métodos con detalle.

20 Los conjugados del anticuerpo y el agente citotóxico se pueden preparar usando diversos agentes de acoplamiento a proteína difuncionales tales como propionato de N-succinimidil-3-(2-piridilditiol) (SPDP), ciclohexano-1-carboxilato de succinimidil-4-(N-maleimidometilo) (SMCC), iminotiolano (IT), derivados difuncionales de imidoésteres (tales como adipimidato de dimetilo HCl), ésteres activos (tales como suberato de disuccinimidilo), aldehídos (tales como glutaraldehído), compuestos bis-azido (tales como bis(p-azidobenzoil) hexanodiamina), derivados de bis-diazonio (tales como bis-(p-diazoniobenzoil)-etilendiamina), diisocianatos (tales como 2,6-diisocianato de tolueno), y compuestos con bis-flúor activo (tales como 1,5-difluoro-2,4-dinitrobenzoceno). Por ejemplo, se puede preparar una inmunotoxina de ricina como se describe en Vitetta *et al.*, Science, 238: 1098 (1987). El ácido 1-isotiocianatobencil-3-metildietilentríaminopentaacético marcado con carbono 14 (MX-DTPA) es un agente quelante a modo de ejemplo para la conjugación de radionucleótidos al anticuerpo. Véase el documento de Patente WO94/11026. El conector puede ser un "conector escindible" que facilita la liberación del fármaco citotóxico en la célula. Por ejemplo, se puede usar un conector lábil frente a ácidos, un conector sensible a peptidasa, un conector fotolábil, un conector de dimetilo o un conector que contiene disulfuro (Chari *et al.*, Cancer Research 52:127-131 (1992); documento de Patente de Estados Unidos N° 5.208.020).

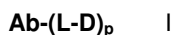
35 Los compuestos contemplan expresamente, pero no se limitan a, ADC preparados con reactivos reticuladores: BMPS, EMCS, GMBS, HBVS, LC-SMCC, MBS, MPBH, SBAP, SIA, SIAB, SMCC, SMPB, SMPH, sulfo-EMCS, sulfo-GMBS, sulfo-KMUS, sulfo-MBS, sulfo-SIAB, sulfo-SMCC, y sulfo-SMPB, y SVSB (succinimidil-(4-vinilsulfona)benzoato) que están disponibles en el mercado (por ejemplo, en Pierce Biotechnology, Inc., Rockford, IL., EE.UU.). Véanse las páginas 467-498, Manual de Aplicaciones y Catálogo 2003-2004.

40

#### **Preparación de conjugados anticuerpo-fármaco**

En los conjugados anticuerpo-fármaco (ADC), se conjuga un anticuerpo (Ab) con uno o más restos de fármaco (D), por ejemplo, de aproximadamente 1 a aproximadamente 20 restos de fármaco por anticuerpo, a través de un conector (L). El ADC de Fórmula I se puede preparar mediante varias rutas, empleando reacciones, condiciones y reactivos de química orgánica conocidos por los expertos en la materia, que incluyen: (1) reacción de un grupo nucleofílico de un anticuerpo con un reactivo conector divalente, para formar Ab-L, a través de un enlace covalente, seguido por reacción con un resto de fármaco D; y (2) reacción de un grupo nucleofílico de un resto de fármaco con un reactivo conector divalente, para formar D-L, a través de un enlace covalente, seguido por reacción con el grupo nucleofílico de un anticuerpo. En el presente documento se describen métodos adicionales para preparar ADC.

50



55 El conector puede estar compuesto por uno o más componentes conectores. Los componentes conectores a modo de ejemplo incluyen 6-maleimidocaproilo ("MC"), maleimidopropanoilo ("MP"), valina-citrulina ("val-cit"), alanina-fenilalanina ("ala-phe"), p-aminobenziloxycarbonilo ("PAB"), 4-(2-piridiltio) pentanoato de N-succinimidilo ("SPP"), 4-(N-maleimidometil) ciclohexano-1 carboxilato de N-succinimidilo ("SMCC"), y (4-yodo-acetil) aminobenzoato de N-succinimidilo ("SIAB"). Se conocen en la técnica componentes conectores adicionales y algunos se describen en el presente documento. Véase también "Monomethylvaline Compounds Capable of Conjugation to Ligands", documento de Patente de Estados Unidos con N° de Serie 10/983,340, presentado el 5 de noviembre de 2004.

60

En algunas realizaciones, el conector puede comprender restos de aminoácido. Algunos componentes conectores de aminoácido a modo de ejemplo incluyen un dipéptido, un tripéptido, un tetrapéptido o un pentapéptido. Algunos dipéptidos a modo de ejemplo incluyen: valina-citrulina (vc o val-cit), alanina-fenilalanina (af o ala-phe). Algunos tripéptidos a modo de ejemplo incluyen: glicina-valina-citrulina (gly-val-cit) y glicina-glicina-glicina (gly-gly-gly). Los restos de aminoácido que comprenden un componente conector de aminoácidos incluyen los de origen natural, así

65

como aminoácidos minoritarios y análogos de aminoácido de origen natural, tales como citrulina. Se pueden diseñar componentes conectores de aminoácido y optimizar su selectividad para la escisión enzimática mediante una enzima particular, por ejemplo, una proteasa asociada a un tumor, cathepsina B, C y D, o una plasmina proteasa.

5 Los grupos nucleofílicos en los anticuerpos incluyen, pero no se limitan a: (i) grupos amino N-terminales, (ii) grupos amino de cadena lateral, por ejemplo, lisina, (iii) grupos tiol de cadena lateral, por ejemplo cisteína, y (iv) grupos hidroxilo o amino de azúcares cuando el anticuerpo está glicosilado. Los grupos amino, tiol, e hidroxilo son nucleofílicos y capaces de reaccionar para formar enlaces covalentes con grupos electrofílicos en los restos de conector y reactivos conectores incluyendo: (i) ésteres activos tales como ésteres NHS, ésteres HOBt, haloformiatos, y haluros de ácido; (ii) haluros de alquilo y bencilo tales como haloacetamidas; (iii) grupos aldehído, cetona, carboxilo y maleimida. Ciertos anticuerpos tienen disulfuros reducibles intercadena, es decir, puentes de cisteína. Los anticuerpos se pueden hacer reactivos para la conjugación con agentes conectores por tratamiento con un agente reductor tal como DTT (ditiotreitól). Cada puente de cisteína formará de ese modo, teóricamente, dos nucleófilos tiol reactivos. Se pueden introducir grupos nucleofílicos adicionales en los anticuerpos a través de la reacción de las lisinas con 2-iminotiolano (reactivo de Traut) dando como resultado la conversión de una amina en un tiol. Se pueden introducir grupos tiol reactivos en el anticuerpo (o un fragmento del mismo) por introducción de uno, dos, tres, cuatro, o más restos de cisteína (por ejemplo, preparando anticuerpos mutantes que comprenden uno o más restos del aminoácido cisteína no nativos).

20 Los conjugados anticuerpo-fármaco también se pueden producir mediante la modificación del anticuerpo para introducir restos electrofílicos, que pueden reaccionar con sustituyentes nucleofílicos en el reactivo conector o en el fármaco. Los azúcares de los anticuerpos glicosilados se pueden oxidar, por ejemplo con reactivos oxidantes de peryodato, para formar grupos aldehído o cetona que pueden reaccionar con el grupo amino de los reactivos conectores o los restos de fármaco. Los grupos imina base de Schiff resultantes pueden formar una unión estable, o se pueden reducir, por ejemplo, con reactivos de borohidruro para formar uniones amino estables. En una realización, la reacción de la parte de carbohidrato de un anticuerpo glicosilado con galactosa oxidasa o meta-peryodato sódico puede producir grupos carbonilo (aldehído y cetona) en la proteína que pueden reaccionar con grupos apropiados en el fármaco (Hermanson, *Bioconjugate Techniques*). En otra realización, las proteínas que contienen restos de serina o treonina N-terminales pueden reaccionar con meta-peryodato sódico, dando como resultado la producción de un aldehído en el lugar del primer aminoácido (Geoghegan & Stroh, (1992) *Bioconjugate Chem.* 3:138-146; documento de Patente US 5.362.852). Tales aldehídos se pueden hacer reaccionar con un resto de fármaco o conector nucleófilo.

35 Asimismo, los grupos nucleofílicos en un resto de fármaco incluyen, pero no se limitan a: grupos amino, tiol, hidroxilo, hidrazida, oxima, hidrazina, tiosemicarbazona, hidrazina carboxilato, aril hidrazina capaces de reaccionar para formar enlaces covalentes con grupos electrofílicos en restos conectores y reactivos conectores que incluyen: (i) ésteres activos tales como ésteres NHS, ésteres HOBt, haloformiatos, y haluros de ácido; (ii) haluros de alquilo y bencilo tales como haloacetamidas; (iii) grupos aldehído, cetona, carboxilo y maleimida.

40 Alternativamente, se puede preparar una proteína de fusión que comprende el anticuerpo y un agente citotóxico, por ejemplo, mediante técnicas recombinantes o síntesis peptídica. La longitud del ADN puede comprender las regiones respectivas que codifican las dos partes del conjugado adyacentes entre sí o separadas por una región que codifica un péptido conector que no destruye las propiedades deseadas del conjugado.

45 El aún otra realización, el anticuerpo se puede conjugar con un "receptor" (tal como estreptavidina) para la utilización en la dirección previa a un tumor en la que se administra el conjugado anticuerpo-receptor al paciente, seguido de retirada del conjugado sin unir de la circulación usando un agente de aclaramiento y a continuación administración de un "ligando" (por ejemplo, avidina) que se conjuga con el agente citotóxico (por ejemplo, un radionucleótido).

## 50 **Ciertos Métodos para Preparar Anticuerpos**

### ***Ciertos métodos basados en hibridoma***

55 Los anticuerpos monoclonales de la invención se pueden preparar usando el método de hibridoma que se describió primero en Kohler *et al.*, *Nature*, 256: 495 (1975), y se describió adicionalmente, por ejemplo, en Hongo *et al.*, *Hybridoma*, 14 (3): 253-260 (1995), Harlow *et al.*, *Antibodies: A Laboratory Manual*, (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2ª ed. 1988); Hammerling *et al.*, en: *Monoclonal Antibodies and T-Cell Hybridomas* 563-681 (Elsevier, N.Y., 1981), y Ni, Xiandai Mianyixue, 26 (4): 265-268 (2006) con respecto a hibridomas de humano-humano. Los métodos adicionales incluyen los que se describen, por ejemplo, en la Pat. de Estados Unidos N° 7.189.826 con respecto a la producción de anticuerpos IgM naturales humanos monoclonales a partir de líneas celulares de hibridoma. La tecnología de hibridoma humano (tecnología de Trioma) se describe en Vollmers y Brandlein, *Histology and Histopathology*, 20 (3): 927-937 (2005) y en Vollmers y Brandlein, *Methods and Findings in Experimental and Clinical Pharmacology*, 27 (3): 185-91 (2005).

Para otras diversas técnicas de hibridoma, véase, por ejemplo, el documento de Patente US 2006/258841; documento de Patente US 2006/183887 (anticuerpos totalmente humanos), documento de Patente US 2006/059575; documento de Patente US 2005/287149; documento de patente US 2005/100546; documento de patente US 2005/026229; y los documentos de Patente de Estados Unidos con números 7.078.492 y 7.153.507. A continuación se describe un protocolo a modo de ejemplo para producir anticuerpos monoclonales usando el método de hibridoma. En una realización, un ratón u otro animal anfitrión, como hámster, se inmuniza para obtener linfocitos que producen o son capaces de producir anticuerpos que se unirán de forma específica a la proteína usada para inmunización. Los anticuerpos se incrementan en animales mediante múltiples inyecciones subcutáneas (sc) o intraperitoneales (ip) de un polipéptido que comprende VEGF o un fragmento del mismo, y un adyuvante, como monofosforil lípido A (MPL)/dicrinomicolato de trehalosa (TDM) (Ribi Immunochem. Research, Inc., Hamilton, MT). Un polipéptido que comprende VEGF o un fragmento del mismo se puede preparar usando métodos bien conocidos en la técnica, tales como métodos recombinantes, algunos de los cuales se describen adicionalmente en el presente documento. Para anticuerpos anti-VEGF, el suero de animales inmunizados se somete a ensayo, y opcionalmente se administran inmunizaciones de refuerzo. Se aíslan linfocitos de animales que producen anticuerpos anti-VEGF. Como alternativa, los linfocitos se pueden inmunizar *in vitro*.

A continuación, los linfocitos se fusionan con células de mieloma usando un agente de fusión adecuado, como polietilenglicol, para formar una célula de hibridoma. Véase, por ejemplo, Goding, *Monoclonal Antibodies: Principles and Practice*, pp. 59-103 (Academic Press, 1986). Se pueden usar células de mieloma que se fusionan de forma eficaz, apoyan una producción de nivel elevado de anticuerpo estable con las células que producen anticuerpos seleccionados, y son sensibles a un medio como un medio de HAT. Las células de mieloma a modo de ejemplo incluyen, pero no se limitan a, líneas de mieloma murino, tales como las derivadas de tumores de ratón MOPC-21 y MPC-11 disponibles en el Salk Institute Cell Distribution Center, San Diego, California USA, y células SP-2 o X63-Ag8-653 disponibles en la Colección Americana de Cultivos Tipo, Rockville, Maryland USA. También se han descrito líneas celulares de mieloma humano y de heteromieloma de ratón-humano para la producción de anticuerpos monoclonales humanos (Kozbor, *J. Immunol.*, 133:3001 (1984); Brodeur *et al.*, *Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications*, pp. 51-63 (Marcel Dekker, Inc., New York, 1987)).

Las células de hibridoma preparadas de este modo se siembran y se cultivan en un medio de cultivo adecuado, por ejemplo, un medio que contiene una o más sustancias que inhiben el crecimiento o la supervivencia de las células de mieloma precursoras, sin fusionar. Por ejemplo, si las células de mieloma precursoras carecen de la enzima hipoxantina guanina fosforribosil transferasa (HGPRT o HPRT), el medio de cultivo para los hibridomas por lo general incluirá hipoxantina, aminopterina, y timidina (medio HAT), cuyas sustancias evitan el crecimiento de células deficientes en HGPRT. Preferentemente, se usan métodos de cultivo de células de hibridoma libres de suero para reducir el uso de suero derivado de animal como suero bovino fetal, como se describe, por ejemplo, en Even *et al.*, *Trends in Biotechnology*, 24 (3), 105-108 (2006).

En Franek, *Trends in Monoclonal Antibody Research*, 111-122 (2005), se describen oligopéptidos como herramientas para aumentar la productividad de cultivos de células de hibridoma. De forma específica, los medios de cultivo convencionales se enriquecen con ciertos aminoácidos (alanina, serina, asparagina, prolina), o con fracciones de hidrolizado de proteína, y la apoptosis se puede suprimir significativamente con oligopéptidos sintéticos, formados por tres a seis restos de aminoácidos. Los péptidos están presentes en concentraciones milimolares o superiores.

El medio de cultivo en el que las células de hibridoma están creciendo se puede someter a ensayo para producción de anticuerpos monoclonales que se unen al VEGF. La especificidad de la unión de los anticuerpos monoclonales producidos por células de hibridoma se puede determinar mediante inmunoprecipitación o mediante un ensayo de unión *in vitro*, como radioinmunoensayo (RIA) o ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA). La afinidad de unión del anticuerpo monoclonal se puede determinar, por ejemplo, mediante análisis de Scatchard. Véase, por ejemplo, Munson *et al.*, *Anal. Biochem.*, 107: 220 (1980).

A continuación, se identifican las células de hibridoma que producen anticuerpos de la especificidad, afinidad, y/o actividades deseadas, los clones se pueden subclonar mediante procedimientos de dilución limitante y cultivar mediante métodos convencionales. Véase, por ejemplo, Goding, citado anteriormente. los medios de cultivo adecuados para este fin incluyen, por ejemplo, medio D-MEM o RPMI-1640. Además, las células de hibridoma se pueden cultivar *in vivo* como tumores de líquido ascítico en un animal. Los anticuerpos monoclonales secretados por los subclones se separan de forma adecuada del medio de cultivo, fluido ascítico, o suero mediante procedimientos de purificación de inmunoglobulina convencionales tales como, por ejemplo, proteína A-Sefarosa, cromatografía en hidroxilapatita, electroforesis en gel, diálisis, o cromatografía por afinidad. Un procedimiento para aislar proteínas a partir de células de hibridoma se describe en el documento de Patente US 2005/176122 y en el documento de Patente de Estados Unidos N° 6.919.436. El método incluye el uso de cantidades mínimas de sales, tales como sales liotrópicas, en el proceso de unión y también preferentemente el uso de pequeñas cantidades de disolventes orgánicos en el proceso de elución.

**Ciertos métodos de identificación sistemática de librerías**

Los anticuerpos de la invención se pueden preparar usando librerías combinatorias para identificar sistemáticamente anticuerpos con la actividad o actividades deseadas. Por ejemplo, en la técnica se conoce diversos métodos para generar librerías de presentación de fagos e identificar sistemáticamente tales librerías de anticuerpos que poseen las características de unión deseadas. Tales métodos se describen generalmente en Hoogenboom *et al.* en *Methods in Molecular Biology* 178:1-37 (O'Brien *et al.*, ed., Human Press, Totowa, NJ, 2001). Por ejemplo, un método para generar anticuerpos de interés es a través del uso de una librería de anticuerpo de fago como se describe en Lee *et al.*, *J. Mol. Biol.* (2004), 340 (5): 1073-93.

En principio, los clones de anticuerpos sintéticos se seleccionan mediante identificación sistemática de librerías de fagos que contienen fagos que presentan diversos fragmentos de región variable de anticuerpo (Fv) fusionada con proteína de envoltura de fago. Tales librerías de fagos se seleccionan mediante cromatografía por afinidad frente al antígeno deseado. Los clones que expresan fragmentos de Fv capaces de unirse al antígeno deseado se adsorben al antígeno de los clones de no unión en la librería. Los clones de unión se eluyen a continuación del antígeno, y se pueden enriquecer adicionalmente mediante ciclos adicionales de adsorción/elución de antígeno. Cualquiera de los anticuerpos de la invención se puede obtener por diseño de un procedimiento de identificación sistemática de antígeno adecuado para seleccionar el clon del fago de interés seguido por construcción de un clon de anticuerpo de longitud completa usando las secuencias de la Fv del clon de fago de interés y secuencias de región constante adecuadas (Fc) que se describen en Kabat *et al.*, *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, Quinta Edición, Publicación del NIH 91-3242, Bethesda MD (1991), vol. 1-3.

En ciertas realizaciones, el dominio de unión a antígeno de un anticuerpo se forma a partir de dos regiones variables (V) de aproximadamente 110 aminoácidos, cada una de las cadenas ligera (VL) y pesada (VH), ambas de las cuales presentan tres lazos hipervariables (HVR) o regiones que determinan la complementariedad (CDR). Los dominios variables se pueden presentar funcionalmente en fagos, como fragmentos de Fv de una sola cadena (scFv), en los que VH y VL están unidas de forma covalente a través de un péptido flexible, corto, o como fragmentos de Fab, en los que cada uno se fusiona a un dominio constante e interactúa de forma no covalente, como se describe en Winter *et al.*, *Ann. Rev. Immunol.*, 12: 433-455 (1994). Como se usa en el presente documento, los clones de fago que codifican scFv y los clones de fago que codifican Fab se denominan de forma colectiva a "clones de fago de Fv" o "clones de Fv".

Los repertorios de genes de VH y VL se pueden clonar de forma separada mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y se pueden combinar aleatoriamente en librerías de fagos, que a continuación se pueden buscar para clones de unión a antígeno como se describe en Winter *et al.*, *Ann. Rev. Immunol.*, 12: 433-455 (1994). Las librerías de fuentes inmunizadas proporcionan al inmunógeno anticuerpos de alta afinidad sin la necesidad de construcción de hibridomas. Como alternativa, el repertorio sin tratamiento previo se puede clonar para proporcionar una sola fuente de anticuerpos humanos a un amplio intervalo de no auto antígenos y también auto antígenos sin inmunización alguna como se describe en Griffiths *et al.*, *EMBO J.*, 12: 725-734 (1993). Por último, también se pueden preparar librerías sin tratamiento de forma sintética por clonación de los segmentos de genes V sin reorganizar a partir de células madre, y usando cebadores de PCR que contienen secuencias aleatorias para codificar las regiones de CDR3 altamente variables y para conseguir la reorganización *in vitro* como se describe en Hoogenboom y Winter, *J. Mol. Biol.*, 227: 381-388 (1992).

En ciertas realizaciones, se usan fagos filamentosos para presentar fragmentos de anticuerpos mediante fusión a la proteína pIII de envoltura minoritaria. Los fragmentos de anticuerpo se pueden presentar como fragmentos de Fv de una sola cadena, en los que los dominios de VH y VL se conectan en la misma cadena de polipéptidos mediante un espaciador de polipéptidos flexible, por ejemplo, como se describe en Marks *et al.*, *J. Mol. Biol.*, 222: 581-597 (1991), o como fragmentos de Fab, en los que una cadena se fusiona a pIII y la otra se secreta en el periplasma de la célula anfitrion bacteriana en el que se ensambla con una estructura de proteína de envoltura de Fab que se llega a presentar en la superficie del fago por desplazamiento de algunas de las proteínas de envoltura de tipo silvestre, por ejemplo, como se describe en Hoogenboom *et al.*, *Nucl. Acids Res.*, 19: 4133-4137 (1991).

En general, se obtienen ácidos nucleicos que codifican fragmentos de genes de anticuerpo a partir de células inmunes cosechadas de seres humanos o de animales. Si se desea una librería predispuesta a favor de clones anti-VEGF, el sujeto se inmuniza con VEGF para generar una respuesta al anticuerpo, y células del bazo y/o linfocitos B en circulación distintos de linfocitos de sangre periférica (PBL) se recuperan para la construcción de librería. En una realización preferente, una librería de fragmento de gen de anticuerpo esté dispuesto a favor de clones anti-VEGF se obtiene por generación de una respuesta a anticuerpo anti-VEGF en ratones transgénicos que portan una matriz de gen de inmunoglobulina humana funcional (y que carecen de un sistema de producción de anticuerpos endógenos funcional) de modo que la inmunización de VEGF da lugar a linfocitos B que producen anticuerpos humanos frente al VEGF. La generación de ratones transgénicos que producen anticuerpos se describe a continuación.

Se puede obtener enriquecimiento adicional para poblaciones de células reactivas anti-VEGF usando un procedimiento adecuado de identificación sistemática para aislar linfocitos B que expresan anticuerpo unido a membrana específico de VEGF, por ejemplo, mediante separación celular usando cromatografía por afinidad de

VEGF o adsorción de células para VEGF marcado con fluorocromo seguidos de clasificación celular activada por flujo (FACS).

5 Como alternativa, el uso de células de bazo y/o linfocitos B u otros PBL de un donante sin inmunizar proporciona una mejor representación del posible repertorio de anticuerpos, y también permite la construcción de una librería de anticuerpos usando cualquier especie animal (humano o no humano) en la que el VEGF no es antigénico. Para librerías que incorporan construcción de genes de anticuerpos *in vitro*, se cosechan células madre a partir del sujeto para proporcionar ácidos nucleicos que codifican segmentos de genes de anticuerpos sin reorganizar. Las células inmunes de interés se pueden obtener a partir de diversas especies animales, tales como especies de ser humano, ratón, rata, lagomorfo, luprina, canina, felina, porcina, bovina, equina, y aviar, etc.

15 Los segmentos de genes variables de anticuerpo que codifican ácidos nucleicos (incluyendo segmentos de VH y VL) se recuperan de las células de interés y se amplifican. En el caso de librerías de genes de VH y VL reorganizados, el ADN deseado se puede obtener aislando ADN genómico o ARNm de linfocitos seguido de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) con cebadores que emparejan los extremos en las posiciones 5' y 3' de genes de VH y VL reorganizados como se describe en Orlandi *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A), 86: 3833-3837 (1989), formando de ese modo diversos repertorios de genes V para expresión. Los genes V se pueden amplificar a partir de ADNc y ADN genómico, con cebadores inversos en el extremo en la posición 5' del exón que codifica el dominio de V maduro y cebadores directos ubicados dentro del segmento J como se describe en Orlandi *et al.* (1989) y en Ward *et al.*, Nature, 341: 544-546 (1989). Sin embargo, para amplificar a partir de ADNc, los cebadores inversos también se pueden ubicar en el exón director como se describe en Jones *et al.*, Biotechnol., 9: 88-89 (1991), y cebadores directos dentro de la región constante como se describe en Sastry *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A), 86: 5728-5732 (1989). Para maximizar la complementariedad, se puede incorporar degeneración can en los cebadores como se describe en Orlandi *et al.* (1989) o en Sastry *et al.* (1989). En ciertas realizaciones, la diversidad de la librería se maximiza usando cebadores de PCR dirigidos a cada familia del gen V para amplificar todas las disposiciones de VH y VL disponibles presentes en la muestra de ácido nucleico de la célula inmune, por ejemplo como se describe en el método de Marks *et al.*, J. Mol. Biol., 222: 581-597 (1991) o como se describe en el método de Orum *et al.*, Nucleic Acids Res., 21: 4491-4498 (1993). Para la clonación del ADN amplificado en vectores de expresión, se pueden introducir sitios de restricción raros dentro del cebador de PCR como una marca en un extremo como se describe en Orlandi *et al.* (1989), o mediante amplificación de PCR adicional con un cebador marcado como se describe en Clackson *et al.*, Nature, 352: 624-628 (1991).

35 Los repertorios de genes V reorganizados de forma sintética se pueden derivar *in vitro* a partir de segmentos de genes V. La mayoría de los segmentos de genes de VH humanos se han clonado y secuenciado (se informa en Tomlinson *et al.*, J. Mol. Biol., 227: 776-798 (1992)), y se hacen mapas (informados en Matsuda *et al.*, Nature Genet., 3: 88-94 (1993); estos segmentos clonados (que incluyen todas las conformaciones principales del lazo H1 y H2) se pueden usar para generar diversos repertorios de genes de VH con cebadores de PCR que codifican lazos H3 de diversas secuencias y longitud como se describe en Hoogenboom y Winter, J. Mol. Biol., 227: 381-388 (1992). Los repertorios de VH también se pueden preparar con toda la diversidad de secuencias enfocada en un lazo H3 largo de una sola longitud como se describe en Barbas *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A, 89: 4457-4461 (1992). Los segmentos Vk y Vl humanos se han clonado y secuenciado (se informa en Williams y Winter, Eur. J. Immunol., 23: 1456-1461 (1993)) y se pueden usar para preparar repertorios de cadena ligera sintéticos. Los repertorios de genes V sintéticos, basados en un intervalo de plegamientos de VH y VL, y longitudes de L3 y H3, codificarán anticuerpos de diversidad estructural considerable. Después de la amplificación de genes V que codifican ADN, los segmentos de genes V de línea germinal se pueden reorganizar *in vitro* de acuerdo con los métodos de Hoogenboom y Winter, J. Mol. Biol., 227: 381-388 (1992).

50 Se pueden construir repertorios de fragmentos de anticuerpo por combinación de repertorios de genes de VH y VL en conjunto de varias formas. Cada repertorio se puede crear en diferentes vectores, y los vectores se pueden recombinar *in vitro*, por ejemplo, como se describe en Hogrefe *et al.*, Gene, 128: 119-126 (1993), o *in vivo* mediante infección combinatoria, por ejemplo, el sistema loxP que se describe en Waterhouse *et al.*, Nucl. Acids Res., 21: 2265-2266 (1993). El enfoque de recombinación *in vivo* se aprovecha de la naturaleza bicatenaria de los fragmentos de Fab para superar el límite del tamaño de la librería impuesto por la eficacia de transformación de *E. coli*. Los repertorios de VH y VL sin tratamiento previo se clonan por separado, uno en un fagémido y el otro en un vector de fago. Las dos librerías se combinan a continuación mediante infección de fagos de bacterias que contienen fagémidos de modo que cada célula contiene una combinación y el tamaño de la librería está limitado solamente por el número de células presentes (aproximadamente  $10^{12}$  clones). Ambos vectores contienen señales de recombinación *in vivo* de modo que los genes de VH y VL se recombinan en un solo replicón y se co-empaquetan en viriones de fagos. Estas librerías enormes proporcionan grandes números de diversos anticuerpos de buena afinidad ( $K_d^{-1}$  de aproximadamente  $10^8$  M).

65 Como alternativa, los repertorios se pueden clonar secuencialmente en el mismo vector, por ejemplo, como se describe en Barbas *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A, 88: 7978-7982 (1991), o ensamblar en conjunto mediante PCR y a continuación clonar, por ejemplo como se describe en Clackson *et al.*, Nature, 352: 624-628 (1991). También se puede usar ensamblaje con PCR para unir los ADN de VH y VL con ADN que codifica un espaciador peptídico flexible para formar repertorios de Fv de una sola cadena (scFv). Además en otra técnica, se usa



"ensamblaje con PCR en la célula" para combinar genes de VH y VL dentro de linfocitos mediante PCR y a continuación clonar repertorios de genes unidos como se describe en Embleton *et al.*, Nucl. Acids Res., 20: 3831-3837 (1992).

5 Los anticuerpos producidos por librerías sin tratamiento previo (naturales o sintéticos) pueden ser de afinidad moderada ( $K_d^{-1}$  de aproximadamente  $10^6$  a  $10^7$   $M^{-1}$ ), pero la maduración de afinidad también se puede limitar *in vitro* por construcción y reelección a partir de librerías secundarias como se describe en Winter *et al.* (1994), citado anteriormente. Por ejemplo, se puede introducir mutación de forma aleatoria *in vitro* usando polimerasa propensa a error (informado en Leung *et al.*, Technique, 1: 11-15 (1989)) en el método de Hawkins *et al.*, J. Mol. Biol., 226: 889-10 896 (1992) o en el método de Gram *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci U.S.A., 89: 3576-3580 (1992). Además, se puede realizar maduración de afinidad mediante mutación de forma aleatoria de una o más CDR, por ejemplo, usando PCR con cebadores que portan secuencias aleatorias que atraviesan la CDR de interés, en clones de Fv individuales seleccionados e identificación sistemática de clones de afinidad más elevada. El documento de Patente WO 9607754 (publicado el 14 de marzo de 1996) describía un método para inducir la mutagénesis en una región que 15 determina la complementariedad de una cadena ligera de inmunoglobulina para crear una librería de genes de cadena ligera. Otro enfoque eficaz es recombinar los dominios de VH o VL seleccionados mediante presentación de fagos con repertorios de variables del dominio de V de origen natural obtenidos a partir de donantes sin inmunizar e identificar sistemáticamente la afinidad más elevada en varias rondas de recombinación de cadenas como se describe en Marks *et al.*, Biotechnol., 10: 779-783 (1992). Esta técnica permite la producción de anticuerpos y 20 fragmentos de anticuerpos con afinidades de aproximadamente  $10^9$  M o inferior.

La identificación sistemática de las librerías se puede conseguir con diversas técnicas conocidas en la técnica. Por ejemplo, se puede usar VEGF para revestir los pocillos de placas de adsorción, expresado en células anfitrionas adheridas a placas de adsorción o usado en clasificación celular, o conjugado con biotina para capturar con perlas 25 revestidas con estreptavidina, o usado en cualquier otro método para selección de librerías de presentación de fagos.

Las muestras de librerías de fagos se ponen en contacto con VEGF inmovilizado en condiciones adecuadas para su unión al menos a una parte de las partículas de fago con el adsorbente. Normalmente, las condiciones, que incluyen 30 pH, fuerza iónica, temperatura y similares se seleccionan para que imiten las condiciones fisiológicas. Los fagos unidos a la fase sólida se lavan y a continuación se eluyen con ácido, por ejemplo, como se describe en Barbas *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci U.S.A., 88: 7978-7982 (1991), o con álcali, por ejemplo, como se describe en Marks *et al.*, J. Mol. Biol., 222: 581-597 (1991), o mediante competición de antígenos del VEGF, por ejemplo, en un procedimiento similar al método de competición de antígenos de Clackson *et al.*, Nature, 352: 624-628 (1991). Los fagos se pueden 35 enriquecer 20-1.000 veces en una sola ronda de selección. Además, los fagos enriquecidos se pueden hacer crecer en cultivo bacteriano y someter a rondas adicionales de selección.

La eficacia de la selección depende de muchos factores, incluyendo la cinética de disociación durante el lavado, y de si se pueden engranar múltiples fragmentos de anticuerpos en un solo fago de forma simultánea con antígenos. Los 40 anticuerpos con cinética de disociación rápida (y afinidades de unión débiles) se pueden retener mediante el uso de lavados breves, presentación de fagos polivalente y densidad de recubrimiento del antígeno elevada en fase sólida. La densidad elevada no solamente estabiliza el fago a través de interacciones polivalentes, sino que favorece la reunión del fago que se ha disociado. La selección de anticuerpos con cinética de disociación baja (y buenas afinidades de unión) se puede estimular mediante el uso de lavados largos y presentación de fagos monovalente 45 como se describe en Bass *et al.*, Proteins, 8: 309-314 (1990) y en el documento de Patente WO 92/09690, y una baja densidad de revestimiento del antígeno como se describe en Marks *et al.*, Biotechnol., 10: 779-783 (1992).

Es posible seleccionar entre anticuerpos de fagos de diferentes afinidades, incluso con afinidades que difieren ligeramente, para VEGF. Sin embargo, es probable que la mutación aleatoria de un anticuerpo seleccionado (por 50 ejemplo, como se realiza en algunas técnicas de maduración por afinidad) de lugar a muchos mutantes, la mayoría que se unen a antígenos, y unos pocos con afinidad más elevada. Con VEGF limitante, podrían competir fagos de afinidad elevada raros. Para mantener todos los mutantes de afinidad más elevada, se pueden incubar fagos con VEGF biotinilado en exceso, pero con el VEGF biotinilado a una concentración de molaridad más baja que la constante de afinidad molar diana para VEGF. Los fagos de unión por afinidad elevada se pueden capturar a 55 continuación con perlas paramagnéticas revestidas con estreptavidina. Tal "captura en equilibrio" permite la selección de los anticuerpos de acuerdo con sus afinidades de unión, con sensibilidad que permite el aislamiento de clones mutantes clones con tan poco como dos veces mayor afinidad a partir de un gran exceso de fagos con menor afinidad. Las condiciones usadas en el lavado de fagos unidos a una fase sólida también se pueden manipular para discriminar sobre la base de la cinética de disociación.

60 Los clones anti-VEGF se pueden seleccionar basándose en la actividad. En ciertas realizaciones, la invención proporciona anticuerpos anti-VEGF que se unen a células vivas que expresan VEGF de forma natural. En una realización, la invención proporciona anticuerpos anti-VEGF que bloquean la unión entre un ligando del VEGF y el VEGF, pero no bloquean la unión entre un ligando del VEGF y una segunda proteína. Los clones de Fv que 65 corresponden a tales anticuerpos anti-VEGF se pueden seleccionar por (1) aislamiento de clones anti-VEGF a partir de una librería de fagos tal como se ha descrito anteriormente, y opcionalmente amplificando la población aislada de

clones de fagos al crecer la población en un anfitrión bacteriano adecuado; (2) selección de VEGF y una segunda proteína frente a la que se desea la actividad de bloqueo y de no bloqueo, respectivamente; (3) adsorción de los clones de fagos anti-VEGF a VEGF inmovilizado; (4) uso de un exceso de la segunda proteína para eluir cualquier clon no deseado que reconoce determinantes de unión al VEGF que se superponen o que se comparten con los determinantes de unión de la segunda proteína; y (5) elución de los clones que permanecen adsorbidos después de la etapa (4). Opcionalmente, los clones con las propiedades deseadas de bloqueo/no bloqueo se pueden enriquecer adicionalmente mediante la repetición de los procedimientos de selección que se describen en el presente documento una o más veces.

El ADN que codifica anticuerpos monoclonales derivados de hibridoma o clones de Fv de presentación de fagos de la invención se aíslan fácilmente y se secuencian usando procedimientos convencionales (por ejemplo, mediante el uso de cebadores de oligonucleótidos diseñados para amplificar de forma específica las regiones de codificación de cadena pesada y ligera de interés a partir del hibridoma o molde de ADN de fago). Una vez aislado, el ADN se puede colocar en vectores de expresión, que se transfectan a continuación en células anfitrionas tales como células de *E. coli*, células COS de simio, células de ovario de hámster chino (CHO), o células de mieloma que no producen de otro modo proteína inmunoglobulina, para obtener la síntesis de los anticuerpos monoclonales deseados en las células anfitrionas recombinantes. Los artículos de revisión sobre expresión recombinante en bacterias de ADN que codifica anticuerpos incluyen Skerra *et al.*, Curr. Opin. Immunol., 5: 256 (1993) y Pluckthun, Immunol. Revs., 130: 151 (1992).

El ADN que codifican los clones de Fv de la invención se puede combinar con secuencias de ADN conocidas que codifican regiones constantes de cadena pesada y/o de cadena ligera (por ejemplo las secuencias de ADN apropiadas se pueden obtener a partir de Kabat *et al.*, citado anteriormente) para formar clones que codifican cadenas pesadas y/o ligera de longitud completa o parcial. Se observará que se pueden usar regiones constantes de cualquier isotipo para este fin, incluyendo regiones constantes de IgG, IgM, IgA, IgD, e IgE, y que tales regiones constantes se pueden obtener a partir de cualquier especie humana o animal. Un clon de Fv derivado del ADN de dominio variable de una especie animal (tal como ser humano) y a continuación fusionado a un ADN de región constantes de otra especie animal para formar secuencia o secuencias de codificación para cadena pesada y/o cadena ligera de longitud total "híbrida", se incluye en la definición de anticuerpo "quimérico" e "híbrido" como se usa en el presente documento. En ciertas realizaciones, un clon de Fv derivado de ADN variable humano se fusiona con ADN de región constante humana para formar secuencia o secuencias de codificación para cadenas pesada y/o ligera de longitud completa o parcial.

El ADN que codifica anticuerpo anti-VEGF derivados de un hibridoma de la invención también se puede modificar, por ejemplo, por sustitución de la secuencia de codificación para dominios constantes de cadena pesada y ligera humana en lugar de secuencias de murino homólogas derivadas del clon de hibridoma (por ejemplo, como en el método de Morrison *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 81: 6851-6855 (1984)). El ADN que codifican un anticuerpo o fragmento derivado de hibridoma o de clon de Fv se puede modificar adicionalmente mediante unión covalente a la secuencia de codificación de inmunoglobulina de toda o parte la secuencia de codificación para un polipéptido que no es inmunoglobulina. De esta manera, se preparan anticuerpos "quiméricos" o "híbridos" que tienen la especificidad de unión el clon de Fv o anticuerpos derivados de clon de hibridoma de la invención.

#### **Vectores, células anfitrionas, y métodos recombinantes**

También se pueden producir anticuerpos usando métodos recombinantes. Para producción recombinante de un anticuerpo anti-VEGF, el ácido nucleico que codifica el anticuerpo se aísla y se inserta en un vector que se puede replicar para clonación adicional (amplificación del ADN) o para expresión. El ADN que codifica el anticuerpo se puede aislar y secuenciar fácilmente usando procedimientos convencionales (por ejemplo, usando sondas de oligonucleótidos que son capaces de unirse de forma específica a genes que codifican las cadenas pesada y ligera del anticuerpo). Están disponibles muchos vectores. Los componentes del vector incluyen por lo general, pero no se limitan a, uno o más de los siguientes: una secuencia de señal, un origen de replicación, uno o más genes marcadores, un elemento potenciador, un promotor, y una secuencia determinación de la transcripción.

#### Componente de la secuencia de señal

Un anticuerpo de la invención se puede producir de forma recombinante no solo directamente, sino también como un polipéptido de fusión con un polipéptido heterólogo, que es preferentemente una secuencia de señal otro polipéptido que tiene un sitio de escisión específico en el extremo N de la proteína o polipéptido maduros. La secuencia de señal heteróloga seleccionada preferentemente es una que la célula anfitriona reconoce y procesa (es decir, se escinde con una peptidasa de señal). Para células anfitrionas procarionas que no reconocen y que procesan una secuencia de señal de anticuerpo nativo, la secuencia de señal se sustituye por una secuencia de señal procarionas, por ejemplo, seleccionada entre el grupo de los directores de fosfatasa alcalina, penicilinas, Ipp, o enterotoxina II estable al calor. Para secreción de levadura, la secuencia de señal nativa se puede sustituir, por ejemplo, con el director de invertasa de levadura, director de factor  $\alpha$  (incluyendo directores de factor  $\alpha$  de *Saccharomyces* y *Kluyveromyces*), o director de fosfatasa ácida, el director de glucoamilasa de *C. albicans*, o la señal que se describe en el documento de Patente WO 90/13646. En expresión de células de mamífero, están disponibles secuencias de

señal de mamíferos así como directores de secreción viral, por ejemplo, la señal gD del herpes simple.

Origen de replicación

5 Los vectores tanto de expresión como de clonación contienen una secuencia de ácidos nucleicos que permite que el vector se replique en una o más células anfitrionas seleccionadas. Por lo general, en vectores de clonación, esta secuencia es una que permite que el vector se replique independientemente del ADN cromosómico anfitrión, e incluye orígenes de replicación o secuencias de replicación de forma autónoma. Tales secuencias son bien conocidas para diversas bacterias, levaduras, y virus. El origen de la replicación a partir del plásmido pBR322 es  
10 adecuado para la mayoría de las bacterias Gram-negativas, el origen del plásmido 2 $\mu$  es adecuado para levadura, y diversos orígenes virales (SV40, poliovirus, adenovirus, VSV o BPV) son útiles para vectores de clonación en células de mamífero. Por lo general, el origen del componente de replicación no es necesario para vectores de expresión de mamífero (por lo general se puede usar el origen de SV40 porque solamente contiene el promotor temprano).

15 Componente de gen de selección

Los vectores de expresión y de clonación pueden contener un gen de selección, también denominado un marcador seleccionable. Los genes de selección habituales codifican proteínas que (a) confieren resistencia a antibióticos u otras toxinas, por ejemplo, ampicilina, neomicina, metotrexato, o tetraciclina, (b) complementan deficiencias auxotróficas, o (c) proporcionan nutrientes críticos no disponibles a partir de medios complejos, por ejemplo, el gen que codifica la D-alanina racemasa para *Bacilli*.  
20

Un ejemplo de un esquema de selección usa un fármaco para detener el crecimiento de una célula anfitriona. Esas células que se transforman de forma satisfactoria con un gen heterólogo producen una proteína que confiere resistencia a fármacos y por lo tanto sobrevive al régimen de selección. Ejemplos de tal selección dominante usan los fármacos neomicina, ácido micofenólico e higromicina.  
25

Otro ejemplo de marcadores seleccionables adecuados para células de mamífero son los que permiten la identificación de células competentes para aceptar ácido nucleico que codifica anticuerpo, tal como DHFR, glutamina sintetasa (GS), timidina quinasa, metalotioneína I y II, preferentemente genes de metalotioneína de primate, adenosina desaminasa, ornitina descarboxilasa, etc.  
30

Por ejemplo, se identifican células transformadas con el gen DHFR por cultivo de los transformantes en un medio de cultivo que contiene metotrexato (Mtx), un antagonista competitivo de DHFR. En estas condiciones, el gen de DHFR se amplifica junto con cualquier otro ácido nucleico cotransformado. Se puede usar una línea de células de ovario de hámster chino (CHO) deficientes en actividad de DHFR endógeno (por ejemplo, CRL-9096 de la ATCC).  
35

Como alternativa, las células transformadas con el gen de GS se identifican por cultivo de los transformantes en un medio de cultivo que contiene L-metionina sulfoximina (Msx), un inhibidor de GS. En estas condiciones, el gen de GS se amplifica junto con cualquier otro ácido nucleico cotransformado. El sistema de selección/amplificación de GS se puede usar en combinación con el sistema de selección/amplificación de DHFR descrito anteriormente.  
40

Como alternativa, las células anfitrionas (en particular anfitriones de tipo silvestre que contienen DHFR endógeno) transformadas o cotransformadas con secuencias de ADN que codifican un anticuerpo de interés, gen de DHFR de tipo silvestre, y otro marcador seleccionable tal como aminoglucósido 3'-fosfotransferasa (APH) se pueden seleccionar mediante crecimiento celular en medio que contiene un agente de selección para el marcador seleccionable tal como un antibiótico aminoglucosídico, por ejemplo, kanamicina, neomicina, o G418. Véase el documento de Patente de Estados Unidos N° 4.965.199.  
45

Un gen de selección adecuado para uso en levadura es el gen *trp1* presente en el plásmido de levadura YRp7 (Stinchcomb *et al.*, Nature, 282:39 (1979)). El gen *trp1* proporciona un marcador de selección para una cepa mutante de levadura que carece de la capacidad de crecer entre triptófano, por ejemplo, N° de la ATCC 44076 o PEP4-1. Jones, Genetics, 85: 12 (1977). La presencia de la lesión *trp1* en el genoma de la célula anfitriona de levadura proporciona entonces un entorno eficaz para detectar la transformación mediante cultivo en ausencia de triptófano.  
50  
55 Del mismo modo, las cepas de levadura deficientes en *Leu2* (20.622 o 38.626 de la ATCC) se complementan con plásmidos conocidos que portan el gen *Leu2*.

Además, se pueden usar vectores derivados del plásmido pKD1 circular de 1,6  $\mu$ m para transformación de levaduras *Kluyveromyces*. Como alternativa, un sistema de expresión para producción a gran escala de quimosina recombinante de ternero se informó para *K. lactis*. Van den Berg, Bio/Technology, 8: 135 (1990). También se han desvelado vectores de expresión de múltiples copias estables a la secreción de albúmina de suero humano recombinante madura mediante cepas industriales de *Kluyveromyces*. Fleer *et al.*, Bio/Technology, 9: 968-975 (1991).  
60

Componente promotor

Los vectores de expresión y de clonación por lo general contienen un promotor que es reconocido por el organismo anfitrión y que se une de forma operativa al ácido nucleico que codifica un anticuerpo. Los promotores adecuados para uso con anfitriones procariotas incluyen el promotor *phoA*, sistemas promotores de  $\beta$ -lactamasa y lactosa, promotor de fosfatasa alcalina, un sistema productor de triptófano (*trp*), y promotores híbridos tales como el promotor *tac*. Sin embargo, son adecuados otros promotores bacterianos conocidos. Los promotores para uso en sistemas bacterianos también contendrán una secuencia de Shine-Dalgarno (S.D.) unida de forma operativa al ADN que codifica un anticuerpo.

Se conocen secuencias promotoras para eucariotas. Virtualmente todos los genes eucariotas tienen una región rica en AT localizada de aproximadamente 25 a 30 bases secuencia arriba del sitio en el que se inicia la transcripción. Otra secuencia encontrada de 70 a 80 bases secuencia arriba del inicio de la transcripción de muchos genes es una región CNCAAT en la que N puede ser cualquier nucleótido. En el extremo en la posición 3' de la mayoría de los genes eucariotas se encuentra una secuencia AATAAA que puede ser la señal a la adición de la cola de poliA al extremo en la posición 3' de la secuencia de codificación. Todas estas secuencias se insertan adecuadamente en vectores de expresión eucariotas.

Ejemplos de secuencias promotoras adecuadas para uso con anfitriones de levadura incluyen los promotores para la 3-fosfoglicerato quinasa otras enzimas glucolíticas, tales como enolasa, gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa, hexoquinasa, piruvato descarboxilasa, fosfofructoquinasa, glucosa-6-fosfato isomerasa, 3-fosfoglicerato mutasa, piruvato quinasa, trifosfato isomerasa, fosfoglucosa isomerasa, y glucoquinasa.

Otros promotores de levadura, que son promotores inducibles que tienen la ventaja adicional de transcripción controlada por condiciones de crecimiento, son las regiones promotoras para la alcohol deshidrogenasa 2, isocitocromo C, fosfatasa ácida, enzimas degradantes asociadas con metabolismo del nitrógeno, metalotioneína, gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa, y enzimas responsables del uso de la maltosa y la galactosa. Los vectores y promotores adecuados para uso en expresión de levadura se describen adicionalmente en el documento de Patente EP 73.657. Los potenciadores de levadura también se usan de forma ventajosa con promotores de levadura.

La transcripción de anticuerpo de vectores en células anfitrionas de mamífero se puede controlar, por ejemplo, por promotores obtenidos a partir de los germanos de virus tales como virus de polio, virus de la viruela aviar, adenovirus (tal como Adenovirus 2), virus del papiloma bovino, virus del sarcoma aviar, citomegalovirus, un retrovirus, virus de la hepatitis B, Virus de Simio 40 (SV40), o de promotores de mamífero heterólogos, por ejemplo, el promotor de actina o un promotor de inmunoglobulina, a partir de promotores de choque térmico, siempre y cuando dichos promotores sean compatibles con los sistemas de células anfitrionas.

Los promotores tempranos y tardíos del virus SV40 se obtienen convenientemente como un fragmento de restricción de SV40 que también contiene el origen viral de replicación de SV40. El promotor temprano inmediato del citomegalovirus humano se obtiene convenientemente como un fragmento de restricción HindIII E. Un sistema para expresar ADN en anfitriones de mamíferos que usa el virus del papiloma bovino como un vector se describe en el documento de Patente de Estados Unidos N° 4.419.446. Una modificación de este sistema se describe en el documento de Patente de Estados Unidos N° 4.601.978. Véase también Reyes *et al.*, Nature 297 598-601 (1982) sobre la expresión del ADNc de  $\beta$ -interferón humano en células de ratón bajo el control de un promotor de timidina quinasa del virus del herpes simple. Como alternativa, se puede usar como promotor la repetición terminal larga del el Virus del Sarcoma de Rous.

Componente del elemento potenciador

La transcripción de un ADN que codifica un anticuerpo de la presente invención por eucariotas superiores se incrementa a menudo mediante la inserción de una secuencia potenciadora en el vector. Ahora se conocen muchas secuencias potenciadoras de genes de mamíferos (globina, elastasa, albúmina,  $\alpha$ -fetoproteína e insulina). Por lo general, sin embargo, se usará un potenciador de un virus de célula eucariota. Los ejemplos incluyen el potenciador de SV40 en el lado tardío del origen de replicación (100-270 pb), el potenciador del promotor temprano del citomegalovirus, el potenciador del polio en el lado tardío del origen de replicación, y potenciadores de adenovirus. Véase también Yaniv, Nature 297: 17-18 (1982) sobre elementos potenciadores para la activación de promotores eucariotas. El potenciador se puede empalmar en el vector en una posición 5' o 3' a la secuencia que codifica el anticuerpo, pero se localiza preferiblemente en un sitio en la posición 5' del promotor

Componente de terminación de la transcripción

Los vectores de expresión usados en células anfitrionas eucariotas (levaduras, hongos, insectos, plantas, animales, seres humanos, o células nucleadas de otros organismos multicelulares) también contendrán secuencias necesarias para la terminación de la transcripción y para estabilizar el ARNm. Dichas secuencias están disponibles normalmente a partir de las regiones no traducidas en la posición 5' y, ocasionalmente en la posición 3', de los ADN

o los ADNc eucarióticos o virales. Estas regiones contienen segmentos de nucleótidos transcritos como fragmentos poliadenilados en la parte no traducida del ARNm que codifica el anticuerpo. Un componente de terminación de la transcripción útil es la región de poliadenilación de la hormona de crecimiento bovina. Véase el documento de Patente WO94/11026 y el vector de expresión que se desvela en el mismo.

5

#### Selección y transformación de células anfitrionas

Las células anfitrionas adecuadas para clonación o expresión del ADN en los vectores en el presente documento son las células procariotas, levadura, o células eucariotas superiores descritas anteriormente. Los procariotas adecuados para esta finalidad incluyen eubacterias, tales como organismos Gram-negativos o Gram-positivos, por ejemplo, Enterobacteriaceae tales como *Escherichia*, por ejemplo, *E. coli*, *Enterobacter*, *Erwinia*, *Klebsiella*, *Proteus*, *Salmonella*, por ejemplo, *Salmonella typhimurium*, *Serratia*, por ejemplo, *Serratia marcescans*, y *Shigella*, así como *Bacilli* tales como *B. subtilis* y *B. licheniformis* (por ejemplo, 41P de *B. licheniformis* desvelado en el documento de Patente DD 266.710 publicado el 12 de abril de 1989), *Pseudomonas* tales como *P. aeruginosa*, y *Streptomyces*. Un anfitrión de clonación de *E. coli* preferente es 294 de *E. coli* (31.446 de la ATCC), aunque son adecuadas otras cepas tales como B de *E. coli*, X1776 de *E. coli* (31.537 de la ATCC), y W3110 de *E. coli* (27.325 de la ATCC). Estos ejemplos son ilustrativos en lugar de limitantes.

10

15

En bacterias se pueden producir anticuerpos de longitud completa, proteínas de fusión de anticuerpos, y fragmentos de anticuerpos, en particular cuando no son necesarias la glicosilación ni la función efectora de Fc, tal como cuando el anticuerpo terapéutico se conjuga con un agente citotóxico (por ejemplo, una toxina) que por sí mismo muestra eficacia en la destrucción de células tumorales. Los anticuerpos de longitud completa tienen una mayor vida media en circulación. La producción en *E. coli* es más rápida y más rentable. Para la expresión de fragmentos de anticuerpo y polipéptidos en bacterias, véanse, por ejemplo, en el documento de Patente de Estados Unidos N° 5.648.237 (Carter *et al.*), el documento de Patente de Estados Unidos N° 5.789.199 (Joly *et al.*), el documento de Patente de Estados Unidos N° 5.840.523 (Simmons *et al.*), que describe la región de iniciación de la traducción (TIR) y las secuencias de señal para optimizar la expresión y la secreción. Véase también Charlton, *Methods in Molecular Biology*, Vol. 248 (B.K.C. Lo, ed., Humana Press, Totowa, NJ, 2003), pp. 245-254, que describe la expresión de fragmentos de anticuerpo en *E. coli*. Después de la expresión, el anticuerpo se puede aislar de la pasta de células de *E. coli* en una fracción soluble y se puede purificar a través de, por ejemplo, una columna de proteína A o G dependiendo del isotipo. La purificación final se puede llevar a cabo de forma similar al proceso para purificar el anticuerpo expresado por ejemplo, en células CHO.

20

25

30

Además de los procariotas, los microbios eucariotas tales como hongos filamentosos o levaduras son anfitriones de clonación o expresión adecuados para vectores que codifican anticuerpos. *Saccharomyces cerevisiae*, o levadura de panadería común, es la más usada normalmente entre microorganismos anfitriones eucariotas inferiores. Sin embargo, un número de otros géneros, especies y cepas están comúnmente disponibles y son útiles en el presente documento, tales como *Schizosaccharomyces pombe*; anfitriones de *Kluyveromyces* tales como, por ejemplo, *K. lactis*, *K. fragilis* (12.424 de la ATCC), *K. bulgaricus* (16.045 de la ATCC), *K. wickerhamii* (24.178 de la ATCC), *K. waltii* (56.500 de la ATCC), *K. drosophilae* (36.906 de la ATCC), *K. thermotolerans*, y *K. marxianus*; *yarrowia* (documento de Patente EP 402.226); *Pichia pastoris* (documento de Patente EP 183.070); *Candida*; *Trichoderma reesia* (documento de Patente EP 244.234); *Neurospora crassa*; *Schwanniomyces* tales como *Schwanniomyces occidentalis*; y hongos filamentosos tales como, por ejemplo, *Neurospora*, *Penicillium*, *Tolypocladium*, y anfitriones de *Aspergillus* tales como *A. nidulans* y *A. niger*. Para una revisión que analiza el uso de levaduras y hongos filamentosos para la producción de proteínas terapéuticas, véase, por ejemplo, Gerngross, *Nat. Biotech.* 22:1409-1414 (2004).

35

40

45

Se pueden seleccionar ciertas cepas de hongos y levadura en las que las rutas de glicosilación se han "humanizado", dando como resultado la producción de un anticuerpo con un patrón de glicosilación parcial o totalmente humano. Véase, por ejemplo, Li *et al.*, *Nat. Biotech.* 24: 210-215 (2006) (que describe la humanización de la ruta de glicosilación en *Pichia pastoris*); y Gerngross *et al.*, citado anteriormente.

50

Las células anfitrionas adecuadas para la expresión del anticuerpo glicosilado también se derivan de organismos pluricelulares (invertebrados y vertebrados). Los ejemplos de células de invertebrados incluyen células de plantas e insectos. Se han identificado numerosas cepas y variantes de baculovirus y las correspondientes células anfitrionas de insecto permisivas de anfitriones tales como *Spodoptera frugiperda* (oruga), *Aedes aegypti* (mosquito), *Aedes albopictus* (mosquito), *Drosophila melanogaster* (mosca de la fruta), y *Bombyx mori*. Hay disponibles públicamente varias cepas virales para transfección, por ejemplo, la variante L-1 de NPV de *Autographa californica* y la cepa Bm-5 de NPV de *Bombyx mori*, y tales virus se pueden usar como el virus en el presente documento de acuerdo con la presente invención, en particular para transfección de células de *Spodoptera frugiperda*.

55

60

Los cultivos de células de plantas de algodón, maíz, patata, soja, petunia, tomate, lentejas de agua (*Lemnaceae*), alfalfa (*M. truncatula*), y tabaco también se pueden usar como anfitriones. Véanse, por ejemplo, los documentos de Patente de Estados Unidos con números 5.959.177, 6.040.498, 6.420.548, 7.125.978, y 6.417.429 (que describen tecnología PLANTIBODIES™ para producir anticuerpos en plantas transgénicas).

65

Se pueden usar células de vertebrados como anfitriones, y la propagación de células de vertebrado en cultivo (cultivo tisular) se ha convertido en un procedimiento de rutina. Los ejemplos de líneas celulares anfitrionas de mamífero útiles son la línea CV 1 de riñón de mono transformada con SV40 (COS-7, CRL 1651 de la ATCC); línea de riñón de embrión humano (293 o células 293 subclonadas para crecimiento en cultivo en suspensión, Graham *et al.*, J. Gen Virol. 36: 59 (1977)); células de riñón de cría de hámster (BHK, CCL 10 de la ATCC); células de sertoli de ratón (TM4, Mather, Biol. Reprod. 23: 243-251 (1980)); células de riñón de mono (CCL 70 de la ATCC de CV1); células de riñón de mono verde africano (VERO-76, CRL-1587 de la ATCC); células de carcinoma del cuello uterino humano (HELA, CCL 2 de la ATCC); células de riñón canino (MDCK, CCL 34 de la ATCC); células de hígado de rata buffalo (BRL 3A, CRL 1442 de la ATCC); células de pulmón humano (W138, CCL 75 de la ATCC); células de hígado humano (Hep G2, HB 8065); humor de mama de ratón (MMT 060562, CCL51 de la ATCC); células TRI (Mather *et al.*, Annals N.Y. Acad. Sci. 383: 44-68 (1982)); células MRC 5; células FS4; y una línea de hepatoma humano (Hep G2). Otras líneas de células anfitrionas de mamífero útiles incluyen células de ovario de hámster chino (CHO), que incluyen células DHFR<sup>r</sup> CHO (Urlaub *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77: 4216 (1980)); y líneas celulares de mieloma tales como NS0 y Sp2/0. Para una revisión de ciertas líneas de células anfitrionas de mamífero adecuadas para producción de anticuerpos, véase, por ejemplo, Yazaki y Wu, *Methods in Molecular Biology*, Vol. 248 (B.K.C. Lo, ed., Humana Press, Totowa, NJ, 2003), pp. 255-268.

Las células anfitrionas con los vectores de expresión o de clonación descritos anteriormente para producción de anticuerpos se cultivan en medios nutrientes convencionales modificados si fuera apropiado para inducir promotores, seleccionar transformantes, o amplificar los genes que codifican las secuencias deseadas.

#### Cultivo de las células anfitrionas

Las células anfitrionas usadas para producir un anticuerpo de la presente invención se pueden cultivar en diversos medios. Los medios disponibles en el mercado tales como F10 de Ham (Sigma), Medio Esencial Mínimo ((MEM), (Sigma), RPMI-1640 (Sigma), y Medio de Eagle Modificado por Dulbecco ((DMEM), Sigma) son adecuados para cultivar las células anfitrionas. Además, cualquiera de los medios que se describen en Ham *et al.*, Meth. Enz. 58: 44 (1979), Barnes *et al.*, Anal. Biochem. 102: 255 (1980), los documentos de Patente de Estados Unidos con números 4.767.704; 4.657.866; 4.927.762; 4.560.655; o 5.122.469; el documento de patente WO 90/03430; el documento de patente WO 87/00195; o el documento de Patente de Estados Unidos Re. N° 30.985 se pueden usar como medios de cultivo para las células anfitrionas. Cualquiera de estos medios se puede complementarse será necesario con hormonas y/o otros factores de crecimiento (tales como factor de crecimiento de insulina, transferrina, o epidérmico), sales (tales como cloruro de sodio, calcio, magnesio, y fosfato), tampones (tales como HEPES), nucleótidos (tales como adenosina y timidina), antibióticos (tales como el fármaco GENTAMYCIN<sup>TM</sup>), elementos traza (definidos como compuestos inorgánicos normalmente presentes a concentraciones finales en el intervalo micromolar), y glucosa o una fuente de energía equivalente. También se puede incluir cualquier otro suplemento necesario a concentraciones apropiadas que serían conocidas por los expertos en la materia. Las condiciones de cultivo, tales como temperatura, pH, y similares, son las usadas anteriormente con la célula anfitriona seleccionada para expresión, y serán evidentes para el experto habitual en la materia.

#### Purificación de anticuerpo

Cuando se usan técnicas recombinantes, el anticuerpo se puede producir intracelularmente, en el espacio periplásmico, o secretar directamente en el medio. Si el anticuerpo se produce intracelularmente, como una primera etapa, los restos de partículas, bien células anfitrionas o fragmentos lisados, se retiran, por ejemplo, mediante centrifugación o ultrafiltración. Carter *et al.*, Bio/Technology 10: 163-167 (1992) describen un procedimiento para aislar anticuerpos que se secretan al espacio periplásmico de *E. coli*. En resumen, la pasta celular se descongela en presencia de acetato de sodio (pH 3,5), EDTA, y fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF) durante aproximadamente 30 min. Los restos celulares se pueden retirar mediante centrifugación. Cuando el anticuerpo se secreta en el medio, los sobrenadantes de dichos sistemas de expresión por lo general se concentran primero usando un filtro de concentración de proteínas disponible en el mercado, por ejemplo, una unidad de ultrafiltración Amicon o Millipore Pellicon. Un inhibidor de proteasa tal como PMSF se puede incluir en cualquiera de las etapas anteriores para inhibir la proteólisis y se pueden incluir antibióticos para evitar el crecimiento de contaminantes accidentales.

La composición de anticuerpo preparada a partir de las células se puede purificar usando, por ejemplo, cromatografía de hidroxilapatita, cromatografía de interacción hidrófoba, electroforesis en gel, diálisis, y cromatografía por afinidad, estando la cromatografía de afinidad por lo general entre una de las etapas de purificación referentes. La idoneidad de la proteína A como un ligando de afinidad depende de la especie y el isotipo de cualquier dominio Fc de inmunoglobulina que está presente en el anticuerpo. La proteína A se puede usar para purificar anticuerpos que se basan en cadenas pesadas  $\gamma 1$ ,  $\gamma 2$ , o  $\gamma 4$  humanas (Lindmark *et al.*, J. Immunol. Meth. 62: 1-13 (1983)). La proteína G se recomienda para todos los isotipos de ratón y para  $\gamma 3$  humana (Guss *et al.*, EMBO J. 5: 15671575 (1986)). La matriz a la que se une el ligando de afinidad es lo más frecuentemente agarosa, pero están disponibles otras matrices. Las matrices mecánicamente estables, tales como vidrio de poro controlado o poli(estireno-divinil)benceno permiten caudales más rápidos y tiempos de procesamiento más cortos que los que se pueden conseguir con agarosa. Cuando el anticuerpo comprende un dominio C<sub>H</sub>3, la resina Bakerbond ABX<sup>TM</sup> (JT Baker, Phillipsburg, NJ) es útil para la purificación. Dependiendo del anticuerpo que se debe recuperar, también

están disponibles otras técnicas para purificación de proteínas tales como fraccionamiento en una columna de intercambio iónico, precipitación con etanol, HPLC en Fase Inversa, cromatografía en sílice, cromatografía en heparina SEPHAROSE™, cromatografía en una resina de intercambio aniónico o catiónico (tal como una columna de ácido poliaspártico), cromatoenfoque, SDS-PAGE, y precipitación con sulfato de amonio.

Después de cualquier etapa o etapas de purificación preliminar, la mezcla que comprende el anticuerpo de interés y los contaminantes se pueden someter a cromatografía de interacción hidrófoba a un pH bajo usando un tampón de elución a un pH entre aproximadamente 2,5-4,5, preferentemente realizada a concentraciones salinas bajas (por ejemplo, de aproximadamente sal a 0-0,25 M)

En general, diversas metodologías para preparar anticuerpos para su uso en investigación, ensayo y clínica están bien establecidas en la técnica, y son coherentes con las metodologías descritas anteriormente y/o las que un experto en la materia considere apropiadas para un anticuerpo de interés en particular.

### **Formulaciones y dosificaciones farmacéuticas**

La composición de anticuerpo se formulará, dosificará y administrará de una manera coherente con la buena práctica médica. Los factores a considerar en este contexto incluyen el trastorno que se está tratando en particular, el mamífero que se está tratando en particular, la afección clínica del paciente individual, la causa del trastorno, el sitio de administración del agente, el método de administración, la programación de la administración, y otros factores conocidos por los expertos en medicina. La "cantidad terapéuticamente eficaz" del anticuerpo a administrar se regirá por tales consideraciones, y es la cantidad mínima necesaria para prevenir, mejorar, o tratar una enfermedad o trastorno. No es necesario que el anticuerpo se formule, pero se formula opcionalmente con uno o más agentes usados actualmente para prevenir o tratar el trastorno en cuestión. La cantidad eficaz de tales otros agentes depende de la cantidad de anticuerpo presente en la formulación, el tipo de trastorno o tratamiento, y otros factores analizados anteriormente. Estos se utilizan generalmente en las mismas dosificaciones y con vías de administración como se ha usado anteriormente en el presente documento o aproximadamente de un 1 a un 99 % de las dosificaciones usadas hasta ahora. Por lo general, el alivio o el tratamiento de una enfermedad o trastorno implican la disminución de uno o más síntomas o problemas médicos asociados con la enfermedad o trastorno. En el caso del cáncer, la cantidad terapéuticamente eficaz del fármaco puede conseguir uno o una combinación de los siguientes: reducir el número de células cancerosas; reducir el tamaño del tumor; inhibir (es decir, disminuir en cierta medida y/o detener) la infiltración de células cancerosas en órganos periféricos; inhibir la metástasis tumoral; inhibir, en cierta medida, el crecimiento del tumor; y/o aliviar en cierta medida uno o más de los síntomas asociados con el cáncer. En la medida en la que el fármaco puede prevenir el crecimiento y/o eliminar las células cancerosas existentes, éste puede ser citostático y/o citotóxico. En algunas realizaciones, una composición de la presente invención se puede usar para prevenir la aparición o reaparición de la enfermedad o trastorno en un sujeto o mamífero.

Para la prevención o tratamiento de la enfermedad, la dosificación apropiada de un anticuerpo de la invención (cuando se usa solo o en combinación con uno u otros agentes terapéuticos adicionales más) dependerá del tipo de enfermedad a tratar, el tipo de anticuerpo, la gravedad y el transcurso de la enfermedad, si el anticuerpo se administra con fines preventivos o terapéuticos, terapia previa, la historia clínica del paciente y respuesta al anticuerpo, y el criterio del médico que trata. El anticuerpo se administra convenientemente al paciente de una vez o durante una serie de tratamientos.

En ciertas realizaciones, dependiendo del tipo y gravedad de la enfermedad, aproximadamente de 1 µg/kg a 50 mg/kg (por ejemplo, 0,1-20 mg/kg) de anticuerpo es una dosificación candidata inicial para la administración al paciente, sea, por ejemplo, mediante una o más administraciones separadas, o mediante infusión continua. En otra realización, de aproximadamente 1 µg/kg a 15 mg/kg (por ejemplo 0,1 mg/kg-10 mg/kg) de anticuerpo es una dosificación candidata inicial para la administración al paciente. Una dosificación diaria habitual podría variar de aproximadamente 1 µg/kg a 100 mg/kg o más, dependiendo de los factores mencionados anteriormente. Para administraciones repetidas durante varios días o más, dependiendo de la afección, el tratamiento se mantiene hasta que se produce una supresión deseada de los síntomas de la enfermedad.

Una dosificación a modo de ejemplo del anticuerpo estaría en el intervalo de aproximadamente 0,05 mg/kg a aproximadamente 15 mg/kg. Por lo tanto, se puede administrar al paciente una o más dosis de aproximadamente 0,5 mg/kg, 2,0 mg/kg, 4,0 mg/kg, 7,5 mg/kg, 10 mg/kg o 15 mg/kg (o cualquier combinación de las mismas). Tales dosis se pueden administrar intermitentemente, por ejemplo todos los días, cada tres días, cada semana o cada dos a tres semanas (por ejemplo, de modo que el paciente recibe de aproximadamente dos a aproximadamente veinte, o por ejemplo, aproximadamente seis dosis del anticuerpo). En una realización, se administran dosis de aproximadamente 10 mg/kg cada tres días. Se puede administrar dosis de carga inicial más elevada, seguida de una o más dosis más bajas. En una realización, un régimen de dosificación a modo de ejemplo comprende la administración de una dosis de carga inicial de aproximadamente 4 mg/kg, seguido de una dosis de mantenimiento semanal de aproximadamente 2 mg/kg del anticuerpo. Sin embargo, pueden ser útiles otros regímenes de dosificación.

En ciertas realizaciones, los regímenes de dosificación analizados en el presente documento se usan en combinación con un régimen de quimioterapia como la terapia de primera línea para el tratamiento del cáncer colorrectal metastásico. En algunos aspectos, el régimen de quimioterapia implica la administración intermitente tradicional de dosis elevadas. En algunos otros aspectos, los agentes quimioterapéuticos se administran usando

5

dosis más pequeñas y más frecuentes sin descansos programados ("quimioterapia metronómica").

La evolución de la terapia de la invención se controla fácilmente mediante técnicas y ensayos convencionales.

Un anticuerpo de la invención (y cualquier agente terapéutico o adyuvante adicionales) se puede administrar mediante cualquier medio adecuado, incluyendo administración parenteral, subcutánea, intraperitoneal, intrapulmonar, e intranasal, y, si se desea para tratamiento local, intralesional. Las infusiones parenterales incluyen administración intramuscular, intravenosa, intraarterial, intraperitoneal, o subcutánea. Además, el anticuerpo se administra de forma adecuada mediante infusión de pulsos, en particular con dosis decrecientes del anticuerpo. La dosificación se puede realizar mediante cualquier vía adecuada, por ejemplo, mediante inyecciones, tales como

10

15

inyecciones intravenosas o subcutáneas, dependiendo en parte de si la administración es breve o crónica.

Las formulaciones farmacéuticas en el presente documento también pueden contener más de un compuesto activo si fuera necesario para la indicación en particular que se está tratando, preferentemente aquéllos con actividades complementarias que no se afectan de forma adversa entre sí. Dichas moléculas están presentes adecuadamente en combinación en cantidades que son eficaces para la finalidad pretendida.

20

Las formulaciones farmacéuticas que comprenden un anticuerpo de la invención se preparan para su almacenamiento mezclando el anticuerpo que tiene el grado de pureza deseado con vehículos, excipientes o estabilizantes opcionales fisiológicamente aceptables.

25

(Remington: The Science and Practice of Pharmacy 20ª edición (2000)), en forma de soluciones acuosas, liofilizadas u otras formulaciones secas. Los vehículos, excipientes o estabilizantes aceptables no son tóxicos para los receptores a las dosificaciones y concentraciones usadas, e incluyen tampones tales como fosfato, citrato, histidina y otros ácidos orgánicos; antioxidantes incluyendo ácido ascórbico y metionina; conservantes (tales como cloruro de octadecildimetilbencil amonio; cloruro de hexametonio; cloruro de benzalconio, cloruro de bencetonio; fenol, alcohol de butilo o bencilo; alquil parabenos tales como metil o propil parabeno; catecol; resorcinol; ciclohexanol; 3-pentanol; y m-cresol); polipéptidos de bajo peso molecular (menos de aproximadamente 10 restos); proteínas, tales como albúmina de suero, gelatina, o inmunoglobulinas; polímeros hidrófilos tales como polivinilpirrolidona; aminoácidos tales como glicina, glutamina, asparagina, histidina, arginina, o lisina; monosacáridos, disacáridos, y otros hidratos de carbono que incluyen glucosa, manosa, o dextrinas; agentes quelantes tales como EDTA; azúcares tales como sacarosa, manitol, trehalosa o sorbitol; contraiones formadores de sales tales como sodio; complejos metálicos (por ejemplo, complejos de Zn-proteína); y/o tensioactivos no iónicos tales como TWEEN™, PLURONICS™ o polietilenglicol (PEG).

30

35

Los principios activos también se pueden atrapar en microcápsulas preparadas, por ejemplo, mediante técnicas de coacervación o mediante polimerización interfacial, por ejemplo, hidroximetilcelulosa o microcápsula de gelatina y microcápsula de poli(metacrilato de metilo), respectivamente, en sistemas de liberación de fármacos coloidales (por ejemplo, liposomas, microsferas de albúmina, microemulsiones, nanopartículas y nanocápsulas) o en microemulsiones. Tales técnicas se describen en Remington: The Science and Practice of Pharmacy 20ª edición (2000).

40

45

Las formulaciones a usar para administración *in vivo* deben ser estériles. Esto se consigue fácilmente mediante filtración a través de membranas de filtración estériles.

Se pueden preparar preparaciones de liberación sostenida. Los ejemplos adecuados de preparaciones de liberación sostenida incluyen matrices semipermeables de polímeros hidrófobos sólidos que contienen la inmunoglobulina de la invención, cuyas matrices están en forma de artículos conformados, por ejemplo, películas, o microcápsulas. Los ejemplos de matrices de liberación sostenida incluyen poliésteres, hidrogeles (por ejemplo, poli(metacrilato de 2-hidroxietilo), o poli(alcohol vinílico)), polilactidas (Pat. de Estados Unidos N° 3.773.919), copolímeros de ácido L-glutámico y  $\gamma$  etil-L-glutamato, de acetato de etileno-vinilo no degradable, copolímeros degradables de ácido láctico-ácido glicólico tales como el LUPRON DEPOT™ (microesferas inyectables formadas por copolímero de ácido láctico-ácido glicólico y acetato de leuprolide), y ácido poli-D-(-)-3-hidroxibutírico. Mientras que los polímeros tales como acetato de etileno-vinilo y ácido láctico-ácido glicólico permiten la liberación de moléculas durante más de 100 días, ciertos hidrogeles liberan proteínas durante periodos de tiempo más cortos. Cuando las inmunoglobulinas encapsuladas permanecen en el cuerpo durante un periodo de tiempo largo, se pueden desnaturalizar o agregar como resultado de la exposición a la humedad a 37 °C, dando como resultado una pérdida de actividad biológica y posibles cambios en la inmunogenicidad. Se pueden idear estrategias racionales para la estabilización dependiendo del mecanismo implicado. Por ejemplo, si se descubre que el mecanismo de agregación es la formación de enlaces S-S intermoleculares a través del intercambio tio-disulfuro, la estabilización se puede conseguir modificando los

50

55

60

65



**Métodos****Métodos terapéuticos**

5 Un anticuerpo de la invención se puede usar, por ejemplo, en métodos terapéuticos *in vitro*, *ex vivo* e *in vivo*.

En un aspecto, la invención proporciona métodos para tratar o prevenir un tumor, un cáncer, y/o un trastorno proliferativo celular (por ejemplo, trastorno asociado con el aumento de la expresión y/o actividad del VEGF) que comprenden la administración de una cantidad eficaz de un anticuerpo anti-VEGF a un sujeto que necesita tal tratamiento.

En un aspecto, la invención proporciona métodos para reducir, inhibir, bloquear, o prevenir el crecimiento de un tumor o cáncer, comprendiendo los métodos la administración de una cantidad eficaz de un anticuerpo anti-VEGF a un sujeto que necesita tal tratamiento.

En un aspecto, la invención proporciona métodos para inhibir la angiogénesis que comprenden la administración de una cantidad eficaz de un anticuerpo anti-VEGF a un sujeto que necesita tal tratamiento.

En un aspecto, la invención proporciona métodos para inhibir la permeabilidad vascular que comprenden la administración de una cantidad eficaz de un anticuerpo anti-VEGF a un sujeto que necesita tal tratamiento.

En un aspecto, la invención proporciona métodos para tratar una afección patológica asociada con la angiogénesis que comprenden la administración de una cantidad eficaz de un anticuerpo anti-VEGF a un sujeto que necesita tal tratamiento. En algunas realizaciones, la afección patológica asociada con la angiogénesis es un tumor, un cáncer, y/o un trastorno proliferativo celular.

Un anticuerpo de la invención se puede administrar a un ser humano con fines terapéuticos. En una realización, un anticuerpo de la invención se usa en un método para unión de VEGF en un individuo que padece un trastorno asociado con el aumento de la expresión y/o actividad del VEGF, método que comprende la administración al individuo del anticuerpo de modo que se une el VEGF en el individuo. En una realización, el VEGF es VEGF humano, y el individuo es un individuo humano. Como alternativa, el individuo puede ser un mamífero que expresa VEGF al que se une un anticuerpo de la invención. Además adicionalmente, el individuo puede ser un mamífero en el que se ha introducido el VEGF (por ejemplo, mediante la administración de VEGF o por expresión de un transgén que codifica VEGF).

En un aspecto, al menos alguno de los anticuerpos de la invención se puede unir al VEGF a partir de especies distintas de la humana. En consecuencia, los anticuerpos de la invención se pueden usar para unirse a la actividad específica del antígeno, por ejemplo, en un cultivo celular que contiene el antígeno, en sujetos humanos o en otros sujetos mamíferos que tienen el antígeno con el que un anticuerpo de la invención reacciona de forma cruzada (por ejemplo, chimpancé, babuino, mono tití, cinomolgo y rhesus, cerdo o ratón). En una realización, el anticuerpo de la invención se puede usar para inhibir actividades de antígeno por contacto del anticuerpo con el antígeno de tal modo que la actividad de antígeno se inhibe. Preferentemente, el antígeno es una molécula de proteína humana.

Además, un anticuerpo de la invención se puede administrar a un mamífero no humano que expresa VEGF con el que el anticuerpo reacciona de forma cruzada (por ejemplo, un primate, cerdo, rata, o ratón) para fines veterinarios o como un modelo animal de enfermedad humana. En cuanto a los últimos, tales modelos animales pueden ser útiles para evaluar la eficacia terapéutica de los anticuerpos de la invención (por ejemplo, ensayo de dosificaciones y transcurros de tiempo de administración).

Los anticuerpos de la invención se pueden usar para tratar, inhibir, retrasar la progresión de, prevenir/retrasar la repetición de, mejorar, o prevenir enfermedades, trastornos o afecciones asociadas con la expresión y/o la actividad de una o más moléculas de antígeno.

La presente invención incluye la prevención y tratamiento de metástasis tumoral y terapia antiangiogénica del cáncer, una nueva estrategia de tratamiento del cáncer dirigida a la inhibición del desarrollo de los vasos sanguíneos del tumor necesarios para proporcionar nutrientes para apoyar el crecimiento del tumor. La invención incluye de forma específica la inhibición del crecimiento neoplásico de tumor en el sitio principal, así como prevenir y/o tratar la metástasis de tumores en los sitios secundarios, permitiendo de ese modo el ataque de los tumores por otros agentes terapéuticos. Los ejemplos de cáncer a tratar (incluyendo prevención) en el presente documento incluyen, pero no se limitan a, carcinoma, linfoma, blastoma, sarcoma, y leucemia o neoplasias linfoides. Los ejemplos más particulares de dichos cánceres incluyen cáncer de células escamosas (por ejemplo, cáncer de células escamosas epiteliales), cáncer de pulmón incluyendo cáncer de pulmón de células pequeñas, cáncer de pulmón de células no pequeñas, adenocarcinoma de pulmón y carcinoma escamoso de pulmón, cáncer del peritoneo, cáncer hepatocelular, cáncer gástrico o de estómago, incluyendo cáncer gastrointestinal y cáncer del estroma gastrointestinal, cáncer pancreático, glioblastoma, cáncer de cuello uterino, cáncer de ovario, cáncer de hígado, cáncer de vejiga, cáncer del tracto urinario, hepatoma, cáncer de mama, cáncer de colon, cáncer rectal, cáncer

colorrectal, carcinoma de endometrio o uterino, carcinoma de glándulas salivares, cáncer de riñón o renal, cáncer de próstata, cáncer de vulva, cáncer de tiroides, carcinoma hepático, carcinoma anal, carcinoma de pene, melanoma, melanoma de extensión superficial, melanoma lentigo maligno, melanomas lentiginosos acrales, melanomas nodulares, mieloma múltiple y linfoma de linfocitos B (incluyendo linfoma no Hodgkin de bajo grado/folicular (NHL); NHL linfocítico pequeño (SL); NHL de grado intermedio/folicular; NHL difuso de grado intermedio; NHL inmunoblástico de alto grado; NHL linfoblástica alto grado; NHL de células pequeñas no escindidas de alto grado; NHL de enfermedad voluminosa; linfoma de células del manto; linfoma relacionado con SIDA; y Macroglobulinemia de Waldenstrom); leucemia linfocítica crónica (CLL); leucemia linfoblástica aguda (ALL); leucemia de células pilosas; leucemia mieloblástica crónica; y trastorno linfoproliferativo posterior al trasplante (PTLD), así como proliferación vascular anómala asociada con facomatosis, edema (tal como el asociado con tumores cerebrales), síndrome de Meigs, cáncer de cerebro, así como de cabeza y cuello, y metástasis asociadas. En ciertas realizaciones, los cánceres que son susceptibles de tratamiento con los anticuerpos de la invención incluyen cáncer de mama, cáncer colorrectal, cáncer rectal, cáncer de pulmón de células no pequeñas, linfoma no Hodgkin (NHL), cáncer de células renales, cáncer de próstata, cáncer de hígado, cáncer pancreático, sarcoma de tejidos blandos, sarcoma de Kaposi, carcinoma carcinoide, cáncer de cabeza y cuello, cáncer de ovario, mesotelioma y mieloma múltiple. En algunas realizaciones, el cáncer se selecciona entre el grupo que consiste en cáncer de pulmón de células pequeñas, neuroblastomas, melanoma, carcinoma de mama, cáncer gástrico, cáncer colorrectal (CRC), y carcinoma hepatocelular. Sin embargo, en algunas realizaciones, el cáncer se selecciona entre el grupo que consiste en cáncer de pulmón de células no pequeñas, cáncer colorrectal y carcinoma de mama, incluyendo formas metastásicas de esos tipos de cáncer.

En ciertas realizaciones, se administra al paciente un inmunoconjugado que comprende un anticuerpo conjugado con uno o más agentes citotóxicos. En algunas realizaciones, el inmunoconjugado y/o antígeno al que se une se internaliza o internalizan por la célula, dando como resultado un aumento de la eficacia terapéutica del inmunoconjugado en la eliminación de la célula diana a la que se une. En una realización, el agente citotóxico dirige o interfiere con el ácido nucleico en la célula diana. En una realización, el agente citotóxico dirige o interfiere con la polimerización de microtúbulos. Los ejemplos de tales agentes citotóxicos incluyen cualquiera de los agentes quimioterapéuticos indicados en el presente documento (tales como un maitansinoide, auristatina, dolastatina, o una caliqueamicina), un isótopo radioactivo, o una ribonucleasa o una ADN endonucleasa.

Cuando la diana de unión de un anticuerpo se encuentra en el cerebro, ciertas realizaciones de la invención proporcionan mantienen el anticuerpo para que atraviese la barrera hematoencefálica. Existen varios enfoques conocidos en la técnica para el transporte de moléculas a través de la barrera hematoencefálica, que incluyen, pero no se limitan a, métodos físicos, métodos basados en lípidos, métodos basados en células madre, y métodos basados en receptor y canal.

Los métodos físicos para transportar un anticuerpo a través de la barrera hematoencefálica incluyen, pero no se limitan a, circunvalación completa de la barrera hematoencefálica, o mediante la creación de aberturas en la barrera hematoencefálica. Los métodos de circunvalación incluyen, pero no se limitan a, inyección directa en el cerebro (véase, por ejemplo, Papanastassiou *et al.*, *Gene Therapy* 9: 398-406 (2002)), administración por infusión intersticial/potenciada por convección (véase, por ejemplo, Bobo *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91: 2076-2080 (1994)), e implantación de un dispositivo de administración en el cerebro (véase, por ejemplo, Gill *et al.*, *Nature Med.* 9: 589-595 (2003); y Gliadel Wafers™, Guildford Pharmaceutical). Los métodos de creación de aberturas en la barrera incluyen, pero no se limitan a, ecografía (véase, por ejemplo, el documento de Publicación de Patente de Estados Unidos N° 2002/0038086), presión osmótica (por ejemplo, por administración de manitol hipertónico (Neuwelt, E. A., *Implication of the Blood-Brain Barrier and its Manipulation*, Vols 1 y 2, Plenum Press, N.Y. (1989)), permeabilización, por ejemplo, mediante bradiquinina o permeabilizador A-7 (véanse, por ejemplo, los documentos de Patente de Estados Unidos con números 5.112.596, 5.268.164, 5.506.206, y 5.686.416), y transfección de neuronas que se extienden a ambos lados de la barrera hematoencefálica con vectores que contienen genes que codifican el anticuerpo (véase, por ejemplo, el documento de Publicación de Patente de Estados Unidos N° 2003/0083299).

Los métodos basados en lípidos para transportar un anticuerpo a través de la barrera hematoencefálica incluyen, pero no se limitan a, encapsulación del anticuerpo en liposomas que se acoplan a fragmentos de anticuerpo que se unen a receptores en el endotelio vascular de la barrera hematoencefálica (véase, por ejemplo, el documento de Publicación de Solicitud de Patente de Estados Unidos N° 20020025313), y revestimiento del anticuerpo en partículas de lipoproteína de baja densidad (véase, por ejemplo, el documento de Publicación de Solicitud de Patente de Estados Unidos N° 20040204354) o apolipoproteína E (véase, por ejemplo, el documento de Publicación de Solicitud de Patente de Estados Unidos N° 20040131692).

Los métodos basados en células madre para transportar un anticuerpo a través de la barrera hematoencefálica implican ingeniería genética de células precursoras neurales (NPC) para expresar el anticuerpo de interés y a continuación implantar las células madre en el cerebro de la persona a tratar. Véase Behrstock *et al.* (2005) *Gene Ther.* Publicación online avanzada de 15 de diciembre de 2005 (que informa que las NPC sometidas a ingeniería genética para expresar el factor neurotrófico GDNF redujo los síntomas de la enfermedad de Parkinson cuando se implantó en el cerebro de modelos de roedores y de primates).

Los métodos basados en receptor y canal para transportar un anticuerpo a través de la barrera hematoencefálica incluyen, pero no se limitan a, uso de bloqueadores de glucocorticoides para aumentar la permeabilidad de la barrera hematoencefálica (véanse, por ejemplo, los documentos de Publicación de Solicitud de Patente de Estados Unidos con números 2002/0065259, 2003/0162695, y 2005/0124533); activación de los canales de potasio (véase, por ejemplo, el documento de Publicación de Solicitud de Patente de Estados Unidos N° 2005/0089473), inhibición de transportadores de fármacos ABC (véase, por ejemplo, el documento de Publicación de Solicitud de Patente de Estados Unidos N° 2003/0073713); revestimiento de anticuerpos con una transferrina y modulación de la actividad del uno o más receptores de transferrina (véase, por ejemplo, el documento de Publicación de Solicitud de Patente de Estados Unidos N° 2003/0129186), y cationización de los anticuerpos (véase, por ejemplo, el documento de Patente de Estados Unidos N° 5.004.697).

Se entiende que cualquiera de los métodos terapéuticos anteriores se puede llevar a cabo usando un inmunoconjugado de la invención en lugar de o además de un anticuerpo anti-VEGF.

#### 15 *Terapias de combinación*

Los anticuerpos de la invención se pueden usar solos o en combinación con otras composiciones en una terapia. Por ejemplo, un anticuerpo de la invención se puede coadministrar con otro anticuerpo, agente o agentes quimioterapéuticos (incluyendo cócteles de agentes quimioterapéuticos), otro agente o agentes citotóxicos, agente o agentes antiangiogénicos, citoquinas, y/o agente o agentes inhibidores del crecimiento. Cuando un anticuerpo de la invención inhibe el crecimiento tumoral, puede ser particularmente deseable combinarlo con uno o más agentes terapéuticos que también inhiben el crecimiento del tumor, por ejemplo, agentes antiangiogénicos y/o agentes quimioterapéuticos. Como alternativa, o adicionalmente, el paciente puede recibir terapia de radiación combinada (por ejemplo, irradiación de haz externo o terapia con un agente marcado con radiactividad, tal como un anticuerpo). Tales terapias combinadas indicadas anteriormente incluyen la administración combinada (cuando los dos o más agentes se incluyen en las mismas formulaciones o en formulaciones separadas), y administración separada, en cuyo caso, la administración del anticuerpo de la invención se puede producir antes, y/o después de la administración de la terapia o terapias adjuntas.

En una realización, un anticuerpo de la invención se puede coadministrar con al menos un agente terapéutico y/o adyuvante adicional. Por ejemplo, se usan anticuerpos anti-VEGF en combinaciones con agentes terapéuticos anticáncer o agentes terapéuticos antineovascularización para tratar diversas afecciones neoplásicas o no neoplásicas. En una realización, la afección neoplásica o no neoplásica se caracteriza por el trastorno patológico asociado con angiogénesis anómala o no deseada. El anticuerpo anti-VEGF se puede administrar en serie o en combinación con otro agente que es eficaz para esos fines, ya sea en la misma composición o como composiciones separadas. Como alternativa, o adicionalmente, se pueden administrar múltiples inhibidores de VEGF.

Por lo general, los anticuerpos anti-VEGF y agentes anticáncer son adecuados para las mismas enfermedades o enfermedades similares para bloquear o reducir un trastorno patológico tal como un tumor, un cáncer o un trastorno proliferativo celular. En una realización, el agente anticáncer es un agente antiangiogénico.

Se han identificado muchos agentes antiangiogénicos y se conocen en las técnicas, incluyendo los que se enumeran en el presente documento, por ejemplo, los enumerados en las "Definiciones", y, por ejemplo, en Carmeliet y Jain, *Nature* 407: 249-257 (2000); Ferrara *et al.*, *Nature Reviews: Drug Discovery*, 3: 391-400 (2004); y Sato *Int. J. Clin. Oncol.*, 8: 200-206 (2003). Véase también, el documento de Solicitud de Patente de Estados Unidos N° US20030055006.

En una realización, un anticuerpo anti-VEGF de la presente invención se usa en combinación con uno o más anticuerpos neutralizantes anti-VEGF (o fragmentos), antagonista a otra familia del VEGF (por ejemplo, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D, factor de crecimiento placentario (PLGF)) o un antagonista del receptor del VEGF que incluye, pero no se limita al, por ejemplo, receptor de VEGF soluble (por ejemplo, VEGFR-1, VEGFR-2, VEGFR-3, fragmentos de neuropilinas (por ejemplo, NRP1, NRP2)), aptámeros capaces de bloquear el VEGF o VEGFR, anticuerpos anti-VEGFR de neutralización, inhibidores de VEGFR tirosina quinasas de bajo peso molecular (RTK), estrategias antisentido para VEGF, ribozimas frente a receptores de VEGF o VEGF, variantes antagonistas del VEGF; y cualquier combinación de los mismos.

En otra realización, el anticuerpo anti-VEGF de la invención se puede usar en combinación con inhibidores de tirosina quinasa receptora de molécula pequeña (RTKI) que se dirigen a uno o más receptores de tirosina quinasa tales como receptores del VEGF, receptores del FGF, receptores del EGF y receptores del PDGF. En la técnica se conocen muchos RTKI de molécula pequeña terapéuticos, que incluyen, pero no se limitan a, vatalanib (PTK787), erlotinib (TARCEVA<sup>®</sup>), OSI-7904, ZD6474 (ZACTIMA<sup>®</sup>), ZD6126 (ANG453), ZD1839, sunitinib (SUTENT<sup>®</sup>), semaxanib (SU5416), AMG706, AG013736, Imatinib (GLEEVEC<sup>®</sup>), MLN-518, CEP-701, PKC-412, Lapatinib (GSK572016), VELCADE<sup>®</sup>, AZD2171, sorafenib (NEXAVAR<sup>®</sup>), XL880, y CHIR-265.

Otros agentes terapéuticos útiles para terapia tumoral de combinación con el anticuerpo de la invención incluyen antagonistas de otros factores que están implicados en el crecimiento tumoral, tales como EGFR, ErbB2 (también

conocido como Her2) ErbB3, ErbB4, o TNF.

En determinadas realizaciones, dos o más inhibidores de la angiogénesis se pueden coadministrar opcionalmente al paciente además del antagonista de VEGF y otro agente. Además en otra realización, uno o más agentes terapéuticos adicionales, por ejemplo, agentes anticáncer, se pueden administrar en combinación con un anticuerpo anti-VEGF de la presente invención, un antagonista para otra familia del VEGF, y/o un agente antiangiogénico.

En ciertos aspectos de la invención, otros agentes terapéuticos útiles para terapia tumoral de combinación con un anticuerpo anti-VEGF incluyen otras terapias para el cáncer, (por ejemplo, cirugía, tratamientos radiológicos (por ejemplo, que implican irradiación o administración de sustancias radiactivas), quimioterapia, tratamiento con agentes anticáncer enumerados en el presente documento y conocidos en la técnica, o combinaciones de los mismos). Una lista a modo de ejemplo y no limitante de agentes quimioterapéuticos contemplados se proporciona en el presente documento en las "Definiciones".

Como alternativa, o adicionalmente, se pueden coadministrar al paciente dos o más anticuerpos que se unen al mismo o dos o más antígenos diferentes desvelados en el presente documento. En ocasiones, también puede ser beneficioso administrar una o más citoquinas al paciente.

Las cantidades eficaces de agentes terapéuticos administrados en combinación con un anticuerpo anti-VEGF será según el criterio del médico o del veterinario. La administración y el ajuste de la dosificación se realizan para conseguir una gestión máxima de las afecciones a tratar. La dosis dependerá adicionalmente de factores tales como el tipo de agente terapéutico a usar y el paciente específicamente que se está tratando. Las clasificaciones adecuadas para el agente anticáncer son las que se usan en la actualidad y se pueden reducir debido a la acción combinada (sinergia) del agente anticáncer y del anticuerpo anti-VEGF. En ciertas realizaciones, la combinación de los inhibidores potencia la eficacia de un solo inhibidor. El término "potencia" se refiere a un aumento de la eficacia de un agente terapéutico en su dosis común o aprobada. Describen en la sección titulada *Formulaciones y dosificaciones farmacéuticas* en el presente documento.

### **Agentes quimioterapéuticos**

En un aspecto, la invención proporciona un método de tratamiento de un trastorno (por ejemplo, un tumor, un cáncer o un trastorno proliferativo celular) mediante la administración de cantidades eficaces de un anticuerpo anti-VEGF y/o un inhibidor o inhibidores de la angiogénesis y uno o más agentes quimioterapéuticos. Se puede usar diversos agentes quimioterapéuticos en los métodos de tratamiento combinado de la invención. Una lista a modo de ejemplo y no limitante de agentes quimioterapéuticos contemplados en el presente documento se proporciona en las "Definiciones". La administración del anticuerpo anti-VEGF y el agente quimioterapéutico se puede realizar simultáneamente, por ejemplo, en forma de una composición única o como dos o más composiciones diferentes, usando las mismas o diferentes vías de administración. Como alternativa, o adicionalmente, la administración se puede realizar secuencialmente, en cualquier orden. Como alternativa, o adicionalmente, las etapas se pueden realizar como una combinación de ambas de forma secuencial y simultánea, en cualquier orden. En ciertas realizaciones, pueden estar presentes intervalos que varían de minutos a días, de semanas a meses, entre las administraciones de las dos o más composiciones. Por ejemplo, el agente quimioterapéutico se puede administrar primero, seguido por el anticuerpo anti-VEGF. Sin embargo, también se contempla la administración simultánea o la administración del anticuerpo anti-VEGF primero. En consecuencia, en un aspecto, la invención proporciona métodos que comprenden la administración de un anticuerpo anti-VEGF (tal como anticuerpo B20-4.1.1 o anticuerpo B20-4.1.1RR), seguido por la administración de un agente quimioterapéutico. En ciertas realizaciones, pueden estar presentes intervalos que varían de minutos a días, de semanas a meses, entre las administraciones de las dos o más composiciones.

Como entenderán los expertos habituales en la materia, las dosis apropiadas de agentes quimioterapéuticos por lo general serán aproximadamente las ya usadas en terapias clínicas en las que los agentes quimioterapéuticos se administran solos o en combinación con otros agentes quimioterapéuticos. Probablemente se producirá variación en la dosificación dependiendo de la afección que se está tratando. El médico que administra el tratamiento será capaz de determinar la dosis apropiada para el sujeto individual.

### **Recidiva del crecimiento tumoral**

La invención también proporciona métodos y composiciones para inhibir o prevenir la recidiva del crecimiento tumoral o la recidiva del crecimiento de células cancerosas. La recidiva del crecimiento tumoral o la recidiva del crecimiento de células cancerosas se usa para describir una afección en la que los pacientes sometidos o tratados con uno o más terapias disponibles en la actualidad (por ejemplo, terapias contra el cáncer, tales como quimioterapia, radioterapia, cirugía, terapia hormonal y/o terapia biológica/inmunoterapia, terapia con anticuerpos anti-VEGF, en particular un régimen terapéutico convencional para el cáncer en particular) no es clínicamente adecuada para el tratamiento de los pacientes o de los pacientes que ya no están recibiendo ningún efecto beneficioso de la terapia de modo que éstos pacientes necesitan terapia eficaz adicional. Como se usa en el presente documento, la expresión también se puede referir a una afección del paciente que "no

responde/refractario", por ejemplo, que describe pacientes que responden a la terapia que aún padecen los efectos secundarios, desarrollo de resistencia, no responden a la terapia, no responden satisfactoriamente a la terapia, etc. En diversas realizaciones, un cáncer es la recidiva del crecimiento tumoral o la recidiva del crecimiento de células cancerosas en el que el número de células cancerosas no se ha reducido significativamente, o ha aumentado, o el tamaño del tumor no se ha reducido significativamente, o ha aumentado, o fracasa en cualquier reducción adicional del tamaño o del número de células cancerosas. La determinación de si las células cancerosas son la recidiva del crecimiento tumoral o la recidiva del crecimiento de células cancerosas se puede realizar *in vivo* o *in vitro* mediante cualquier método conocido en la técnica para someter al ensayo la eficacia del tratamiento sobre las células cancerosas, usando los significados aceptados en la técnica para "recidiva" o "refractario" o "no responde" en ese contexto. Un tumor resistente al tratamiento con anti-VEGF es un ejemplo de una recidiva del crecimiento tumoral.

La invención proporciona métodos para bloquear o reducir la recidiva del crecimiento tumoral o la recidiva del crecimiento de células cancerosas en un sujeto mediante la administración de uno o más anticuerpos anti-VEGF de la presente invención para bloquear o reducir la recidiva del crecimiento tumoral o la recidiva del crecimiento de células cancerosas en sujetos. En ciertas realizaciones, el anticuerpo se puede administrar después del agente terapéutico para el cáncer. En ciertas realizaciones, los anticuerpos anti-VEGF se administran simultáneamente con la terapia para el cáncer. Como alternativa, o adicionalmente, la terapia con anticuerpo anti-VEGF se alterna con otra terapia contra el cáncer, que se puede realizar en cualquier orden. La invención también incluye métodos para administrar uno o más anticuerpos inhibidores para prevenir la aparición o reaparición del cáncer en pacientes con predisposición a tener cáncer. Generalmente, el sujeto estaba o está sometido de forma simultánea a terapia para el cáncer. En una realización, la terapia para el cáncer es el tratamiento con un agente antiangiogénico, por ejemplo, un antagonista de VEGF-C. El agente antiangiogénico incluye, pero no se limita a, los conocidos en la técnica y los que se encuentran en las "Definiciones" en el presente documento. En una realización, el agente antiangiogénico es un anticuerpo o un fragmento neutralizante anti-VEGF (por ejemplo, A4.6.1 humanizado, AVASTIN® (Genentech, South San Francisco, CA), Y0317, M4, G6, B20, 2C3, etc.). Véanse, por ejemplo, los documentos de Patente de Estados Unidos con números 6.582.959, 6.884.879, 6.703.020; los documentos de Patente WO98/45332; WO 96/30046; WO94/10202; EP 0666868B1; los documentos de Solicitud de Patente de Estados Unidos con números 20030206899, 20030190317, 20030203409, y 20050112126; Popkov *et al.*, Journal of Immunological Methods 288: 149-164 (2004); y, el documento de Patente WO2005012359. Se pueden administrar agentes adicionales en combinación con el anticuerpo anti-VEGF para bloquear o reducir la recidiva del crecimiento tumoral o la recidiva del crecimiento de células cancerosas, por ejemplo, véase la sección titulada Terapias de Combinación en el presente documento.

### **Métodos de diagnóstico y métodos de detección**

En un aspecto, la invención proporciona un método para diagnosticar un trastorno asociado con el aumento de expresión del VEGF. En ciertas realizaciones, el método comprende poner en contacto una célula de ensayo con un anticuerpo anti-VEGF; determinar el nivel de expresión (ya sea cuantitativa o cualitativamente) del VEGF mediante la célula de ensayo por detección de la unión del anticuerpo anti-VEGF al VEGF; y comparar el nivel de expresión del VEGF por la célula de ensayo con el nivel de expresión del VEGF mediante una célula de control (por ejemplo, una célula normal del mismo origen de tejido al igual que la célula de ensayo o una célula que expresa VEGF a niveles comparables con los de tal célula normal), en el que un mayor nivel de expresión del VEGF por la célula de ensayo en comparación con la célula de control indica la presencia de un trastorno asociado con el aumento de expresión del VEGF. En ciertas realizaciones, la célula de ensayo se obtiene de un individuo de que se sospecha que tiene un trastorno asociado con el aumento de expresión del VEGF. En ciertas realizaciones, el trastorno es un tumor, cáncer y/o un trastorno proliferativo celular.

Los trastornos a modo de ejemplo que se pueden diagnosticar con ayuda de un anticuerpo de la invención incluyen, pero no se limitan a, cáncer de células escamosas, cáncer de pulmón de células pequeñas, cáncer de pulmón de células no pequeñas, adenocarcinoma de pulmón, carcinoma escamoso de pulmón, cáncer del peritoneo, cáncer hepatocelular, cáncer gástrico, cáncer gastrointestinal, cáncer del estroma gastrointestinal, cáncer pancreático, glioblastoma, cáncer de cuello uterino, cáncer de ovario, cáncer de hígado, cáncer de vejiga, hepatoma, cáncer de mama, cáncer de colon, cáncer colorrectal, carcinoma de endometrio o uterino, carcinoma de glándulas salivares, cáncer de riñón o renal, cáncer de hígado, cáncer de próstata, cáncer de vulva, cáncer de tiroides, carcinoma hepático y varios tipos de cáncer de cabeza y cuello, melanoma, melanoma de extensión superficial, melanoma lentigo maligno, melanomas lentiginosos acrales, melanomas nodulares, linfoma de linfocitos B, leucemia linfocítica crónica (CLL); leucemia linfoblástica aguda (ALL); leucemia de células pilosas; leucemia mieloblástica crónica; trastorno linfoproliferativo posterior al trasplante (PTLD), proliferación vascular anómala asociada con facomatosis, edema asociado con tumores cerebrales y síndrome de Meigs.

En otro aspecto, la invención proporciona un complejo de cualquiera de los anticuerpos anti-VEGF que se describen en el presente documento y VEGF. En algunas realizaciones, el complejo es *in vivo* o *in vitro*. En algunas realizaciones, el complejo comprende una célula cancerosa.

En otro aspecto, la invención proporciona un método para detectar la presencia de VEGF en una muestra biológica. El término "detectar" como se usa en el presente documento incluye detección cuantitativa o cualitativa.

En ciertas realizaciones, el método comprende poner en contacto la muestra biológica con un anticuerpo anti-VEGF en condiciones que permiten la unión del anticuerpo anti-VEGF al VEGF, y detectar si se forma un complejo entre el anticuerpo anti-VEGF y VEGF.

5 Los anticuerpos anti-VEGF se pueden usar para la detección del VEGF en uno cualquiera de un número de métodos de ensayo de detección bien conocidos. Por ejemplo, una muestra biológica se puede someter a ensayo para VEGF mediante la obtención de la muestra a partir de una fuente deseada, mezclando la muestra con anticuerpo anti-VEGF para permitir que el anticuerpo forme complejo de anticuerpo/VEGF con cualquier VEGF presente en la mezcla, y detectar cualquier complejo de anticuerpo/VEGF presente en la mezcla. La muestra biológica se puede  
10 preparar para el ensayo por métodos conocidos en la técnica que son adecuados para la muestra en particular. Los métodos para mezclar la muestra con anticuerpos y los métodos de detección de complejo de anticuerpo/VEGF se eligen de acuerdo con el tipo de ensayo usado.

15 Todos los métodos analíticos para VEGF usan uno o más de los siguientes reactivos: análogo de VEGF marcado, análogo de VEGF inmovilizado, anticuerpo anti-VEGF marcado, anticuerpo anti-VEGF inmovilizado y/o conjugados estéricos. Los reactivos marcados también se conocen como "indicadores".

En ciertas realizaciones, el anticuerpo anti-VEGF está marcado de forma detectable. La marca usada es cualquier funcionalidad detectable que no interfiera con la unión del VEGF y el anticuerpo anti-VEGF. Las marcas incluyen, pero no se limitan a, marcas o restos que se detectan directamente (tales como marcas fluorescentes, cromóforas, de densidad electrónica, quimioluminiscentes, y radiactivas), así como restos, tales como enzimas o ligandos, que se detectan indirectamente, por ejemplo, a través de una reacción enzimática o interacción molecular. Las marcas a modo de ejemplo incluyen, pero no se limitan a, los radioisótopos  $^{32}\text{P}$ ,  $^{14}\text{C}$ ,  $^{125}\text{I}$ ,  $^3\text{H}$ , y  $^{131}\text{I}$ , fluoróforos tales como quelatos de tierras raras o fluoresceína y sus derivados, rodamina y sus derivados, dansilo, umbeliferona, luciferinas, por ejemplo, luciferina de luciérnaga y luciferina bacteriana (Pat. de Estados Unidos N° 4.737.456), luciferina, 2,3-dihidroftalazinadionas, peroxidasa de rábano picante (HRP), fosfatasa alcalina,  $\beta$ -galactosidasa, glucoamilasa, lisozima, oxidasas de sacáridos, por ejemplo, glucosa oxidasa, galactosa oxidasa, y glucosa-6-fosfato deshidrogenasa, oxidasas heterocíclicas tales como uricasa y xantina oxidasa, acopladas con una enzima que usa peróxido de hidrógeno para oxidar un precursor colorante tal como HRP, lactoperoxidasa, o microperoxidasa,  
20 biotina/avidina, marcas de espín, marcas de bacteriófagos, radicales libres estables, y similares.

Están disponibles métodos convencionales para unir estas marcas de forma covalente a proteínas o polipéptidos. Por ejemplo, los agentes de acoplamiento tales como dialdehídos, carbodiimidas, dimaleimidas, bis-imidatos, bencidina bis-diazotizada, y similares se pueden usar para marcar los anticuerpos con las marcas fluorescentes, quimioluminiscentes, y enzimáticas descritas anteriormente. Véanse, por ejemplo, los documentos de Patente de Estados Unidos con números 3.940.475 (fluorimetría) y 3.645.090 (enzimas); Hunter *et al.*, Nature, 144: 945 (1962); David *et al.*, Biochemistry, 13: 1014-1021 (1974); Pain *et al.*, J. Immunol. Methods, 40: 219-230 (1981); y Nygren, J. Histochem. and Cytochem., 30: 407-412 (1982). En el presente documento, las marcas preferentes son enzimas tales como peroxidasa de rábano picante y fosfatasa alcalina. La conjugación de dicha marca, incluyendo las  
25 enzimas, con el anticuerpo es un procedimiento de manipulación convencional para un experto habitual en técnicas de inmunoensayo. Véase, por ejemplo, O'Sullivan *et al.*, "Methods for the Preparation of Enzyme-antibody Conjugates for Use in Enzyme Immunoassay", en Methods in Enzymology, ed. J.J. Langone y H. Van Vunakis, Vol. 73 (Academic Press, Nueva York, Nueva York, 1981), pp. 147-166.

45 En ciertas realizaciones, los anticuerpos se inmovilizan sobre una matriz insoluble. La inmovilización puede implicar la separación de un anticuerpo anti-VEGF de cualquier VEGF que permanece libre en solución. Esto se consigue convencionalmente ya sea por insolubilización del anticuerpo anti-VEGF antes del procedimiento de ensayo, como por adsorción a una matriz o superficie insoluble en agua (Bennich *et al.*, documento de Patente de Estados Unidos N° 3.720.760), o mediante acoplamiento covalente (por ejemplo, usando reticulación con glutaraldehído), o mediante insolubilización del anticuerpo anti-VEGF después de la formación de un complejo entre el anticuerpo anti-VEGF y VEGF, por ejemplo, por inmunoprecipitación.

Los ensayos usados para detectar la unión de anticuerpos anti-VEGF a VEGF incluyen, pero no se limitan a, ensayos de unión a antígeno que se conocen bien en la técnica, tales como transferencias de Western, radioinmunoensayos, ELISA (ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas), ensayos competitivos y de tipo "sándwich", ensayos de inmunoprecipitación, inmunoensayos fluorescentes, inmunoensayos de proteína A, inmunohistoquímica (IHC) y ensayos de inhibición estérica.

En una realización, la expresión de proteínas en una muestra se puede examinar usando protocolos de inmunohistoquímica y de tinción. Se ha demostrado que la tinción inmunohistoquímica de secciones de tejido es un método fiable para evaluar o detectar la presencia de proteínas en una muestra. Las técnicas de inmunohistoquímica ("IHC") usan un anticuerpo para investigar y visualizar antígenos celulares *in situ*, generalmente por métodos cromogénicos o fluorescentes. Para la preparación de muestras, se puede usar una muestra de tejido o célula de un mamífero (normalmente un paciente humano). Los ejemplos de muestras incluyen, pero no se limitan a, células de cáncer tales como células de cáncer de colon, mama, próstata, ovario, pulmón, estómago, páncreas, linfoma y leucemia. La muestra se puede obtener mediante diversos procedimientos conocidos en la técnica, que incluyen,

pero no se limitan a escisión quirúrgica, aspiración o biopsia. El tejido puede ser recién preparado o congelado. En una realización, la muestra se fija y se embebe en parafina o similar. La muestra de tejido se puede fijar (es decir, conservar) con metodología convencional. Un experto habitual en la materia observará que la elección de un fijador se determina por la finalidad para la que la muestra se va a teñir histológicamente o se va analizar de otro modo. Un experto habitual en la materia también observará que la duración de la fijación depende del tamaño de la muestra de tejido y el fijador usado.

Se puede realizar IHC en combinación con técnicas adicionales tales como tinción morfológica y/o hibridación *in situ* con fluorescencia. Están disponibles dos métodos generales de IHC; ensayos directos e indirectos. De acuerdo con el primer ensayo, la unión del anticuerpo al antígeno diana (por ejemplo, VEGF) se determina directamente. Este ensayo directo usa un reactivo marcado, tal como una marca fluorescente o un anticuerpo primario marcado con enzima, que se puede visualizar sin interacción adicional de anticuerpos. En un ensayo indirecto habitual, el anticuerpo primario sin conjugar se une al antígeno y a continuación un anticuerpo secundario marcado se une al anticuerpo primario. Cuando el anticuerpo secundario se conjuga con una marca enzimática, se añade un sustrato cromogénico o fluorogénico para proporcionar la visualización del antígeno. La amplificación de la señal se produce debido a que varios anticuerpos secundarios pueden reaccionar con diferentes epítopos sobre el anticuerpo primario. El anticuerpo primario y/o secundario usado para inmunohistoquímica por lo general se marcará con un resto detectable.

Aparte de los procedimientos de preparación de muestras analizados anteriormente, se puede desear tratamiento adicional de la sección de tejido antes, durante o después de IHC. Por ejemplo, se pueden llevar a cabo métodos de recuperación de epítipo, tales como calentamiento de la muestra de tejido en tampón citrato (véase, por ejemplo, Leong *et al.* Appl. Immunohistochem. 4 (3): 201 (1996)).

Después de una etapa de bloqueo opcional, la sección de tejido se expone a anticuerpo primario durante un periodo de tiempo suficiente y en condiciones adecuadas de modo que el anticuerpo primario se une al antígeno de la proteína diana en la muestra de tejido. Las condiciones apropiadas para conseguir esto se pueden determinar mediante experimentación de rutina. La extensión de la unión del anticuerpo a la muestra se determina usando uso una cualquiera de las marcas detectables analizadas anteriormente. preferentemente, la marca es una marca enzimática (por ejemplo, HRPO) que cataliza una alteración química del sustrato cromogénico tal como el cromógeno 3,3'-diaminobencidina. Preferentemente, la marca enzimática se conjuga con el anticuerpo que se une específicamente al anticuerpo primario (por ejemplo, el anticuerpo primario es anticuerpo policlonal de conejo y en anticuerpo secundario es anticuerpo de cabra anti-conejo).

Las muestras de ensayo preparadas de este modo se pueden montar y poner en cubreobjetos. La evaluación del portaobjetos se determina a continuación, por ejemplo, usando un microscopio, y se pueden usar criterios de intensidad de tinción, que se usan rutinariamente en la técnica. Los criterios de intensidad de tinción se pueden evaluar como sigue a continuación:

**TABLA 2**

| Patrón de tinción   | Puntuación |
|---|------------|
| No se observa tinción en las células.   | 0          |
| Se detecta tinción débil/apenas perceptible en más de un 10 % de las células. | 1+         |
| Se observa tinción de débil a moderada en más de un 10 % de las células.      | 2+         |
| Se observa tinción de moderada a fuerte en más de un 10 % de las células.     | 3+         |

Por lo general, una puntuación del patrón de tinción de aproximadamente 2+ o superior en un ensayo de IHC es diagnóstico y/o pronóstico. En algunas realizaciones, una puntuación del patrón de tinción de aproximadamente 1+ o superior es diagnóstico y/o pronóstico. En otras realizaciones, una puntuación del patrón de tinción de aproximadamente 3 o superior es diagnóstico y/o pronóstico. Se entiende que cuando las células y/o tejido de un tumor o adenoma de colon se examinan usando IHC, la tinción se determina o se evalúa generalmente en células y/o tejido tumorales (en comparación con tejido del estroma o circundante que puede estar presente en la muestra).

Otros métodos de ensayo, conocidos como ensayos competitivos o de sándwich, están bien establecidos y se usan ampliamente en la industria del diagnóstico comercial.

Los ensayos competitivos se basan en la capacidad de un análogo de VEGF indicador para competir con el VEGF de la muestra de ensayo para un número limitado de sitios de unión a antígeno del anticuerpo anti-VEGF. El anticuerpo anti-VEGF generalmente se insolubiliza antes o después de la competición y a continuación el indicador y el VEGF unido al anticuerpo anti-VEGF se separan del indicador no unido y VEGF. Esta separación se consigue por decantación (en la que se insolubilizó previamente la pareja de unión) o por centrifugación (en la que la pareja de unión se precipitó después de la reacción competitiva). La cantidad de VEGF de la muestra de ensayo es inversamente proporcional a la cantidad de indicador unido tal como se mide por la cantidad de sustancia

marcadora. Se preparan curvas de dosis-respuesta con cantidades conocidas de VEGF y se comparan con los resultados del ensayo para determinar cuantitativamente la cantidad de VEGF presente en la muestra de ensayo. Estos ensayos se denominan sistemas ELISA cuando las enzimas se usan como marcadores detectables.

- 5 Otra especie de ensayo competitivo, denominado un ensayo "homogéneo", no requiere una separación de fases. Aquí, se prepara un conjugado de una enzima con el VEGF y se usa de tal manera que cuando el anticuerpo anti-VEGF se une al VEGF, la presencia del anticuerpo anti-VEGF modifica la actividad de la enzima. En este caso, el VEGF o sus fragmentos inmunológicamente activos se conjugan con un puente orgánico difuncional a una enzima tal como peroxidasa. Se seleccionan conjugados para su uso con el anticuerpo anti-VEGF de modo que la unión del anticuerpo anti-VEGF inhibe o potencia la actividad enzimática de la marca. Este método, *per se*, se pone en práctica ampliamente bajo el nombre de EMIT.

15 En métodos de impedimento estérico se usan conjugados estéricos para ensayo homogéneo. Estos conjugados se sintetizan uniendo covalentemente un hapteno de bajo peso molecular a un fragmento de VEGF pequeño, de modo que el anticuerpo a hapteno es sustancialmente incapaz de unirse al conjugado al mismo tiempo que el anticuerpo anti-VEGF. En virtud de este procedimiento de ensayo, el VEGF presente en la muestra de ensayo se unirá al anticuerpo anti-VEGF, permitiendo de ese modo que el anti-hapteno se una al conjugado, dando como resultado un cambio en el carácter del hapteno conjugado, por ejemplo, un cambio en la fluorescencia cuando el hapteno es un fluoróforo.

20 Los ensayos de sándwich son particularmente útiles para la determinación de VEGF o anticuerpos anti-VEGF. En ensayos de sándwich secuenciales, se usa un anticuerpo anti-VEGF inmovilizado para adsorber el VEGF de la muestra de ensayo, la muestra de ensayo se retira por ejemplo por lavado, el VEGF unido se usa para adsorber un segundo anticuerpo anti-VEGF marcado y el material unido se separa a continuación del indicador residual. La cantidad de indicador unido es directamente proporcional al VEGF de la muestra de ensayo. En ensayos de sándwich "simultáneos", la muestra de ensayo no se separa antes de añadir el anti-VEGF marcado. Un ensayo de sándwich secuencial que usa un anticuerpo monoclonal anti-VEGF como un anticuerpo y un anticuerpo anti-VEGF policlonal como el otro es útil en las muestras de ensayo para VEGF.

30 Los anteriores son simplemente ensayos de detección a modo de ejemplo para VEGF. Otros métodos desarrollados ahora o a partir de ese momento que usan anticuerpos anti-VEGF para la determinación de VEGF se incluyen dentro del alcance de los mismos.

35 Se entiende que cualquiera de las realizaciones anteriores de diagnóstico o de detección se pueden llevar a cabo usando un inmunoconjugado de la invención en lugar de o además de un anticuerpo anti-VEGF.

#### **Artículos de fabricación**

40 En otro aspecto de la invención, se proporciona un artículo de fabricación que contiene materiales útiles para el tratamiento, prevención y/o diagnóstico de los trastornos descritos anteriormente. El artículo de fabricación comprende un envase y una etiqueta o prospecto en o asociado con el envase. Los envases adecuados incluyen, por ejemplo, frascos, viales, jeringas, etc. Los recipientes pueden estar formados por diversos materiales tales como vidrio o plástico. El envase contiene una composición que se presenta por sí misma o combinada con otra composición eficaz para tratar, prevenir y/o diagnosticar la afección y puede tener un puerto de acceso estéril (por ejemplo el envase puede ser una bolsa de solución intravenosa o un vial que tiene un tapón perforable por una aguja de inyección hipodérmica). Al menos un agente activo en la composición es un anticuerpo o inmunoconjugado de la invención. La etiqueta o prospecto indica que la composición se usa para tratar la afección de elección. Además, el artículo de fabricación puede comprender (a) un primer envase con una composición contenida en el mismo, en el que la composición comprende un anticuerpo o inmunoconjugado de la invención; y (b) un segundo envase con una composición contenida en el mismo, en el que la composición comprende un agente citotóxico o de otra manera terapéutico adicionales. En esta realización de la invención, el artículo de fabricación puede comprender adicionalmente un prospecto que indica que las composiciones se pueden usar para tratar una afección en particular. Como alternativa, o adicionalmente, el artículo de fabricación puede comprender adicionalmente un segundo (o tercer) envase que comprende un tampón farmacéuticamente aceptable, tal como agua bacteriostática para inyección (BWF), solución salina tamponada con fosfato, solución de Ringer y solución de dextrosa. Puede incluir adicionalmente otros materiales deseables desde un punto de vista comercial y del usuario, incluyendo otros tampones, diluyentes, filtros, agujas y jeringas.

60 Los siguientes ejemplos están destinados simplemente a ilustrar la práctica de la presente invención y no se proporcionan a modo de limitación.



**Ejemplos****Ejemplo 1**5 Generación y caracterización de anticuerpos anti-VEGF

Se construyeron librerías de anticuerpos de fago sintéticas en un único marco (anticuerpo anti-ErbB2 humanizado, 4D5) mediante la introducción de diversidad dentro de las regiones determinantes de la complementariedad (CDR) de cadenas pesadas y ligeras (Lee, C. V. *et al.* J Mol Biol 340, 1073-93 (2004)). En resumen, se construyeron librerías de anticuerpos sintéticos que presentan fagos en un único marco humano mediante la introducción de diversidad sintética en posiciones expuestas a disolvente dentro de las regiones determinantes de la complementariedad de cadena pesada (CDR). Para mejorar el rendimiento de la librería, se construyeron librerías de fragmento (Fab) de unión a antígeno monovalente y divalente, y se exploraron diferentes diversidades de CDR-H3 mediante la variación de la composición del aminoácido y la longitud de la CDR. A continuación, la librería se amplió mediante el aumento de la variabilidad de la longitud de CDR-H3 y el uso de codones adaptados que imitaban la composición de los aminoácidos de las secuencias de CDR-H3 naturales. El uso de estas librerías con las CDR completamente sintéticas presentadas en un solo andamio, se generaron anticuerpos de alta afinidad. Para detalles adicionales de estrategias y métodos para generar librerías de anticuerpos sintéticos con un solo molde, véase, por ejemplo, el documento de Patente WO 2005/012359 publicado el 10 de febrero de 2005.

Se realizó selección en fase de solución con librerías sin tratamiento previo frente a VEGF murino biotinilado en solución y a continuación se capturó con 5 ug/ml de neutravidina inmovilizada en inmunoplasmas MaxiSorp™. Después de tres rondas de selección con disminución de la concentración de VEGF murino biotinilado, los clones se seleccionaron al azar y se identificaron aglutinantes específicos usando ELISA de fagos. Para cada clon de fago positivo, se subclonaron regiones variables de las cadenas pesadas y ligeras en vectores de expresión de pRK que diseñaron mediante ingeniería para expresar cadenas de IgG de longitud completa. Se cotransfectaron constructos de cadena pesada y de cadena ligera en células 293 o CHO, y los anticuerpos expresados se purificaron a partir de medio libre de suero usando columna de afinidad por proteína A. Para la maduración de afinidad, se construyeron librerías de fagos con diferente combinación de lazos de CDR (CDR-H1 y H2, CDR-L1, L2 y L3) derivadas del clon inicial de interés mediante la estrategia de aleatoriedad suave de modo que cada posición seleccionada se mutó a un resto de tipo no silvestre o se mantuvo como de tipo silvestre a una frecuencia de aproximadamente 50:50 (Lee, C. V. *et al.*, Blood, 108: 3103-3111, 2006). A continuación se identificaron clones de alta afinidad a través de cuatro rondas de selección en fase de solución frente al VEGF humano biotinilado como se ha descrito. La disminución de la concentración de antígeno biotinilado permitió más rigurosidad en la selección.

**Ejemplo 2**Afinidades de unión de anticuerpos anti-VEGF

Para determinar las afinidades de unión de IgG anti-VEGF, se usó medida de resonancia de plasmones superficiales (SRP) con un instrumento BIAcore™-3000. Se activaron chips biosensores de dextrano carboximetilado (CM5, BIAcore Inc.) con clorhidrato de *N*-etil-*N*-(3-dimetilaminopropil)-carbodiimida (EDC) y *N*-hidroxisuccinimida (NHS) de acuerdo con las instrucciones del proveedor. Se inmovilizó VEGF humano o murino para conseguir aproximadamente 60 unidades de respuesta (RU) de proteína acoplada. Véase la Figura 10. Para medidas de cinética, se inyectaron diluciones en serie con un índice de dos de IgG anti-VEGF (de 7,8 nM a 500 nM) por separado en tampón PBT (PBS con un 0,05 % (v/v) de Tween 20) a 37 °C con un caudal de 25 µl/min. Las velocidades de asociación ( $k_{on}$ ) y velocidades de disociación ( $k_{off}$ ) se calcularon usando un modelo de unión bivalente (versión 3.2 del Software de Evaluación de BIAcore). La constante de disociación en equilibrio ( $K_D$ ) se calculó como la relación  $k_{off}/k_{on}$ .

Debido a la velocidad de disociación que no se puede medir de B20.4.1, se inmovilizaron IgG para conseguir aproximadamente 1000 unidades de respuesta (RU) de proteína acoplada. Véase la Figura 11. Se inyectaron diluciones en serie con un índice de dos de VEGF humano o murino (de 7,8 nM a 500 nM) en tampón PBT (PBS con un 0,05 % (v/v) de Tween 20) a 37 °C con un caudal de 25 µl/min. Las velocidades de asociación ( $k_{on}$ ) y velocidades de disociación ( $k_{off}$ ) se calcularon usando un modelo sencillo de unión de Langmuir uno a uno (versión 3.2 del Software de Evaluación de BIAcore) para obtener la constante de disociación en equilibrio ( $K_D$ ).

**Ejemplo 3**60 Ensayo de incorporación de timidina a HUVEC

Para estudiar la función de los anticuerpos anti-VEGF mediante la inhibición de la proliferación celular inducida por VEGF, se realizó ensayo de incorporación de timidina a HUVEC. Se cultivaron células endoteliales de la vena umbilical humana (HUVEC) (Clontech, Mountain View, CA) y se sometieron a ensayo como se ha descrito. Aproximadamente 3000 HUVEC se sembraron en cada pocillo de la placa de cultivo celular de 96 pocillos y se incubaron en medio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM)/medio F12 suplementado con un 1,5 % (v/v) de

suero bovino fetal (medio de ensayo) durante 18 horas. A continuación se añadió a las células medio de ensayo recién preparado con cantidades fijas de VEGF humano (concentración final 0,1 nM), determinadas titulando primero el VEGF que puede estimular la síntesis de ADN submáxima, y concentraciones crecientes de IgG anti-VEGF. Después de la incubación a 37 °C durante 18 horas, las células se pulsaron con 0,5 mCi/pocillo de [<sup>3</sup>H] timidina durante 24 horas y se recogieron para contar con un contador de Centelleo de Microplacas TopCount como se ha descrito.

El ensayo de incorporación de timidina a HUVEC muestra que variantes de B20 pueden inhibir de forma eficaz la proliferación de células HUVEC. La Figura 12 muestra que B20-4.1.1 y B20-4.1.1 RR tienen inhibición similar a la de G6-31.

#### **Ejemplo 4**

##### *Ensayo de proliferación de células endoteliales*

Para determinar la especificidad de unión y la actividad de bloqueo de B20-4.1.1, se realizó un ensayo basado en células usando células endoteliales microvasculares de retina bovina (BRME), en el que el anticuerpo se sometió a ensayo para determinar su capacidad para bloquear la proliferación celular inducida por VEGF humano o murino. Las BRME se sembraron a una densidad de 500 células/pocillo en placas de 96 pocillos en medio de crecimiento (DMEM bajo en glucosa suplementado con de suero de ternera al 10 %, glutamina 2 mM, y antibióticos). Para el ensayo de inhibición, se añadió B20-4.1.1 a la concentración indicada (ng/ml) a pocillos por triplicado (Figura 13). Después de 0,5 horas, se añadió VEGF-A humano (hVEGF) o VEGF-A de ratón (mVEGF) a una concentración final de 6 ng/ml. Después de seis a siete días, el crecimiento celular se determinó con azul Alamar (BioSource; Invitrogen). La fluorescencia se controló a 530 nm de longitud de onda de excitación y 590 nm de longitud de onda de emisión.

Como se muestra en la Figura 13, B20-4.1.1 reduce la capacidad tanto de hVEGF como de mVEGF para estimular la proliferación de BRME. Como se muestra en la Figura 16, el anticuerpo avastina reduce la capacidad de hVEGF para estimular la proliferación de BRME. El anticuerpo avastina no inhibió la proliferación inducida por mVEGF al igual que no se observó inhibición de mVEGF a una concentración de hasta 1500 nM del anticuerpo avastina.

#### **Ejemplo 5**

##### *Estudios de inhibición tumoral in vivo*

Se hicieron crecer células A549 (células de cáncer de pulmón humano) y células MDA-MB231 (células de cáncer de mama humano) en cultivo celular y se inyectaron por vía subcutánea en ratones atímicos de color beige de 8 a 12 semanas de edad a una densidad celular de  $\sim 5 \times 10^6$  células/ratón. Cuarenta y ocho horas después de la inoculación de células tumorales o cuando el tumor alcanzó un tamaño de aproximadamente 200 mm<sup>3</sup>, los ratones (n = 10) fueron inyectados por vía intraperitoneal con B20-4.1.1 a una concentración de 5 mg/kg o con tampón vehículo. Los anticuerpos se administraron dos veces por semana a partir de ese momento. Los volúmenes tumorales se midieron con calibradores en los puntos de tiempo indicados.

Como se muestra en las Figuras 14 y 15, B20-4.1.1 fue eficaz en la reducción de los volúmenes tumorales en ratones inyectados con células A549 (Figura 14) o células MDA-MB231 (Figura 15).

Aunque en la descripción anterior la invención se ilustra con referencia a ciertas realizaciones, no está tan limitada. De hecho, diversas modificaciones además de las mostradas y descritas en el presente documento serán evidentes para los expertos en la materia a partir de la descripción anterior y pueden entrar dentro del alcance de las reivindicaciones adjuntas.

## REIVINDICACIONES

1. Anticuerpo anti-factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) aislado en donde el anticuerpo comprende:
- 5 (1) una HVR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID N°:1;  
(2) una HVR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID N°:2;  
(3) una HVR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID N°:3  
(4) una HVR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID N°:4 o SEC ID N°: 5;  
10 (5) una HVR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID N°:6; y  
(6) una HVR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID N°:7.
2. El anticuerpo anti-VEGF aislado de la reivindicación 1, en el que el dominio variable de cadena ligera comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID N°: 44 o 45 y en el que el dominio variable de cadena pesada comprende opcionalmente la secuencia de aminoácidos de SEC ID N°: 43.
- 15 3. El anticuerpo de las reivindicaciones 1 o 2, en donde el anticuerpo es un anticuerpo monoclonal, y/o es humanizado o humano.
4. El anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en donde el anticuerpo comprende además una secuencia de marco y al menos una parte de la secuencia de marco es una secuencia de marco de consenso humana.
- 20 5. El anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones 1-4, que es un anticuerpo monoclonal de longitud completa.
- 25 6. El anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones 1-4, en donde el anticuerpo es biespecífico.
7. Polinucleótido que codifica el anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones 1-6.
- 30 8. Vector que comprende el polinucleótido de la reivindicación 7, en donde el vector es opcionalmente un vector de expresión.
9. Célula anfitriona que comprende el vector de la reivindicación 8.
- 35 10. La célula anfitriona de la reivindicación 9, en donde la célula anfitriona es procariota, eucariota o de mamífero.
11. Inmunoconjugado que comprende el anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones 1-6 conjugado con un agente, tal como un fármaco o un agente citotóxico.
- 40 12. Método para preparar el anticuerpo anti-VEGF de una cualquiera de las reivindicaciones 1-6 o el inmunoconjugado de la reivindicación 11, comprendiendo dicho método (a) expresar el vector de la reivindicación 8 en una célula anfitriona adecuada, y (b) recuperar el anticuerpo o inmunoconjugado.
- 45 13. El método de la reivindicación 12, en el que la célula anfitriona es procariota o eucariota.
14. Composición que comprende (i) el anticuerpo anti-VEGF de una cualquiera de las reivindicaciones 1-6 o (ii) el polinucleótido de la reivindicación 7, en donde la composición comprende además opcionalmente un vehículo.
- 50 15. El anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones 1-6, la composición de la reivindicación 14 o el inmunoconjugado de la reivindicación 11 para su uso en un método terapéutico.
16. El anticuerpo, la composición o el inmunoconjugado para el uso de acuerdo con la reivindicación 15, en donde el anticuerpo, la composición o el inmunoconjugado son para uso en un método para el tratamiento de un tumor, un cáncer o un trastorno proliferativo celular, y/o para inhibir angiogénesis o permeabilidad vascular, en donde dicho método de tratamiento comprende administrar dichos anticuerpo composición o inmunoconjugado a un sujeto que lo necesita.
- 55 17. El anticuerpo, la composición o el inmunoconjugado para el uso de acuerdo con la reivindicación 16, en el que el tumor, el cáncer o el trastorno proliferativo celular son cáncer de colon, cáncer de pulmón, cáncer de mama, glioblastoma o cáncer de células renales.
- 60

| Clon #      | H1 |    |    |    |    |    |    |    |              |
|-------------|----|----|----|----|----|----|----|----|--------------|
|             | 28 | 29 | 30 | 31 | 32 | 33 | 34 | 35 |              |
| B20-4.1.1   | S  | I  | S  | G  | S  | W  | I  | F  | SEC ID N°: 1 |
| B20-4.1.1RR | S  | I  | S  | G  | S  | W  | I  | F  |              |

| Clon #      | H2 |    |    |    |     |    |    |    |    |    |    |              |
|-------------|----|----|----|----|-----|----|----|----|----|----|----|--------------|
|             | 49 | 50 | 51 | 52 | 52a | 53 | 54 | 55 | 56 | 57 | 58 |              |
| B20-4.1.1   | G  | A  | I  | W  | P   | P  | G  | G  | Y  | T  | H  | SEC ID N°: 2 |
| B20-4.1.1RR | G  | A  | I  | W  | P   | P  | G  | G  | Y  | T  | H  |              |

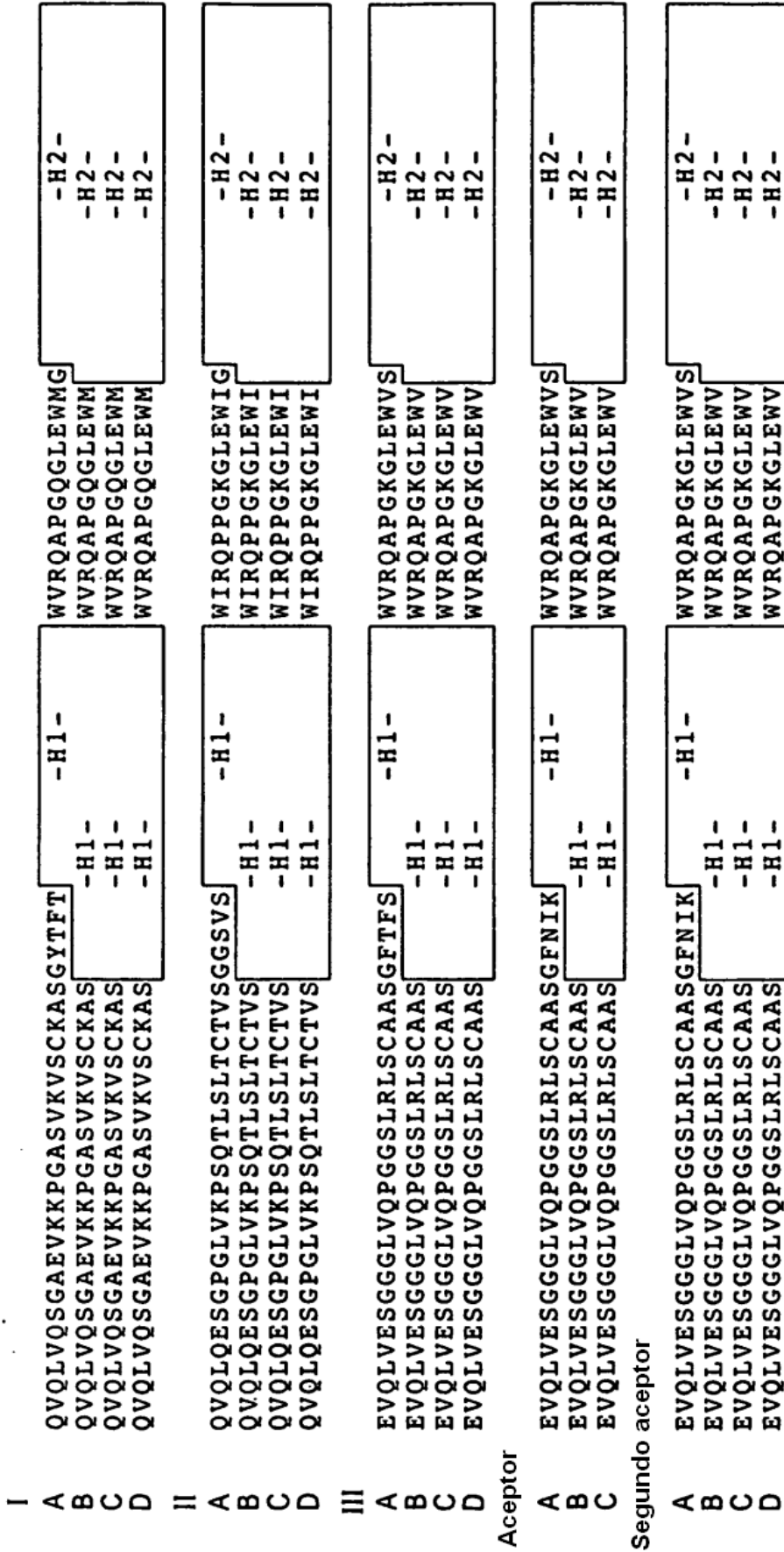
| Clon #      | H3 |    |    |    |    |    |     |   |   |   |   |     |     |              |
|-------------|----|----|----|----|----|----|-----|---|---|---|---|-----|-----|--------------|
|             | 94 | 95 | 96 | 97 | 98 | 99 | 100 | a | b | c | d | 101 | 102 |              |
| B20-4.1.1   | R  | W  | G  | H  | S  | T  | S   | P | W | A | M | D   | Y   | SEC ID N°: 3 |
| B20-4.1.1RR | R  | W  | G  | H  | S  | T  | S   | P | W | A | M | D   | Y   |              |

| Clon #      | L1 |    |    |    |    |    |              |
|-------------|----|----|----|----|----|----|--------------|
|             | 28 | 29 | 30 | 31 | 32 | 33 |              |
| B20-4.1.1   | G  | V  | R  | T  | S  | L  | SEC ID N°: 4 |
| B20-4.1.1RR | A  | I  | R  | R  | S  | L  |              |

| Clon #      | L2 |    |    |    |    |    |              |
|-------------|----|----|----|----|----|----|--------------|
|             | 50 | 51 | 52 | 53 | 54 | 55 |              |
| B20-4.1.1   | D  | A  | S  | S  | L  | A  | SEC ID N°: 6 |
| B20-4.1.1RR | D  | A  | S  | S  | L  | A  |              |

| Clon #      | L3 |    |    |    |    |    |              |
|-------------|----|----|----|----|----|----|--------------|
|             | 91 | 92 | 93 | 94 | 95 | 96 |              |
| B20-4.1.1   | S  | Y  | K  | S  | P  | L  | SEC ID N°: 7 |
| B20-4.1.1RR | S  | Y  | K  | S  | P  | L  |              |

**FIG. 1**



**FIG. 2A**

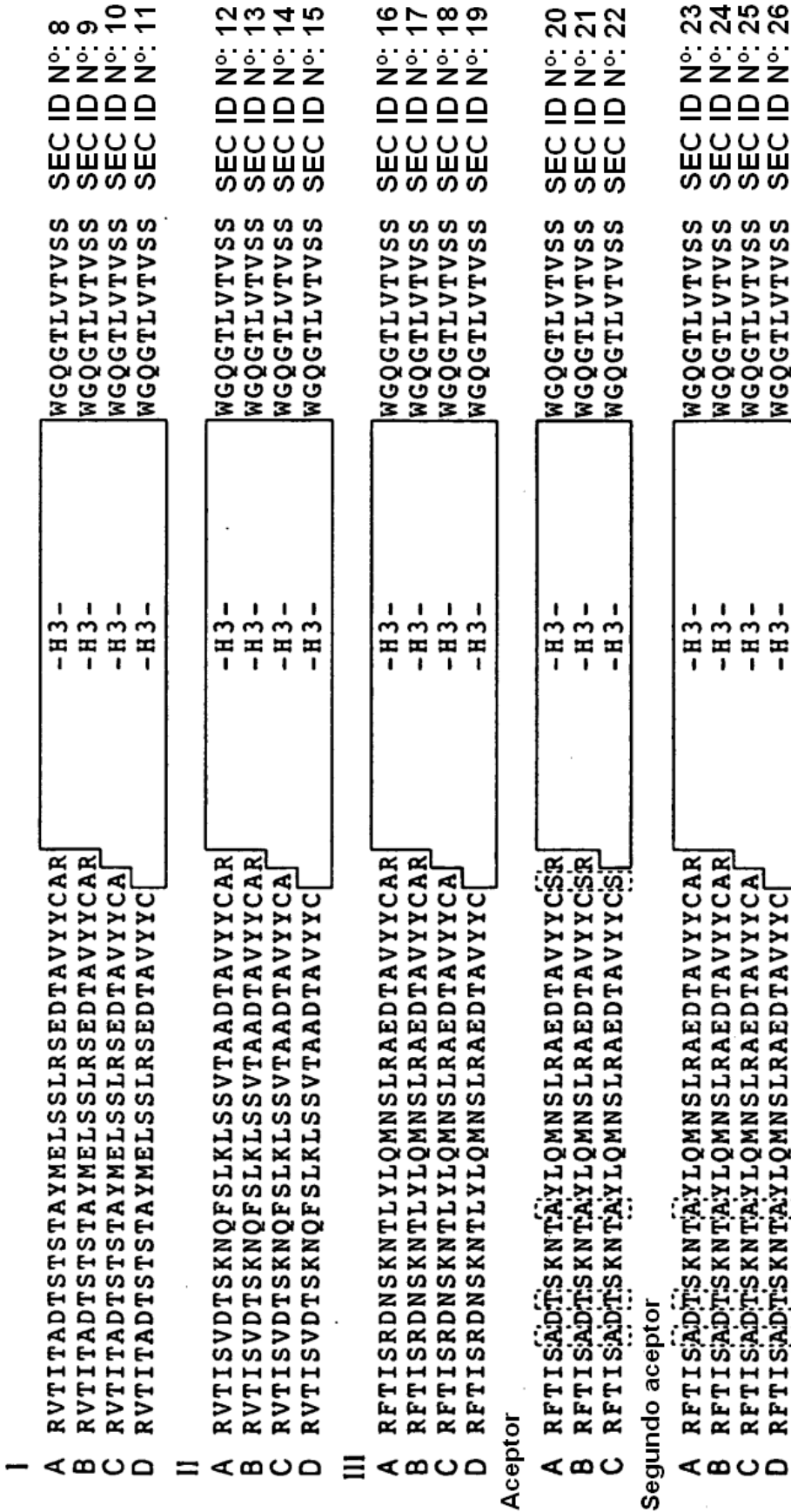
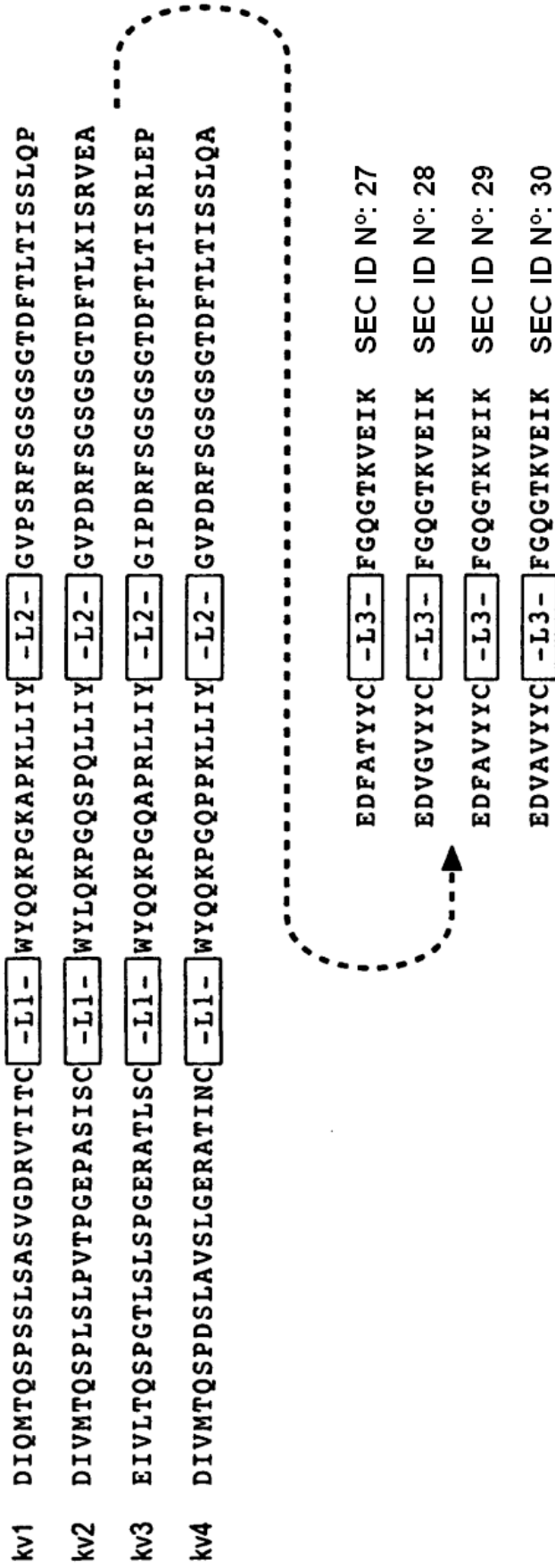


FIG. 2B



**FIG. 3**

Secuencias de marco de la cadena pesada de huMAb4D5-8

- HC-FR1 <sup>1</sup>Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser<sup>25</sup> (SEC ID N°: 31)
- HC-FR2 <sup>36</sup>Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val<sup>48</sup> (SEC ID N°: 32)
- HC-FR3 <sup>66</sup>Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser Lys Asn Thr Ala Tyr Leu Gln Met Asn<sup>82a</sup> Ser<sup>82b</sup> Leu<sup>82c</sup> Arg<sup>83</sup> Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys<sup>92</sup> (SEC ID N°: 33)
- HC-FR4 <sup>103</sup>Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser<sup>113</sup> (SEC ID N°: 34)

Secuencias de marco de la cadena ligera de huMAb4D5-8

- LC-FR1 <sup>1</sup>Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys<sup>23</sup> (SEC ID N°: 35)
- LC-FR2 <sup>35</sup>Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr<sup>49</sup> (SEC ID N°: 36)
- LC-FR3 <sup>57</sup>Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Arg Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys<sup>88</sup> (SEC ID N°: 37)
- LC-FR4 <sup>98</sup>Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys<sup>107</sup> (SEC ID N°: 38)

**FIG. 4**

Secuencias de marco de la cadena pesada de huMAb4D5-8 modificada en las posiciones 71, 73 y 78 (subrayadas)

- HC-FR1 <sup>1</sup>Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser<sup>25</sup> (SEC ID N°: 31)
- HC-FR2 <sup>36</sup>Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val<sup>48</sup> (SEC ID N°: 32)
- HC-FR3 <sup>66</sup>Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn<sup>82a</sup> Ser<sup>82b</sup> Leu<sup>82c</sup> Arg<sup>83</sup> Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys<sup>92</sup> (SEC ID N°: 42)
- HC-FR4 <sup>103</sup>Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser<sup>113</sup> (SEC ID N°: 34)

Secuencias de marco de la cadena ligera de huMAb4D5-8 modificada en la posición 66 (subrayada)

- LC-FR1 <sup>1</sup>Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys<sup>23</sup> (SEC ID N°: 35)
- LC-FR2 <sup>35</sup>Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr<sup>49</sup> (SEC ID N°: 36)
- LC-FR3 <sup>57</sup>Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys<sup>88</sup> (SEC ID N°: 41)
- LC-FR4 <sup>98</sup>Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys<sup>107</sup> (SEC ID N°: 38)

**FIG. 5**



|               | CDR-L1 |    |    |    |    | CDR-L2 |    |    |    |    | CDR-L3 |    |    |    |    |    |    |    |
|---------------|--------|----|----|----|----|--------|----|----|----|----|--------|----|----|----|----|----|----|----|
| N° Kabat      | 28     | 29 | 30 | 31 | 32 | 33     | 50 | 51 | 52 | 53 | 54     | 55 | 91 | 92 | 93 | 94 | 95 | 96 |
| B20-4.1.1     | G      | V  | R  | T  | S  | L      | D  | A  | S  | S  | L      | A  | S  | Y  | K  | S  | P  | L  |
| B20-4.1.1.IRR | A      | I  | R  | R  | S  | L      | D  | A  | S  | S  | L      | A  | S  | Y  | K  | S  | P  | L  |

**FIG. 6**

|               | CDR-H1 |    |    |    |    | CDR-H2 |    |    |    |    | CDR-H3 |    |     |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |     |   |   |   |   |     |     |
|---------------|--------|----|----|----|----|--------|----|----|----|----|--------|----|-----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|-----|---|---|---|---|-----|-----|
| N° Kabat      | 28     | 29 | 30 | 31 | 32 | 33     | 34 | 35 | 49 | 50 | 51     | 52 | 52a | 53 | 54 | 55 | 56 | 57 | 58 | 94 | 95 | 96 | 97 | 98 | 99 | 100 | a | b | c | d | 101 | 102 |
| B20-4.1.1     | S      | I  | S  | G  | S  | W      | I  | F  | G  | A  | I      | W  | P   | F  | G  | G  | Y  | T  | H  | R  | W  | G  | H  | S  | T  | S   | P | W | A | M | D   | Y   |
| B20-4.1.1.IRR | S      | I  | S  | G  | S  | W      | I  | F  | G  | A  | I      | W  | P   | F  | G  | G  | Y  | T  | H  | R  | W  | G  | H  | S  | T  | S   | P | W | A | M | D   | Y   |

**FIG. 7**

Cadena ligera de anti-VEGF

N° Kabat 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21 22 23 24 25 26 27 A B C D E F 28 29 30 31 32 33 34 35 36 37

|                  |
|------------------|
| Kabat - CDR L1   |
| Chothia - CDR L1 |
| Contact - CDR L1 |

B20.4.1.1 D I Q H T Q S P S S L S A S V G D R V T I T C R A S Q G V R T S L A W Y Q  
 B20.4.1.1RR D I Q H T Q S P S S L S A S V G D R V T I T C R A S Q A I R R S L A W Y Q

N° Kabat 38 39 40 41 42 43 44 45 46 47 48 49 50 51 52 53 54 55 56 57 58 59 60 61 62 63 64 65 66 67 68 69 70 71 72 73 74 75 76 77 78 79 80

|                  |
|------------------|
| Kabat - CDR L2   |
| Chothia - CDR L2 |
| Contact - CDR L2 |

B20.4.1.1 Q K P G K A P K L L I Y D A S S L A S G V P S R F S G S G T D F T L T I S S L Q P  
 B20.4.1.1RR Q K P G K A P K L L I Y D A S S L A S G V P S R F S G S G T D F T L T I S S L Q P

N° Kabat 81 82 83 84 85 86 87 88 89 90 91 92 93 94 95 96 97 98 99 100 101 102 103 104 105 106 107 108

|                  |
|------------------|
| Kabat - CDR L3   |
| Chothia - CDR L3 |
| Contact - CDR L3 |

B20.4.1.1 E D F A T Y Y C Q Q S Y K S P L T F G Q G T K V E I K R  
 B20.4.1.1RR E D F A T Y Y C Q Q S Y K S P L T F G Q G T K V E I K R

FIG. 8

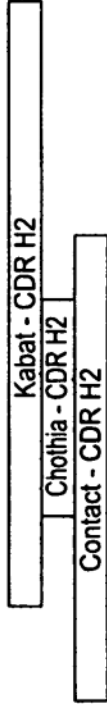
Cadena pesada de anti-VEGF

N° Kabat 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21 22 23 24 25 26 27 28 29 30 31 32 33 34 35 A 36 37 38 39 40 41



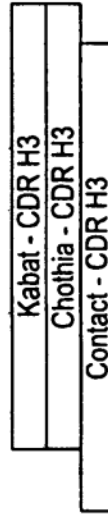
B20.4.1.1 E V Q L V E S G G L V Q P G G S L R L S C A A S G F S I S G S W I F W V R Q A P  
 B20.4.1.1RR E V Q L V E S G G L V Q P G G S L R L S C A A S G F S I S G S W I F W V R Q A P

N° Kabat 42 43 44 45 46 47 48 49 50 51 52 52 52 52 53 54 55 56 57 58 59 60 61 62 63 64 65 66 67 68 69 70 71 72 73 74 75 76 77 78 79



B20.4.1.1 G K G L E W V G A I W P F G G Y T H Y A D S V K G R R F T I S A D T S K N T A Y  
 B20.4.1.1RR G K G L E W V G A I W P F G G Y T H Y A D S V K G R R F T I S A D T S K N T A Y

N° Kabat 80 81 82 A B C 83 84 85 86 87 88 89 90 91 92 93 94 95 96 97 98 99 100 A B C D K 101 102 103 104 105 106 107 108 109 110 111 112 113



B20.4.1.1 L Q H N S L R A E D T A V Y Y C A R R W G H S T S P W A M D Y W G Q G T L V T V S S  
 B20.4.1.1RR L Q H N S L R A E D T A V Y Y C A R R W G H S T S P W A M D Y W G Q G T L V T V S S

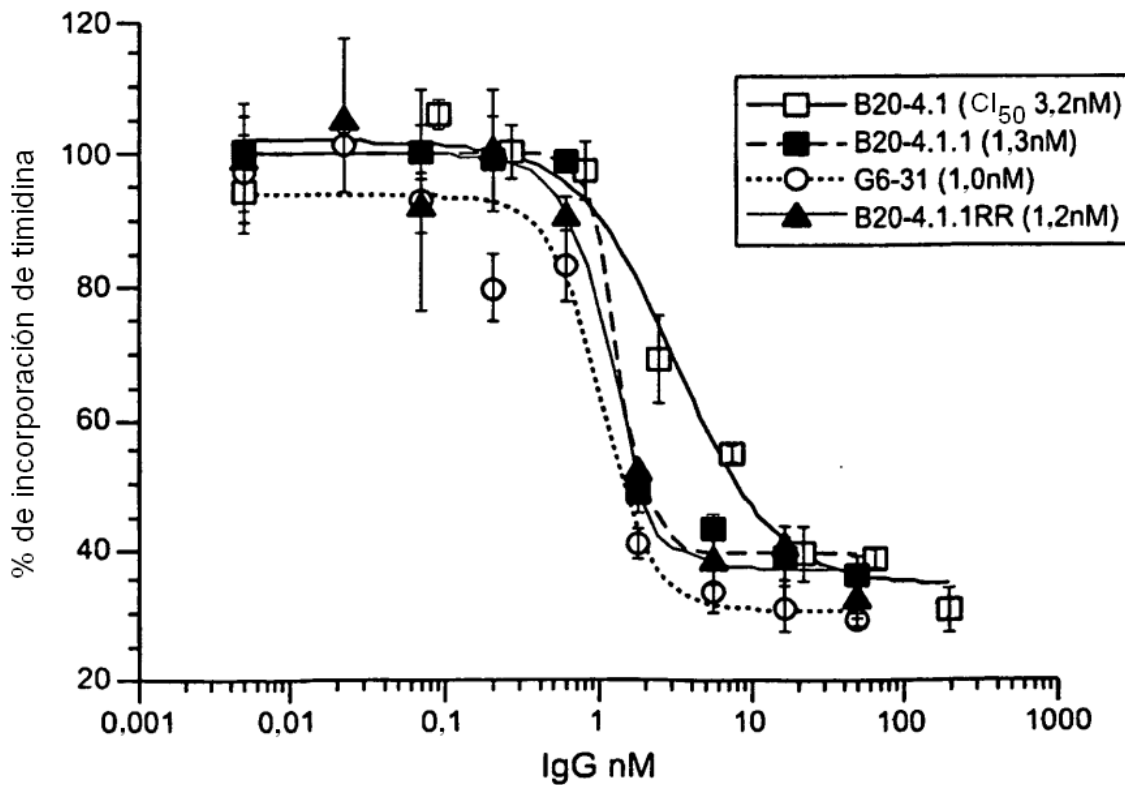
FIG. 9

| 37C<br>IgG  | $k_{on}(x10^4)M^{-1}s^{-1}$ |       | $k_{off}(x10^{-4})s^{-1}$ |       | $Kd(k_{off} / k_{on})nM$ |       |
|-------------|-----------------------------|-------|---------------------------|-------|--------------------------|-------|
|             | hVEGF                       | mVEGF | hVEGF                     | mVEGF | hVEGF                    | mVEGF |
| B20.4.1     | 0,74                        | 0,64  | 0,002                     | 0,024 | 0,02                     | 0,37  |
| B20.4.1.1   | 7,1                         | 5,59  | 5,94                      | 5,66  | 8,34                     | 10,13 |
| B20.4.1.1RR | 19,4                        | 13,9  | 6,23                      | 7,27  | 3,21                     | 5,23  |

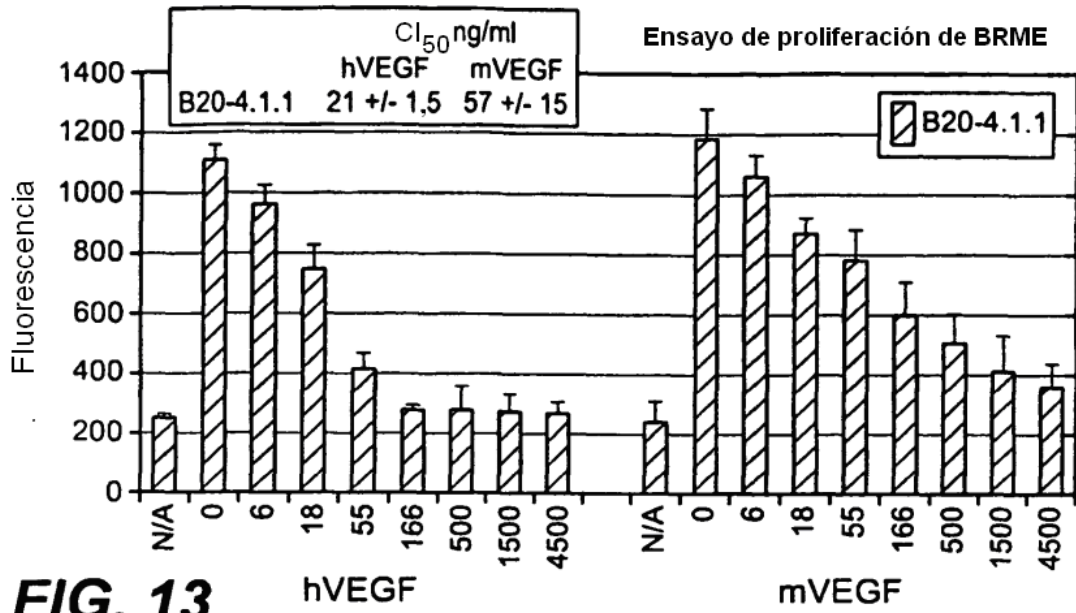
**FIG. 10**

| 37C<br>IgG  | $k_{on}(x10^4)M^{-1}s^{-1}$ |       | $k_{off}(x10^{-4})s^{-1}$ |       | $Kd(k_{off} / k_{on})nM$ |       |
|-------------|-----------------------------|-------|---------------------------|-------|--------------------------|-------|
|             | hVEGF                       | mVEGF | hVEGF                     | mVEGF | hVEGF                    | mVEGF |
| B20.4.1     | 19,2                        | 31,9  | 2,23                      | 7,2   | 1,16                     | 2,26  |
| B20.4.1.1   | 57,1                        | 33,1  | 9,68                      | 7,91  | 1,70                     | 2,39  |
| B20.4.1.1RR | 65,1                        | 44,6  | 5,53                      | 6,07  | 0,85                     | 1,36  |

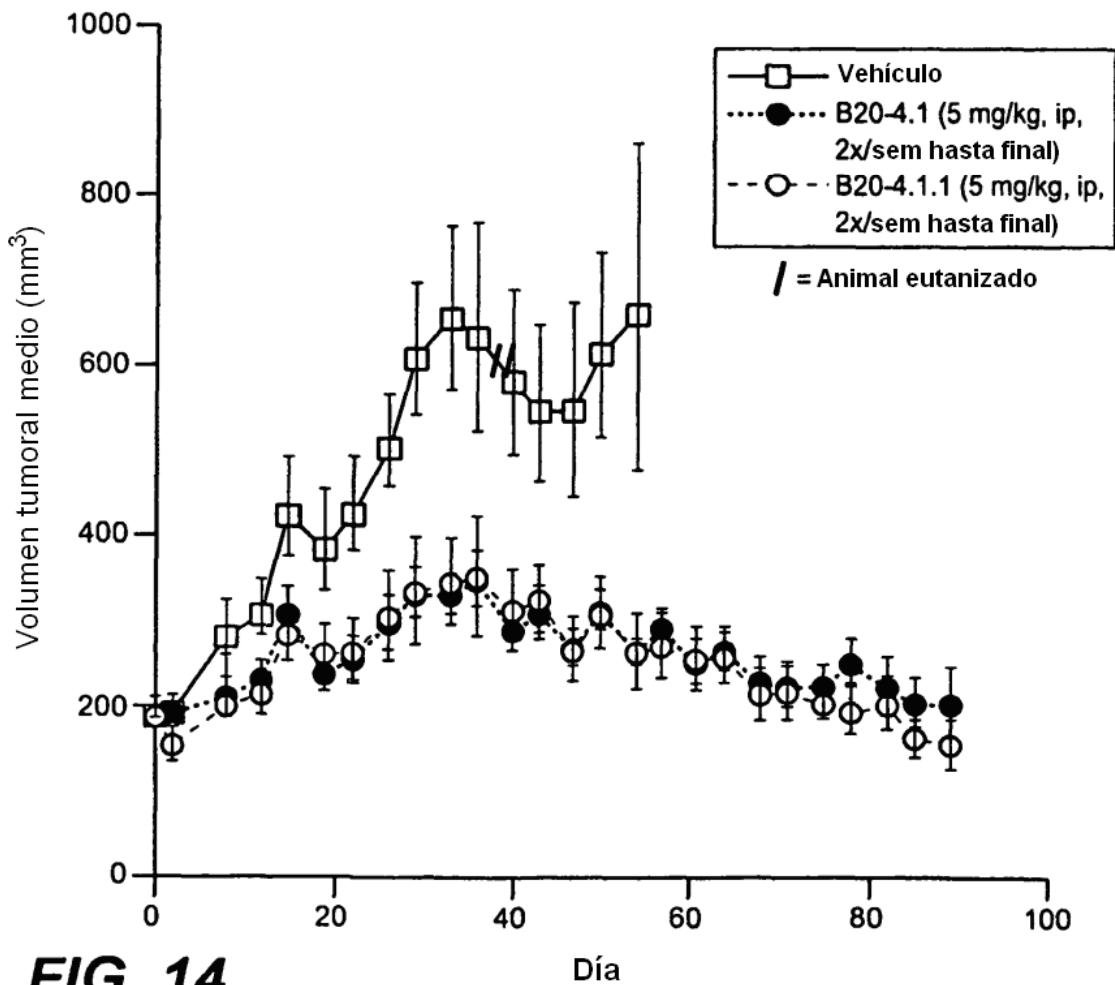
**FIG. 11**



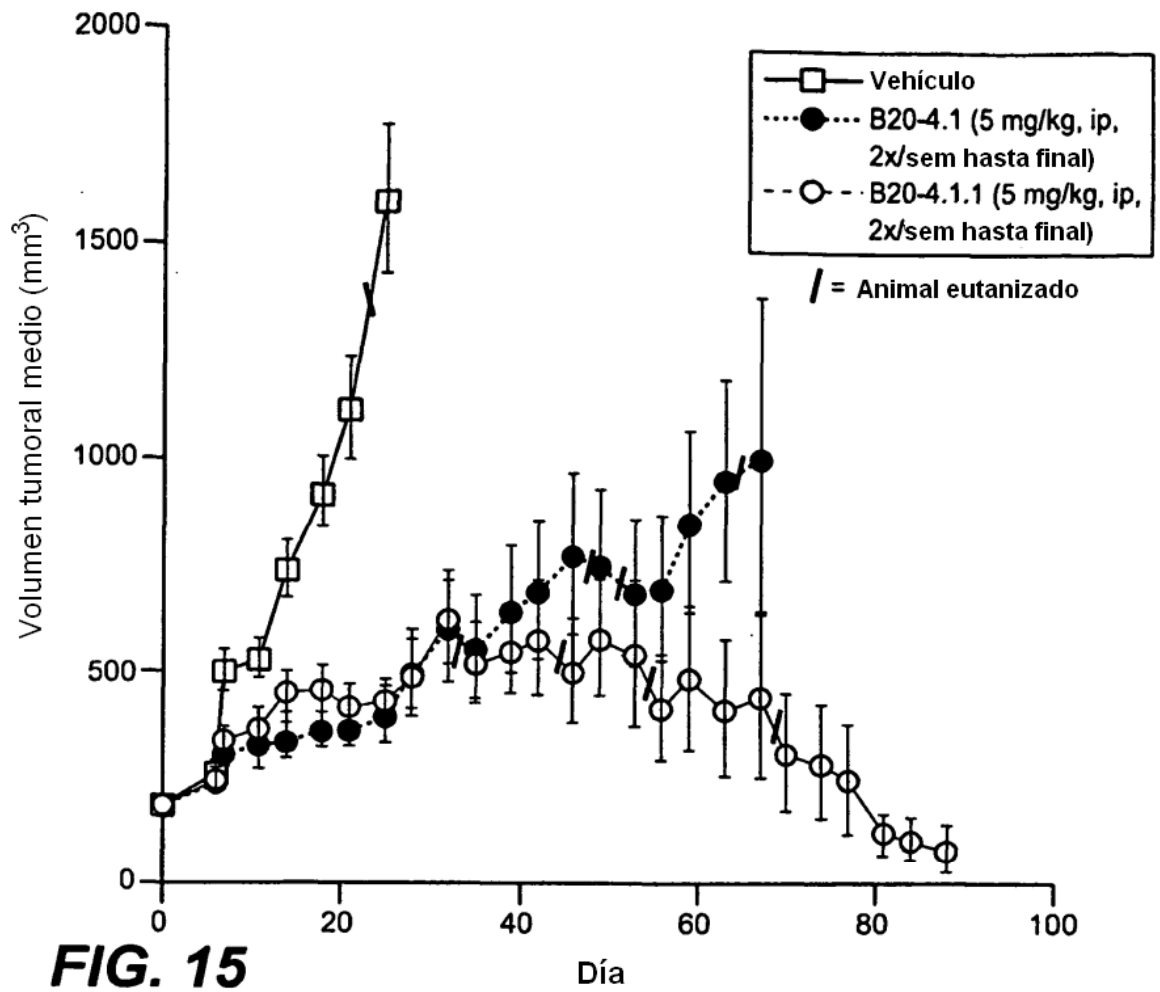
**FIG. 12**



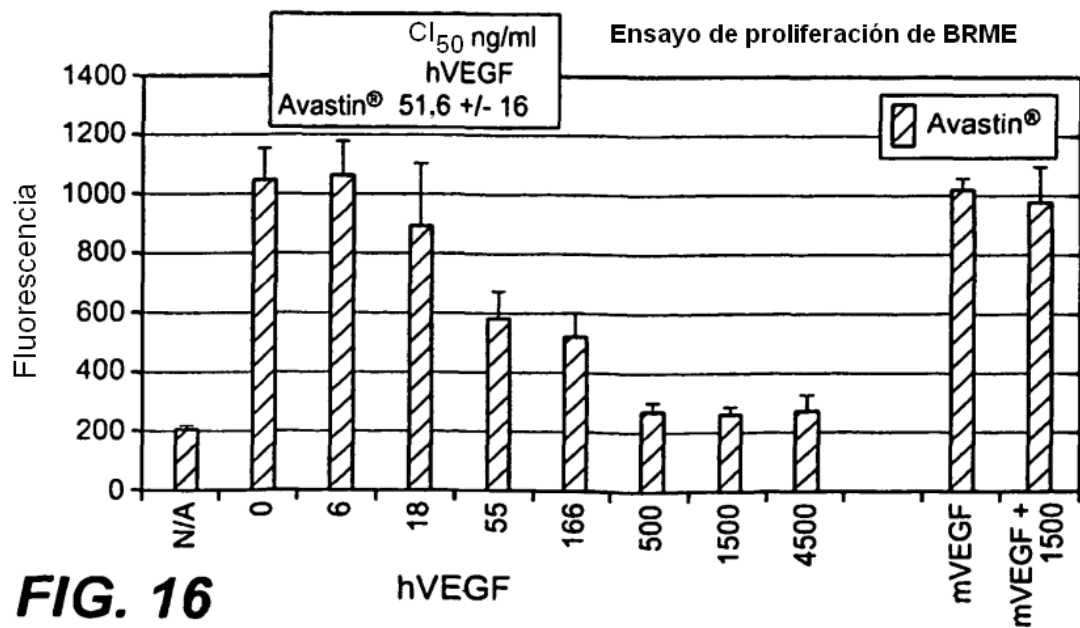
**FIG. 13**



**FIG. 14**



**FIG. 15**



**FIG. 16**